UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SST

Unité Inserm 618, équipe 2 Vecteurs, Virus et Vaccins

THÈSE présentée par :

Nicolas COMBELAS

soutenue le : **18 octobre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais, Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / ICMV

Induction d'une immunité cross-neutralisante contre les papillomavirus humains à haut risque

THÈSE dirigée par :

Mr TOUZÉ Antoine	Professeur, université François – Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme MOUGIN Christiane	Professeur, université de Franche-Comté, Besançon
Mr DELMAS Bernard	Directeur de Recherche INRA, INRA de Jouy-en-Josas

---

JURY :

Mme JACOBS Nathalie	Chercheur FNRS, université de Liège
Mr COURSAGET Pierre	Directeur de Recherche Inserm, université François–Rabelais, Tours
Mr TOUZÉ Antoine	Professeur, université François – Rabelais, Tours
Mr ROINGEARD Philippe	Professeur, université François – Rabelais, Tours
Mme MOUGIN Christiane	Professeur, université de Franche-Comté, Besançon
Mr DELMAS Bernard	Directeur de Recherche INRA, INRA de Jouy-en-Josas

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Docteur Pierre Coursaget pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire « Vecteurs, Virus et Vaccins » à la faculté des Sciences Pharmaceutiques de Tours, Unité INSERM 618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires ». Ses conseils avisés, ses connaissances et le partage de son expérience ont rendu ces années de thèse enrichissantes.

Je remercie vivement Antoine Touzé, « le Grand Jeune Homme Elégant » pour avoir dirigé mon travail, pour sa sympathie, sa confiance, son enthousiasme et pour m'avoir initié à l'enseignement, au ski nautique, et à la pause d'ardoises.

Je tiens ensuite à témoigner ma reconnaissance à Madame le Professeur Christiane Mougin et à Monsieur le Docteur Bernard Delmas, pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et d'avoir consacré leur temps à l'analyse et à la critique de ce travail.

Je tiens également à remercier sincèrement Monsieur le Professeur Philippe Roingeard pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je remercie Madame le Docteur Nathalie Jacobs et Monsieur le Docteur Pierre Coursaget d'avoir accepté d'être membre du jury de ma thèse, qu'ils soient assurés ici de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier le personnel du Laboratoire de Microscopie Electronique de la faculté de Médecine de TOURS, et plus particulièrement Pierre-Yves Sizaret et Julien Gaillard pour leurs conseils, leur très grande disponibilité et leur sympathie.

Je remercie également la ligue contre le cancer pour avoir financé en partie mon travail de thèse.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du laboratoire, Maxime Fleury, Valérie Leblond (Valoche), Françoise Arnold (Fanfan), Audrey Carpentier (Dr Dré), Camille Berthauld (Kam's) et Nathalie Riche pour leur sympathie, leur humour et leur bonne humeur qui ont rendu ces 3 années très agréables.

Un remerciement tout particulier à mes anciens « padawan », Maxime Bouabdelli, Emilie Saussereau « Sauss72 », Stéphane Frémont « Baygon vert », Jémone Nicol « Sam », pour leur sympathie, leur amitié et pour m'avoir accompagné dans ce travail de Thèse. Bonne quête du précieux Sam !!!!!

Mes remerciements vont également à mes collègues de promo mais néanmoins amis Aymeric Fauvin, Grégory Douard et Damien Coupeau pour leur soutient, leur sympathie, les soirées détentes…. Courage c'est bientôt votre tour.

Je remercie également l'ensemble de mes amis du 87 pour leur amitié et leur soutien depuis de nombreuses années.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à ma famille et plus particulièrement à ma mère et ma petite sœur, pour m'avoir soutenu et accepter mes choix durant toutes ces années.

Enfin un remerciement tout particulier à toi, Hélène, les grandes effluves n'ont pas leur place ici, alors simplement merci pour être à mes côtés, pour ton soutient moral et affectif, pour ta compréhension et ta grande patience surtout dans les dernières semaines. Maintenant que je vais avoir un peu plus de temps, promis je range l'appart.

Résumé

Les papillomavirus à « haut risque » (HR) sont les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus. Les vaccins prophylactiques actuels assurent une protection contre les lésions induites par les génotypes 16 et 18, responsables de 70% de ces cancers. Les lésions induites par les treize autres HPV HR responsables de 30% des cancers ne sont potentiellement pas prévenues par ces vaccins.

Les objectifs de ma thèse ont été d'évaluer la capacité du vaccin quadrivalent anti-HPV et des vaccins de seconde génération à induire une immunité cross-neutralisante contre les HPV HR.

Tout d'abord, la capacité du vaccin quadrivalent anti-HPV à induire des anticorps neutralisant les HPV 31 et 58 a été analysée. L'induction d'anticorps neutralisant les HPV 31 et 58 a été mise en évidence, 1 mois après la dernière injection, chez 33% et 24% des femmes vaccinées, respectivement. Les pseudovirions (PsV) de l'HPV 58 produits en système cellulaire et utilisés pour cette étude présentent une capacité de transduction des cellules COS-7 10 fois supérieure à celle des PsV 31 et représente un vecteur de choix pour des applications en immunisation génique.

La deuxième partie de ma thèse s'est orientée sur le développement et l'analyse de la réponse immune induite par des vaccins de seconde génération basés sur la protéine L2. L'utilisation de la protéine L2, capable d'induire des anticorps cross-neutralisants, est un candidat de choix pour développer un vaccin protégeant contre l'ensemble des papillomavirus HR.

Afin d'augmenter la réponse anti-L2, trois systèmes reposant sur l'interaction streptavidine/biotine ont été évalués pour exposer la protéine L2 à de multiples copies à la surface de VLP.

Enfin, une stratégie reposant sur l'immunisation avec des PsV, composés des protéines L1 et L2 de l'HPV 58 contenant le gène de la protéine L2 de l'HPV 31, a également été évaluée.

Les résultats obtenus indiquent que les PsV58-31L2 représentent la meilleur formulation de la protéine L2 et permet d'induire des anticorps neutralisants les HPV 16, 31,58 et surtout l'HPV 18, phylogénétiquement éloigné des valences vaccinales.

Mots clés : HPV, pseudovirions, L2, neutralisation croisée, streptavidine/biotine, immunisation

Résumé en anglais

High risk human papillomaviruses (HR HPV) are the etiologic agents of cervical cancer. Current prophylactic HPV vaccines have been shown to protect against natural infection and against the development of high-grade lesions associated with HPV 16 and 18, both responsible of 70% of cervical cancer. However, these vaccines have not the potential to protect against all the thirteen other HR HPV.

The aims of my PhD thesis were to evaluate the quadrivalent anti HPV vaccine and second generation vaccine capacity to induce cross-neutralizing antibodies against HR HPV.

First, we have investigated the neutralizing antibodies against HPV 58 and HPV 31 after immunization in a population of 65 vaccinated HPV 31 and HPV 58 DNA-negative Colombian women. The results have shown that 33% and 24% of the immunized women exhibited cross neutralizing antibodies against HPV 31 and HPV 58 one month after vaccination, respectively. HPV 58 pseudovirions generated in a cellular system and used in this study exhibit a 10 fold higher capacity to transduce COS-7 cells than those of the HPV 31 PsV and thus represent an interesting candidate for DNA immunization application.

The second and third parts of my work were to develop and analyze the immune response induced by second generation vaccine based on L2 protein. In fact, because L2 protein is able to induce cross-neutralizing antibodies, it represents a good alternative in order to develop broad-spectrum HPV vaccine.

In order to enhance the anti-L2 immune response, three systems based on the streptavidin/biotin interaction have been evaluated in order to decorate HPV 16 VLPs with multiple L2 protein.

Finally, we have produced HPV58 pseudovirions encoding the HPV31 L2 protein. Results obtained indicated that cross-neutralizing antibodies against HPV 16, 31, 58 and a more distant type HPV 18 are only obtained after immunization with pseudovirions encoding the L2 protein.

Key words: HPV, pseudovirions, L2, cross-neutralization, streptavidine/biotine, immunization

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 5
Résumé en anglais 6
Table des matières 7
Introduction 9
1. Les Papillomavirus 11
2. Les protéines virales des papillomavirus 12
3. Structure et antigénicité de la capside des Papillomavirus 19
4. Les pseudoparticules virales comme vecteur de gène 22
4.1.2 Formation de PsV à l'aide de virus de la forêt de Semliki 23
5. Mécanisme d'entrée des papillomavirus et cycle viral des HPV 28
6. PAPILLOMAVIRUS ET CANCER DU COL DE L'UTÉRUS 33
7. Antigénicité des protéines de capside de papillomavirus 38
8. Vaccins prophylactiques anti-papillomavirus 42
9. Développement de vaccins de seconde génération 49
Objectifs 54
Matériels et Méthodes 57
1. Clonage moléculaire 58
2. Expression des protéines dans le système d'expression Baculovirus/Cellules d'insecte 61
3. Techniques d'analyses des protéines recombinantes 65
4. Production de PsV en cellules de mammifère et par la technique de dissociation-réassociation 69
5. Test de transfert de gènes des PsV en cellules de mammifère COS-7 71
6. Détection d'anticorps neutralisants 72
7. Immunisation de souris 73
8. Analyses statistiques 73
Résultats 74
A. Détection d'anticorps cross-neutralisants induits par le vaccin quadrivalent anti-HPV 75
1. Développement des tests de neutralisation 75
B. Modification des pseudoparticules virales de papillomavirus afin d'exposer à leur surface la protéine mineure de capside L2 80

B.1 Réalisation de capside chimérique de papillomavirus à l'aide du système d'exposition StrepTagII/Streptactine 80
1. Construction et clonage du gène L1 16h-Streptag II 81
2. Expression de la protéine L1STII en système baculovirus/cellules d'insecte 82
3. Expression de la protéine de fusion L2-Streptactine 83
4. Constructions des protéines de fusion L213-78-SA, L213-200-SA et L217-36-SA 84
5. Expression de la protéine de fusion HPV 16 L2-Streptactine en système baculovirus/cellules d'insecte 86
6. Expression des protéines L213-78-SA, L213-200-SA et L217-36-SA 87
7. Assemblage des VLP L1STII avec la protéine de fusion L2SA 88
B.2 Réalisation de capside chimérique de papillomavirus et du virus de l'hépatite B : utilisation d'un système de biotinylation endogène 89
1. Construction des gènes L1 16h-BAP-DE, L1 16h-BAP-HI et HBc-BAP 89
2. Expression des protéines L1-BAP et HBc-BAP en système baculovirus/cellules d'insecte 92
3. Assemblage des structures HBc-BAP avec les protéines de fusion L2-SA 93
B.3 Réalisation de capside chimérique de papillomavirus par biotinylation chimique 94
1. Formation des complexes VLP-L2SA 94
C. Analyse de la réponse cross-neutralisante obtenue par immunisation avec différentes formulations de la protéine L2 96
1. PsV vectorisant le gène de la protéine L2 96
2. Immunisation de souris Balb/c et analyse de la réponse immune 97
Discussion 100
A. Développement des tests de neutralisation des HPV HR et recherche des anticorps cross-neutralisants chez des femmes Colombiennes vaccinées avec le vaccin quadrivalent 102
B. Réalisation de capsides chimériques de papillomavirus afin d'exposer à leur surface la protéine mineure de capside L2 104
C. Analyse de la réponse cross-neutralisante à partir de différentes formulations de la protéine L2 110
Bibliographie 115
Figures 134
Résumé 194
Résumé en anglais 195

Introduction

Quinze types de papillomavirus humains (HPV) génitaux à « haut risque » (HR) sont responsables du développement du cancer du col de l'utérus, deuxième cancer en terme de mortalité chez la femme dans le monde (Munoz *et al.*, 2003). L'utilisation de méthodes sensibles de détection des HPV ont permis de mettre en évidence la présence de ces génotypes HR dans 99,7% des cancers du col de l'utérus (Walboomers *et al.*, 1999), parmi lesquels les types 16 et 18 sont retrouvés dans 70% des tumeurs (Munoz *et al.*, 2003). Récemment, deux vaccins prophylactiques, contenant les antigènes vaccinaux de ces deux principaux types d'HPV, ont été développés et commercialisés par Merck et GlaxoSmithKline. La stratégie vaccinale repose sur l'utilisation de la protéine majeure de capside L1 auto-assemblée en pseudoparticules virales (ou *Virus-like Particles*, VLP) (Kirnbauer *et al.*, 1992). Le vaccin commercialisé par Merck est un vaccin quadrivalent contenant les VLP des HPV 16 et 18 ainsi que les types 6 et 11, papillomavirus à « bas risque » (BR), responsables des verrues génitales. Le vaccin commercialisé par GSK est un vaccin bivalent qui ne cible que les HPV HR 16 et 18. Ces vaccins induisent de forts titres d'anticorps neutralisants qui permettent d'obtenir une protection supérieure à 95% contre les lésions associées aux types 16 et 18 (Harper *et al.*, 2006; Joura *et al.*, 2007; Paavonen *et al.*, 2007; Paavonen *et al.*, 2009). Toutefois, 30% des cancers du col de l'utérus sont dus aux treize autres types d'HPV et ne sont donc pas prévenus par ces vaccins. Une des solutions consisterait à inclure les VLP de tous les types d'HPV HR afin d'obtenir une protection proche de 100% mais le rapport coût/bénéfice d'une telle stratégie serait trop important. En effet, l'incorporation de nombreuses VLP est une solution coûteuse et l'augmentation des valences d'HPV pourrait entraîner une compétition entre les différentes valences, ce qui conduirait à une protection de faible durée contre certains papillomavirus.

De ce fait, les recherches s'orientent actuellement sur l'utilisation de la protéine mineure de capside L2, qui a la particularité de présenter des épitopes capables d'induire des anticorps neutralisant plusieurs types d'HPV (Roden *et al.*, 2000a). En raison de l'immunodominance de la protéine L1, l'utilisation de VLP composées à la fois des protéines L1 et L2 ne permet pas d'obtenir un titre en anticorps anti-L2 suffisant pour espérer une protection contre les différents types d'HPV (Roden *et al.*, 1994). Différentes stratégies consistant à utiliser la protéine L2 seule (entière ou sous forme de peptides) sont développées, mais les titres en anticorps induits contre la protéine L2 restent faibles, même avec l'utilisation d'adjuvants qui ne sont pas utilisables en médecine humaine (Alphs *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2007; Pastrana *et al.*, 2005).

1. Les Papillomavirus

1.1 Classification

Longtemps regroupés dans la famille des *Papovaviridae* avec les polyomavirus, les papillomavirus sont individualisés depuis une dizaine d'années pour former l'unique sous-famille de la famille des *Papillomaviridae*. Les papillomavirus sont de petit virus nus à ADN possédant une capside icosaédrique (de Villiers *et al.*, 2004; de Villiers *et al.*, 2005). Ce sont des virus très anciens, spécifiques d'espèce, ayant évolué avec leur hôte naturel. Ces virus ont pour tropisme les épithéliums malpighiens et ont l'inconvénient, en termes d'étude du cycle viral et de vaccinologie, d'être non cultivables *in vitro*. La barrière entre deux types est définie par le degré d'homologie du génome entre ces types : un virus constitue un nouveau type lorsque la séquence de la protéine majeure de capside L1 présente une identité inférieure à 90% avec l'ADN des autres papillomavirus (de Villiers *et al.*, 2004). Les virus qui présentent entre 90% et 98% d'homologie et un profil de restriction différent du papillomavirus de référence sont définis comme des sous-types et les isolats présentant plus de 98% d'homologie représentent des variants (de Villiers, 1994).

Les papillomavirus sont classés en 189 types répartis en 29 genres sur la base de l'analyse de leur génome. Cent vingt types ont été isolés chez l'Homme, 64 chez les mammifères, 3 chez les oiseaux et 2 chez les reptiles (Bernard *et al.*, 2010) (Figure 1). Les HPV sont responsables d'infections des muqueuses génitales et de la peau, et induisent différentes lésions variées (Bernard *et al.*, 1994; Birley *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1995; Van Ranst *et al.*, 1992). Les papillomavirus responsables de lésions muqueuses chez l'homme sont regroupés dans le genre des alpha-papillomavirus. Au sein de ce genre, les lésions bénignes régressant spontanément tels que les condylomes, sont causées par les génotypes BR comme les types 6 et 11, regroupés dans l'espèce des alpha-10. En revanche, les lésions conduisant à des transformations malignes de l'épithélium infecté sont causées par les génotypes HR qui sont regroupés dans les espèces alpha-7 et alpha-9. Les 15 génotypes HR les plus fréquemment retrouvés lors du développement des cancers du col de l'utérus, du pénis, du vagin et de la vulve sont par ordre d'importance au niveau mondial : les types 6, 18, 45, 31, 33, 52, 58, et 35 (Munoz *et al.*, 2003).

1.2 Génome des Papillomavirus

Les papillomavirus ont un génome constitué d'une molécule d'ADN circulaire double brin et super-enroulée de 8 kpb associés à des histones (Figure 2). La comparaison des séquences nucléotidiques des papillomavirus dans les différentes espèces a révélé une organisation génomique commune. Les phases ouvertes de lecture (ORF) sont situées sur un seul brin de l'ADN viral (Chen *et al.*, 1982). Le génome des papillomavirus présente un GC% allant de 41 à 49% correspondant à 12% de la masse du virion (Favre *et al.*, 1975) et comporte trois régions (Figure 2) :

(i) La région précoce, appelée E pour *early*, représente 50% du génome et code des protéines qui sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral (E1 et E2), la régulation de l'expression des gènes viraux (E2) et des oncoprotéines impliquées dans la transformation cellulaire (E5, E6 et E7).

(ii) La région tardive, appelée L pour *late*, code les protéines structurales L1 et L2, qui sont respectivement la protéine majeure et mineure de capside.

(iii) La troisième région, non codante, appelée LCR pour *Long Control Region* représente 7 à 11% du génome. Cette LCR contient l'origine de réplication (*ori*), les promoteurs des gènes précoces (p97 pour l'HPV 16 et p105 pour HPV 18) et des séquences activatrices ou inhibitrices régulées par des facteurs d'origine cellulaire et virale en amont du promoteur (Chen *et al.*, 1982). Ces éléments de régulation présentent une spécificité de cellule ou de tissu, contribuant ainsi au tropisme des papillomavirus.

2. Les protéines virales des papillomavirus

2.1 Les protéines non structurales

2.1.1 La protéine E1

La protéine E1 est la protéine la plus conservée des papillomavirus (Chiang *et al.*, 1992). Il s'agit d'une protéine nucléaire dont le poids moléculaire varie de 67 à 76 kDa en fonction du type de papillomavirus. Le domaine N-terminal de la protéine E1 contient un signal de localisation nucléaire (NLS) et un site de liaison aux histones (résidus 1-125). Les autres fonctions de la protéine E1 sont portées par le domaine C-terminal qui a des fonctions homologues à celles de l'antigène T du SV40 dans l'initiation de la réplication (Clertant &

Seif, 1984; Seif, 1984) (Figure 3). Cette région contient notamment un site de liaison à l'ATP et des domaines ATPase-hélicase (résidus 170-649) nécessaires à la réplication et au maintien sous forme épisomale du génome viral (Sedman *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 1993). La protéine E1 initie la réplication en se fixant à l'ADN sous forme de dimère sur la séquence E1BS (*E1 binding site*) au niveau de la région *ori* contenue dans la région LCR (Chen & Stenlund, 1998; Sun *et al.*, 1996). Elle interagit avec l'ADN polymérase α (Conger *et al.*, 1999; Masterson *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1994) et le facteur A de réplication (Han *et al.*, 1999). Bien que la protéine E1 soit capable de répliquer seule le génome viral *in vitro*, son interaction avec la protéine E2 renforce son affinité pour l'origine de réplication et est indispensable pour une réplication efficace *in vivo* (Chen & Stenlund, 1998; 2000; Thorner *et al.*, 1993). Enfin, E1 est capable de s'associer aux complexes cycline/CDK, entraînant sa phosphorylation, nécessaire à son maintien au niveau nucléaire et régulant son activité (Deng *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 1999).

2.1.2 La protéine E2

La protéine E2 est une protéine d'un poids moléculaire de 50 kDa qui a un rôle fondamental dans le cycle viral. En effet, elle est responsable de la régulation négative de la transcription des oncogènes viraux, de l'activation de la réplication du génome viral en association avec la protéine E1 (Figure 4). Elle comporte 3 domaines fonctionnels : un domaine C-terminal de 80 aa qui assure sa dimérisation et sa liaison à l'ADN (McBride *et al.*, 1988), une région centrale flexible, riche en proline, de séquence et de taille variable selon les types de papillomavirus et un domaine N-terminal de 200 aa qui module la transcription des gènes E6 et E7 (Demeret *et al.*, 1997; Demeret *et al.*, 1994).

Le domaine N-terminal est impliqué dans toutes les fonctions de la protéine E2 comme la répression transcriptionnelle et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par un mécanisme impliquant la stabilisation de la protéine p53 activant le régulateur de cycle p21 et la mort par apoptose (Desaintes *et al.*, 1997; Dowhanick *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998). La protéine E2 est aussi capable d'induire l'apoptose, indépendamment de la protéine p53 (Desaintes *et al.*, 1997), jouant ainsi un rôle important au cours du cycle viral productif en induisant l'apoptose des cellules les plus différenciées de l'épiderme où les virions se forment, augmentant ainsi leur dissémination dans le milieu extérieur (Figure 4).

2.1.3 La protéine E4

La protéine E4 peut représenter de 20 à 30% des protéines cellulaires dans les verrues plantaires provoquées par l'HPV 1 (Doorbar *et al.*, 1989) et se retrouve à un taux plus faible pour les papillomavirus qui infectent les muqueuses tels que les types 6 et 16 (Crum *et al.*, 1990). La protéine E4 est exprimée durant la phase tardive du cycle viral, sous la forme d'une protéine de fusion E1^E4, de 17 kDa, constituée des 5 aa N-terminaux de la protéine E1 et de la protéine E4 (Doorbar *et al.*, 1988; Nasseri *et al.*, 1987) (Figure 5). De la forme principale (E1^E4) sont issues deux autres formes mineures de 10 et 16 kDa obtenues par modifications post-traductionnelles et par clivage protéolytique (Brown *et al.*, 1996). Ces différentes formes sont retrouvées associées sous forme de multimères qui s'agrègent sous forme d'inclusions cytoplasmiques et nucléaires (Rogel-Gaillard *et al.*, 1993).

Le rôle de la protéine E4 n'est pas très bien élucidé. En effet, la délétion du gène E4 n'entraîne pas de défaut de transformation et de réplication de l'ADN viral. Il a été observé que la protéine E1^E4 de l'HPV 16 s'associe aux filaments intermédiaires de cytokératine en favorisant la déstabilisation et la destruction de la lamine nucléaire permettant ainsi la libération des particules virales. Une séquence située à l'extrémité N-terminale (MADXXA) et une séquence riche en leucine (LLXLL) jouent un rôle clé dans cette activité (Doorbar *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2004). La protéine E4 peut interagir avec les hélicases impliquées dans la stabilité des ARN et le contrôle de la traduction (Doorbar *et al.*, 2000; Doorbar *et al.*, 1996). Il a également été suggéré que la protéine E1^E4 pourrait s'associer avec les mitochondries altérant ainsi leur potentiel de membrane (Raj *et al.*, 2004). Il a aussi été montré que la région comprise entre les aa 17-45 et 21-58 de la protéine E1^E4 de l'HPV 16 et de l'HPV 18, induit l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire (Davy *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2004; Nakahara *et al.*, 2002) en séquestrant dans le cytoplasme le complexe CdK1/Cyclin B1 sur le réseau de cytokératine, empêchant ainsi sa migration vers le noyau et donc l'entrée en mitose (Davy *et al.*, 2005).

2.1.4 La protéine E5

La protéine E5 de l'HPV 16 à une taille de 10 kDa (Bubb *et al.*, 1988). Cependant, la majorité des études sur cette protéine non structurale a été effectuée sur la protéine E5 du BPV 1. La protéine E5 des HPV génitaux ne possède, *in vitro,* qu'une faible activité transformante confirmant ainsi la différence du rôle joué par cette protéine selon les différents types de papillomavirus considérés. Malgré de nombreuses homologies avec celle de l'HPV

16, la protéine E5 du BPV 1 présente une taille 2 fois inférieure à celle-ci et est responsable de l'activité transformante de ce virus. Cette protéine présente 2 domaines fonctionnels:

- un domaine N-terminal hydrophobe de 30 aa, responsable de la localisation de E5 au niveau des membranes et des compartiments cytosoliques (Schlegel *et al.*, 1986).

- un domaine C-terminal de 14 aa qui contient deux cystéines essentielles pour la formation d'homodimères nécessaires à la propriété transformante de E5. (Burkhardt *et al.*, 1987). Cette région contient également des aa indispensables à son activité transformante (Sparkowski *et al.*, 1996). La protéine E5 du BPV 1 est suffisante pour transformer certaines lignées de cellules de rongeurs (DiMaio *et al.*, 1986). Cependant, la protéine E5 des HPV génitaux ne possède, *in vitro,* qu'une faible activité transformante, confirmant ainsi la différence du rôle joué par cette protéine selon les différents types de papillomavirus. Comme d'autres protéines d'expression précoce, la protéine E5 n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque, mais intervient plutôt dans la modification des propriétés des protéines cellulaires. En effet, la protéine E5 interagit avec le récepteur de plusieurs facteurs de croissance (Cohen *et al.*, 1993) en activant le récepteur du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (Sparkowski *et al.*, 1996) et le récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Piccini *et al.*, 1997). De cette activation résulte l'expression de gènes comme *c-fos* et *c-jun* (Chen *et al.*, 1996a; Chen *et al.*, 1996b). La protéine E5, en modifiant la transduction de signaux extracellulaires, dérégule la prolifération cellulaire. Le complexe AP-1 (*fos-jun*) peut se fixer aux séquences spécifiques présentes au niveau de la LCR de l'HPV 16 et activer l'expression des gènes viraux.

2.1.5 La protéine E6

Le gène E6 est l'un des premiers gènes exprimé lors d'une infection par un HPV et joue un rôle crucial dans l'immortalisation. La protéine E6 présente un poids moléculaire variant de 16 à 18 kDa en fonction du type de papillomavirus. Il s'agit d'une protéine basique, riche en cystéine, contenant 4 motifs CXXC formant des motifs en doigts de zinc (Figure 6A) qui lui permettent d'interagir avec l'ADN cellulaire (Barbosa *et al.*, 1989). La protéine E6 a été détectée dans différents compartiments cellulaires, incluant le noyau, la membrane plasmique et le cytoplasme (Rapp & Chen, 1998).

La protéine E6 des HPV HR est capable d'immortaliser des cellules épithéliales humaines telles que les kératinocytes ou les fibroblastes primaires humains en association avec la protéine E7 (Durst *et al.*, 1987; Munger, 1995; Rapp & Chen, 1998).

La capacité des protéines E6 des HPV HR à se lier et inactiver la protéine suppresseur de tumeur p53 conduit à la prolifération cellulaire (Doorbar, 2005; Munger, 1995; Tidy, 1992; Vousden, 1993). La protéine p53 est un activateur transcriptionnel des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Contrairement à l'oncoprotéine E6 des HPV HR, l'oncoprotéine E6 des HPV BR possède une affinité réduite pour la protéine p53 (Crook *et al.*, 1991; Werness *et al.*, 1990).

L'oncoprotéine E6 des HPV HR induit la protéolyse de la protéine p53 en présence de la protéine cellulaire E6-AP (E6 associated protein) (Huibregtse *et al.*, 1993) (Figure 6B). La protéine p53 est dégradée par le protéasome après ubiquitinylation (Ciechanover *et al.*, 1994; Hochstrasser, 1995). Une étude a suggéré la localisation de la protéine E6-AP dans la région périnucléraire de la cellule et que la protéolyse de la protéine p53 a également lieu dans cette région (Daniels *et al.*, 1998).

Bien que l'inactivation de la protéine p53 semble jouer un rôle important dans la fonction oncogénique de la protéine E6, E6 possèderait des fonctions oncogéniques indépendantes de l'inactivation de la protéine p53 (Chen *et al.*, 1995; Werness *et al.*, 1990).

Enfin, la protéine E6 est capable d'interagir *in vitro* et *in vivo* avec la protéine cellulaire ERC-55, protéine de liaison au calcium localisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Cette interaction pourrait jouer un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire en inhibant la différenciation terminale des cellules épithéliales, créant ainsi un environnement propice à la réplication des l'ADN des HPV (Rapp & Chen, 1998).

2.1.6 La protéine E7

L'oncoprotéine E7 est une phosphoprotéine nucléaire de 11 kDa. Tout comme la protéine E6, la protéine E7 ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et semble fonctionner essentiellement en association avec les protéines cellulaires impliquées dans la prolifération ou la différentiation cellulaire. La protéine E7 est capable, en association avec la protéine E6, d'induire l'immortalisation des kératinocytes. Cependant il a été démontré que la protéine E7 seule était capable d'immortaliser des kératinocytes humains lorsqu'elle est fortement exprimée (Sedman *et al.*, 1991).

La protéine E7 est constituée de 3 régions conservées présentant de fortes homologies de séquences avec les régions CR1, CR2 et CR3 de la protéine E1A des adénovirus (Figure 7A). Les régions CR2 et CR3 de la protéine E7 des papillomavirus comporte aussi de fortes homologies avec l'antigène T du SV40. Ainsi, ces régions présentent un motif conservé parmi les papillomavirus génitaux BR et HR, LXCXE, contenant le site de liaison à la protéine

supresseur de tumeur du rétinoblastome (pRB), mais également aux protéines apparentées p107 (active lors de la transition G1/S) et p130 (active lors de la transition G0/G1) (Dahiya *et al.*, 2000; Dyson *et al.*, 1989; Ghittoni *et al.*, 2009). Le domaine CR2 de la protéine E7 des HPV possède un site de phosphorylation par la caséine kinase II (SSEEEDE) sur une sérine (Barbosa *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2006), la phosphorylation de E7 étant nécessaire à son activité transformante. La région CR3 contient également 2 motifs en doigt de zinc de type CXXC séparés par 29 résidus. Ce domaine de liaison est présent en 2 copies sur la protéine E6 (Clemens *et al.*, 1995). Ces motifs sont impliqués dans la dimérisation de la phosphoprotéine E7 et la liaison à l'ADN (Alonso *et al.*, 2004; McIntyre *et al.*, 1993). La région CR3 est également impliquée dans l'activation de la transcription de la protéine E7.

L'expression de la protéine E7 est associée à une augmentation de la synthèse de l'ADN cellulaire et à la prolifération cellulaire (Blanton *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995) (Figure 7B). Grâce à l'interaction entre la protéine E7 et la pRb (Dyson *et al.*, 1989). La liaison de E7 à pRb hypophosphorylée favorise la dissociation du complexe pRb-E2F/DP. Le facteur E2F/DP ainsi libéré permet la trans-activation des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (CDK1, cycline D, cycline A, Myc, Myb) et la synthèse d'ADN (thymidine kinase, dihydropholate réductase et ADN polymérase) (Munger, 1995).

Dans les carcinomes cervicaux associés à HPV, la protéine E2 est absente du fait de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire avec rupture de la POL E2. Le complexe Rb/E2F se dissocie et libère le facteur E2F qui va permettre la trans-activation des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, ce qui a pour conséquence une prolifération cellulaire incontrôlée.

2.2 Les protéines structurales

2.2.1 La protéine L1

La protéine L1 est la protéine majeure de la capside virale des papillomavirus. Elle représente 90% des protéines de capside (Favre *et al.*, 1975; Roseto *et al.*, 1984). Cette protéine est hautement conservée entre les papillomavirus et possède une masse moléculaire allant de 56 à 60 kDa. Un site de fixation à l'ADN a été localisé dans les onze aa situés à l'extrémité C-terminale de la protéine L1 de l'HPV 11 (Li *et al.*, 1997) et dans les neuf aa C-terminaux de la protéine L1 de l'HPV 16 (Touzé *et al.*, 2000). Rapidement après leur synthèse, les protéines structurales des papillomavirus sont transportées dans le noyau (Zhou *et al.*, 1991a), lieu d'assemblage des virions (Orth *et al.*, 1977; Zhou *et al.*, 1993). La translocation des protéines L1 et L2 dans le noyau est assurée par leurs NLS. La protéine L1 contient deux séquences

NLS situées en position C-terminale. La principale séquence NLS de la protéine L1 de l'HPV 16 présente une homologie avec le NLS de l'antigène T du SV40 et possède six aa basiques, KRKKRK, en position 499 à 504. L'autre NLS correspond à une séquence bipartite constituée d'un groupe d'aa basiques KRK (aa 484 à 486) séparé par douze aa d'un deuxième groupe de K et R (Zhou *et al.*, 1991a). Une mutation dans un des NLS n'altère pas la localisation nucléaire de la protéine tant que l'autre reste intact. Les séquences NLS de la protéine L1 sont également essentielles à la formation des virions car ils favorisent l'interaction avec la protéine L2 et la stabilisation de la capside (Schafer *et al.*, 2002).

2.2.2 La protéine L2

La protéine L2, d'un poids moléculaire apparent d'environ 75 kDa, représente 10% des protéines de la capside. Cette protéine est nécessaire à l'infectiosité des papillomavirus (Buck *et al.*, 2004).

De nombreuses études montrent l'importance de cette protéine à différentes étapes du cycle viral. La protéine L2 interagit avec la protéine L1. En effet, au niveau de sa partie C-terminale, un domaine de liaison à la protéine L1 de 44 aa a été mis en évidence et cette interaction stabiliserait la capside virale (Finnen *et al.*, 2003) (Figure 8).

Lors du cycle infectieux du virus, l'étape d'interaction entre ce dernier et la membrane plasmique est majoritairement réalisée par la protéine L1 liant les héparanes sulfates cellulaires et la laminine-5, composants de la matrice extracellulaire. Lors de cette étape d'interaction, la protéine L2 est clivée par la furine en position 12 après le NLS N-terminal. Ce clivage permettrait l'exposition d'un second site d'interaction avec des récepteurs de surface cellulaire (Richards *et al.*, 2006). Les résidus 13-31 et 108-120 de la protéine interviennent dans ce mécanisme, mais aucun des ligands cellulaires impliqués n'a encore été caractérisé (Kawana *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003). La partie N-terminale semble être essentielle à la protéine L2 afin qu'elle adopte une bonne conformation au sein de la capside (Buck *et al.*, 2008). Au sein de la partie N-terminale, une étude récente a mis en évidence l'importance de la formation d'un pont dissulfure entre les cystéines 22 et 28 pour un repliement correct de la protéine L2 (Campos & Ozbun, 2009).

3. Structure et antigénicité de la capside des Papillomavirus

3.1 Pseudoparticules virales de papillomavirus

La capacité de la protéine L1, en présence comme en absence de protéine L2, à s'auto-assembler en pseudoparticules virales ou VLP dans différents systèmes eucaryotes a permis une étude plus approfondie de la structure de la capside et de la fonction des protéines la composant. En effet, les VLP de papillomavirus possèdent une structure semblable à celle des virions. Elles sont dépourvues d'ADN viral, sont fortement immunogènes (Kirnbauer *et al.*, 1992; Kirnbauer *et al.*, 1994), et conservent la capacité de lier et de transférer de l'ADN vers les cellules cibles (Combita *et al.*, 2001; Goldmann *et al.*, 1999; Kawana *et al.*, 1998; Sandalon *et al.*, 1997; Touzé & Coursaget, 1998) (Figure 9). Dans l'ensemble des systèmes, l'expression de la protéine L1 seule permet l'obtention de VLP. La protéine L1 est donc l'élément structural indispensable à la formation des capsomères et à l'assemblage de la capside. Les VLP ont été obtenues par expression des protéines de capside dans divers systèmes d'expression eucaryotes comprenant le virus de la vaccine (Zhou *et al.*, 1991b), le système baculovirus/cellules d'insecte (Kirnbauer *et al.*, 1992; Le Cann *et al.*, 1994), les levures (Hofmann *et al.*, 1995; Sasagawa *et al.*, 1995) et le virus de la forêt de Semliki (Heino *et al.*, 1995; Roden *et al.*, 1996a). La production de VLP a également été réalisée *in vitro* par assemblage de capsomères de protéines L1 exprimées en *E.coli* (Chen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997).

La co-expression des protéines L1 et L2 assure l'incorporation stable de la protéine L2 au sein de la capside et permet également d'augmenter la quantité de VLP produites d'un facteur 4 (Kirnbauer *et al.*, 1993).

3.2 Structure tri dimensionnelle des protéines L1et L2

Une étude cristallographique réalisée avec l'HPV16 a permis de connaitre la structure 3-D de la protéine L1 (Chen *et al.*, 2000). La protéine L1 est composée de 3 régions structurales distinctes : une courte partie N-terminale, une région centrale et une région C-terminale (Figure 10).

Une région centrale, comprise entre les aa 20 à 382, est formée de feuillets β antiparallèles conservés entre les différents types de papillomavirus, induisant la formation de

six boucles antigéniques, qui sont quant à elles variables selon les différents types. Les boucles BC, DE, EF, FG et HI sont orientées vers l'extérieur de la capside, alors que la boucle CD est orientée vers l'intérieur. La boucle HI d'un monomère s'insère entre les boucles FG et EF du monomère voisin permettant ainsi la formation de pentamère de protéine L1 (Chen *et al.*, 2000).

La région C-terminale, comprise entre les aa 383 à 475, est constituée principalement d'hélices α et intervient dans le phénomène d'assemblage des capsides en permettant le contact entre les pentamères (Chen *et al.*, 2000). Ces pentamères s'assemblent à l'aide de ponts disulfures inter-capsomériques. La position des 31 derniers aa, contenant les NLS et la région fixant l'ADN, n'a pas pu être déterminée du fait de sa mobilité. La structure tridimensionnelle de la protéine L2 n'est pas connue car les VLP formées des protéines L1 et L2 n'ont à ce jour pas pu être cristallisées.

3.3 Structure de la capside des papillomavirus

Les papillomavirus possèdent une capside icosaèdrique de 50 à 55 nm de diamètre, composée de 360 protéines L1 (Baker *et al.*, 1991) assemblées en 72 pentamères appelés capsomères (Figure 11), et de 12 à 72 protéines L2 (Buck *et al.*, 2008). Les capsomères pentamériques s'assemblent selon une symétrie icosaédrique T=7d (Hagensee *et al.*, 1994). Contrairement à la majorité des virus qui possèdent une capside formée de capsomères penta ou hexamériques, l'assemblage des capsomères des papillomavirus aboutit à la formation d'une capside ne présentant que des capsomères pentamériques, pentavalents sur les faces et hexavalents aux sommets (Klug & Caspar, 1960). Les capsomères sont capables d'entrer en contact avec leurs six voisins sur les faces, comme il est observé pour les 60 capsomères hexavalents disposés sur les faces de l'icosaèdre, ou d'entrer en contact avec leurs cinq voisins dans les 12 capsomères pentavalents des sommets de l'icosaèdre (Baker *et al.*, 1991; Trus *et al.*, 1997). Les contacts inter-capsomères s'effectuent par la base des capsomères (Belnap *et al.*, 1996).

L'étude des domaines nécessaires à l'auto-assemblage des protéines majeures de capside a été menée par délétions N- et C-terminales de ces protéines. Ainsi, toute délétion dans la région N-terminale de la protéine L1 abolit l'assemblage sous forme de particules. En revanche, l'extrémité C-terminale semble moins impliquée car la délétion des onze aa C-terminaux n'affecte pas l'assemblage pour l'HPV 11 (Li *et al.*, 1997). Les 31 acides aminés C-

terminaux de la protéine L1 de l'HPV 16 ne semblent pas nécessaires à l'auto-assemblage des protéines (Touzé *et al.*, 2000). Des délétions situées au-delà de ces régions abolissent la formation des capsides et ne permettent que la formation d'agrégats ou de capsomères. Les cystéines 175 et 428 jouent un rôle clé dans le processus d'assemblage de la capside du papillomavirus. Ces cystéines créent des ponts disulfures inter-capsomères entre trois protéines L1 qui appartiennent à trois capsomères différents. Si l'une de ces cystéines est mutée, la capacité à former des capsides est abolie, mais les capsomères sont toujours produits (Sapp *et al.*, 1998). De même, la C-185 est impliquée dans l'établissement de pont-disulfures inter-capsomères entre deux protéines L1 (Ishii *et al.*, 2003). Les C 424 et C 429 sur la protéine L1 de l'HPV 18 sont également indispensables à la formation et à la stabilité des capsides (Sapp *et al.*, 1998).

La structure tridimensionnelle des VLP d'HPV 16 a été déterminée par l'analyse cristallographique aux rayons X de pseudoparticules virales de symétrie T=1 d'un diamètre de 318 Å, comprenant 12 capsomères assemblés *in vitro* à partir de la protéine L1, délétée des 10 premiers aa N-terminaux, exprimée en *E.coli*. En effet, des pseudoparticules virales de symétrie T=7 constituées de la protéine entière n'ont pas pu être cristallisées (Chen *et al.*, 2000). Dans chaque pentamère, les principaux domaines des cinq sous-unités L1 s'associent intimement les uns aux autres. Les contacts interpentamériques sont formés par de petites saillies latérales, les domaines "*elbowlike*", lesquelles se forment autour des trois axes de symétrie. La forme de ces unités morphologiques correspond aussi à des pentamères observés en microscopie électronique.

La protéine L2 est en quantité substoechiométrique même si le nombre exact de protéines L2 dans la capside n'a pas pu être déterminé avec certitude. Des études ont montré que les protéines L2 sembleraient être au nombre de 12 dans une particule virale où chaque L2 serait associée à un capsomère formant un sommet (Buck *et al.*, 2008; Trus *et al.*, 1997). Dans ce modèle, la protéine L2 serait enchâssée par ses parties N et C-terminales entre chaque capsomère pentavalent, ne laissant apparaitre qu'une faible partie centrale à la surface de la capside. Les analyses en SDS-PAGE de capsides d'HPV composées des protéines L1 et L2 font apparaitre un ratio de 1 protéine L2 pour 30 protéines L1, confirmant ainsi le nombre de 12 protéines L2 dans la capside (Bossis *et al.*, 2005; Hagensee *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994). Cependant, l'étude par SDS-PAGE de virions de l'HPV 1, ainsi que des analyses des VLP composées des protéines L1 et L2 de l'HPV 11, suggèrent que les capsides de papillomavirus pourraient contenir plus de 36 et au maximum 72 protéines L2 par capside (Buck *et al.*, 2008; Doorbar & Gallimore, 1987; Finnen *et al.*, 2003) (Figure 12).

Cette hypothèse semble être confirmée par une étude récente, portant sur l'analyse de pseudovirions d'HPV 16 composés des protéines L1 et L2, produits en système cellulaire en surexprimant la protéine L2 par co-transfection de cellules 293TT. L'analyse des pseudovirions réalisés par transfection des cellules 293TT par un plasmide codant les gènes des protéines L1 et L2 de l'HPV révèle des ratios de L1 : L2 variant de 9 : 1 à 10 : 1, indiquant ainsi un nombre de 36 L2 par capside (Buck *et al.*, 2008). L'analyse par cryoélectro microscopie des capsides constituées de la protéine L1 seule, ou des protéines L1L2, ne révèle pas de différence au niveau de la structure externe de la capside. Cependant, l'analyse des coupes des pseudoparticules virales de l'HPV 16 révèle, après coloration de la protéine L1 et de la protéine L2, l'existence de 72 sites d'interaction possibles entre les protéines L1 et L2, indiquant ainsi l'interaction de la protéine L2 avec 1 capsomère pentamérique. La protéine L2 peut donc être présente à raison de 72 copies par capside avec un rapport de 1 L2 pour 5 L1 (Figure 12).

4. Les pseudoparticules virales comme vecteur de gène

L'absence de système de réplication *in vitro* des papillomavirus a longtemps rendu impossible l'étude de la réponse immune induite par les papillomavirus ainsi que la détection des anticorps neutralisants. L'utilisation de VLP en tant que vecteurs de gènes nécessite l'obtention de pseudovirions (PsV), pseudoparticules virales associées à l'ADN, obtenus par expression du gène L1 seul ou par co-expression des gènes L1 et L2 en présence d'un plasmide codant un gène rapporteur. Ces PsV peuvent être obtenus à partir de systèmes cellulaires et acellulaires.

4.1 Les systèmes de formation cellulaire des PsV

4.1.1 Formation de PsV en utilisant le virus de la vaccine recombinant

Les premières études, portant sur le développement de pseudovirions obtenus en système cellulaire, ont été réalisées en utilisant un virus de la vaccine recombinant codant les gènes L1 ou L1 et L2 du BPV 1. Après infection de cellules CON/BPV.B2 contenant 50 copies du génome viral du BPV 1 sous forme épisomale (Zhou *et al.*, 1993), des particules de BPV 1 infectieuses ont pu être obtenues uniquement à partir des virus de la vaccine recombinants

codant les deux protéines de capside. Les particules obtenues avec des virus de la vaccine recombinants codant seulement le gène L1 ne contenant pas d'ADN, la co-expression de la protéine L2 est donc nécessaire à l'encapsidation du génome du BPV 1.

Des PsV de BPV 1 ont également été obtenus par co-transfection de cellules COS-1 à l'aide d'un plasmide rapporteur et d'un virus de la vaccine recombinant codant les gènes L1 et L2 du BPV 1 (Zhao *et al.*, 1998). Les PsV constitués uniquement de la protéine L1 sont capables d'encapsider l'ADN rapporteur alors que ceux obtenus avec un virus de la vaccine recombinant codant les gènes L1 et L2 du BPV 1 ont une capacité d'encapsidation augmentée d'un facteur 50. Les PsV ainsi formés sont capables d'encapsider un plasmide de taille maximale de 10,2 kb, taille bien supérieure à celle du génome du BPV 1. Ces résultats suggèrent que les protéines L1 et L2 sont nécessaires pour une encapsidation efficace avec l'ADN.

Des PsV de l'HPV 33 ont été obtenus en utilisant des virus de la vaccine recombinants codant les gènes L1 ou L1 et L2 pour infecter des cellules COS-7 contenant de nombreuses copies d'un plasmide rapporteur (Sapp & Selinka, 2005; Unckell *et al.*, 1997).

Ces résultats confirment que la protéine L2 est nécessaire à l'encapsidation de l'ADN, à la formation optimale de PsV ainsi qu'à leur infectiosité, même si des PsV ont été obtenus avec un virus de la vaccine recombinant codant seulement le gène L1.

4.1.2 Formation de PsV à l'aide de virus de la forêt de Semliki

L'utilisation du virus de la forêt de Semliki (SFV) comme système d'expression des protéines L1 et L2 du BPV 1 a également permis l'obtention de PsV en système cellulaire. Des cellules de hamster BPHE-1, contenant 50 à 200 copies du génome du BPV 1 sous forme épisomale, ont été infectées par le SFV codant, soit le gène de la protéine L1, soit le gène de la protéine L2 ou infectées par le virus codant les 2 protéines (Roden *et al.*, 1996a). Néanmoins, des PsV infectieux ont seulement été obtenus avec les SFV codant les gènes L1 et L2. Ces résultats confirment ainsi le rôle joué par la protéine L2, aussi bien dans l'encapsidation de l'ADN que dans l'infectiosité des PsV. Au cours de cette même étude, des PsV d'HPV 16, encapsidant le génome du BPV 1, ont également été obtenus en utilisant le même système cellulaire.

4.1.3 Formation de PsV par transfection de gènes optimisés des protéines de capside

Hormis les systèmes cellulaires basés sur l'utilisation de virus de la vaccine recombinant ou de la forêt de Semliki, un autre système a été décrit plus récemment. Ce système repose sur

une simple co-transfection de cellules d'origine humaine 293TT à l'aide d'un plasmide codant les gènes optimisés des protéines de capside L1 et L2 et d'un plasmide rapporteur codant un gène d'intérêt (Buck *et al.*, 2004; 2005a; Buck *et al.*, 2005b) (Figure 13). L'optimisation consiste à remplacer tous les codons des gènes viraux par les codons les plus différents possibles (ADAP : *As Different As Possible*). Les cellules productrices utilisées dans ce système ont été modifiées de façon à surexprimer l'antigène T du SV40 de façon constitutive. Afin d'optimiser au maximum la quantité de PsV produits, les plasmides, codant les gènes de capside L1 et L2 d'un type d'HPV ainsi que le plasmide codant le gène rapporteur, contiennent l'origine de réplication du SV40 faisant de ce système le système de production de PsV le plus performant. Comme il a déjà été démontré dans les autres systèmes cellulaires, la co-expression des protéines L1 et L2 est indispensable à la formation de PsV infectieux.

D'un point de vue technique, ce système permet d'encapsider des plasmides d'une taille inférieure ou égale à celle du génome des papillomavirus (8 kpb). La capacité à transférer l'ADN encapsidé est inversement proportionnelle à la taille du plasmide codant le gène rapporteur (Buck *et al.*, 2004). Les différences de caractéristiques entre les VLP et les PsV ont été soulignées dans une étude récente (Culp *et al.*, 2007) qui montre des différences de réactivité de fixation d'anticorps monoclonaux sur les VLP ou sur des PsV produits en cellules de mammifères 293TT (Buck *et al.*, 2004). Certains anticorps monoclonaux sont capables de se fixer sur des VLP mais ne sont pas capables de se fixer sur les PsV, indiquant une différence dans l'exposition des épitopes entre les VLP et les PsV.

4.2 Les systèmes acellulaires de formation des PsV

4.2.1 Obtention de PsV de papillomavirus par dissociation-réassociation

La détermination du rôle des ions calcium et des ponts disulfures dans la formation des capsides a permis l'utilisation de pseudoparticules virales de papillomavirus pour la formation de PsV par encapsidation d'un ADN plasmidique après déstabilisation de la structure de la VLP (McCarthy *et al.*, 1998; Touzé & Coursaget, 1998).

La technique de dissociation-réassociation est basée sur le principe décrit par Colomar (Colomar *et al.*, 1993). Au cours de cette étude, des virions du SV40 ont été dissociés en présence de DTT et EGTA afin d'encapsider le génome du SV40. Lors de l'étape de réassociation, des capsomères sont réalisés par ajout du calcium au milieu réactionnel. Cette méthode a également été appliquée à la formation de PsV de papillomavirus à partir de VLP

d'HPV 16 constituées de la protéine L1. Les résultats obtenus montrent que le plasmide est contenu dans les pseudocapsides. Ces PsV, constitués uniquement de la protéine L1, sont capables de transférer le plasmide rapporteur dans différentes lignées (MRC5, HeLa, CaCo2, HuH-7, NIH 3T3, Cos-7, Vero, MDCK, CHO). La technique de dissociation-réassociation, comme pour les méthodes basées sur les systèmes cellulaires, permet d'encapsider des plasmides d'une taille inférieure ou égale à celle du génome des papillomavirus (8 kpb) (Touzé & Coursaget, 1998).

Cette méthode a également été utilisée afin d'obtenir des PsV de papillomavirus constitués de la protéine L1 et de la protéine L2. Des études ont permis de montrer que la protéine L2 augmente l'efficacité du transfert de gène d'un facteur pouvant aller de 2 à 10 en ce qui concerne les PsV de l'HPV 16 (El Mehdaoui *et al.*, 2000; Kawana *et al.*, 1998).

Plus récemment, la méthode de dissociation-réassociation a été optimisée par addition de chlorure de zinc afin d'augmenter l'efficacité du reassemblage. Cette optimisation repose sur une étude de Hanslip (Hanslip *et al.*, 2006) qui, en utilisant des VLP d'HPV 16 produites en *E. coli*, a montré que l'utilisation de Zn^{2+} dans le tampon d'assemblage permet d'augmenter de façon considérable la formation de VLP. Ce principe a donc été repris et adapté à la méthode de dissociation-réassociation. Les VLP de papillomavirus constituées de la protéine L1 ou des protéines L1 et L2 sont dissociées, permettant ainsi de déstructurer la capside sous forme de capsomères (Figure 14). Ces capsomères, en présence du plamide d'intérêt, du $CaCl_2$ et du $ZnCl_2$, vont former des PsV. Ces PsV ont été testés pour leur capacité à transférer le gène de la luciférase *in vitro* vis-à-vis de PsV obtenus en absence de zinc. Les résultats montrent une augmentation de l'efficacité de transduction évaluée par une expression de la luciférase augmentée d'un log en présence de chlorure de zinc, laissant ainsi penser que ce système est plus performant pour des applications *in vivo* (Bousarghin *et al.*, 2009b).

4.2.2 Obtention de PsV de papillomavirus par choc osmotique et interaction directe.

Le choc osmotique consiste à mettre en présence des VLP et un plasmide d'intérêt, puis à créer un choc osmotique qui entraînerait l'entrée de l'ADN dans les particules. Cette technique, réalisée chez les polyomavirus (Barr *et al.*, 1979), a été appliquée aux papillomavirus pour la production de PsV à partir de VLP des HPV de types 16 et 31 formées seulement de la protéine L1. Les résultats montrent que l'efficacité de transfert de gène est cinq à dix fois supérieure par rapport à la technique de dissociation-réassociation en absence

de chlorure de zinc et permet d'obtenir des PsV encapsidant des plasmides d'une taille pouvant aller jusqu'à 9,7 kpb (Bousarghin *et al.*, 2002).

La méthode d'interaction directe consiste à mettre en présence les VLP et le plasmide d'intérêt dans une solution de NaCl à 0,15M pendant 30 minutes. Cette technique permet de pallier aux problèmes rencontrés lors de l'encapsidation de plasmide présentant une taille supérieure à celle du génome des papillomavirus. En effet, les plasmides d'une taille allant jusqu'à 9,7 kpb sont protégés des dégradations nucléasiques et sont efficacement véhiculés dans des cellules où ils s'expriment (Bousarghin *et al.*, 2002). Cette méthode a été réalisée à partir de VLP des HPV de types 16 et 31 formées seulement de la protéine L1 (Figure 15). Les PsV ainsi obtenus ont une capacité de transfert de gène 100 fois supérieure à la technique de dissociation-réassociation en absence de chlorure de zinc (Bousarghin *et al.*, 2002). Des PsV d'HPV 6, 11, 16 et 18 contenant les protéines L1 ou L1 et L2 ont également été réalisés en fixant chimiquement un gène codant pour la β lactamase sur les capsides virales de papillomavirus (Yeager *et al.*, 2000).

4.3 Applications des PsV de papillomavirus au développement de tests de détection des anticorps neutralisants

Le développement du premier test de neutralisation a été rendu possible par la mise au point d'un système de greffe de prépuce néonatal humain sur des souris *nude* ou SCID (Kreider *et al.*, 1987). Les fragments de prépuces scarifiés de nouveau-nés sont infectés par des virions d'HPV 11, extraits de verrues génitales, puis greffés sous la capsule rénale des souris. Trois à cinq mois plus tard, les condylomes développés à partir des greffes sont extraits et mesurés. Les virions issus des noyaux de ces condylomes sont extraits et utilisés pour infecter une autre génération de greffe de prépuce afin de vérifier l'infectiosité des virions ainsi produits.

Pour la détection des anticorps neutralisants, des prépuces scarifiés sont mis en contact pendant 1h avec des virions d'HPV 11, préalablement incubés avec les sérums ou anticorps monoclonaux à étudier, puis greffés sous la capsule rénale de souris *nude*. Comme précédemment, les condylomes sont extraits, mesurés et leur taille est comparée à celle obtenue par la simple greffe de prépuce infecté par des virions. Les résultats obtenus montrent une réduction significative des condylomes. La mise en contact des virions d'HPV 11 avec

des anticorps permet donc de mesurer l'activité neutralisante d'anticorps puisqu'en présence d'anticorps neutralisants, la formation des condylomes est réduite ou nulle (Christensen & Kreider, 1990). Les difficultés de cette technique de réalisation longue ont limité son application. De plus, elle n'est possible que pour les HPV 11 et 16 avec de grandes difficultés de réalisation pour ce dernier type (White *et al.*, 1998).

Des tests de neutralisation ont également été développés en mesurant la capacité d'anticorps monoclonaux ou de sérum issus d'immunisation à l'aide de VLP constituées de la protéine L1 des HPV de types 6, 11, 16, 18, 31, 33 et 45 à inhiber l'agglutination d'érythrocytes de souris (Roden *et al.*, 1996b).

La mise au point d'une technique de propagation de virions d'HPV 16 a permis la mise au point d'une deuxième méthode basée sur l'utilisation de culture HaCaT, lignée de kératinocytes humaines immortalisés et infectés par des virions d' HPV 11. L'activité neutralisante est évaluée par RT-PCR. Dans ce cas, les ARNm sont purifiés 2-6 jours post-infection et les transcrits E1^E4 sont analysés par RT-PCR. La pré-incubation des virions avec des anticorps neutralisants se traduit par l'absence de détection des transcrits E1^E4 (White *et al.*, 1998; White *et al.*, 1999).

Le développement des systèmes cellulaires de production de PsV a conduit au développement des premiers tests de détection des anticorps neutralisants. Basés sur la détection de foyers de prolifération cellulaire en cellules C127 (Roden *et al.*, 1996a) ou par comptage de cellules bleues indiquant que les pseudovirions ont bien transférés le plasmide rapporteur pSVβgal dans les cellules cibles COS-7 (Unckell *et al.*, 1997). Ces premiers systèmes ont montré un intérêt limité du fait de leur très faible sensibilité.

Les systèmes de formation acellulaire de PsV, par la méthode d'interaction directe, de choc osmotique ou de dissociation-réassociation, ont permis de mettre au point des tests de neutralisation plus sensibles. Ces systèmes utilisent le gène de la luciférase comme gène rapporteur. Les PsV sont mis en contact avec des anticorps puis utilisés pour transduire des cellules COS-7. L'activité neutralisante des anticorps est alors mesurée par l'inhibition partielle ou totale du signal luciférase (Bousarghin *et al.*, 2002; Combita *et al.*, 2002).

Plus récemment, un nouveau système cellulaire de prodution de PsV a été développé. Ce système est basé sur une simple co-transfection de cellules 293FT ou TT par un plamide codant les gènes des protéines de capside L1 et L2 et un plasmide rapporteur codant le gène de la *secreted alkaline phosphatase* (SEAP) (Buck *et al.*, 2004) ou codant le gène de la luciférase (Fleury *et al.*, 2009). Les forts titres de PsV produits permettent d'obtenir des tests

de neutralisation d'une grande sensibilité. La détection des anticorps neutralisants repose sur le même principe que celui des systèmes acellulaires et est déterminée par l'inhibition du transfert de gène mesuré à l'aide du gène rapporteur (Figure 16).

5. Mécanisme d'entrée des papillomavirus et cycle viral des HPV

5.1 Mécanisme d'entrée des papillomavirus

5.1.1 Attachement du virus à la cellule

Les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) ont été identifiés comme récepteurs primaires d'attachement aux cellules pour les HPV de types 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 58, 59 et 68 (Giroglou *et al.*, 2001a; Joyce *et al.*, 1999). Les HSPG sont retrouvés dans la matrice extra-cellulaire de la plupart des cellules. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques et sont donc, de part leur localisation sur la cellule, des récepteurs de choix pour les virus (Bernfield *et al.*, 1999; Shafti-Keramat *et al.*, 2003). Les HSPG sont composés d'oligosaccharides organisés par une alternance d'unités disaccharidiques d'acide uronique et de glucosamine qui peuvent être sulfatés ou acétylés à divers degrés. Parmi ces différentes formes, la forme O-sulfatée est suffisante pour l'attachement de la capside du papillomavirus à la cellule (Selinka *et al.*, 2003). Cependant, d'autres candidats récepteurs ont été proposés pour les HPV. En effet, les virions d'HPV 11 ont montré une grande affinité pour la laminine 5 en plus de celle pour les HSPG indiquant un rôle possible de la laminine 5 dans l'attachement à la matrice extracellulaire (Culp *et al.*, 2006a; Culp *et al.*, 2006b; Selinka *et al.*, 2007). Cependant, les HPV de types 16 et 18 semblent utiliser préférentiellement les HSPG lors de l'attachement à la cellule, indiquant que l'interaction avec la laminine 5, bien que d'affinité supérieure à celles des HSPG, est de moindre importance dans la progression de l'infection (Culp *et al.*, 2006b; Sapp & Day, 2009; Selinka *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un second récepteur ou d'un co-récepteur lors de l'attachement de la capside à la cellule. Dans ce modèle, les HSPG ne représentent qu'un simple site d'encrage de faible spécificité induisant un changement de conformation de la capside (Selinka *et al.*, 2007). Cette hypothèse est supportée par le fait que les HSPG à eux seuls ne permettent pas l'internalisation des virions (Day *et al.*, 2008). Un second candidat récepteur est l'α6 intégrine qui est impliquée dans les interactions cellules/cellules. Les protéoglycanes et les intégrines sont fortement associés aux composants de la matrice extracellulaire. Cependant, le rôle spécifique des intégrines est très difficile à mettre en évidence du fait de leurs étroites interactions avec les HSPG (Evander *et al.*, 1997).

De nombreuses études suggèrent que la protéine L2 facilite l'infection en interagissant avec un récepteur secondaire (Kawana *et al.*, 2001; Roden *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003). L'attachement de la protéine L1 de capside à un récepteur primaire de la cellule induit un changement de conformation rendant ainsi accessible une région spécifique de la protéine L2. Cette région comprenant un domaine de clivage par la furine, hautement concervé chez les différents types de papillomavirus, de type RXR dans les 12 premiers aa de la partie N-terminale interagit avec une molécule de la surface cellulaire à l'entrée des virions (Day *et al.*, 2008). Ce changement de conformation, strictement nécessaire, induit une diminution de l'affinité de la capside pour les HSPG. Un nouveau changement de conformation s'opère alors, libérant ainsi le site de fixation, et plus particulièrement la séquence 17-36 identifiée comme neutralisante, à un récepteur secondaire (Kines *et al.*, 2009) (Figure 17).

5.1.2 Internalisation des papillomavirus.

Les études menées sur les virus nus à ADN montrent que l'entrée dans la cellule s'effectue par un ou plusieurs mécanismes tels que l'endocytose médiée par des vésicules hérissées à clathrine, ou par des vésicules lisses à cavéole, représentant une sous-population d'invaginations de la membrane plasmique non recouverte et riche en cholestérol et en sphingomyéline.

L'entrée des papillomavirus nécessite une internalisation par endocytose qui, pour la plupart des virus, se fait en quelques minutes après l'attachement au récepteur primaire. Néanmoins, l'internalisation des papillomavirus s'effectue beaucoup plus lentement et peut s'effectuer 2 à 4h après l'attachement au récepteur primaire (Culp & Christensen, 2004). La raison reste inconnue, cependant l'induction d'une cinétique lente après l'interaction de virus avec les syndécanes a été reportée pour d'autres virus (Williams & Fuki, 1997). De plus, le changement de conformation de la capside ou le transfert d'affinité vers un second récepteur sont des possibilités pouvant expliquer la lenteur de l'internalisation des papillomavirus.

L'étude des différentes voies d'endocytose a été réalisée en utilisant des inhibiteurs chimiques ou des mutants dominants négatifs de protéines impliquées dans ces voies. Ainsi, pour le BPV 1, après analyse microscopique et utilisation d'inhibiteurs des voies d'entrées connues, il a été montré que l'endocytose des particules virales est réalisée par une voie clathrine-dépendante (Day *et al.*, 2003; Selinka *et al.*, 2002).

Des études portant sur l'HPV 31 ont montré que l'utilisation de drogues inhibant la voie d'entrée cavéole-dépendante empêchait l'internalisation du virus dans les cellules COS-7 et dans des kératinocytes, indiquant un mécanisme d'entrée cavéole-dépendant (Bousarghin *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007b). Le traitement des cellules avec la chlorpromazine, inhibiteur chimique des voies clathrine-dépendantes, préviendrait l'infection par des PsV de l'HPV 31 (Hindmarsh & Laimins, 2007). Cependant, cette étude est réalisée en infectant des cellules COS-7 et 293TT et non sur les cellules HaCaT, lignées de cellules de kératinocyes mimant les cellules cibles d'une infection par HPV. De plus, elle ne comporte pas l'utilisation d'inhibiteurs des voies cavéoles-indépendantes, empêchant ainsi toute comparaison.

Bien que l'HPV 16 soit phylogénétiquement proche de l'HPV 31, son entrée est bloquée par des inhibiteurs de la voie d'entocytose clathrine-dépendante dans les cellules COS-7 (Bousarghin *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés dans des lignées de cellules épithéliales et de kératinocytes (Day *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007b).
L'HPV 31 semble interagir avec les HSPG de la même façon que l'HPV 16 lors des études d'infection *in vitro*. Ainsi, la différenciation dans la voie d'endocytose utilisée peut provenir de l'utilisation d'un co-récepteur différent de celui de l'HPV 16.

Plus récemment, des études portant sur des PsV de l'HPV 16 suggèrent que l'HPV 16 utilise une voie d'entrée clathrine et cavéole indépendante en cellules Hela et 293TT (Spoden *et al.*, 2008). Les résultats ont montré que l'utilisation de siRNA régulant négativement la formation des chaînes lourdes de la cavéoline 1 et de la clathrine n'affectait pas l'entrée et l'infectiosité des PsV. De plus, la surexpression de mutants dominants négatifs de la dynamine 2, de la cavéoline 1 et de l'eps 15 ayant un rôle dans la formation des vésicules à clathrine, n'inhibe pas l'entrée des PsV. L'HPV 16 utiliserait dans ce modèle une voie d'entrée faisant appel aux microdomaines enrichis par la tétraspanine. Ces résultats, bien que confirmés dans une autre étude (Schelhaas *et al*., oral 25th Papillomavirus Workshop), n'ont pas été étendus aux lignées de cellules de kératinocytes.

Une fois les capsides virales entrées dans la cellule, l'infection par les papillomavirus nécessite la sortie du virus des vésicules d'endocytose. Ce mécanisme fait intervenir une acidification de ces vésicules nécessaire à l'échappement des particules de papillomavirus de l'endosome (Day *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007b; Spoden *et al.*, 2008). Un peptide de déstabilisation membranaire de 23 aa a été mis en évidence dans la partie C-terminale de la protéine L2 en position 445-467. Cette partie C-terminale est impliquée la sortie des virions de l'endosome tardif (Kamper *et al.*, 2006). De plus, les 40 aa C-terminaux interagissent avec les microtubules par l'intermédiaire de la dynéine (Florin *et al.*, 2006).

Le trafic vésiculaire de l'HPV 31 fait intervenir le passage du cavéosome, présentant un pH neutre et constitué de la cavéoline comme protéine majoritaire, vers l'endosome précoce en utilisant un mécanisme Rab5 GTPase dépendant. Le transport vésiculaire des capsides nécessite l'interaction de ces GTPases avec des récepteurs présents dans la vésicule d'endocytose. Un site d'attachement à la syntaxine 18, protéine retrouvée dans le RE, a été mis en évidence sur la protéine L2 du BPV 1 en position 40-44 en aval du site de clivage de la furine. Il reste cependant difficile de connaitre la position exacte de la syntaxine 18 au sein du RE et de connaitre les mécanismes ou les conséquences de son interaction avec la protéine L2. A ce jour, aucun résultat convaincant ne semble démontrer la localisation des papillomavirus ou du moins des protéines structurales au sein du RE lors de l'infection.

5.1.3 Transport vers le noyau

La capside de nombreux virus possède présente une taille supérieure aux pores nucléaires (26 nm) et ne peut donc pas être importée dans le noyau après leur passage dans le cytoplasme. Le trafic vésiculaire des virions se fait le long des microtubules puisqu'une perturbation des microtubules par du nocodazole inhibe l'infection par les papillomavirus (Day *et al.*, 2003). Le transport cytoplasmique le long de ces microtubules nécessite l'utilisation de protéines utilisant l'énergie cellulaire. La protéine L2 des HPV 16 et 33 interagit avec le réseau de microtubules en utilisant la dynéine durant l'entrée dans la cellule (Florin *et al.*, 2006). Le site d'interaction semble être localisé au niveau des 40 derniers aa de la partie C-terminale de la protéine L2.

Au cours de l'infection par les papillomavirus, les VLP semblent entrer dans le noyau sous forme de capsomères de la protéine L1 pour les HPV 11, 16 et 45 (Merle *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2000). Les virus ont développé différents mécanismes pour traverser la membrane nucléaire. L'enveloppe nucléaire, comme les autres membranes cellulaires, est imperméable aux macromolécules. Les protéines contenant un NLS, séquence riche en aa chargés positivement, passent à travers les pores nucléaires pour atteindre le noyau (Bastos *et al.*, 1995). Parmi les récepteurs nucléaires figurent les importines α ou caryophérines α qui sont des protéines agissant comme des adaptateurs pour lier des protéines présentant un NLS (Gorlich, 1998).

La protéine L2 possède deux NLS aux extrémités N et C terminales indispensables à l'infectiosité laissant penser que la protéine L2 assure le transport du génome viral vers le noyau (Becker *et al.*, 2003; Darshan *et al.*, 2004; Fay *et al.*, 2004). Les deux NLS semblent

fonctionner en collaboration durant l'infection. Il semble cependant que le NLS de la protéine L2 du BPV 1 situé en position C-terminale soit le site majeur de liaison à l'ADN. La protéine L2, par son NLS situé en C-terminal, fonctionne ainsi comme un adaptateur entre l'ADN viral *via* le NLS C-terminal et la caryophérine α *via* le NLS N-terminal aboutissant au transport de l'ADN vers le noyau et la poursuite de l'infection (Fay *et al.*, 2004). Au niveau nucléaire, la protéine L2 est localisée dans la zone ND10 (nuclear domain 10), constituée majoritairement de PML (Promyelocytic Leukemia Protein) (Day *et al.*, 1998). Cette localisation nucléaire fait intervenir la protéine Hsc70 (*heat shock cognate protein* 70) (Florin *et al.*, 2004) et favoriserait la translocation de la protéine L1 et de la protéine E2 au noyau (Heino *et al.*, 2000). Au niveau des domaines ND10, l'association L2-L1-E2-génome permettrait ainsi l'assemblage des virions (Day *et al.*, 1998).

5.2 Cycle viral

Les HPV génitaux infectent spécifiquement les épithéliums pluristratifiés et ont un cycle viral dépendant de la différentiation cellulaire. Le virus pénètre par l'intermédiaire de microlésions dans la couche basale de l'épithélium. La réplication du génome des HPV se fait en même temps que celle de L'ADN de la cellulle hôte et se déroule en 3 étapes successives (établissement, maintenance et amplification).

La phase d'établissement est non productive et se déroule dans les couches basales de l'épithélium. L'ADN viral, sous forme épisomale, se réplique de façon limitée jusqu'à 50 à 100 copies par cellule. L'activation de la réplication implique une interaction en tandem de la protéine E2 avec la protéine E1 qui se fixe sur une séquence représentant une origine de réplication necessaire et suffisante à la réplication d'un ADN dans les cellules en culture (Demeret *et al.*, 1994). La fixation de E2 aux sites proximaux du promoteur précoce réprime la transcription des gènes E6 et E7 par encombrement stérique, en empêchant la fixation du facteur de transcription cellulaires essentiel à la formation du complexe de pré-initiation de la transcription, tels que les facteurs Sp1 et TBP (« Tata box Binding Protein ») (Demeret *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1994).

La phase de maintien a lieu dans les couches basales et suprabasales et le nombre de copies d'ADN d'HPV reste stable dans les cellules en division. A ce stade, il n'y a toujours pas de production de virions et seules les protéines précoces sont exprimées.

La phase d'amplification est quant à elle associée à une phase productive. Cette étape est étroitement liée à la différentiation des cellules épithéliales. Les protéines de capside ainsi que la protéine E4 sont exprimées. La protéine E4 va favoriser la libération des virus *via* la desorganisation de la lamina nucléaire. Les HPV n'étant pas des virus lytiques, ils profitent de la desquamation naturelle des cellules pour être libérés dans le milieu extérieur (Flores & Lambert, 1997) (Figure 18).

Les papillomavirus HR possède la capacité par l'intermédiaire des protéines E6 et E7 d'immortaliser et de transformer des cellules, ces protéines sont les seules à être constamment exprimées dans les tumeurs du col de l'utérus (Song *et al.*, 1999). Le pouvoir transformant et immortalisant des HPV HR est étoitement lié à l'état physique du génome viral. L'intégration est un évènement important du processus de carcinogénèsse, mais constitue une impasse biologique pour le virus, car une fois son matériel génétique intégré, il ne peut plus avoir de cycle complet de multiplication (Popescu & DiPaolo, 1990). La linéarisation du génome intervient le plus souvent au niveau de la POL E1/E2 (Baker *et al.*, 1987; Shirasawa *et al.*, 1987). La rupture du cadre de lecture de la protéine E2 entraîne une perte d'expression de la protéine E2, et de la régulation de l'expression des gènes précoces. L'intégration du génome des HPV semble s'effectuer au hasard dans le génome de la cellule hôte, mais peut également être une conséquence directe de l'instabilité chromosomique et représente un évènement important dans la progression vers le cancer. Plus de 190 sites d'intégration du génome viral ont été décrits et l'ensemble des résultats obtenus au cours des études confirme le caractère aléatoire de l'intégration du génome viral (Wentzensen *et al.*, 2004).

6. PAPILLOMAVIRUS ET CANCER DU COL DE L'UTÉRUS

6.1 Epidémiologie, lésions et cancer

A partir des années 1980, plusieurs études ont confirmé que le risque de développer un cancer du col de l'utérus était étroitement associé à la présence et à la persistance d'un HPV HR (Munoz, 2000; Schiffman & Brinton, 1995; Walboomers *et al.*, 1999; Wallin *et al.*, 1999). Le risque relatif est de 100 chez des sujets porteurs du virus par rapport à ceux qui ne sont pas porteurs (Bosch *et al.*, 1995; Munoz, 2000). Le cancer du col représente le second cancer chez la femme dans le monde et le premier cancer reconnu par l'OMS comme étant attribuable à 100% à une infection par un papillomavirus (WHO, 2005).

Les HPV 16 et 18 sont retrouvés dans 70% des cancer du col de l'utérus, le type 16 étant retrouvé à lui seul dans plus de 50% des cancers du col de l'utérus (Munoz *et al.*, 2003). Dans la majorité des infections, le virus est éliminé naturellement (Figure 19). Les lésions intraépithéliales cervicales ou CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*) sont classées en trois grades selon la proportion de l'épithélium présentant des changements morphologiques. Les CIN de grade 1 correspondent à une désorganisation du tiers inférieur de l'épithélium entrainant une hyperplasie des cellules basales tandis que les grades 2 et 3 correspondent à une modification des deux tiers et de toute l'épaisseur de l'épithélium, respectivement (Richart, 1987) (Figure 20A). Les lésions de type CIN 3 regroupent les dysplasies sévères et les carcinomes *in situ.* En 1988, le système de classification cytologique de Bethesda a été introduit. Dans ce système, actualisé en 2001, les CIN 1 sont classés comme des lésions intraépithéliales de bas grade ou SIL (*Squamous intraepithelial lesion*) tandis que les CIN 2 et 3 sont groupés en SIL de haut grade (Salomon, 1989; Salomon *et al.,* 2002). Il est généralement estimé que 4 à 5 ans sont nécessaires pour l'évolution d'une lésion de type CIN 1 en CIN 3, 9 à 10 ans pour le passage d'un CIN 3 à un cancer invasif subclinique et 4 à 5 ans de plus sont nécessaires pour que le cancer devienne symptomatique. Il est logique de penser qu'il existe un *continuum* dans l'évolution des lésions conduisant au cancer invasif. Cependant, il a été proposé de différencier les condylomes et les CIN 1 qui correspondraient à des lésions cellulaires associées à une réplication complète du virus avec production de virus infectieux. Il existe un *continuum* morphologique CIN 2 – CIN 3 - cancer invasif soutenu par une réplication persistante du virus conduisant à l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte avec pour conséquence, l'absence d'expression de certaines protéines virales comme L1 et L2 et l'expression des oncoprotéines E6 et E7 (Doorbar, 2005) (Figure 20B).

6.2 Stratégies de prévention

6.2.1. Dépistage des lésions précancéreuses

Le dépistage constitue un moyen de prévention secondaire. Les lésions induites par les HPV sont mises en évidence par cytologie, colposcopie. La cytologie est une méthode de dépistage non invasive qui consiste en un frottis cervico-utérin (FCU) des cellules superficielles exfoliées. L'infection par les papillomavirus est caractérisée par la présence de cellules vacuolisées appelées koïlocytes. Ces derniers sont mis en évidence dans les frottis après coloration de Papanicolaou. Afin d'assurer un dépistage efficace, un FCU tous les 3 ans après deux frottis normaux réalisés à 1 an d'intervalle est recommandé à partir de 25 ans et

jusqu'à 65 ans. Par contre, les femmes à risque doivent effectuer un frottis annuel. Dans la population générale, 2 à 7% des frottis présentent une cytologie anormale caractéristique d'une infection par un HPV. Cette méthode présente cependant l'inconvénient d'une faible sensibilité, toutefois son utilisation en dépistage systématique a permis de réduire considérablement l'incidence du cancer du col dans les pays développés (Cuzick *et al.*, 1995). La cytologie en milieu liquide permet un prélèvement représentatif de la zone collectée et des étalements cellulaires de meilleure qualité par rapport au frottis conventionnel. Elle a en particulier permis de réduire de façon significative le nombre de faux négatifs. En France, le dépistage du cancer du col de l'utérus repose sur un dépistage d'initiative individuelle. A l'exception de quelques départements, il n'existe aucun programme organisé.

Suite à un examen cytologique anormal, un examen visant à localiser la lésion du col utérin est réalisé. La colposcopie est une méthode visuelle d'exploration du col avec une loupe binoculaire, permettant d'évaluer l'aspect macroscopique de l'épithélium cervical et la topographie des lésions. Cet examen est indispensable pour effectuer une biopsie et par conséquent aboutir à un diagnostic histologique. On distingue alors les lésions présentant des signes mineurs d'inflammation, les lésions présentant une koïlocytose sans dysplasie et les lésions dysplasiques et néolasiques. C'est la méthode de référence qui permet de donner un diagnostic avec certitude quant au type de lésion.

6.2.2. Détection des HPV

La détection des HPV repose sur la mise en évidence de leur génome par des techniques d'hybridation moléculaire qui utilisent des sondes spécifiques des différents génotypes viraux. Elle est réalisée après extraction de l'ADN tissulaire ou directement sur les lames histologiques. Différents outils de détection peuvent être utilisés en fonction du type de prélèvement (Southern blot, hybridation *in situ*, PCR, hybridation liquide, immunohistochimie, …), permettant de mettre en évidence de l'ADN, des ARN messagers, des protéines. Le Southern blot, couplé à une analyse du polymorphisme de taille des fragments obtenus après coupure de l'ADN viral par une enzyme de restriction, a longtemps été la méthode de référence pour la détection des HPV et leur identification. Cette technique nécessite des quantités relativement importantes d'ADN viral et sa mise en œuvre est complexe. Elle n'est donc pas adaptée au diagnostic virologique de routine. L'hybridation *in situ* de l'ADN d'un HPV avec une sonde spécifique (ADN ou ARN) sur coupes histologiques ou frottis, permet de détecter, dans des koïlocytes ou des cellules atypiques, l'accumulation de l'ADN viral résultant de la multiplication des HPV. La sensibilité de cette technique est faible

(de 20 à 50 copies d'ADN viral par cellule), d'où un nombre élevé de faux négatifs (Brink *et al.*, 2006).

La PCR requiert des étapes préalables d'extraction et de purification d'ADN à partir de cellules épithéliales. La séquence cible recherchée est ensuite amplifiée à l'aide d'amorces consensus ou spécifiques. C'est la technique la plus sensible puisqu'elle permet de détecter jusqu'à une seule copie de génome viral par cellule. Bien que cette haute sensibilité peut parfois poser des problèmes d'interprétations cliniques, le problème majeur des PCR est son risque élevé de contamination, pouvant occasionner des résultats faussement positifs (Cuzick *et al.*, 1999). Actuellement, le développement de biopuces à ADN, tests sensibles et rapides devrait permettre de faire progresser considérablement le diagnostic des infections par les HPV.

Le test *Hybrid Capture* (HC) est basé sur l'hybridation en milieu homogène de sondes d'ARN simple brin non-marqué. La cinétique de réassociation entre les brins d'acide nucléique est favorisée en milieu liquide permettant de compléter plus rapidement la réaction par rapport aux autres tests mentionnés qui utilisent un format de réaction hétérogène. L'hybridation en phase liquide est une technique qui ne nécessite pas de purification de l'ADN. L'ADN présent dans les cellules de frottis (ou de tissu « frais ») est dénaturé, puis mis en présence de cocktails de sondes spécifiques, soit des HPV BR soit des HPV HR. Les hybrides formés sont détectés par une réaction de type ELISA. Cette méthode est sensible, rapide et reproductible. Des trousses commerciales, basées sur ce principe sont utilisées en routine (Clavel *et al.*, 1998; Lorincz, 1996; Terry *et al.*, 2001). Le test HC de première génération était difficile à automatiser et avait une sensibilité et une spécificité sous-optimale. Cette méthode pouvait détecter la présence de 9 génotypes d'HPV à HR (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 et 56) et de 5 génotypes BR (Cuzick *et al.*, 1999), sans identifier spécifiquement le type d'HPV. Le test HC de deuxième génération permet de détecter plus de génotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68). Le format du test permet son automatisation et ainsi son utilisation à grande échelle.

Une nouvelle méthode de détection et de génotypage est le développement des biopuces à ADN des HPV. Cette méthode rapide et sensible utilise la PCR couplée avec l'ADN micro-array et devrait permettre de faire progresser considérablement le diagnostic des infections par les HPV (Iftner *et al.*, 2003; Iftner & Villa, 2003).

Dans la mesure où le portage chronique ou la persistance d'un HPV est le principal facteur de risque de développer un cancer du col de l'utérus, il est nécessaire de détecter de façon répétée l'ADN des HPV pour estimer si une patiente présente un risque réel de développer des

lésions précancéreuses. Par ailleurs, la détection de l'ADN d'HPV associée à la cytologie est très efficace pour identifier, parmi les patientes présentant des anomalies cytologiques mineures, celles qui ont le plus de risque de développer des lésions du col utérin.

De nouvelles approches dans le dépistage sont actuellement évaluées dans lesquelles la place de l'examen cytologique est ré-évaluée. La proportion de « tests HPV » positifs selon le type d'anomalies cytologiques montre qu'il existe une corrélation entre la sévérité de l'anomalie cytologique et la proportion de tests positifs. Plus l'anomalie cytologique est de grade élevé, plus la probabilité de retrouver de l'ADN viral et plus la probabilité d'avoir une lésion histologique augmentent (Clavel *et al.*, 2004; Riethmuller *et al.*, 1999). Cependant, la combinaison de ces 2 analyses (cytologique et virologique) se heurte a des problèmes de coûts et à ce jour, aucun pays européens n'a recommandé cette option de dépistage combiné (Wiener *et al.*, 2007).

De nombreux travaux d'évaluation du test viral en dépistage primaire exclusif sont en cours (Ronco *et al.*, 2006). Cette méthode, s'appuie sur la grande sensibilité du test viral qui permet d'éviter les faux positifs chez les femmes présentant un test viral positif. Les sujets doublement positives (virologie et cytologie) sont invitées en colposcopie.

Une étude de Naucler sur le coût–bénéfice de cette politique de dépistage virologique montre son caractère moins onéreux que la cytologie biennale (Naucler *et al.*, 2007).

6.2.3 Détection des anticorps anti-HPV

La détection des anticorps anti-papillomavirus au cours de l'histoire naturelle de la maladie a été limitée, jusqu'à ces dernières années, par l'absence de bons antigènes pour développer des tests. L'obtention de particules virales recombinantes des papillomavirus a fourni la base pour des tests sensibles et reproductibles de détection de la réponse humorale anti-papillomavirus (Kirnbauer *et al.*, 1994; Le Cann *et al.*, 1995; Sasagawa *et al.*, 1996). La réponse anti-VLP est très largement spécifique de type, malgré la présence de réactions croisées entre les génotypes les plus proches (Combita *et al.*, 2002; Giroglou *et al.*, 2001b; Roden *et al.*, 1996a; Rose *et al.*, 1994). La détection des anticorps anti-VLP est un marqueur de valeur pour les études séro-épidémiologiques et pour mieux connaître l'histoire naturelle de la maladie. Cependant, la détection des anticorps anti-VLP n'est pas un test utilisable pour le diagnostic puisque la détection de ces anticorps est décalée par rapport à l'infection, qui ne sont pas toujours présents et ne persistent pas chez tous les sujets infectés.

7. Antigénicité des protéines de capside de papillomavirus

7.1 Antigénicité de la protéine L1

Les protéines L1 assemblées en VLP induisent un fort titre en anticorps anti-L1. En effet, l'immunogénicité des VLP constituées de la protéine L1 est principalement due à la présence d'un épitope exposé à la surface de la capside, capable d'induire des anticorps neutralisants. Les VLP ont la capacité d'induire l'activation des lymphocytes B et des cellules dendritiques, ce qui fait en fait un très bon immunogène.

Les épitopes induisant ces anticorps ont été identifiés à l'aide de batteries d'anticorps monoclonaux et de mutants de la protéine L1. Les épitopes linéaires sont reconnus par des anticorps non neutralisants et des réactivités croisées peuvent exister entre différents papillomavirus phylogénétiquement proche comme les types 6 et 11, les types 16, 31, 58 et les types 18 et 45 (Christensen *et al.*, 1996a; Christensen *et al.*, 1996b; Combita *et al.*, 2002; Giroglou *et al.*, 2001b; Roden *et al.*, 1996a).

La majorité des épitopes caractérisés au niveau de la protéine L1 sont spécifiques de types et conformationnels (Christensen *et al.*, 1994; Giroglou *et al.*, 2001b; Rose *et al.*, 1994; White *et al.*, 1998; White *et al.*, 1999). Seuls les épitopes conformationnels sont capables d'induire des anticorps neutralisants (Kirnbauer *et al.*, 1992) et ont été identifiés à partir de VLP L1 natives ou de mutants de délétion ou de substitution de boucle. La position de ces épitopes au niveau des boucles antigéniques de la protéine L1 varie selon le type d'HPV (Figure 21).

L'épitope majeur conformationnel de la protéine L1 de l'HPV 16 a été localisé sur la boucle FG (Carter *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 1996a; Sadeyen *et al.*, 2003). Il semblerait cependant que la boucle HI soit également impliquée dans la reconnaissance de cet épitope suggérant ainsi qu'un épitope conformationnel induisant des anticorps neutralisants ne se situe pas sur une seule boucle mais réprésente un épitope discontinu nécessitant la présence de plusieurs boucles (Carter *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2001). La présence de plusieurs boucles antigéniques pour la reconnaissance d'un épitope conformationnel et neutralisant peut également signifier qu'un épitope peut être localisé sur une seule boucle antigénique mais que la bonne conformation de cet épitope nécessite une bonne conformation de la capside et donc l'intégrité d'une ou plusieurs boucles antigéniques. Ainsi pour l'HPV 16, la partie 171-505 a été identifiée comme étant nécessaire à l'induction d'anticorps neutralisants (Christensen *et al.*, 2001). L'épitope majeur conformationnel

représente donc au sein de cette partie un épitope discontinu nécessitant la bonne conformation de la boucle FG (position 266-297) et de la boucle HI (position 339-365).

Un deuxième épitope conformationnel a été localisé sur la boucle BC au niveau d'une phénylalanine en position 50 qui représente un résidu conservé permettant une interaction avec la boucle FG (Christensen *et al.*, 2001). En dehors des boucles, un épitope conformationnel reconnu par l'anticorps neutralisant spécifique de type H16.U4 a été localisé au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine L1 de l'HPV 16 (Carter *et al.*, 2003).

Des études conduisant à l'identification des épitopes de l'HPV 16 ont été réalisées en construisant des mutants de remplacement avec les boucles homologues de l'HPV 11. Ces travaux démontrent qu'une mutation des aa 131 et 132 entraîne une disparition de l'antigénicité des VLP vis-à-vis d'anticorps neutralisants (Ludmerer *et al.*, 1996; Ludmerer *et al.*, 1997) semblant cibler la boucle DE comme porteuse de l'épitope majeur conformationnel neutralisant. Un deuxième épitope conformationnel neutralisant situé au niveau de la boucle HI de la protéine L1 entre les aa 346 et 349 a également été mis en évidence (Ludmerer *et al.*, 2000).

Pour l'HPV 31, un épitope conformationnel a été décrit sur la boucle EF (Carter *et al.*, 2003) de la protéine L1 sur lequel se fixe l'anticorps monoclonal neutralisant H31.A6 (Christensen *et al.*, 1996a; Combita *et al.*, 2002). La boucle FG semble porter un épitope linéaire reconnu par l'anticorps monoclonal H31.D24 et également un épitope conformationnel neutralisant sur lequel se fixe l'anticorps monoclonal H31.F16 (Fleury *et al.*, 2006). De plus, la boucle FG semble porter des épitopes conformationnels reconnus par les anticorps H31.C19 et H31.F7. Ces 2 anticorps réagissent en ELISA vis-à-vis des HPV 16 et 18 pour l'anticorps H31.C19 et des HPV 16, 18 et 58 pour l'anticorps H31.F7. Ce dernier est capable d'induire une neutralisation du type 16. Cette étude est la première mettant en évidence l'existence d'épitope capable d'induire des neutralisations croisées de types phylogéniquement proches au sein de la protéine L1 (Fleury *et al.*, 2006).

Des épitopes linéaires reconnus par des anticorps non neutralisants ont également été identifiés au niveau des différentes régions. L'anticorps H16.I23 reconnait la partie 111-130 au sein de la boucle DE, la région 203-209 au sein de la boucle EF est reconnue par l'anticorps CAMVIR-1 (McLean *et al.*, 1990). Enfin, la région 261-283 au sein de la boucle FG de l'HPV 16 est reconnue par les anticorps monoclonaux Cason 1 (Cason *et al.*, 1989) et H16.J4 (Christensen *et al.*, 1996a). La séquence reconnue par les anticorps Cason 1 et H16.J4 au niveau des aa 279-280 est capable de neutraliser les HPV 31, 33, 35, 45 et le BPV 1.

7.2 Antigénicité de la protéine L2

Les études en modèles animaux ont montré que la protéine L2, tout comme la protéine L1, avait le potentiel d'induire des anticorps neutralisants. Les premières études portent sur l'immunisation de bovins à l'aide de la protéine L2 entière ou de polypeptides produits en bactéries. Les résultats obtenus indiquent que l'immunisation d'animaux à l'aide de la partie 11-200 du BPV 4 permet d'induire la protection après une infection par des virions du BPV 4 (Chandrachud *et al.*, 1995; Jarrett *et al.*, 1991). Des résultats similaires ont également été obtenus après immunisation avec la protéine L2 entière du BPV 4 posant ainsi le principe que contrairement à la protéine L1, les anticorps neutralisants induits après immunisation avec la protéine L2 reconnaissent des épitopes linéaires. Cependant, les titres en anticorps neutralisants obtenus après immunisation avec la protéine L2 du BPV 4 sont inférieurs à ceux obtenus après immunisation avec des VLP constituées de la protéine L1 du BPV 4. La vaccination de lapins à l'aide de la protéine L2 ou de polypeptides de cette protéine induit également la protection après une infection par le CRPV dans ce modèle (Christensen & Kreider, 1991; Lin *et al.*, 1992).

Dans ces deux modèles, la partie N-terminale de la protéine L2, et plus précisément la partie 11-200 est suffisante pour induire une réponse protectrice. En effet, cette partie est très conservée entre les différents types de papillomavirus (Figure 22) et permet l'induction, non seulement d'anticorps capables de neutraliser les types homologues de papillomavirus, mais également des types non inclus dans les préparations vaccinales et plus éloignés phylogénétiquement (Chandrachud *et al.*, 1995). L'induction de neutralisations croisées, contrairement à la neutralisation type spécifique conférée par l'immunisation avec des VLP constituées de la protéine L1, font de la protéine L2 un candidat de choix pour le développement d'un vaccin prophylactique contre la majorité des HPV HR.

L'immunogénicité de la protéine L2 a également été évaluée dans le contexte d'immunisation à l'aide de VLP constituées des protéines L1 et L2 (Breitburd *et al.*, 1995). Au cours de cette étude, l'incorporation de la protéine L2 au sein de la capside permet d'obtenir une protection équivalente à celle obtenue après immunisation de lapins avec des VLP L1 contre les lésions associées au CRPV. La capacité des VLP constituées des protéines L1 et L2 à induire des anticorps neutralisants et cross-neutralisants a également été évaluée (Roden *et al.*, 2000b). Cette étude repose sur l'analyse comparative de sérums de moutons et

de lapins immunisés par des VLP ou de protéines L2 des HPV de types 6, 16 et 18 à induire des anticorps neutralisants et cross-neutralisants. Les HPV 6, 16 et 18 permettent de couvrir les HPV les plus souvent retrouvés lors d'infection par des HPV BR (HPV 6) et HR (HPV 16 et HPV18). De plus, ces 3 types de papillomavirus appartiennent à des genres phylogéniquement différents, à savoir l'espèce alpha-11 pour l'HPV 6, l'espèce alpha-9 pour l'HPV 16 et l'espèce alpha-7 pour l'HPV 18.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence que l'immunisation avec la protéine L2 seule d'un type de papillomavirus est suffisante pour induire des anticorps cross-neutralisants des papillomavirus de types hétérologues et que l'immunisation à l'aide de VLP composées des protéines L1 et L2 ne permet pas d'induire des anticorps cross-neutralisants justifiant ainsi le caractère immunodominant de la protéine L1. Cependant, les titres en anticorps obtenus contre la protéine L2 sont faibles, 100 fois inférieurs à ceux obtenus à l'aide de la protéine L1. Cette protection croisée impliquerait la présence d'épitopes cross-neutralisants sur cette protéine.

Les études visant donc à identifier plus précisément le ou les épitopes induisant une neutralisation croisée se sont ensuite portées sur les papillomavirus humains et plus précisément sur le type 16.

L'analyse de la capacité de 3 anticorps monoclonaux, interagissant avec les régions 69 -81 et 108-120 de la protéine L2 de l'HPV 16, à se fixer sur des capsides composées des protéines L1 et L2 de l'HPV 16 et à neutraliser des PsV les HPV 6 et 16 a permis de mettre en évidence un épitope cross-neutralisant situé au niveau des aa 108 et 120 de la protéine L2 de l'HPV 16 (Kawana *et al.*, 1999; Kawana *et al.*, 2001). L'immunisation de lapins avec une protéine L2 entière du BPV 1 ou avec la protéine L2 présentant la séquence 1-88 a permis de mettre en évidence une autre région de la protéine L2 capable d'induire des anticorps cross-neutralisants. Ces 2 protéines ont été injectées avec de l'adjuvant complet de Freund pour la première injection et incomplet pour les rappels (Pastrana *et al.*, 2005). En comparaison avec la protéine L2 entière qui permet d'induire des anticorps capables de neutraliser les HPV de types 16, 18 et du BPV 1, l'immunisation à l'aide de la partie 1-88 permet d'élargir la neutralisation aux HPV 6, 31 et au CRPV. La différence observée pourrait être due au ciblage d'une zone potentiellement conservée (56-58%) entre les différents papillomavirus testés.

Plus récemment, l'étude de la région 14-144 de la protéine L2 de l'HPV 16 à l'aide de 10 peptides comprenant les régions 14-27, 18-38, 28-42, 56-75, 61-75, 64-81, 90-111, 96-115, 107-122 et 131-144, injectés seuls ou en combinaison, a permis de montrer l'induction d'anticorps cross-neutralisants chez le lapin. Parmi l'ensemble de ces peptides, le peptide 56-

75 est celui qui permet d'induire une cross-neutralisation la plus large avec les types 16, 18, 31 et 58. Cependant, l'immunisation à l'aide des 3 peptides 18-38, 56-75, 96-115 fusionnés permet de neutraliser les types 16, 18, 31 et 58 avec des titres sensiblement plus élevés que le peptide 56-75 seul. Il est donc probable qu'il existe, au sein d'une même protéine L2, plusieurs épitopes capables d'induire la production d'anticorps cross-neutralisants et c'est en synergie qu'ils permettent d'acquérir la capacité à induire la cross-neutralisation la plus large (Kondo *et al.*, 2007).

L'immunisation de lapins avec la séquence N-terminale de la L2 de l'HPV 16 (peptide 11-200) induit la production d'anticorps qui protègent des infections par le ROPV (rabbit oral papillomavirus) et CRPV (Gambhira *et al.*, 2007). Au sein de cette séquence, le peptide 17-36, identifié grâce à l'anticorps monoclonal RG-1 (Figure 8), permet la production d'anticorps neutralisants chez le lapin contre les HPV de types 16 et 18 ainsi que contre les types 5, 6, 45, 52 et 58 mais avec des titres plus faibles.

8. Vaccins prophylactiques anti-papillomavirus

8.1 Résumé des études menées dans les modèles animaux

Du fait de la spécificité d'espèce des papillomavirus et de l'absence de systèmes de réplication *in vitro* permettant leur étude, les essais de vaccinations se sont longtemps cantonnés à 3 modèles animaux (Breitburd & Coursaget, 1999) pour étudier l'efficacité de vaccins prophylactiques contre des papillomavirus : le lapin Cottontail avec le papillomavirus du lapin (CRPV ou ROPV), la vache avec le papillomavirus bovin (BPV 4) et le chien avec le papillomavirus oral canin (COPV). Ainsi, il a été démontré que la vaccination de bovins à l'aide de virions du BPV 4 inactivés au formol induit la protection contre le BPV 4 alors qu'une immunisation basée sur un virus dénaturé n'assure pas de protection. De même, l'injection de virions inactivés du COPV permet de protéger les chiens contre une épreuve virulente homologue. Les succès de la vaccination dans les modèles animaux à l'aide de virus inactivés ont permis de démontrer que la capside conformée des papillomavirus permet d'induire la protection (Bell *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1962; Olson *et al.*, 1959). L'immunogénicité des VLP a également été évaluée dans ces modèles animaux, indiquant que la protéine L1 assemblée sous forme de VLP et non la protéine L1 dénaturée entraîne de

forts titres en anticorps neutralisants uniquement contre les types à partir desquels le vaccin était formulé (Breitburd *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996c; Kirnbauer *et al.*, 1996; Suzich *et al.*, 1995).

Malheureusement, ces études se sont uniquement portées sur des modèles d'infection cutanée ou de la muqueuse orale et aucune étude animale n'a pu porter sur l'étude de papillomavirus infectant les muqueuses génitales du fait de l'absence de modèle (Tableau I).

Néanmoins, les résultats obtenus dans ces différents modèles animaux ont permis d'obtenir les informations suivantes :

- une protection totale au niveau des muqueuses peut être obtenue par immunisation par voie systémique à l'aide de capsides virales recombinantes constituées de la protéine L1 mais aucune protection n'est observée après immunisation avec des VLP dénaturées, malgré une forte production d'anticorps anti-L1.

- la majorité des anticorps neutralisants reconnaissent des épitopes conformationnels et la protection est spécifique de type.

- de faibles doses de VLP sont suffisantes pour induire une protection, même sans adjuvant.

- la présence de la protéine L2 en plus de la protéine L1 dans une VLP n'augmente pas la protection, une protection à 100% étant obtenue avec les VLP constituées de la protéine L1 homologue au virus utilisé pour l'épreuve virulente.

- les capsomères constitués de la protéine L1 permettent d'obtenir la même protection que les VLP.

- la réponse à médiation cellulaire n'est pas nécessaire pour la protection contre une infection par les papillomavirus, un transfert passif d'IgG d'animal immunisé à lui seul assurant la protection.

Au cours des années 1990, l'étude des vaccins prophylactiques s'est élargie aux HPV. Les VLP représentent donc le candidat idéal pour un vaccin sûr et efficace puisqu'elles sont produites à partir du gène de la capside d'HPV, donc en absence d'ADN viral, et qu'elles sont non infectieuses.

8.2 Développement des études cliniques de vaccins prophylactiques

Les résultats de vaccination à l'aide de VLP constituées de la protéine L1 obtenus chez l'animal ont permis d'envisager des études cliniques chez l'homme afin de mettre en évidence la protection des vaccins contre les lésions associées aux HPV.

Les essais cliniques de phase I se sont tout d'abord portés sur l'étude de la tolérance et de l'immunogénicité d'un vaccin à base de VLP constituées de la protéine L1 de l'HPV de type 11 (Evans *et al.*, 2001). Cet essai, contre placebo, réalisé chez 65 volontaires, a permis de mettre en évidence la tolérance et l'immunogénicité d'un vaccin adjuvanté à l'aide d'hydroxyde d'aluminium. Des doses allant de 3 à 100 µg de VLP ont été évaluées. Les résultats obtenus montrent que le vaccin est bien toléré, induit de très forts titres d'anticorps neutralisants spécifiques de types ainsi qu'une prolifération lymphocytaire B et T importante. Aucune différence significative n'a été observée entre les doses de 9, 30 et 100 µg de VLP

Ces résultats ont été confirmés lors d'un second essai de phase I avec des VLP d'HPV 16 chez 72 volontaires (Harro *et al.*, 2001). Cet essai a été randomisé en double aveugle, contre placebo avec 3 doses sur 4 mois de 10 ou 50 µg de VLP en combinaison avec de l'hydroxyde d'aluminium ou du MF59, émulsion huile dans eau adjuvante, déjà utilisée dans un vaccin contre la grippe, ou sans adjuvant. Ce vaccin est hautement immunogène, même sans adjuvant, avec des titres 40 fois supérieurs à ceux obtenus au cours d'une infection naturelle pour la plus forte dose. De plus, il y a bien développement d'anticorps neutralisants et les titres de 10240 obtenus sans adjuvant en ELISA, de 10240 avec le MF59 et de 2190 avec de l'hydroxyde d'aluminium sont bien corrélés avec le titre en anticorps neutralisants. Enfin, une dernière étude réalisée sur 40 femmes vaccinées à l'aide de VLP constituées de la protéine L1 de l'HPV 18 contre placébo a permis de confirmer la bonne tolérance et l'immunogénicité de ces candidats vaccins. En effet, les résultats obtenus montrent des titres en ELISA 60 fois supérieurs pour les sujets immunisés par rapport à une infection naturelle par l'HPV de type 18 (Ault *et al.*, 2004).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces 3 études a permis d'envisager l'étude sur la protection induite grâce à ces vaccins. Cette étude a été réalisée en double aveugle contre placebo sur 2392 femmes âgées de 16 à 23 ans vaccinées avec 3 doses de 40 µg reçues au jour 0, après 2 mois et une dernière dose à 6 mois de VLP constituées de la protéine L1 de l'HPV 16 en combinaison avec 225 µg de sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium amorphe. L'objectif premier de cette étude était d'évaluer l'efficacité du candidat vaccin dans la réduction de l'incidence combinée des infections persistantes à l'HPV 16 et des maladies associées. Pour cela, les analyses se sont portées uniquement sur les femmes ne possédant pas d'anticorps anti-HPV 16 et ADN négatives à l'inclusion dans l'étude. Sur les 1533 femmes, les analyses d'efficacité 7 mois après la première injection ont montré qu'aucune femme dans le groupe vacciné n'a développé d'infection persistante par l'HPV 16 contre 41/765 dans le groupe placebo. De plus, parmi ces 41 femmes, 5 ont

développé un CIN 1 et 4 un CIN 2. Cette étude a mis en évidence une efficacité de 100% d'un tel vaccin dans la réduction des infections persistantes dues à l'HPV 16 et des lésions génitales associées (Koutsky *et al.*, 2002).

L'ensemble des données récoltées au cours de ces études ont permis le développement d'essais cliniques de phase II et III de 2 vaccins prophylactiques constitués de VLP formées de la protéine L1 des 2 types d'HPV oncogènes les plus fréquemment retrouvés dans les cancers du col de l'utérus (Tableau II).

8.3 Essai clinique de phases II et II de deux vaccins prophylactiques

8.3.1 Vaccin quadrivalent Gardasil

Le vaccin prophylactique quadrivalent Gardasil® développé par Merck Sharp & Dohme contient des VLP, produites en levures, composées de la protéine L1 des HPV 6, 11, 16 et 18 combinées à du sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium amorphe. Ce vaccin a le potentiel de prévenir 70% des cas de cancers du col de l'utérus, principalement dus aux HPV 16 et 18, et n'a pas comme cible unique le cancer du col de l'utérus puisqu'il a également le potentiel de prévenir 90% des verrues génitales ainsi que les lésions de la vulve et du vagin dont les types 6 et 11 sont les principaux responsables.

L'efficacité de ce vaccin quadrivalent a été évaluée dans 4 essais cliniques (phases II et III) impliquant au total 20 800 femmes âgées de 16 à 26 ans.

Les essais de phase III réalisés en double aveugle contre placebo (The FUTURE II Study Group, 2007a ; 2007b) se sont portés sur 5 455 femmes âgées de 16 à 24 ans issus de 16 pays différents (Garland *et al.*, 2007; Joura *et al.*, 2007; Paavonen *et al.*, 2007). Le calendrier de vaccination comporte une injection du vaccin quadrivalent (20 µg de VLP d'HPV 6, 40 µg de VLP d'HPV 11, 40 µg de VLP d'HPV 16, 20 µg de VLP d'HPV 18) au jour 1, 2 mois après la première injection et 6 mois après la première injection. Les résultats des essais cliniques de phase III pour les séronégatives à l'inclusion vis-à-vis des HPV 6, 11, 16 et 18 et ADN négatives pour ces mêmes types (Garland *et al.*, 2007) montrent une efficacité de 98% dans la prévention des VIN 2+ et des VaIN2+. Des résultats d'efficacité similaires sont obtenus dans la prévention des condylomes et des lésions de la vulve et du vagin associés aux HPV 6 et 11. De plus, ce vaccin assure la prévention des CIN 1, 2 et 3, ainsi que des lésions associées aux HPV de types 16 et 18 avec des valeurs d'efficacité de 100%.

Une autre étude porte sur le suivi d'un petit échantillon de 241 femmes vaccinées, randomisées en double aveugle contre placebo, montre une persistance de forts titres en

anticorps jusqu'à 5 ans indiquant ainsi la mise en place d'une mémoire immunitaire. Néanmoins, les titres en anticorps déclinent à partir du mois 7, atteignent un plateau au mois 24 puis persistent jusqu'au mois 60 (Olsson *et al.*, 2007). Cette mémoire se caractérise par la forte production de lymphocytes B mémoires, induite par le vaccin, qui après ré-exposition à l'antigène vaccinal génère une réponse immune de grande intensité permettant de prévenir l'infection. Une des premières étapes pour la génération d'une mémoire immune par les lymphocytes B implique une intéraction entre les cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques ou les lymphocytes B eux mêmes, avec les cellules T helper (Th) naïves (McHeyzer-Williams & McHeyzer-Williams, 2005). Les lymphocytes Th intéragissent avec les lymphocytes B ce qui induit leur différenciation en cellules plasmatiques dont certaines vont se différencier en cellules B mémoires (Manz *et al.*, 2005).

Le pourcentage de sujets seropositifs pour l'HPV 18 dimimue jusqu'à 65% au mois 60, contrairement aux 3 autres valences vaccinales. Néamoins l'administration d'une dose de rappel permet de retrouver une séropositivité proche de 100% soulignant ainsi l'induction d'une réponse anamnestique.

De plus, une étude complémentaire à celle du FUTURE II de suivi des sujets vaccinés sur 3 ans a porté sur les titres en anticorps induits après vaccination chez 17 599 femmes randomisées en double aveugle contre placebo. Cette étude montre que le vaccin quadrivalent de Merck&Co induit de hauts niveaux d'anticorps chez l'ensemble des personnes vaccinées, avec cependant des variations selon les types inclus dans le vaccin. Ainsi, les niveaux d'anticorps anti-HPV 6, 11 et 16 restent relativement élevés tout au long de l'étude, 2 log supérieurs à l'infection naturelle. L'efficacité mesurée au cours de cette étude est de 100% contre les condylomes induits par les types 6 et 11 et de 98,4% contre les lésions associées au type 16. Une décroissance a cependant été observée pour l'HPV 18 (Figure 23) mais cette baisse n'a pas été corrélée avec une augmentation des lésions associées à l'HPV 18. En effet, seulement un cas sur 8 799 CIN (tous grades confondus) a été observé dans le groupe vacciné contre 60/8800 dans le groupe placebo. Ceci n'est pas surprenant car à l'heure actuelle, le niveau d'anticorps minimum conférant la protection n'a pas encore été défini (Joura *et al.*, 2008).

8.3.2 Vaccin bivalent Cervarix

Le vaccin prophylactique bivalent Cervarix®, développé par GlaxoSmithKline (GSK), se compose des VLP des types 16 et 18 (Harper *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 2006) produites en

système baculovirus/cellules d'insecte. Ce vaccin, contrairement au Gardasil n'a pour cible première que le cancer du col de l'utérus et, comme son concurent, a le potentiel de prévenir 70% des cancers du col de l'utérus. Le protocole d'immunisation comporte 1'injection de 20 µg de VLP L1 de l'HPV 16 et de 20 µg de VLP L1 de l'HPV 18, au jour 0, 1 un mois plus tard et 1 six mois après la première injection. Ce vaccin est administré en combinaison avec du 3-*O*-desacyl-4´-monophosphoryl lipid A (MPL) couplé à de l'hydroxyde d'aluminium (AS04). Les essais cliniques de phase III réalisés en double aveugle contre placebo (Paavonen *et al.*, 2007) ont été réalisés dans le but premier de mesurer l'efficacité du vaccin dans la prévention des infections persistantes dues aux HPV 16 et 18, 12 mois après la dernière injection chez un grand échantillon de sujets anticorps et ADN négatif pour les types inclus dans le vaccin. L'efficacité du vaccin sur la prévention des CIN 1, 2, 3 et des adénocarcinomes associés aux HPV des types 16 et 18 a également été évaluée 3 ans post-vaccination. Cette étude a porté sur la vaccination 18 664 femmes, âgées de 15 à 25 ans, à l'aide du vaccin anti-papillomavirus bivalent ou du vaccin HAVRIX contre l'hépatite A, utilisé comme placebo (Paavonen *et al.*, 2009). Le vaccin bivalent HPV16/18 a montré une protection complète à 12 mois sur les infections persistantes associées aux HPV 16 et 18. De même, une protection totale a été observée contre les CIN 1, 2, et 3 pour tous les sujets anticorps et ADN négatifs au début de l'étude. Le suivi à 6,4 ans a permis de mettre en évidence l'efficacité de ce vaccin dans la prévention des lésions de haut grade associées aux HPV des types 16 et 18 (Romanowski *et al.*, 2009) (Figure 24).

Une étude clinique de phase III, menée en double aveugle contre placebo s'est également portée sur l'effet de la vaccination contre les papillomavirus humains de types 16 et 18 sur des femmes issues de 2 provinces du Costa Rica déjà infectées par un papillomavirus HR. Le but de cette étude a été de mesurer l'effet thérapeutique et donc la clairance virale chez 2189 femmes, vaccinées par 3 doses du vaccin bivalent Cervarix ou par le vaccin Havrix, toutes ADN positives au début de l'étude (Hildesheim *et al.*, 2007). Les résultats ont été obtenus au mois 6, soit après les 2 premières injections et au mois 12, soit après les 3 injections. Le taux de clairance virale a été défini par PCR en mesurant l'absence des types de papillomavirus détectés à l'inclusion chez chaque femme. Aucune différence entre le groupe vacciné et le groupe placebo n'a pu être observée. En effet, les taux de clairance pour les HPV 16 et 18 mesurés à 6 mois dans le groupe vacciné est de 33,4% contre 31,6% dans le groupe placebo. Cette étude a mis en évidence l'utilisation strictement prophylactique des vaccins anti-papillomavirus et donc leur inutilité en vue de traitement d'infections déjà existantes.

8.4 Cross-neutralisation et cross-protection induites par les vaccins commerciaux

L'immunité induite par les 2 vaccins semble être spécifique des types inclus dans le vaccin. Cependant, les fortes homologies de séquences entre certains types font de l'induction d'une immunité cross-protectrice une hypothèse envisageable. En effet, les HPV 31 et 35 ont des séquences relativement proches vis-à-vis de l'HPV 16 et l'HPV 45 et partage une forte homologie vis-à-vis de l'HPV 18, par exemple. Ainsi, la première étude de cross-neutralisation a été menée sur 10 sujets vaccinés à l'aide de 3 doses du vaccin quadrivalent, séronégatifs et ADN négatifs pour les HPV 6, 11, 16, 18 et 45. La capacité des sérums à neutraliser des types de papillomavirus non inclus dans la formulation vaccinale a été testée vis-à-vis des HPV 45 et 31. Les résultats montrent que 6 femmes sur 10 ont développé des anticorps cross-neutralisant l'HPV 45 et 8 femmes sur 10 ont développé des anticorps cross-neutralisant l'HPV 31. Cependant, les titres obtenus contre les types de papillomavirus hétérologues sont inférieurs de 1 à 2 log au titre obtenu pour le type spécifique (Smith *et al.*, 2007a).

L'induction d'une activité cross-neutralisante induite après vaccination par le vaccin bivalent a permis l'étude de la corrélation entre la cross-neutralisation et la cross-protection induites par les deux vaccins commerciaux lors des études cliniques de phases II et III. De plus, ces essais indiquent une protection contre les infections persistantes de 8% contre le type 52, de 79% contre le type 31, 46% contre le type 33 et de 76% contre le type 45 qui ne sont pas inclus dans le vaccin (Paavonen *et al.*, 2009).

Les résultats de cross-protection concernant le vaccin quadrivalent ont été déterminés après un suivi de 3 ans concernant les CIN 2 et 3 et les adénocarcinomes *in situ*. Les résultats sont présentés en termes d'efficacité combinée. Ainsi, le vaccin quadrivalent induit une protection de 62% contre les lésions associées aux types 31 et 45 (IC 95% : 10-85), de 43% contre les types combinés 31, 33, 45, 52, 58 (IC à 95% : 7-66) et de 38% contre 10 types de papillomavirus humains oncogènes (HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) avec IC à 95% de 6-60. Ces 10 génotypes sont responsables de 16% des cas de cancer en Europe et de 22% dans le monde.

De plus, l'ensemble des résultats des essais cliniques de phase III indique une cross-protection contre des types de papillomavirus non inclus dans le vaccin. Ainsi, une efficacité

de 94% a été observée contre les infections persistantes associées au type 45 avec 1 cas détecté sur 528 dans le groupe des vaccinés *vs* 17 cas sur 518 dans le groupe placebo. De même, des résultats de cross-protection ont également été observés contre l'HPV 31 avec 14 cas dans le groupe vacciné vs 30 dans le groupe placebo, indiquant ainsi une efficacité du vaccin bivalent de 54,5% contre le type 31. La protection combinée contre les HPV 16/18/31/45 permettrait de prévenir 80% des cas de cancers associés à ces types dans le monde (Munoz *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007a).

9. Développement de vaccins de seconde génération

Les vaccins de premières générations assurent une protection contre les cancers et les lésions induites par les types inclus dans les 2 vaccins commerciaux. Le Gardasil, de part les valences incluses dans ce vaccin, a en plus le potentiel de protéger contre les condylomes et les verrues génitales. Afin de prévenir l'ensemble des infections par les HPV HR, des vaccins de seconde génération doivent être développés car la protection des vaccins commerciaux contre les types non inclus dans les valences vaccinales reste cantonnée aux HPV HR phylogénétiquement proches.

9.1 Les vaccins à base de peptides synthétiques de la protéine L2

La capacité de la protéine L2 à induire des anticorps cross-neutralisant des papillomavirus hétérologues (Roden *et al.*, 2000b) a conduit des équipes à cartographier les régions de la protéine L2 hautement conservées entre les différents types de papillomavirus afin de trouver une séquence consensus et un mode de présentation de la protéine L2 utilisable comme vaccin pan-HPV.

La recherche de peptides s'est essentiellement concentrée sur la partie N-terminale de la protéine L2 est plus particulièrement sur la région 11-200 car cette partie a été décrite comme étant suffisante pour prévenir l'infection par le BPV 4 chez les bovins (Chandrachud *et al.*, 1995) (Tableau III).

La protéine L2 induisant de faibles titres d'anticorps cross-neutralisants, il apparait nécessaire de coupler ces peptides à de puissants adjuvants. Ainsi, l'immunisation dans différents modèles animaux avec de courts peptides de la protéine L2 couplés à la Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), les protège d'une infection expérimentale homologue au niveau

cutané et muqueux (Embers *et al.*, 2002). L'immunisation intra-nasale de souris à l'aide du peptide 108-120 de la protéine de L2 de l'HPV 16 seule ou en présence de toxine cholérique permet de neutraliser les papillomavirus de types 16 et 11 (Kawana *et al.*, 2001).

Plus récemment, l'utilisation du peptide 17-36 de l'HPV 16 associé à la KLH, permet l'induction d'anticorps neutralisant les HPV des types 5, 6, 16, 18, 31, 45, 52, 58 (Gambhira *et al.*, 2007). Le développement d'un vaccin « auto-adjuvanté » représente jusqu'à présent l'approche vaccinale basée sur un peptide synthétique la plus aboutie. Ce candidat vaccin se compose du peptide 17-36 de la protéine L2 de l'HPV 16 couplé d'une part au Pam2Cys, ligand lipidique du TLR2, et d'autre part à un épitope T helper (P25). Ce système permet l'induction chez la souris d'anticorps neutralisant les HPV des types 16, 18, 45 et le BPV 1 et permet également de neutraliser des pseudovirions de l'HPV 16 et de l'HPV 45 *in vivo* chez la souris. La synthèse chimique de vaccin offre de nombreux avantages face aux systèmes biologiques en termes de préparation, de purification, de reproductibilité, de coût et de stabilité.

9.2 Insertion de peptides L2 au sein de VLP composées de la protéine L1

Des études ont permis de valider l'utilisation de VLP comme capside porteuse afin d'augmenter la réponse immune contre un élément exposé à la surface de ces capsides. L'insertion de peptide de la protéine L2 au sein des boucles antigéniques, exposées en surface des VLP permet une présentation plus directe au système immunitaire. En effet, la répétition de motifs antigéniques au sein d'une structure organisée permet d'augmenter la réponse des lymphocytes B (Chackerian *et al.*, 2002). La nature antigénique de la protéine porteuse doit cependant être conservée, que ce soit au niveau de sa structure ou de l'exposition des boucles antigéniques porteuses des épitopes neutralisants.

Une des stratégies vaccinales repose donc sur l'utilisation d'un peptide de la protéine L2 inducteur d'anticorps neutralisants, inséré dans les boucles antigéniques de la protéine L1.

Ainsi, l'insertion de différents peptides 174-186, 131-143, 81-93, 414-426 de la protéine L2 de l'HPV 16 au sein des boucles antigéniques EF, DE, CD et de l'hélice h4 a permis de mettre en évidence les difficultés rencontrées lors de l'insertion d'un motif peptidique au sein d'une VLP.

En effet, parmi l'ensemble des constructions testées, seules les insertions dans la boucle EF et l'hélice h4 permettent l'obtention de VLP correctement conformées, l'insertion du motif 414-426 au sein de l'hélice h4 permettant d'induire la meilleure réponse immune dirigée contre la protéine L2 chez la souris en présence de l'adjuvent incomplet de Freund (Varsani *et al.*, 2003). L'exposition de peptides L2 au sein des boucles antigéniques d'une VLP apparait donc comme être une bonne solution pour améliorer la présentation de la protéine L2 et ainsi s'affranchir de l'immunodominance de la protéine L1 au sein de la capside. L'insertion de ce même peptide au sein de la protéine L1 de BPV 4 permet l'induction d'anticorps neutralisant des types de papillomavirus hétérologues chez le lapin en présence de l'adjuvent de complet Freund (Slupetzky *et al.*, 2007). De même, l'insertion de différents peptides de la protéine L2 de l'HPV 16, correspondant à la région 14-144, au sein de la boucle HI de la protéine L1 de l'HPV16 permet d'induire des anticorps neutralisant les papillomavirus des types 16, 18, 31, 52, 58 (Kondo *et al.*, 2008). L'insertion du peptide 17-36 de la protéine L2 de l'HPV16 dans la boucle antigénique DE d'une capside L1 du même type en présence hydroxyde d'aluminium et de MPL comme adjuvants permet l'induction, chez le lapin, d'anticorps neutralisant des types de papillomavirus phylogénétiquement éloignés de l'HPV 16 tels que les HPV 18, 31, 45, 52, 58, 6, 11, 5 avec des titres cependant 100 fois inférieurs à ceux observés en présence de l'adjuvant de Freund (Schellenbacher *et al.*, 2009).

Malgré des résultats encourageants, l'utilisation de capsides chimériques, exposant à leurs surfaces un peptide de la protéine L2, semble une solution difficilement réalisable dans le développement de vaccins de seconde génération. En effet, les régions de la protéine L2, pouvant induire des anticorps capables de neutraliser des types de papillomavirus hétérologues, sont variées et l'insertion de motifs peptidiques au sein des boucles antigéniques d'une capside L1 peut entrainer une mauvaise conformation de la capside ou des défauts d'assemblage lors de son expression dans les différents systèmes d'expression eucaryote (Sadeyen *et al.*, 2003). De plus, dans l'ensemble de ces études, les titres en anticorps neutralisants restent en moyenne 100 fois inférieurs à ceux observés après immunisation avec des VLP L1.

9.3 Les vaccins à base de polypeptides recombinants

L'utilisation de peptides de la protéine L2, insérés au niveau de boucles antigéniques de la protéine L1 ou sous forme de peptides synthétiques, induit des titres en anticorps neutralisants supérieurs contre les types proches comparés aux types éloignés. Il semble donc ne pas y avoir de relation directe entre les titres en anticorps obtenus et la distance phylogénétique du type de papillomavirus vis-à-vis du type inclus dans les préparations vaccinales testées dans les différentes études (Pastrana *et al.*, 2005).

Il convient donc de développer des stratégies permettant d'augmenter l'immunogénicité des différentes formes de la protéine L2 actuellement étudiées dans le but d'augmenter la réponse immune contre les types hétérologues.

Les études actuelles s'orientent donc vers la répétition de motifs peptidiques, issus de la protéine L2 d'un ou plusieurs types de papillomavirus, assemblés en une même chaîne et injectés en présence d'un adjuvant de la réponse humorale.

L'étude de la région 1-120 de la protéine L2 de l'HPV 16, découpée en différents peptides 20–38; 28–42; 56–75; 64–81; 96–115; 108–120 répétés 1 à 15 fois et associés à la thiorédoxine *d'E. coli* a permis de montrer que l'immunisation à l'aide du peptide 20-38 répété 3 fois constitue une approche efficace d'immunisation en modèle souris présentant des avantages au niveau de la facilité et du coût de production comparé au développement de peptides monovalents fusionnés à des ligands de TLR (Rubio *et al.*, 2009).

Une stratégie, basée sur l'étude d'une vaccination reposant sur une protéine de fusion construite à partir de la répétition de peptides de la protéine L2 de papillomavirus de types différents, a également été évaluée chez la souris et le lapin (Jagu *et al.*, 2009). Trois différentes constructions produites en bactéries et injectées avec de l'adjuvant de Freund ont été testées :

- la construction 11-200×3 formée des peptides 11-200 de la protéine L2 des HPV 6, 16 et 18
- la construction 11-88×5 formée des peptides 11-88 de la protéine L2 des HPV 1, 5, 6, 16, 18
- la construction 17-36×22 formée des peptides 17-36 de la protéine L2 de 5 papillomavirus cutanée (types 1, 2, 63, 5, 8), 2 papillomavirus BR (6, 11) et des 15 types de papillomavirus HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82).

La construction 17-36×22 induit des titres neutralisants relativement faibles en comparaison avec ceux obtenus pour les constructions 11-200×3 et 11-88×5 et tout particulièrement contre les HPV 6 et 31. Les constructions 11-200×3 et 11-88×5 induisent des titres en anticorps neutralisants supérieurs de 1 à 2 log à ceux obtenus après immunisation de

lapins avec forme monovalente du peptide contre les types 5, 6, 16 et 18. De plus, cette construction permet d'induire des anticorps neutralisant les HPV 31, 45 et 58 qui ne sont pas inclus dans la protéine de fusion avec des titres également supérieurs de 1 à 2 log en comparaison avec la forme monovalente.

Afin de confirmer ces résultats dans un autre modèle animal et effectuer une étude préliminaire de protection, la construction 11-200×3 a été injectée à des souris en présence d'adjuvants utilisables en médecine humaine. Trois adjuvants ont été testés, l'hydroxyde d'aluminium, la séquence immunostimulatrice, 1018, et un dérivé de la saponine, le GPI 0100 seul ou en combinaison. Quatre mois post-vaccinantion, un challenge viral avec des PsV de l'HPV 16 a été effectué et les résultats montrent que la formulation 11-200×3 injectée en combinaison avec du GPI-0100 représente la stratégie vaccinale la plus efficace pour assurer une protection contre une infection par des PsV.

Objectifs

Les travaux développés lors de ma thèse se sont articulés autour de 3 axes complémentaires dont l'objectif final a été l'étude des cross-neutralisations induites d'une part, avec le vaccin quadrivalent anti-HPV, et d'autre part avec différentes préparations vaccinales de seconde génération exploitant les cross-neutralisations induites par la protéine L2.

Le premier aspect de ma thèse porte sur l'analyse de la capacité du vaccin quadrivalent anti-HPV à induire des anticorps cross-neutralisant des types non-inclus dans le vaccin. Cette étude a été réalisée en colaboration avec l'Institut National du Cancer de Bogota dans le cadre d'un projet financé par le comité ECOS-Nord. Pour cela, des PsV des papillomavirus des types 31 et 58 ont été produits afin de développer ou d'améliorer les tests de détection des anticorps neutralisants. La présence d'anticorps cross-neutralisant l'HPV 58 a été recherchée chez 320 femmes Colombiennes issues de la population générale. De plus, la recherche de neutralisations croisées a été effectuée pour les HPV 31 et 58 chez 65 femmes Colombiennes vaccinées avec le vaccin quadrivalent anti-HPV.

La seconde partie s'est orientée sur le développement de vaccins de seconde génération capables d'induire, grâce à la protéine L2, des anticorps cross-neutralisants dirigés contre de nombreux papillomavirus HR. Depuis une décennie, différentes approches ont été considérées, en utilisant soit la protéine L2 entière (Roden *et al.*, 2000b), soit différents peptides contenant des épitopes cross-neutralisants (Gambhira *et al.*, 2007; Pastrana *et al.*, 2005) ou encore des VLP chimériques exposant ces peptides (Kondo *et al.*, 2008; Slupetzky *et al.*, 2007). Ces études ne montrent pas véritablement de résultats concluants en raison des faibles titres d'anticorps induits et de nouvelles approches doivent donc être envisagées. Nous avons donc choisi de tester différents systèmes d'expositions de la protéine L2 entière à une forte densité à la surface de VLP afin d'induire une immunité cross-neutralisante contre les papillomavirus HR. Ces systèmes reposent sur l'interaction entre la streptavidine et la biotine. Un premier système d'exposition repose sur l'interaction spécifique entre un motif peptidique de 8 acides aminés (StrepTagII), et la streptactine correspondant à une streptavidine optimisée pour l'interaction avec le motif StrepTagII (Korndorfer & Skerra, 2002). Ce système permet de présenter la protéine L2, fusionnée à la streptactine, au système immunitaire hors du contexte d'une VLP.

Un système de biotinylation endogène des VLP a également été évalué. Un site de biotinylation, le BAP (Biotine Acceptor Peptide), a été incorporé au niveau des séquences

codant les différentes boucles antigéniques de la protéine L1 de l'HPV16, et de la protéine de capside du virus de l'hépatite B (HBc). Afin d'optimiser la biotinylation des ces protéines, une enzyme bactérienne, BirA (*E. coli* biotin holoenzyme synthetase), a été co-exprimée avec les protéines L1 et HBc en cellules d'insectes (Kaikkonen *et al.*, 2008; Mechold *et al.*, 2005).

Enfin, l'étude des systèmes d'expositions a été complétée par la fixation de la protéine L2 sur des VLP biotinylées chimiquement.

La dernière partie de ma thèse s'inscrit dans une stratégie visant à évaluer différentes préparations vaccinales utilisant plusieurs formes de la protéine L2 pour induire des anticorps neutralisant plusieurs types d'HPV hétérologues. Parmi celles-ci, une stratégie reposant sur l'immunisation avec des pseudovirions composés des protéines L1 et L2 de l'HPV 58 ayant encapsidé le gène de la protéine L2 de l'HPV 31 a également été évaluée. En effet, il a été montré que des pseudovirions de type 31 pouvaient être utilisés comme vecteurs d'un antigène du virus HEV et induisaient des titres d'anticorps supérieurs à ceux induits par des VLP de l'HEV lors de l'immunisation de souris (Renoux *et al.*, 2008). Les anticorps neutralisants induits par ces différentes préparations vaccinales ont été analysés en utilisant les PsV-luciférase des HPV 16, 18, 31 et 58 préalablement construits en système cellulaire et acellulaire.

Matériels et Méthodes

1. Clonage moléculaire

1.1 Gènes optimisés

Les gènes utilisés pour la construction des différents PsV et des VLP ont été optimisés pour l'expression en cellules de mammifère. Cette optimisation consiste à "humaniser" l'usage des codons, augmenter le GC%, supprimer les éléments de régulation négative ainsi que les séquences cryptiques de polyadénylation interne et enfin ajouter une séquence consensus Kozak en amont de l'ATG. L'usage des codons de *Spodoptera frugiperda* étant quasi-similaire à l'usage de codons d'*Homo sapiens*, les gènes optimisés peuvent être efficacement exprimés avec le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte et en cellules de mammifère.
Nous avons utilisé comme matrice les gènes L1 et L2 optimisés des l'HPV 16, 18, 31 ou 58 synthétisés par Geneart (Geneart, Regensburg, GE) pour générer des PsV ou des VLP.

Le gène Streptactine, streptavidine motifiée, a également été utilisé selon le même principe que les autres gènes et synthétisé (Geneart, Regensburg, GE) en respectant les mutations insérées en position 44, 45 et 47 au niveau de la boucle d'intéraction de la streptavidine avec la biotine en respectant les travaux de Vos et Skerra (Voss & Skerra, 1997). Les mutations introduites dans la boucle d'interaction de la streptavidine permettent d'augmenter d'un facteur 100 l'interaction de la Streptactine avec le StrepTagII.

1.2 Amplification des fragments d'ADN

Les PCR sont réalisées dans un volume final de 50 µL en mélangeant 100 ng de matrice, 0,6 µM d'amorces (Eurogentec) (Tableaux IV et V), 0,3 mM de désoxy-ribonucléotide triphosphate (dNTP, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1 mM de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et 1,5 UI de polymérase *Platinum High Concentrated* (Invitrogen) dans le tampon d'amplification adapté 10X (Invitrogen).

1.3 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons à analyser sont mélangés avec 0,1 volume de tampon de charge (0,3% de bleu de bromophénol, 0,3% de xylène cyanol, 50% de glycérol) puis déposés dans un gel d'agarose préparés à 0,8% dans une solution tampon (Tris-acétate 40 mM, EDTA, 1 mM pH7,6) contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium. La migration des fragments d'ADN est effectuée sous 100 mA

constant. Après migration, les fragments sont visualisés sous ultra-violets. Le marqueur de taille (MT) utilisé est de l'ADN du phage λ, digéré par l'enzyme *Hind*III (Invitrogen).

1.4 Purification des fragments d'ADN à partir de gel d'agarose

La purification d'ADN est effectuée à l'aide du kit NucleoTrap (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Le principe repose sur la propriété que possède la silice de se lier sélectivement à l'ADN en présence de hautes concentrations en sels chaotropiques et à pH 7,5.

Le fragment d'ADN d'intérêt est découpé du gel d'agarose à l'aide d'une lame de scalpel de manière à minimiser le volume d'agarose prélevé. Le fragment d'agarose est déposé dans un microtube puis pesé. L'agarose est ensuite dissout en ajoutant 300 µL de solution NT1 pour 100 mg d'agarose. L'addition de 4 µL de matrice de silice/µg d'ADN et l'incubation de la solution à 10 min à 50°C permet la dissolution de l'agarose et la fixation de l'ADN sur la matrice. Une fois le gel totalement dissout, l'échantillon est centrifugé 30 sec à 10000 g. Le culot de matrice de silice est lavé une fois avec 500 µL de solution NT2 et 2 fois avec 500 µL de solution NT3. Entre chaque lavage, l'échantillon est centrifugé 30 sec à 10000 g. A la fin du troisième lavage, la silice est séchée à 25°C pendant 10 à 15 min. L'ADN est ensuite décroché de la matrice de silice à l'aide de 25 à 50 µL de tampon NE (Tris-HCl 5 mM pH 8,5) pendant 10 à 15 min à 25°C. L'échantillon est centrifugé 30 sec à 10000 g. Le surnageant qui contient l'ADN est récupéré, déposé dans un nouveau microtube et placé à 4°C.

1.5 Clonage des produits de PCR dans le vecteur pCR 2.1-TOPO

Le vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) (Figure 25) a été choisi parce qu'il est capable d'intégrer facilement les produits de PCR par "TA cloning" et parce qu'il contient des séquences d'amorces consensus pour le séquençage. L'insertion ne nécessite pas l'intervention d'une DNA ligase. C'est une topo-isomérase fixée sur les extrémités du plasmide qui réalise la ligation. Dans ce vecteur, le site d'insertion est situé dans le gène *lac Z*. Ainsi, l'insertion d'un gène à ce niveau rompt le cadre de lecture du gène *lacZ* ce qui permet la sélection "blanc/bleu".

La ligation des produits de PCR est réalisée 5 min à 20°C dans un volume final de 6 µL contenant 4 µL de produit de PCR, 1 µL de vecteur pCR 2.1-TOPO et 1 µL de "Salt solution".

1.6 Transformation bactérienne

Les bactéries utilisées sont des *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen). Ces bactéries sont rendues compétentes par un traitement au $CaCl_2$. Les bactéries sont cultivées sous agitation

(180 rpm) à 37°C jusqu'en en phase exponentielle de croissance (A_{600nm} = 0,4) dans du milieu Luria-Bertani (LB, tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, Invitrogen), puis centrifugées 10 min à 2500 g à 4°C. Le culot bactérien est remis en suspension dans du $CaCl_2$ 50 mM à 4°C, incubé 30 min dans la glace puis les bactéries sont centrifugées 10 min à 2500 g à 4°C. Les bactéries sont reprises dans une solution de conservation ($CaCl_2$ 50 mM, glycérol 20%) et stockées à - 80°C.

Pour réaliser une transformation bactérienne, 100 µL de bactéries compétentes sont mélangées à 15 µL de produits de ligation ou 6 µL de produits de ligation dans le cas d'un clonage dans le vecteur pCR 2.1-TOPO. Après une incubation de 30 min dans la glace, un choc thermique est réalisé en plaçant l'échantillon 1 min 30 s à 42°C puis 5 min dans la glace. Après addition d'1 mL de milieu LB, les bactéries sont remises en culture à 37°C pendant 1 h puis étalées sur gélose LB/agar (32 g/L, Invitrogen)/Ampicilline (100 µg/mL, Invitrogen).

1.7 Ligation des fragments d'ADN

La ligation des fragments d'ADN est réalisée suivant un rapport molaire vecteur/insert de 1/3 en utilisant 100 ng de vecteur. Les réactions sont effectuées dans un volume final de 30 µL contenant du tampon de ligation 1X (Tris-HCl 30 mM pH 7,8 ; $MgCl_2$ 10 mM ; DTT 10 mM, ATP 1 mM) et 2 unités d'ADN Ligase T4 (Invitrogen). La réaction de ligation est effectuée pendant 16 h à 16°C.

1.8 Mini-preparation d'ADN plasmidique

La purification des plasmides est effectuée par lyse alcaline (Birnboim & Doly, 1979). Des colonies bactériennes issues d'une transformation sont mises en culture dans 2 mL de milieu LB/Ampicilline (100 µg/mL) (Invitrogen, France). Après 16 h de culture à 37°C sous agitation, la culture (1,5 mL) est centrifugée 2 min à 14000 g à 20°C. Le culot bactérien est remis en suspension dans 100 µL de solution I (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucose 50 mM). Les bactéries sont ensuite lysées par 200 µL de solution II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) pendant 5 min à 25°C. L'ADN génomique et les protéines sont ensuite précipités par 150 µL de solution III (NaOAc 3 M pH 5,5). Après une incubation de 15 min dans la glace, l'échantillon est centrifugé 10 min à 14000 g à 4°C. L'ADN plasmidique, présent dans le surnageant, est récupéré puis purifié par un traitement au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (respectivement 25V/24V/1V, Invitrogen) puis centrifugé 10 min à 5000 g à 20°C. Le culot d'ADN purifié est récupéré après une centrifugation de

15 min à 14000 g à 4°C, puis lavé avec 500 µL d'éthanol 70%. Après 5 min de centrifugation à 14000 g à 4°C, le culot est séché puis repris dans 25 µL d'une solution de Rnase (0,1mg/mL, Sigma).

1.9 Séquençage d'ADN

Le séquençage est pris en charge par la société MWG Biotech (Eurofins, Allemagne) en utilisant les amorces M13 Rev (-29) et T7 Forward. La réaction de séquençage s'appuie sur la méthode de Sanger qui correspond en une amplification de l'ADN par le fragment de Klenow en utilisant des dNTP et des didéoxynuléotides (ddNTP) marqués avec un fluorochrome. Les résultats du séquençage sont ensuite contrôlés par une analyse bioinformatique. L'analyse permet de vérifier la présence/absence de mutations dans la séquence grâce à l'utilisation du logiciel de deux logiciels : BlastX ou BlastN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Le premier réalise une comparaison entre la séquence traduite en séquences d'aa avec une base de données protéiques alors que le second compare la séquence nucléotidique à une banque de données.

2. Expression des protéines dans le système d'expression Baculovirus/Cellules d'insecte

2.1 Système d'expression baculovirus/cellules d'insecte

L'utilisation des baculovirus, virus infectant naturellement les cellules d'insecte, reposent sur les travaux de Miller *et al*. qui en 1981, émet l'hypothèse d'utiliser ce virus comme vecteur pour la propagation et l'expression de gènes dans les cellules d'insecte afin de produire des protéines recombinantes. Ce système fait partie, avec la bactérie *E. coli* la levure *S. cerevisiae* et les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), des quatre systèmes les plus couramment utilisés pour la production de protéines recombinantes. L'avantage de ce système est la production de protéines en grande quantité, sans altérer les caractères antigéniques et fonctionnelles de la protéine native tout en assurant la majeure partie des modifications post traductionnelles essentielles à l'activité biologique (glycosylation, phosphorylation, pont disulfure, sécrétion).

Le système utilisé pour générer des baculovirus recombinants est le système BAC-TO-BAC (Invitrogen) (Figure 26). Le plasmide donneur pFastBacDual, contenant le gène d'intérêt est utilisé pour transformer les bactéries DH10Bac. La souche de bactérie *E. coli* DH10Bac héberge le

génome d'un baculovirus sous la forme d'un bacmide qui porte le gène de résistance à la kanamycine et permet la complémentation du gène *lacZ*. Cette souche héberge également un plasmide codant une transposase et contenant le gène de résistance à la tétracycline. La transposase permet la transposition spécifique du gène d'intérêt, cloné dans le plasmide donneur pFastBacDual entre les sites Tn7 R et L, sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine, vers le bacmide au niveau du site mini-*att*Tn7, situé dans le gène *lacZ*. Les bactéries dans lesquelles la transposition a eu lieu seront donc blanches, et celles uniquement transformées apparaissent bleues en présence d'un substrat chromogène comme le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyrannoside) et d'IPTG (iso-propyl-β-D-thiogalactoside) comme inducteur. La présence de l'insert transposé est vérifiée par PCR après purification de l'ADN bacmidique qui est utilisé pour la transfection de cellules Sf21 afin de produire des baculovirus recombinants qui serviront à l'expression de la protéine d'intérêt.

2.2 Transformation des bactéries DH10BAC

Les bactéries DH10Bac sont transformées avec 50 ng de plasmide pFastBacDual recombinant. Après transformation par choc thermique (45 secondes à 42°C puis 2 min dans la glace), la suspension bactérienne est mise en culture dans 900 µL de milieu SOC (peptone 140 20 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 0,19 g/L, glucose 3,6 g/L, Invitrogen) pendant 4 h à 37°C. Cent microlitres de la culture et 100 µL de dilutions (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) de cette culture sont étalés sur du milieu LB/agar additionné de kanamycine à 50 µg/mL (Interchim, Montluçon, France), de gentamicine à 7 µg/mL (Invitrogen), de tétracycline à 10 µg/mL (Sigma Aldrich, France), de X-Gal à 100 µg/mL et d'IPTG (Sigma Aldrich, France) à 40 µg/mL et incubées 48 h à 37°C sous agitation.

2.3 Mini-préparation d'ADN bacmidique

Les colonies blanches obtenues sont mises en culture dans 2 mL de LB agar additionné de kanamycine à 50 µg/mL, de gentamicine à 7 µg/mL, de tétracycline à 10 µg/mL, pendant 36 h à 37°C et sous agitation. Les bactéries contenues dans 1,5 mL de cette culture sont centrifugées 2 min à 14000 g à 20°C et le culot bactérien est remis en suspension avec 300 µL de solution I à 4°C contenant de la RNAse. Les bactéries sont ensuite lysées avec 300 µL de solution II pendant 5 min à 20°C. Ensuite, 300 µL de solution III (4°C) sont ajoutés sous forte agitation. La préparation est ensuite incubée 10 min dans la glace. Le précipité est éliminé après centrifugation de 10 min à

14000 g à 4°C. Le surnageant est récupéré, l'ADN bacmidique est précipité par addition de 800 µL d'isopropanol 100% et incubé 10 min dans la glace. Après une centrifugation de 15 min à 14000 g à 4°C, le culot d'ADN est lavé avec 500 µL d'éthanol 70% puis centrifugé 5 min à 14000 g. Le culot est ensuite séché avant d'être repris par 40 µL d'eau ultra pure.

2.4 Vérification de la présence du gène d'intérêt dans les bacmides

La détection des gènes d'intérêt est réalisée par PCR avec les amorces M13/pUC Forward et M13/pUC Reverse. La réaction d'amplification s'effectue dans un volume final de 50 µL contenant 5 µL d'ADN bacmidique, 0,3 mM de dNTP, 1,5 µL de $MgCl_2$ et 0,5 unité de *Taq* polymérase (Invitrogen) en présence de 5 µL de tampon de réaction 10X. Le programme de PCR utilisé est le suivant : 3 min à 93°C puis 35 cycles d'amplification (45 sec à 94°C, 45 sec à 55°C, 6 min à 72°C) et 10 min à 72°C. La migration électrophorétique des produits de PCR permet de visualiser des fragments d'ADN dont la taille dépend du gène intégré. Les amorces s'hybrident en effet sur le bacmide, de part et d'autre du site de transposition.

Ainsi, un fragment de 300 pb est visible lorsque l'amplification est réalisée à partir d'un bacmide sauvage. Une bande de 2562 pb est observée lorsque l'amplification a été faite à partir d'un bacmide qui a subi une transposition à partir d'un plasmide pFastBacDual vide, et une bande de (2562 pb + X pb) est observée lorsque l'amplification a été faite à partir d'un bacmide qui a subi une transposition à partir d'un plasmide pFastBacDual contenant un gène d'intérêt de X pb.

2.5 Transfection des cellules d'insecte et production des protéines d'intérêt

2.5.1 Les cellules d'insectes

Les cellules utilisées dans le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte sont issues du tissu ovarien de larves du lépidoptère *Spodoptera frugiperda.* Les cellules de la lignée Sf21 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), isolées par Vaughn et al., en 1977, sont cultivées dans du milieu SF 900 II (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dit « complet » supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal (SVF), et additionné de pénicilline à 100 U/ml, de streptomycine à 50 µg/ml (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et de fungizone à 50 µg/ml (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Elles sont cultivées en monocouche dans des boîtes de culture de 25 à 150 cm2 (TPP, ATGC, Marne la vallée, France) à 27°C. Le temps de doublement de ces cellules est de 24 à 48h.

La récolte ne nécessite pas de trypsination du fait de leur faible adhérence sur les boîtes de culture et les cellules sont remises en suspension par grattage à l'aide d'un grattoir à cellules.

2.5.2 Transfection des cellules d'insectes Sf21

Des cellules Sf21 (10^6) sont déposées dans une plaque 6 puits (TPP, ATGC). Après 1h d'incubation, les cellules adhérentes sont lavées à l'aide de milieu SF 900 II (Invitrogen). Cinq microlitres d'ADN bacmidique recombinant, 6 µL de Cellfectin (Invitrogen) et 200 µL de milieu SF 900 II non complet sont mélangés, incubés pendant 45 min à 25°C. Le mélange est ensuite déposé sur les cellules Sf21. Après une incubation de 5h à 27°C, 3 ml de milieu SF 900 II complet sont ajoutés puis le surnageant de culture contenant les baculovirus recombinants est récupéré après 72h de culture à 27°C. Le titre des baculovirus recombinants est ensuite augmenté par des cycles d'infections successives.

2.5.3 Titration des baculovirus et productions des protéines recombinantes.

Un millilitre du surnageant dilué (10^{-4} à 10^{-9}) est ajouté à des cellules Sf21 à 80 % de confluence en plaque de culture 6 puits. Les cellules sont incubées 1 h à 27°C puis le surnageant de culture est remplacé par 3 ml de milieu SF 900 II complet contenant 0,8 % d'agarose en surfusion à 50°C. Une semaine après l'infection, les cellules vivantes sont colorées avec 500 µl d'une solution de MTT (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à 0,5 mg/ml en PBS 1X (Shanafelt, 1991). Après 4 h d'incubation, les plages de lyse apparaissent blanches alors que le reste du tapis cellulaire non infecté est coloré en violet. Le nombre de plages à une dilution donnée permet le calcul du titre des baculovirus en MOI (Multiplicity of Infection).

Pour la production des protéines recombinantes, des cellules Sf21 à 70% de confluence, dans une boite 150 cm² (TPP, ATGC), sont lavées avec du milieu SF 900 II non complet, puis infectées avec 3 mL de baculovirus dans 7 mL de milieu SF 900 II non complet. Après 1h d'incubation à 27°C, 10 mL de milieu SF 900 II complet sont rajoutés. Trois jours post-infection, les cellules sont décollées par grattage puis centrifugées (10 min à 300 g, 4°C). Le culot cellulaire est conservé à –20°C et le surnageant contenant les baculovirus est conservé à 4°C pour les infections ultérieures.

3. Techniques d'analyses des protéines recombinantes

3.1 Purification et analyse des productions de pseudoparticules virales

3.1.1 Pseudoparticules virales des papillomavirus

Le culot de cellules Sf21 contenant les protéines recombinantes est mis en suspension dans 5 ml de PBS 1X contenant 0,5 % de Nonidet P40 (LKM, Bromma, Suède), et 4% d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free, Roche diagnostics, Meylan, France) afin de lyser les cellules. La lyse des membranes plasmiques s'effectue pendant 30 minutes dans la glace. Le lysat est ensuite centrifugé à 300g pendant 20 min à 4°C. Le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 2 ml de PBS 1X avec 4% d'inhibiteurs de protéases (Roche) puis soniqué pour libérer les protéines recombinantes (3 cycles de 15 sec à 60% de la puissance maximale) (Vibracell, Bioblock). L'extrait nucléaire est déposé sur un gradient discontinu de Chlorure de Cesium (CsCl) de densité 1,164, 1,272, 1,338 et 1,380 g/mL (8,5mL de chaque densité). Un gradient de densité linéaire est formé par ultracentrifugation à 27000 rpm pendant 22h à 4°C dans un rotor Beckman SW28 et la partie centrale du gradient est récoltée en 10 fractions de 1,5 mL. La densité de chaque fraction est déterminée au réfractomètre d'Abbé.

Les VLP de l'HPV 16 et de l'HBV présentent une densité de 1,272, ainsi les fractions dont la densité est comprise entre 1,26 et 1,28 sont analysées par SDS-PAGE. Les fractions contenant les protéines d'intérêt sont regroupées, diluées dans du PBS 1X et centrifugées 3h à 28000 rpm dans un rotor Beckman SW28. Les culots sont repris dans 500 µL de NaCl 0,15M puis soniqués 3 fois 5 secondes à la puissance maximale.

3.1.2 Pseudoparticules virales du virus de l'hépatite B

Les pseudocapsides HBc étant retrouvées à la fois dans la fraction nucléaire, mais aussi dans le compartiment cytoplasmique des cellules (Touzé *et al.*, 1999), le culot cellulaire est repris dans 2 ml de PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéase, puis lysé par sonication (3 cycles de 15 sec à la puissance maximale) (Vibracell, Bioblock). L'extrait cellulaire est déposé sur un gradient de CsCl. Le processus de purification est ensuite identique à celui décrit pour les pseudo-capsides de papillomavirus.

3.2 Purification de la protéine de fusion L2-Streptactine

Les protéines de fusion L2SA sont purifiées en utilisant de l'iminobiotine immobilisée sur un gel d'agarose (Thermo Scientific). La fraction nucléaire, à partir des culots de cellules d'insecte Sf21 infectées par les baculovirus recombinants, est obtenue comme précédemment. Des aliquots de 500 µL sont prélevés afin d'être purifiés par affinité.

Cinq cents microlitres de gel sont mis en contact avec l'aliquot de 500 µL et 500 µL de tampon d'accrochage (tampon carbonate d'ammonium 50 mM, pH 11) puis incubé 45 minutes à température ambiante sous agitation constante. Après 5 min de centrifugation à 3000 g, le gel est lavé avec 500 µL de tampon de liaison. Le lavage est répété 4 fois. Les surnageants de lavage sont récupérés et placés à –20°C avant d'être analysés. Enfin, les protéines L2SA sont éluées avec 500 µL de tampon d'élution (tampon acétate d'ammonium, pH4). Trois élutions sont effectuées. Les surnageants contenant la protéine purifiée sont récupérés puis conservé à –20°C.

3.3 Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées à l'aide d'un fluoromètre de paillasse, Qubit™ (Invitrogen). L'appareil est étalonné avec une gamme étalon d'albumine bovine aux concentrations 0, 200 et 400 ng/mL. La Quant-it™ *protein working solution* est réalisée en diluant au 1/200 le fluorochrome (Quant-it™ *protein reagent*) dans du Quant-it™ *buffer*. Les échantillons de la gamme étalon sont ensuite dilués au 1/20 dans la Quant-it™ *protein working solution*. Le fluorochrome va se fixer spécifiquement sur les groupements amines terminaux. Il permet ainsi un marquage quantitatif des protéines présentes dans les échantillons.

Le dosage des protéines est réalisé en diluant les échantillons à tester au 1/200 dans la Quant-it™ *protein working solution*. La lecture est effectuée à 570 nm et les résultats fournis par l'appareil sont exprimés en µg/mL.

3.4 Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide dénaturant

Le gel d'électrophorèse de polyacrylamide dénaturant ou SDS-PAGE est composé d'un gel de séparation à 10% (Tris-HCl 0,56 M pH 8,8, acrylamide-bis acrylamide 10%, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1%, Temed 0,05%) et d'un gel de concentration à 5% (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, acrylamide-bis acrylamide 5%, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 0,1%, Temed 0,1%).

Les protéines sont diluées dans du tampon de charge 3X (Tris-HCl pH 6,8 100mM, SDS 4%, β-mercaptoéthanol 1%, bleu de bromophénol 0,2%, glycérol 20%), puis dénaturées par chauffage à 99°C pendant 10 min, avant d'être séparées dans le gel sous un courant de 50 mA. Les protéines présentes sont visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,25%, méthanol 45% et acide acétique 10%) pendant 30 min puis par décoloration dans une solution de décoloration (méthanol 45% et acide acétique 10%). Un marqueur de poids moléculaire contenant des protéines pré-colorées d'une taille de 6,0 à 181,8 kDa (BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen, France) est utilisé.

3.5 Caractérisation des protéines par immuno-empreinte

Après séparation sur gel de polyacrylamide dénaturant, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert (Hoeffer) 45 min à 40 mA avec du tampon de transfert (40 mM de Tris base, 39 mM de glycine, 0,037% de SDS et 20% de méthanol). La membrane de nitrocellulose est ensuite saturée pendant 1h sous agitation dans du tampon TNT (15 mM de Tris-HCl pH8, 140 mM de NaCl et 0,05% de Tween 20) contenant 5% de lait écrémé. Après 2 lavages de 5 min avec du TNT, la membrane est incubée 1h avec l'anticorps primaire ou un sérum polyclonal (tableau II), dilué au 1/1000 dans du tampon TNT-5% lait écrémé. La membrane est lavée 3 fois avec du TNT-5% lait écrémé puis incubée 1h avec un anticorps anti-Ig couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) selon l'anticorps primaire utilisé, dans le même tampon que précédemment. Après 3 lavages de 5 min dans du TNT-5% lait et deux dans du TNT, la révélation s'effectue avec 5 mL de NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, Promega). La réaction de coloration est arrêtée par lavage avec de l'eau distillée.

3.6 Assemblage des VLP avec les protéines de fusion

3.6.1 Assemblage des VLP L1 STII avec la protéine de fusion L2SA

La fixation de la protéine de fusion sur les VLP L1 16h StrepTagII a été réalisée en mélangeant les VLP avec la protéine de fusion L2-Streptactine dans du tampon d'intéraction (Tris HCl pH 8 100mM, Nacl 1M, Triton X 0,25%) 1h à 25°C sous agitation. Les complexes formés sont séparés des protéines de fusion L2SA libres par une étape de sédimentation à 60000 rpm pendant une heure dans un rotor Beckman SW60. Le culot contenant les complexes est repris dans 250µL de NaCl 0,15M. Après 2 cycles de sonication (2 fois 5 secondes à la puissance maximale),

l'échantillon est dénaturé puis déposé sur gel de polyacrylamide. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose puis analysées par immuno-empreinte avec un anticorps monoclonal spécifique de la protéine L1 (CamVir-1, BD Biosciences) et un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine L2 de l'HPV16 (don de R. Roden, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA).

3.6.2 Assemblage des VLP L1 16-BAP et HBc-BAP avec les protéines de fusion

La fixation de la protéine de fusion sur les VLP L1 16-BAP et HBc-BAP a été réalisée en mélangeant les VLP avec la protéine de fusion L2SA dans du tampon NaCl 0,15M, 1h à 25°C sous agitation. Les complexes formés sont séparés des différentes protéines de fusion L2SA libres par une étape de sédimentation à 60000 rpm pendant une heure dans un rotor Beckman SW60, à 4°. Le culot contenant les complexes est repris dans 250 µL de NaCl 0,15M. Après sonication (2 fois 5 secondes à la puissance maximale), l'échantillon est dénaturé puis déposé sur gel de polyacrylamide dénaturant. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose puis analysées par immuno-empreinte avec un anticorps monoclonal spécifique de la protéine L1 (CamVir-1, BD Biosciences), un sérum de patient infecté par le VHB et un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine L2 de l'HPV 16 (don de R. Roden, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA).

3.6.3 Assemblage des VLP L1 16 biotynylées avec la protéine de fusion L2SA.

Les VLP sont biotinylées par la EZ-LinkTM NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) (Figure 27) selon un rapport massique VLP : biotine de 1 : 2. La réaction de biotinylation est réalisée dans du PBS 1X, 2h dans la glace. Le mélange réactionnel est ensuite dilué dans 30mL de PBS 1X et centrifugé 4h à 28000 rpm à 4°C dans un rotor Beckman SW28. Le surnageant contenant la biotine libre est éliminé et le culot de VLP est lavé par 30mL de PBS 1X. Une nouvelle centrifugation de 1h à 28000 rpm est appliquée. Les culots sont repris dans 200 µL de PBS 1X puis soniqués 3 fois 5 secondes à la puissance maximale.

La réaction de fixation de la L2SA aux VLP biotinylées est réalisée dans du PBS 1X, pendant 1h, à 25°C et sous agitation. Le mélange réactionnel est ensuite dilué dans 30 mL de PBS 1X et centrifugé 4h à 28000 rpm à 4°C dans un rotor Beckman SW28. Le surnageant contenant la L2SA libre est éliminé et le culot de VLP est lavé par 30 mL de PBS 1X. Une nouvelle centrifugation de 1h à 28000 rpm est appliquée. Les culots sont repris dans 200 µL de PBS 1X puis soniqués 3 fois 5 secondes à la puissance maximale.

3.7 Observation des VLP en microscopie électronique

Les échantillons sont déposés sur des grilles de cuivre de 400 meshs, recouvertes d'un film de carbone. Après coloration négative à l'acétate d'uranyle 1,5%, les grilles sont observées au microscope électronique à transmission (Jeol 1400). L'observation est réalisée, sous une tension d'accélération de 80 kV et un grandissement nominal de 50000, à la plateforme de microscopie de l'université de Tours.

3.8 Contrôle de la réactivité des protéines par ELISA

La réactivité antigénique des protéines produites a été vérifiée par ELISA avec des anticorps primaires mono ou polyclonaux spécifiques (tableau VI). Cent microlitres de solution de protéines diluée dans du PBS 1X sont déposées dans les puits d'une plaque à 96 puits (Maxisorp, Nunc) et incubés pendant 18h à 4°C. Les puits sont ensuite saturés avec 200 µl de PBS 1X contenant 1% de sérum de veau fœtal (SVF) pendant 1h à 37°C. Après élimination de la solution de saturation, 100 µL d'anticorps spécifiques dilués dans du tampon de dilution (PBS 10X, SVF 10%, Tween 20 2%) sont ajoutés. Après 1h d'incubation à 45°C et 4 lavages avec du PBS contenant 0,1% de Tween 20, les anticorps fixés spécifiquement sont détectés par l'addition de 100 µL d'anticorps anti-IgG couplés à la peroxydase (Sigma, Aldrich) dilués au 1/1000 dans le tampon de dilution. Après 1h d'incubation à 45°C et 4 lavages, la réactivité des anticorps est révélée par l'addition de 100 µL de solution de substrat contenant 1 mg/mL d'o-phénylène diamine et 0,03% d'H_2O_2 dans du tampon citrate (acide citrique 25 mM, Na_2HPO4 50 mM). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction est arrêtée par addition de 100 µL d'acide sulfurique 4N. L'absorbance est mesurée à 492 nm (Microplate Reader Model 550, Biorad) et le seuil de positivité choisi est de 0,2.

4. Production de PsV en cellules de mammifère et par la technique de dissociation-réassociation

4.1 Système de production en cellules 293FT

Le système utilisé pour la production de PsV en cellules de mammifère repose sur une co-transfection de cellules 293FT à l'aide d'un plasmide encodant les gènes optimisés des protéines de capside L1 et L2 et d'un plasmide rapporteur (Buck *et al.*, 2004). L'utilisation de gènes optimisés permet d'augmenter fortement la production des protéines de capside. Les cellules 293FT sont

capables de produire des concentrations très élevées de protéines du fait de l'expression endogène de l'antigène T du SV40. Le plasmide codant les gènes des protéines de capside ainsi que le plasmide rapporteur contiennent l'origine de réplication du SV40 ce qui permet une forte amplification et une augmentation de la production des protéines. L'assemblage des protéines de capside autour du plasmide rapporteur est limité par un mécanisme de discrimination lié à la taille du plasmide rapporteur à encapsider et ne pourra être effective que si la taille du plasmide rapporteur n'excède pas la taille du génome des papillomavirus à savoir 8 kpb.

4.2 Culture des cellules de mammifère 293FT

Les cellules 293FT (Invitrogen) sont cultivées en flasques de 75 cm² à 37°C en présence de 5 % de CO_2. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Invitrogen) supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen), de pénicilline à 100 U/ml, de streptomycine à 50 µg/ml, de fungizone à 50 µg/ml (Invitrogen), 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma), 0,1mM d'acides aminés non essentiels (Invitrogen) et 500 µg/ml de G418 (Invitrogen). Les cellules à 90% de confluence sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen) puis reprises dans 5 mL de milieu DMEM et centrifugées 10 min à 300 g. Le culot est remis en suspension dans 1 mL de milieu complet puis 7.10^5 cellules sont ajoutées à 10 mL de milieu complet dans une flasque de 75 cm^2.

4.3 Transfection des cellules de mammifère 293FT

Les PsV des HPV 31 et 58 sont produits en utilisant un plasmide pIRES (Figure 28) contenant les gènes L1 et L2 optimisés de type correspondant. Dix-sept µg d'ADN plasmidique pIRESL1/L2 ainsi que 17 µg du plasmide rapporteur pGL3-luciférase (Promega, Charbonnières, France) (Figure 29) ou vaccinal pIRES L2ΔNLS sont mélangés à 72 µL de Fugene6 (Roche, Meylan, France) et 800 µL de milieu DMEM puis incubés 45 min à température ambiante. Une flasque de 75 cm² de cellules 293FT à 70 % de confluence, préalablement lavées avec 5 mL de milieu DMEM, est transfectée par le mélange ADN/Fugene6, addionné de 4 mL de milieu DMEM. Après 5h d'incubation à 37°C, 5 ml de milieu DMEM complet sont ajoutés puis 24h post-transfection les cellules sont trypsinées, reprises dans 5 mL de milieu DMEM et centrifugées 10 min à 300g à 4°C. Le culot de cellules est remis en suspension avec 1 ml de milieu DMEM complet et 500 µL sont répartis dans deux flasques de 75 cm^2 contenant 10 mL de milieu DMEM complet. Les cellules sont trypsinées de la même manière 48 h post-transfection puis centrifugées à 300 g pendant 10 min. Le culot est conservé à -20°C.

4.4 Purification des PsV

Le culot cellulaire est repris dans 2 ml de PBS 1X contenant 0,5 % de NP40 et des inhibiteurs de protéases. La suspension est incubée 30 min dans la glace puis centrifugée à 12000g pendant 20 min à 4°C. Le culot nucléaire est repris dans 500µL de PBS 1X contenant les inhibiteurs de protéases puis lysé par sonication (3 cycles de 15 s à la puissance maximale). Cette suspension correspond au stock de PsV, aucune autre étape de purification n'est effectuée.

4.5 Production des PsV par la technique de dissociation-réassociation.

Les pseudovirions des HPV 16 et 18 sont produits en respectant le protocole de dissociation-réassociation décrit Touzé et Coursaget., 1998 (Touzé & Coursaget, 1998) en y incorporant les modifications décrites par Bousarghin *et al.* (Bousarghin *et al.*, 2009b). Les VLP composées des protéines L1 et L2 des HPV 16 ou 18 sont incubées dans du tampon Tris-HCl 50mM (pH7,5) contenant 20mM de DTT et 1mM d'EGTA, pendant 30 minutes à température ambiante. A cette étape, 10 µg du plasmide pGL3-luc sont ajoutés aux VLP dénaturées. La préparation est ensuite diluée par ajout de concentration croissante de $CaCl_2$ (pour obtenir une concentration finale de 5mM) en présence de 10nM de $ZnCl_2$. Les PsV sont ensuite dialysés contre du PBS 1 X durant toute la nuit et stockés à 4°C avant utilisation.

5. Test de transfert de gènes des PsV en cellules de mammifère COS-7

5.1 Culture des cellules de mammifère COS-7

Les cellules COS-7 (ATCC CRL-1651) (Invitrogen) sont cultivées dans des flasques de 75 cm^2, à 37°C avec 5 % de CO_2 et en présence de milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté de 10% de SVF (Invitrogen), 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma), de pénicilline à 100 U/ml, de streptomycine à 50 µg/ml et de fungizone à 50 µg/ml (milieu complet). Les cellules à 90% de confluence sont trypsinées puis centrifugées de la même manière que les cellules 293FT. Le culot est repris dans 1 mL de milieu DMEM complet et 70 µL sont ajoutés à 10 mL de milieu complet dans une nouvelle flasque de 75 cm^2.

5.2 Pseudo-infection des cellules de mammifères COS-7

Lors du test de transfert de gène avec des PsV-luciférase (PsV ayant encapsidé le plasmide pGL3-luciférase contenant le gène de la luciférase), les cellules COS-7 issues d'une flasque de 75 cm^2 sont dénombrées et 10^4 cellules sont déposées dans chaque puits d'une plaque 96 puits (TPP, ATCG). Après 24h d'incubation à 37°C avec 5 % de CO_2, les cellules sont lavées avec 100 µL de

milieu DMEM. Les PsV sont dilués de 2 en 2 dans 100 µL de milieu DMEM à partir du 1/25 puis transférés dans les puits. Après 3h d'incubation à 37°C, 100 µL de milieu DMEM complet sont ajoutés dans chaque puits.

Lorsque le test de transfert de gène est réalisé sur les PsV58 / L2ΔNLS (PsV ayant encapsidé le plasmide pIRES contenant le gène L2, optimisé et sans séquences NLS, de l'HPV 31), les cellules COS-7 sont déposées dans une plaque 24 puits à raison de 5.10^4 cellules par puits. Après 24h d'incubation à 37°C en présence de 5 % de CO_2, les cellules sont lavées avec 1 mL de milieu DMEM. Ces cellules sont incubées 3h en présence des PsV dilués au 1/25 puis 1 mL de milieu DMEM complet est ajouté. Après 48h d'incubation, les cellules sont récoltées puis centrifugées à 1000g pendant 10 min. La révélation est effectuée par immuno-empreinte sur le culot cellulaire et le surnagenant.

5.2 Détermination de l'activité luciférase

La mesure de l'activité luciférase est réalisée 48h post infection à l'aide du kit Firefly Luciferase 1 Step Assay Kit (Interchim, France). Le milieu est éliminé des puits et 100 µL de solution de révélation sont ajoutés et laissés en contact 15 min à l'obscurité. Les cellules sont mises en suspension et transférées dans une plaque de lecture (Black and White plate, Nunc, ATGC) puis l'activité luciférase est mesurée à l'aide du Luminoskan ascent (Thermo Fisher scientific). Les résultats obtenus sont exprimés en RLU (Relative Light Unit).

6. Détection d'anticorps neutralisants

Afin de détecter la capacité de neutralisation des anticorps, ces derniers sont mis au contact avec des PsV-luciférase et l'inhibition du transfert de gène est testée. Les cellules COS-7 sont déposées en plaque 96 puits à raison de 10^4 cellules par puits. Le stock de PsV est utilisé à la dilution pour laquelle 0,2 RLU est obtenue lors du test de transfert de gène. Les PsV dilués dans du milieu DMEM sont incubés 1h à 37°C en présence des anticorps dilués de 2 en 2 dans 50 µL de milieu DMEM à partir du 1/25 puis le mélange est ensuite déposé sur les cellules COS-7. Le protocole est ensuite le même que pour le test de transfert de gène des PsV portant pGL3-luciférase. Les anticorps sont considérés comme neutralisants lorsqu'ils induisent une inhibition d'au moins 50 % de l'activité luciférase par rapport au résultat obtenu sans aucun anticorps.

7. Immunisation de souris

Des souris femelles BALB/c de 6 semaines (CERJ Janvier, Le Genest St Isle, France) ont été utilisées dans les protocoles expérimentaux d'immunisation. Les protocoles expérimentaux ont été réalisés en respect des bonnes règles d'expérimentation animales et ont été approuvés par le comité régional d'éthique animale (CREAA Centre-Limousin). Le calendrier vaccinal prévoit des injections aux J0, J7, J21.

Pour la détection des anticorps spécifiques, du sang est prélevé au jour 28, au niveau du sinus rétro-orbital. Il est incubé une nuit à température ambiante pour coagulation et le sérum est récupéré après centrifugation à 1000 g pendant 10 min à 25°C. La réactivité des sérums est ensuite analysée par ELISA suivant le protocole du paragraphe 3.8. Le titre retenu est l'inverse de la dernière dilution donnant une absorbance supérieure à 0,2.

8. Analyses statistiques

Les titres moyens géométriques sont comparés afin d'évaluer les réponses ELISA et les réponses neutralisantes. Les résultats de chaque groupe (10 souris par groupe) sont comparés en utilisant le test *t* de Student inclus dans le logiciel XLStat (Addinsoft,Paris, France).

Résultats

A. Détection d'anticorps cross-neutralisants induits par le vaccin quadrivalent anti-HPV

1. Développement des tests de neutralisation

1.1 Production des PsV d'HPV 31 et 58 en système cellulaire

En 2004, un nouveau procédé permettant une production de forts titres de PsV de papillomavirus a été décrit pour l'HPV 16 (Buck *et al.*, 2004). Ce procédé permet l'amélioration de la sensibilité de la détection des anticorps neutralisants (Pastrana *et al.*, 2004). Le laboratoire dispose de PsV de l'HPV 31 construits selon ce procédé et l'objectif de mon travail a été de produire de manière similaire des PsV du papillomavirus humains de type 58, génotype HR non inclus dans les vaccins de première génération, puis d'appliquer cette stratégie à l'HPV 18 afin d'avoir plusieurs types de PsV. Ces PsV ont été développés dans le but d'obtenir des tests de détection des anticorps neutralisants plus sensibles et de les appliquer à l'analyse de l'induction d'anticorps neutralisants dans le cadre d'études séro-épidémiologiques, en lien avec la vaccination prophylactique, ainsi que dans l'analyse des neutralisations croisées induites par des candidats vaccins de seconde génération.

1.1.1 Construction du plasmide pIRES-L1L2 de l'HPV 58

Les gènes L1 et L2 de l'HPV 58 ont été optimisés pour l'expression en cellules de mammifère et synthétisés par Geneart (Regensburg, Allemagne). L'optimisation consiste à remplacer les codons par les codons les plus fréquemment utilisés dans les séquences codantes chez l'Homme. Le GC% est alors augmenté, les séquences potentielles de polyadénylation internes et d'épissage sont supprimées et une séquence Kozak est ajoutée avant le codon d'initiation de la traduction. Ces gènes fournis dans le plasmide pGA4 ont ensuite été sous-clonés dans le plasmide d'expression bi-cistronique pIRES. La séquence codant la protéine L1 est encadrée avec les sites de restrictions *Eco*RI et *Nhe*I et la séquence codant la protéine L2 est encadrée avec les sites de restrictions *Xba*I et *Not*I afin de permettre leur clonage dans les sites de multiclonage A et B du plasmide pIRES, respectivement.

Le plasmide pGA4-L1 58 a été digéré avec les enzymes de restriction *Eco*RI et *Nhe*I et parallèlement, le plasmide pIRES a été linéarisé avec le même couple d'enzyme. Une bande de 6100 pb correspondant au plasmide pIRES linéarisé ainsi qu'une bande d'environ 1500 pb correspondant au gène de la protéine L1 ont été obtenues (résultat non présenté). Ces deux bandes ont été découpées, les ADN purifiés puis ligaturés de manière à insérer le gène L1 dans le site de clonage multiple MCS A du plasmide pIRES. Des bactéries DH5α ont ensuite été transformées avec le produit de ligature. La présence du gène L1 58 dans le plasmide a été vérifiée par restriction en utilisant les enzymes *Eco*RI et *Nhe*I. Les clones positifs présentent un insert de 1500 pb (Figure 30).

Afin d'y insérer le gène L2, le plasmide pIRES-L1 58 a été linéarisé avec les enzymes *Xba*I et *Not*I également utilisées pour libérer le gène L2 du plasmide pGA4. Après électrophorèse, les fragments d'intérêt de 7600 pb et de 1400 pb, correspondant au plasmide pIRES-L1 58 linéarisé et au gène de la protéine L2, ont été découpés, purifiés et ligaturés afin d'insérer le gène L2 dans le site de clonage multiple MCS B du plasmide pIRES. Après transformation de bactéries DH5α et minipréparation d'ADN plasmidique, une restriction par les enzymes *Xba*I et *Not*I permet de confirmer la présence du gène L2 d'une taille de 1400 pb (Figure 30).

*1.1.2 Expression des gènes L1 et L2 de l'HPV 58 en cellules 293*FT

Afin de valider la construction du plasmide pIRES-L1L2 58, l'expression des protéines L1 et L2 a été vérifiée en cellules 293FT. Ces cellules ont été transfectées avec le plasmide puis la présence des protéines L1 et L2 a été détectée par immuno-empreinte dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques. La protéine L1 a été révélée avec l'anticorps cross-réactif CamVir-1. Une bande d'environ 60 kDa correspondant à la taille théorique de la protéine L1 de l'HPV 58 est observée uniquement dans la fraction nucléaire (Figure 31A). À l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-L2, une bande d'environ 85 kDa correspondant à la protéine L2 est également observée dans la fraction nucléaire (Figure 31B). La construction plasmidique pIRES-L1L2 58 peut ainsi être utilisée pour la production de PsV.

1.1.3 Caractérisation des PsV d'HPV 58 L1L2

Des PsV-luciférase de l'HPV31, dont la construction pIRES-L1L2 a été obtenue précédemment au laboratoire, ainsi que ceux de type 58, ont été produits en cellules 293FT par co-transfection du plasmide rapporteur pGL3-luciférase et des plasmides pIRES-L1L2. Des études antérieures réalisées sur les PsV de type 31 avaient montré que la co-expression des protéines de

capside était nécessaire pour l'obtention de PsV, aucun transfert du gène rapporteur n'étant obtenu lorsque les PsV étaient réalisés par co-transfection avec le plasmide pIRES-L1 31 et le plasmide rapporteur pGL3 (Fleury *et al.*, 2008). Ainsi, seules les constructions codant les protéines L1 et L2 ont été testées pour la production de PsV. Afin de déterminer si ces PsV permettent de transférer le gène luciférase qu'ils ont encapsidé, une pseudo-infection a été réalisée sur des cellules COS-7. Les cellules ont été incubées pendant 48h en présence de différentes dilutions de PsV du 1/25 au 1/51200. Les PsV de types 58 et 31 permettent de transduire le gène luciférase dans les cellules COS-7. L'efficacité de transduction obtenue avec des PsV31-luciférase permet d'obtenir 0,2 RLU (valeur utilisée dans des études antérieure (Fleury *et al.*, 2008) pour une dilution de 1/800. Par comparaison, cette valeur de 0,2 RLU est obtenue pour une dilution de 1/10000 avec les PsV de l'HPV 58. Ces derniers ont ainsi une capacité de transduction des cellules COS-7 10 fois supérieure à celle des PsV de l'HPV 31 (Figure 32).

Dans un second temps, afin d'affiner la caractérisation des capacités de transduction de ces nouveaux PsV, le titre infectieux des PsV de types 31 et 58 a été déterminé en cellules COS-7. Pour cela, les PsV ont été dilués de 10 en 10 du $1/10^2$ au $1/10^8$. L'activité luciférase a été révélée 48h post-transfection. Le titre infectieux est alors défini comme la dernière dilution pour laquelle l'activité luciférase observée est supérieure à celle des cellules COS-7 non transduites. Les résultats obtenus confirment la plus forte capacité de transduction des PsV du type 58, ces derniers présentant un titre infectieux de 10^{10}/ ml contre 10^7/ml pour les PsV du type 31 (Figure 33).

1.2 Production et caractérisation des PsV des HPV 16 et 18 obtenus en système cellulaire 293FT

La production de PsV d'HPV 31 et 58 en système cellulaire ayant donné des résultats satisfaisants, nous avons voulu étendre ce système à la production de PsV d'HPV 16 et 18. Les gènes L1 et L2 de ces 2 HPV ont été optimisés puis sous-clonés dans le plasmide pIRES comme décrit précédemment. Des immuno-empreintes ont été réalisées afin de vérifier la production des protéines 16 L1 et L2, 18 L1 et L2 après transfection de cellules 293FT (résultats non montrés). Ces immuno-empreintes indiquent une production efficace des protéines L1 et L2 des HPV 16 et 18 dans les fractions nucléaires. Cependant, aucun transfert de gène n'a été obtenu après transduction de cellules COS-7 à partir des PsV d'HPV 16 et 18. Néanmoins, afin de disposer des PsV pour ces types, nous nous sommes finalement orientés sur le système acellulaire de dissociation-réassociation utilisé auparavant (Bousarghin *et al.*, 2009a).

1.3 Production et caractérisation des PsV d'HPV 18 L1L2 et d'HPV 16 L1L2 obtenus par dissociation-réassociation

La méthode d'obtention de PsV en système acellulaire par dissociation-réassociation a été développée par (Touzé & Coursaget, 1998) puis optimisée (Bousarghin *et al.*, 2009a) afin d'obtenir un système de production de PsV performant bien que moins efficace que le système cellulaire. Des VLP constituées des protéines L1 et L2 de l'HPV 16 et de l'HPV 18 ont été produites en système baculovirus/cellules d'insecte. Afin de former des PsV, ces VLP ont été traitées avec du DTT, réducteur des ponts dissulfures inter-capsomériques, et avec de l'EGTA, chélateur des ions calcium nécessaires à l'assemblage des capsides. Le plasmide pGL3-luc est ajouté à cette étape et les capsomères sont réassemblés sous forme de PsV par dilution de l'agent réducteur et par addition d'ions Ca^{2+} et Zn^{2+}. Dans ces conditions, les capsomères se réassemblent sous forme de PsV contenant le plasmide rapporteur codant la luciférase. Les capacités de transduction du gène de la luciférase de ces PsV ont été testées selon le même protocole que celui utilisé pour les PsV obtenus en système cellulaire. Les résultats obtenus montrent un transfert de gène efficace pour ces 2 types de PsV (Figure 34). Cependant, la dilution pour laquelle une valeur de 0,2 RLU est obtenue est plus faible que celle observée pour les PsV réalisés en cellules de mammifère : 1/500 pour les PsV du type 16 et 1/50 pour ceux du type 18, contre 1/800 et 1/10000 pour les HPV 31 et 58, respectivement.

1.4 Recherche des anticorps cross-neutralisants chez des femmes Colombiennes vaccinées avec le vaccin quadrivalent.

Les anticorps neutralisants ont été recherchés vis-à-vis des HPV 31 et 58 qui sont, après l'HPV 16, les 2 types les plus fréquemment retrouvés, dans la population Colombienne et en Amérique Latine. avec une prévalence respective de 11,2% et 10,9% en Colombie (Molano *et al.*, 2002). Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une mission financée par le comité ECOS-NORD entre l'Institut National du Cancer de Bogota et notre équipe. L'objectif de cette étude est d'évaluer la réponse immune humorale à la fois en termes d'anticorps totaux par ELISA mais également en termes d'anticorps cross-neutralisants à l'aide de PsV. Les travaux réalisés au laboratoire portent essentiellement sur l'analyse de la réponse cross-neutralisante.

Tout d'abord, les PsV de type 58 ont été utilisés pour la détection d'anticorps neutralisants au sein de la population générale colombienne et les PsV31 et 58 pour rechercher les anticorps neutralisants chez des femmes vaccinées avec le vaccin quadrivalent.

Dans un premier temps, les prélèvements sériques de 320 femmes de la population générale colombienne ont été analysés en ELISA vis-à-vis des VLP des HPV des types 16, 18, 31 et 58. Les résultats obtenus par nos partenaires colombiens confirment ceux d'une étude antérieure menée au laboratoire et principalement la forte séroprévalence des HPV HR en Colombie. En effet, 56% de la population générale présente des anticorps contre au moins l'un des papillomavirus HR testé, les anticorps contre l'HPV 16 étant les plus fréquemment retrouvés (21%) suivis par les anti-HPV 58 (20,4%) (Combita *et al.*, 2002).

La recherche d'anticorps neutralisants anti-HPV 58 a également été évaluée (Tableau VII).

Les résultats obtenus indiquent que la prévalence des anticorps neutralisant l'HPV 58 augmente avec le nombre de partenaires sexuels. En effet, 4%, 12% et 38% des femmes ayant eu 1, 2-5 et un nombre ≥5 de partenaires sexuels présentent des anticorps neutralisant l'HPV 58 (Figure 35). La plus forte prévalence en anticorps neutralisant l'HPV 58 est observée chez les femmes appartenant aux tranches d'âge entre 20-24 ans et 30-34 (Figure 36).

La recherche des anticorps anti-HPV 31 et 58 a également été réalisée chez 65 femmes vaccinées avec le vaccin quadrivalent. Les sujets testés sont tous ADN négatifs pour les types 31 et 58 au début de l'étude et tous ont reçus les trois doses prévues dans le schéma vaccinal. L'analyse de cette population inclue la recherche des anticorps neutralisant les HPV 31 et 58 avant la vaccination et 1 mois après la dernière dose (mois 7). Sur les 65 femmes ADN négatives pour les HPV des types 31 et 58, 11 (17%) présentent des anticorps neutralisant l'HPV 58 et 10 (15,4%) présentent des anticorps neutralisant l'HPV 31. Un mois après la dernière injection, 24 femmes (37%) et 29 femmes (45%) présentent des anticorps neutralisant les HPV 58 et 31, respectivement. De plus, la vaccination permet d'induire des anticorps cross-neutralisants l'HPV 58 chez 13 femmes (24%) et l'HPV 31 chez 18 femmes (33%) (Tableau VIII).

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'existence possible d'une corrélation entre la présence d'anticorps neutralisant l'HPV 16 et la présence d'anticorps neutralisant l'HPV 31 et l'HPV 58. En effet, les réponses immunes dirigées contre les HPV 31 ou 58 observées chez les femmes vaccinées semblent être dues à la réponse induite par les VLP de l'HPV 16 incluses dans le vaccin quadrivalent. Nous avons donc comparé le titre en anticorps neutralisants anti-HPV 16 chez les femmes vaccinées initialement anti-HPV 31 et 58 séronégatives et qui ont développé des anticorps neutralisants contre l'un ou ces 2 types de papillomavirus à la fin du calendrier de vaccination. La recherche d'anticorps neutralisants anti-HPV 16 a été effectuée en utilisant les PsV de l'HPV 16 obtenus par la méthode de dissociation-réassociation. Les résultats obtenus montrent une corrélation (R^2= 0,74) entre les titres d'anticorps neutralisant l'HPV 16 et les titres en anticorps neutralisants dirigés contres les HPV 31 ou 58 (Figure 37).

B. Modification des pseudoparticules virales de papillomavirus afin d'exposer à leur surface la protéine mineure de capside L2

Les travaux réalisés dans ce domaine ont porté sur la production de VLP chimériques composées de la protéine L1 de l'HPV 16 ou de la nucléocapside du virus de l'hépatite B capables d'exposer à leur surface la protéine mineure de capside L2 de l'HPV 16. Les matrices utilisées dans cette partie ont, comme pour la production des PsV, été humanisées afin d'augmenter la production de pseudoparticules virales. En effet, l'usage des codons de *Spodoptera frugiperda* étant quasi-similaire à l'usage des codons d'*Homo sapiens,* les gènes optimisés peuvent être efficacement exprimés dans le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte et en cellules de mammifère. Les systèmes d'exposition retenus reposent tous sur l'intéraction entre la steptavidine et la biotine et ont pour but d'augmenter la quantité de protéine L2 exposée au système immunitaire afin d'induire des anticorps capables de neutraliser des papillomavirus hétérologues. Cette partie de travail s'articule autour de 3 systèmes (i) le système StreptagII/ Streptactine, (ii) un système de biotinylation endogène des VLP et (iii) un système de biotinylation chimique des VLP.

B.1 Réalisation de capside chimérique de papillomavirus à l'aide du système d'exposition StrepTagII/Streptactine

Le premier système d'exposition testé repose sur la réalisation d'une capside chimérique en utilisant le système StrepTagII/Streptactine. Ce système a été développé initialement dans le but de purifier de protéines étiquetées avec le motif StrepTagII. Le motif StrepTagII est un peptide de 8 aa, WSHPQFEK, mimant le domaine d'interaction de la biotine avec la streptavidine (Voss & Skerra, 1997). Ce motif a été sélectionné car les travaux réalisés au laboratoire en termes d'insertion de motifs peptidiques dans les boucles antigéniques de la protéine L1 ont montré que la taille du motif à insérer dans les boucles influençait la capacité d'auto-assemblage de la protéine L1 en VLP. La Streptactine correspond à une streptavidine portant 3 mutations dans la boucle d'intéraction avec la biotine en position 45, 46, 47 qui permettent d'augmenter l'affinité avec le motif StrepTagII (Korndorfer & Skerra, 2002). En effet, la constante d'affinité décrite entre le motif StrepTagII et la streptavidine (K_d= 13 µM) n'est pas assez faible pour assurer une fixation stable entre ces 2

composants et les mutations introduites aboutissant à la Streptactine permettent d'obtenir une K_d de 1 µM.

La stratégie retenue est ainsi une capside virale qui se compose de la protéine L1 de l'HPV 16 exposant à sa surface le motif StrepTagII au niveau de la boucle DE de la protéine L1. Ce choix permet de conserver la capacité prophylactique liée à la boucle FG et la forte immunogénicité de cette VLP utilisée dans les vaccins actuels. L'insertion du motif StrepTagII dans une VLP permet une interaction directe avec la protéine L2 fusionnée à la Streptactine.

1. Construction et clonage du gène L1 16h-Streptag II

Le gène L1 16h-Streptag II (L1STII) a été construit par PCR recombinante. Les amorces ont été choisies de façon à introduire la séquence codant le motif StreptagII, au niveau de la boucle DE, entre les aa 140-141 de la protéine L1 de l'HPV 16. Le site d'insertion en position 140-141 a été retenu car il a été décrit que l'insertion de séquences à cette position dans la boucle DE n'altérait pas la formation des VLP (Sadeyen *et al.*, 2003).

Le gène L1STII a été obtenu en 2 étapes de PCR à partir de la matrice plasmidique pIRES-L1L2 16. Lors de la première étape, les amorces 5' L1h*Bam*HI et aval STII ainsi que les amorces amont STII et 3' L1h *Hind*III ont été utilisées pour générer des fragments chevauchants assemblés lors de la deuxième réaction.

Dix cycles de PCR de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 2 minutes à 72°C ont été réalisés. La taille des fragments obtenus, 400 pb et 1100 pb, est compatible avec celles attendues (Figure 38). Ces deux fragments se chevauchent au niveau de leur extrémité 3' et 5' qui codent le motif StrepTagII. L'assemblage des deux fragments préalablement amplifiés, pour former le gène L1STII, a été réalisé en dix cycles de PCR de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 2 minutes 30 secondes à 72°C en utilisant le couple d'amorce 5' L1h*Bam*HI et 3'L1h *Hind*III. Le produit de PCR d'une taille d'environ 1500 pb est inséré dans le plasmide pCR 2.1-TOPO par "TA cloning" et des bactéries DH5α ont été transformées avec ce plasmide. La présence de l'insert a été vérifiée après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (Figure 39A). La présence d'un fragment d'environ 1500 pb pour les clones 1-3 indique que le gène L1STII a été inséré dans le plasmide pCR2.1. Les clones 1 et 2 ont été séquencés et les séquences obtenues confirment la présence de la séquence StrepTagII en position 140-141 pour les 2 clones testés ainsi

que l'absence de mutation non-silencieuse non désirée. Le clone 1 a été sélectionné pour construire le plasmide pFastBacDual-L1STII.

Les plasmides pCR2.1-L1STII et pFastBacDual ont été digérés avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les fragments correspondant au gène L1STII et au plasmide pfastBacDual linéarisé ont été découpés, purifiés, et le gène L1STII a été cloné dans le plasmide PfastBacDual. Des bactéries DH5α ont été transformées avec le produit de ligature puis la présence de l'insert a été vérifiée après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (Figure 39B). La présence d'une bande d'une taille d'environ 1500 pb indique que le gène codant pour la protéine L1STII a bien été inséré dans le plasmide pfastBacDual.

2. Expression de la protéine L1STII en système baculovirus/cellules d'insecte

2.1 Production de baculovirus codant pour la protéine L1STII

Des bactéries DH10Bac ont été transformées avec le plasmide pFastBacDual-L1STII. Les bacmides obtenus ont été analysés par PCR en utilisant les amorces M13/pUC Forward et M13/pUC Reverse afin de vérifier la transposition du gène codant la protéine L1STII. Des produits de PCR d'environ 4000 pb, correspondant à la transposition du pFastBacDual (2562 pb), dans lequel le gène L1STII a été cloné (1500 pb), dans le bacmide ont été observés (résultats non présentés). Un des bacmides recombinants a ensuite été utilisé pour la transfection des cellules Sf21. Trois jours post-transfection, le surnageant de culture a été récolté et utilisé pour l'infection des cellules Sf21 afin de produire la protéine d'intérêt.

2.2 Production et caractérisation de la protéine L1STII

Des extraits cytoplasmiques et nucléaires des cellules Sf21 infectées ont été analysés par immuno-empreinte avec l'anticorps CamVir-1 (Figure 40). Les résultats obtenus indiquent la présence, dans la fraction nucléaire, d'une protéine d'environ 60 kDa, correspondant à la taille théorique de la protéine L1STII.

Les extraits nucléaires de cellules infectées par le baculovirus recombinant L1STII ont été séparés en gradient de CsCl. Douze fractions de 1 ml ont été récoltées et analysées par réfractométrie. La fraction présentant une densité de 1,272 g/ml, densité des VLPs d'HPV, a été observée en microscopie électronique à transmission. L'observation d'une grande quantité de VLP d'un diamètre (50 nm) et d'un aspect semblable à celles obtenues par expression de la protéine L1 sauvage, indique un auto-assemblage efficace de la protéine L1STII (Figure 41). Les VLP ont ensuite été concentrées par ultracentrifugation et leur réactivité a été analysée par ELISA avec

plusieurs anticorps visant à vérifier d'une part, la présence du motif StrepTagII et d'autre part la bonne conformation des principaux épitopes conformationnels inducteurs d'anticorps neutralisants de la protéine L1 de l'HPV 16.

La présence du motif StrepTagII à la surface des VLP a été analysée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-StrepTagII (EMB Biosciences, Darmstadt, Germany). Les résultats obtenus indiquent que le peptide StrepTagII est bien présenté sur les VLP L1STII (Figure 42A).

La bonne conformation des VLP et plus particulièrement de la boucle FG de la protéine L1 a été vérifiée avec deux anticorps monoclonaux neutralisants (H16.V5 , E70) reconnaissant des épitopes conformationnels. Les résultats obtenus montrent que ces épitopes situés sur la boucle FG sont toujours correctement exposés (Figure 42B).

3. Expression de la protéine de fusion L2-Streptactine

3.1 Obtention du gène codant pour la protéine L2

Le gène codant la protéine L2 délétée des séquences NLS carboxy- et amino- terminales a été obtenu par PCR en utilisant les amorces 5' L2 *Bam*HI et 3 'L2 *Sal*I et le plasmide pIRES16 L1L2h comme matrice. Dix cycles de PCR de 94°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 2 minutes ont été réalisés. La taille du fragment obtenu, 1400 pb, correspond à la taille théorique. Ce produit de PCR a été inséré dans le plasmide pCR 2.1-TOPO. Des bactéries DH5α ont ensuite été transformées avec ce plasmide et la présence de l'insert a été vérifiée après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *Bam*HI et *Sal*I (Figure 43). La présence d'un insert d'une taille de 1400 pb pour les clones 1-5 et 7-9 indique que le gène codant pour la protéine L2 a bien été inséré dans le plasmide pCR2.1. Le séquençage n'a pas révélé de mutations non silencieuses non désirées.

3.2 Obtention du gène codant la Streptactine

Le gène codant la Streptactine dont l'usage des codons a été optimisé pour l'expression en cellules d'insecte a été synthétisé par Geneart à partir de la séquence de la Streptavidine. Trois mutations ponctuelles ont été insérées en position 44, 45 et 47 afin d'optimiser l'intéraction entre le peptide StrepTagII et la Streptactine (Voss & Skerra, 1997). Trois sites de restriction ont été insérés : *Bam*HI en 5' pour permettre l'insertion dans le plasmide pFastBacDual, *Sal*I en aval du site *Bam*HI pour permettre la fusion avec la protéine L2 et enfin un site *Hind*III en 3' pour permettre le clonage dans le plasmide pFastBacDual.

Le plasmide pGA4 contenant le gène de la Streptactine ainsi que le plasmide pFastBacDual ont été digérés avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III puis les fragments d'interêt ont été ligaturés. Le produit de ligature a ensuite été utilisé pour transformer des bactéries DH5α. La présence de l'insert a été vérifiée par minipréparation d'ADN plasmidique et digestion enzymatique par *Bam*HI et *Hind*III. Un insert de 480 pb indique que le gène de la Streptactine a bien été inséré dans le plasmide pFastBacDual (Figure 44).

3.3 Construction du plasmide pFastBacDual L2-Streptactine

La fusion en phase du gène L2 avec le gène la Streptactine a été réalisée en clonant le gène L2 dans le plasmide pFastBacDual-Streptactine construit précédemment (Figure 45). Pour cela, le plasmide pCR2.1-L2 et le plasmide pFastBacDual-Streptactine ont été digérés avec les enzymes *Bam*HI et *Sal*I. Les bandes d'une taille de 1400 pb correspondant au gène L2 et de 5718 pb correspondant au plasmide pFastBacDual-Streptactine ont été découpées et les fragments d'ADN purifiés. Le fragment de 1400 pb codant la protéine L2 est ensuite cloné dans le plasmide pFastBacDual-Streptactine. La présence de l'insert est vérifiée par minipréparation d'ADN plasmidique puis digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (Figure 46). La présence d'un insert de 1880 pb dans les clones 1-5 indique la présence du gène codant la protéine de fusion L2-Streptactine (L2SA) dans le plasmide pFastBacDual.

4. Constructions des protéines de fusion L2$_{13\text{-}78}$-SA, L2$_{13\text{-}200}$-SA et L2$_{17\text{-}36}$-SA

La partie N-terminale de la protéine L2 de différents HPV HR (16, 18, 31, 45 et 58) présente des régions très conservées, et notamment entre les aa 13 et 200. De nombreuses études ont montré que cette région permettait l'induction d'anticorps cross-neutralisants. Nous avons sélectionné 3 peptides 17-36, 13-78 et la partie 13-200 afin de les exposer à la surface de protéines porteuses dans le but d'augmenter la réponse immunitaire contre ces peptides décrits comme inducteur de cross-neutralisations larges. Le peptide 13-200 regroupe la partie N-terminale décrite comme inductrice d'anticorps cross neutralisants, le peptide 13-78 a été choisi car il permet de regrouper au sein d'une même séquence peptidique le peptide 17-36 décrit par Gambhira *et al.* et induisant des anticorps neutralisant les HPV 5, 6, 16, 18, 31, 45, 52, 58 et le BPV 1 (Gambhira *et al.*, 2007) et le peptide 56-75 décrit par Kondo *et al.*, (Kondo *et al.*, 2007) induisant des anticorps neutralisant les HPV 16,

18, 31, 52, 58. Enfin, le peptide 17-36 cible spécifiquement l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal RG-1.

4.1 Construction des gènes codant les protéines L2$_{13-78}$-SA et L2$_{13-200}$-SA

Les gènes codant les peptides selectionnés ont été obtenus par PCR à partir de la matrice pIRESL1L2 16 (disponible au laboratoire). Les amorces Amont L2 *Bam*HI et Aval 13-78 ont été utilisées pour amplifier la séquence codant pour le peptide L2$_{13-78}$. Cette séquence, d'environ 200 pb incluse dans l'amorce Aval 13-78, présente les sites de restriction *Bam*HI et *Sal*I en 5' et 3', respectivement. L'amplification du gène codant le peptide L2$_{13-200}$, à l'aide des amorces Amont L2 *BamHI* et Aval 13-200, a permis l'obtention d'un fragment d'environ 560 pb présentant les sites de restriction *BamHI* et *SalI* en 5' et 3', respectivement. Des fragments d'ADN d'environ 200 pb pour la construction L2$_{13-78}$ et de 560 pb pour L2$_{13-200}$ sont obtenus (Figure 47). Ces fragments ont été clonés dans le plasmide pCR2.1-TOPO. Des bactéries DH5α ont ensuite été transformées avec ces plasmides. Une minipréparation d'ADN plasmidique suivie d'une digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Sal*I a permis de vérifier la présence des inserts d'une taille de 200 pb pour le gène L2$_{13-78}$ et de 560 pb pour le gène L2$_{13-200}$ (résultats non présentés). L'absence de mutations non désirées dans les séquences L2$_{13-78}$ et L2$_{13-200}$ a été vérifié par séquençage.

4.2 Construction des plasmides pFastBacDual-L2$_{13-78}$-SA et pFastBacDual-L2$_{13-200}$-SA

Le plasmide pFastBacDual dans lequel est inséré le gène codant pour la streptactine a été linéarisé avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Sal*I. Les deux séquences L2$_{13-78}$ et L2$_{13-200}$, clonées dans le plasmide pCR2.1, ont également été digérées avec ces deux enzymes, puis clonées dans le pFastBacDual-SA au niveau des sites *Bam*HI et *Sal*I. Des bactéries DH5α ont été transformées avec les plasmides pFastBacDual-L2$_{13-78}$-SA et pFastBacDual-L2$_{13-200}$-SA. Après minipréparation d'ADN plasmidique, et digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III, des fragments d'environ 700 pb pour la construction L2$_{13-78}$-SA (Figure 48A), et d'environ 1050 pb pour la construction L2$_{13-200}$-SA (Figure 48B), attestent de la présence des gènes codant les protéines de fusion dans le plasmide navette pFastBacDual.

4.3 Construction du gène L2$_{17-36}$-SA

Le gène codant la protéine de fusion L2$_{17-36}$-SA a été construit en 2 étapes de PCR par extension en 5'de la séquence codant la streptactine. Lors de la première étape de PCR, 10 cycles d'amplification (15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 1 min 30 s à 72°C) ont été réalisés à l'aide des amorces Aval *Hind*III-st et amont1 17/36 sur la matrice pFastBacDual-SA. Elle permet l'addition de 35

nucléotides, codant la partie C-terminale du peptide L2$_{17-36}$ (3'L2$_{17-36}$), au niveau de la partie 5' du gène codant la streptactine. Une seconde étape de PCR de 10 cycles d'amplification (15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 1 min 30 s à 72°C) a été réalisée sur le fragment obtenu lors de la première PCR à l'aide des amorces Aval *Hind*III-st et amont2 17/36. Elle permet l'addition des 25 nucléotides codant la partie N-terminale du peptide L2$_{17-36}$, le site de restriction *Bam*HI ainsi que le codon d'initiation de la traduction ATG, en 5' du gène codant pour la streptactine. Ce produit d'amplification est ensuite cloné dans le plasmide pCR2.1-TOPO. Des bactéries DH5α ont ensuite été transformées avec ce plasmide. Une bande à 540 pb (résultats non présentés) correspondant à la taille attendu du gène L2$_{17-36}$-SA a été visualisée après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *BamH*I et *Hind*III. L'absence de mutation a été vérifiée par séquençage.

4.4 Construction du plasmide pFastBacDual-L2$_{17-36}$-SA

Le gène codant la protéine de fusions L2$_{17-36}$-SA a ensuite été cloné dans le plasmide pFastBacDual. Pour cela, le plasmide pCR2.1-TOPO et le plasmide pFastBacDual ont été digérés par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Le gène a ensuite été cloné dans le plasmide pFastBacDual au niveau de ces sites de restriction. La présence de l'insert d'une taille de 540 pb a été vérifiée par électrophorèse après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (Figure 49).

5. Expression de la protéine de fusion HPV 16 L2-Streptactine en système baculovirus/cellules d'insecte

5.1 Production du baculovirus codant la protéine de fusion L2-Streptactine

La transformation de bactéries DH10Bac est réalisée comme pour la protéine L1STII. Les bacmides obtenus ont été analysés par PCR en utilisant les amorces M13/pUC Forward et M13/pUC Reverse afin de vérifier la transposition du gène codant la protéine de fusion L2SA. La visualisation d'un fragment d'environ 4400 pb (résultat non présenté) confirme cette transposition. Un clone positif est utilisé pour la transfection des cellules Sf21, le surnageant de transfection est ensuite utilisé pour l'infection des cellules Sf21 afin de produire la protéine de fusion L2-Streptactine.

5.2 Expression de la protéine de fusion L2-Streptactine

Les cellules Sf21 infectées avec le baculovirus recombinant codant la L2SA sont récoltées après 3 jours d'infection. Les fractions sub-cellulaires ont été analysées par immuno- empreinte avec un sérum de lapin dirigé contre la protéine L2 de l'HPV 16 (Figure 50). Les résultats obtenus indiquent la présence d'une protéine immunoréactive de 115 kDa dans les fractions nucléaires. La masse observée pour la protéine L2SA diffère de la masse attendue qui correspond à la taille apparente de la protéine L2 (environ 70 kDa) additionnée de la masse de la streptactine (environ 17,6 kDa). Des modifications post-traductionnelles pourraient être à l'origine de cette différence.

5.3 Purification de la protéine de fusion L2-Streptactine

La protéine L2 présente dans les extraits nucléaires des cellules Sf21 infectées avec le baculovirus recombinant est purifiée par affinité grâce à de l'iminobiotine immobilisée sur des billes d'agarose. Après plusieurs lavages et une étape d'élution, la protéine L2SA purifiée ainsi que les produits de lavage ont été analysés par immuno-empreinte avec un sérum polyclonal de lapin anti-L2. Une bande de 115 kDa est visualisée, en bleu de Coomassie et en Western Blot, après la purification. Les lavages ont permis l'élimination des protéines contaminantes présentes dans la fraction nucléaire (Figure 51). La même bande est visualisée dans les surnageants de lavages, ce qui indique une perte de matériel.

6. Expression des protéines L2$_{13\text{-}78}$-SA, L2$_{13\text{-}200}$-SA et L2$_{17\text{-}36}$-SA

L'expression et la production des protéines de fusion ont été réalisées comme décrit précédemment à l'aide du système baculovirus/cellules d'insecte. Les différents plasmides pFastBacDual obtenus ont été utilisés pour transformer des bactéries DH10Bac. La transposition a été vérifiée par PCR à l'aide des amorces M13/pUC forward et M13/pUC Reverse. Une bande à 3100 pb a été visualisée sur gel d'agarose pour la construction L2$_{17\text{-}36}$-SA, une bande à 3250 pb pour la L2$_{13\text{-}78}$-SA, et une bande à 3700 pb pour la L2$_{13\text{-}200}$-SA (résultats non présentés). La production des protéines de fusion est réalisée comme précédemment par transfection de cellules d'insecte à l'aide d'un clone positif pour chacune des constructions.

6.1 Purification des protéines de fusion L2$_{13\text{-}78}$-SA, L2$_{13\text{-}200}$-SA et L2$_{17\text{-}36}$-SA

Les différentes protéines de fusion L2SA ont été purifiées par affinité comme précédemment grâce à leur affinité pour l'iminobiotine. Les protéines purifiées ont ensuite été analysées par

immuno-empreinte. Les résultats obtenus indiquent la présence d'une protéine immunoréactive, d'environ 28 kDa pour la protéine L2$_{13-78}$-SA et d'environ 25 kDa pour la protéine L2$_{17-36}$-SA. La protéine L2$_{13-200}$-SA n'a pas été détectée (Figure 52). Une forte réactivité en ELISA a été mise en évidence à l'aide d'un sérum polyclonal anti-L2 pour les protéines L2$_{17-36}$-SA et L2$_{13-78}$-SA. Les résultats obtenus pour la construction L2$_{13-200}$-SA, non détectée en western-blot, ainsi que sa faible réactivité en ELISA (résultats non présentés), indique une production faible de cette protéine par les cellules. Cette protéine a donc été écartée pour le reste de l'étude.

7. Assemblage des VLP L1STII avec la protéine de fusion L2SA

La protéine L2-Streptactine a été mise en contact avec la VLP StrepTagII par interaction directe en mélangeant 5 µg de VLP L1STII avec 5 µg de la protéine de fusion dans du tampon d'intéraction (Tris HCl pH 8 100 mM, Nacl 1M, Triton X 100 0,25%). La protéine L2SA présente une taille apparente de 115 kDa soit environ deux fois celle de la protéine L1STII (60 kDa). Cependant, la taille réelle de la protéine L2SA est de 50 kDa, ainsi un rapport massique de 1:1 correspond à un rapport molaire d'une protéine L1STII pour une protéine L2SA. Un contrôle négatif d'association a été réalisé avec des VLP constituées de la protéine L1 de l'HPV 16 sauvage. Une étape de centrifugation à 60000 rpm dans un rotor SW60 permet de sédimenter les complexes L1STII/L2SA. Les complexes ainsi formés ont été analysés par immuno-empreinte. Les protéines L1 et L2 ont été détectées respectivement avec l'anticorps monoclonal Camvir-1 et un sérum de lapin anti-L2 (Figure 53). Les résultats obtenus avec l'anticorps anti-L1 indiquent la présence d'une bande de 60 kDa correspondant à la protéine L1 pour les deux échantillons testés ainsi que pour le témoin L1 16 wt. L'étape de sédimentation permet bien de récupérer les VLP. Le résultat obtenu avec l'anticorps polyclonal anti-L2 montre la présence d'une bande de 115 kDa correspondant à la protéine de fusion L2SA uniquement pour les échantillons L1STII. Ainsi, la protéine de fusion L2SA se fixe sur les VLP L1STII.

La capacité des VLP L1STII à fixer la protéine de fusion L2 Streptactine a également été étudiée par ELISA. Cinq rapports protéines L1STII/L2SA ont été envisagés en faisant interagir respectivement 5 µg de VLP L1STII avec 2,5 µg de L2SA (rapport molaire 1:0,5), 5 µg de VLP L1STII avec 5 µg de L2SA (rapport 1:1), 5 µg de VLP L1STII avec 10 µg de L2SA (rapport 1:2), 5 µg de protéine L116h StrepTagII avec 20 µg de L2 Streptactine (rapport 1:4) et 5µg de protéine L1STII avec 40 µg de L2-Streptactine (rapport 1:8). Les complexes formés sont purifiés par

sédimentation comme précédemment, remis en suspension dans du NaCl 0,15M, puis déposés dans les puits d'une plaque ELISA (Figure 54). Les résultats obtenus avec le sérum polyclonal de lapin anti-L2 montrent une augmentation proportionnelle de la réactivité anti-L2 des complexes formés en fonction de la quantité de L2 mise en présence des VLP L1STII. Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas de mettre en évidence une saturation du système avec la protéine L2SA. Le système testé ne semble pas avoir une affinité optimale pour permettre de fixer la protéine L2SA à une forte densité sur les VLP L1STII, des systèmes plus performants présentant des constantes d'affinité plus fortes doivent donc être testés pour permettre une meilleure exposition de la protéine L2.

B.2 Réalisation de capside chimérique de papillomavirus et du virus de l'hépatite B : utilisation d'un système de biotinylation endogène

Le second système d'exposition retenu repose sur la biotinylation endogène de VLP. Nous avons choisi de sélectionner en plus des VLP L1 de l'HPV 16 les VLP du virus de l'hépatite B. Le choix de ce porteur irrelevant permet de s'affranchir des neutralisations et des cross-neutralisations induites par la protéine L1 et d'attribuer directement à la protéine L2 les effets neutralisants observés. Un motif de biotinylation, le BAP (*Biotine Acceptor Peptide*), a été inséré au niveau des séquences codant les différentes boucles antigéniques de la protéine L1 de l'HPV 16 et de la protéine de capside du virus de l'hépatite B (HBc). Ceci conduisant à la biotinylation des protéines L1 et HBc, produites en système baculovirus/cellules d'insecte. Afin d'optimiser la biotinylation des protéines L1 et HBc, une enzyme bactérienne, BirA (*E.coli* biotin holoenzyme synthetase), capable de fixer spécifiquement une biotine sur le motif BAP, a été co-exprimée avec les protéines L1 et HBc en cellules d'insectes.

1. Construction des gènes L1 16h-BAP-DE, L1 16h-BAP-HI et HBc-BAP

Les différentes séquences ont été construites par PCR recombinante en trois étapes au lieu de deux du fait de la taille de la séquence codant le motif BAP. Les deux premières étapes ont permis l'obtention de fragments chevauchants assemblés lors de la troisième étape. Les amorces utilisées permettent d'introduire la séquence codant le motif BAP (GLNDIFEAQKIEWHE) au niveau de la boucle antigénique DE (entre les aa 140 et 141) ou HI (entre les aa 352 et 353) de la protéine L1 de l'HPV 16, ou en remplaçant les aa 76-83 de la boucle antigénique de l'HBc. Ces

différents sites ont été décrits dans la littérature comme n'altérant pas la formation des VLP (Kratz *et al.*, 1999; Sadeyen *et al.*, 2003).

1.1 Construction du gène L1 16h-BAP-DE

La première étape de PCR a été réalisée à l'aides des amorces 5'L1-16-*Bam*HI, 3' BAP DE et 3'L1-16-*Hind*III, 5' BAP DE à partir de la matrice pIRES-L1L2 16 (Figure 55). Dix cycles d'amplification (15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 1 min 30 s à 72°C) ont permis de générer deux fragments. Un fragment d'environ 400 pb (fragment 1) présentant en 5' le site de restriction *Bam*HI et en 3' le début de la séquence BAP (5'BAP). Un second fragment d'environ 1100 pb (fragment 2) présente en 5' la fin de la séquence BAP (3'BAP) et en 3' le site de restriction *Hind*III.
Les amorces 3'L1-16-*Hind*III et 5'START BIOT ont été utilisées lors de la seconde étape de PCR, en prenant pour matrice le fragment 2 obtenu lors de la première étape de PCR. Cette réaction a permis l'addition de la partie 5' de la séquence BAP (5'BAP) sur ce fragment. Le fragment ainsi obtenu (fragment 3) et le fragment 1 généré lors de la première étape de PCR, se chevauchent au niveau de leur extrémité 3'et 5' qui codent le motif BAP.
La dernière réaction de PCR a permis l'assemblage des fragments chevauchants à l'aide des amorces 5'L1-16-*Bam*HI et 3'L1-16-*Hind*III et l'obtention du gène L1 16h-BAP-DE avec les sites de restriction *Bam*HI et *Hind*III en 5'et 3' respectivement. Le produit de PCR d'environ 1500 pb a été inséré dans le plasmide pCR2.1-TOPO. Des bactéries compétentes DH5α ont été transformées par ce plasmide. Une minipréparation d'ADN plasmidique suivie d'une digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III ont permis de vérifier la présence de l'insert (Figure 56). Les clones présentant un fragment d'environ 1500 pb ont été sélectionnés et séquencés. Les séquences obtenues confirment la présence du motif BAP en position 140-141 ainsi que l'absence de mutations non désirées.

1.2 Constructions du gène L1 16h-BAP-HI

Le gène L1 16h-BAP-HI a été construit en trois étapes de PCR comme décrit précédemment pour le gène L1 16h-BAP-DE. La première étape de PCR a été réalisée à l'aide des amorces 5'L1-16-*Bam*HI, 3' BAP HI et 3'L1-16-*Hind*III, 5' BAP HI sur la matrice pIRES L1L2 16. Le fragment 1, d'une taille d'environ 1100 pb présente en 5' le site de restriction *Bam*HI et en 3' le début de la séquence BAP (5'BAP). Le second fragment d'environ 400 pb (fragment 2) présente en 5' la fin de la séquence BAP (3'BAP) et en 3' le site de restriction *Hind*III. La seconde étape de PCR (amorce 3'L1-16-*Hind*III et 5' BAP) a permis l'addition de la partie 5' de la séquence BAP sur le fragment 2 obtenu lors de la première étape de PCR. La dernière réaction de PCR a permis l'assemblage des fragments chevauchants et l'obtention d'un fragment d'environ 1500 pb correspondant au gène L1 16h-BAP-HI présentant les sites de restriction *Bam*HI et *Hind*III en 5' et 3', respectivement

(résultats non présentés). Comme précédemment, le gène L1 16h-BAP-HI a été cloné dans le plasmide pCR2.1-TOPO. Après minipréparition d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III, la présence d'une bande d'environ 1500 pb confirme l'obtention du gène L1 16h-BAP-HI (Figure 56). L'absence de mutation a été vérifiée par séquençage.

1.3 Construction du gène HBc-BAP

Le gène HBc-BAP a été construit en 3 étapes de PCR, comme précédemment pour les gènes L1. La première étape de PCR a été réalisée à l'aide des amorces 5'HBc *Bam*HI, 3' BAP HBc et 3'HBc *Hind*III, 5' BAP HBc sur la matrice pCR2.1-HBc1-183 (présente au laboratoire). Le fragment 1, d'une taille d'environ 240 pb possède en 5' le site de restriction *Bam*HI et en 3' le début de la séquence BAP (5'BAP). Le second fragment d'environ 300 pb (fragment 2) présente en 5' la fin de la séquence BAP (3'BAP) et en 3' le site de restriction *Hind*III. La seconde étape de PCR, réalisée en utilisant le couple d'amorce 5'START BIOT et 3'HBc HindIII a permis l'addition de la partie 5' de la séquence BAP sur le fragment 2 obtenu lors de la 1ère étape de PCR. La dernière réaction de PCR a permis l'assemblage des fragments chevauchants et l'obtention du gène HBc-BAP avec les sites de restriction *Bam*HI et *Hind*III en 5' et 3', respectivement. Un fragment d'environ 540 pb, correspondant à la taille du gène HBc-BAP, a été cloné dans le plasmide pCR2.1-TOPO. Les clones présentant un fragment d'environ 540 pb après digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III ont été sélectionnés (Figure 56). La présence du motif ainsi que l'absence de mutation ont été vérifiées par séquençage.

1.4 Clonage des gènes d'intérêt dans le plasmide pFastBacDual

Les plasmides pCR2.1 recombinants, ainsi que le plasmide pFastBacDual ont été digérés avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les gènes d'intérêts ont ensuite été clonés dans le plasmide pFastBacDual linéarisé. L'analyse de l'ADN plasmidique des transformants par digestion avec *Bam*HI et *Hind*III a permis de mettre en évidence une bande d'environ 1500 pb pour les gènes L1 16h-BAP-DE ou L1 16h-BAP-HI et une bande d'environ 500 pb pour le gène HBc-BAP (Figure 57).

1.5 Construction des plasmides pFastBacDual-hBirA

Le plasmide pFastBacDual présente deux sites de multiclonage et offre donc la possibilité de cloner deux gènes différents et de les exprimer sous le contrôle des promoteurs pPolh et p10. Le gène hBirA, dont la séquence a été humanisée à partir du gène BirA procaryote a été inséré sous le contrôle du promoteur p10.

Le gène codant la protéine hBirA est cloné dans le plasmide pOZ (don de Vasily Ogryzko, Institut Gustave Roussy, Villejuif). Afin d'adapter ses extrémités au site de multiclonage du plasmide pFastBacDual, une PCR de 10 cycles d'amplification (15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 1 min 30 s à 72°C) a été réalisée avec pour matrice le plasmide pOZ et les amorces 5' hBirA *Xho*I et 3' hBirA *Kpn*I. Cette PCR a permis l'amplification du gène codant pour la protéine hBirA. Le gène a ensuite été cloné dans le plasmide pCR2.1-TOPO. Après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes de restrictions *Xho*I et *Kpn*I, une bande de 960 pb correspondant au gène hBirA a été observée et l'absence de mutation a été vérifiée par séquençage (résultats non présentés). En parallèle, les plasmides pFastBacDual-L1 16h-DE-BAP, -HI-BAP et -HBc-BAP ont été linéarisés avec ces deux enzymes. Après clonage du gène hBirA dans les différents pFastBacDual, les plasmides suivants ont été obtenus : hBirA-pFastBacDual-L1 16h-BAP-DE, hBirA-pFastBacDual-L1 16h-BAP-HI et hBirA-pFastBacDual-HBc-BAP. Après digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III, des bandes à 1500 pb et 500 pb ont été visualisées pour les plasmides dans lesquels les gènes L1-BAP ou HBc-BAP ont été clonés. Ces bandes confirment la présence des gènes d'intérêts dans les plasmides (Figure 57).

2. Expression des protéines L1-BAP et HBc-BAP en système baculovirus/cellules d'insecte

2.1 Production de baculovirus codant les protéines L1 16h-BAP-DE, L1 16h-BAP-HI, HBc-BAP et hBirA

Des bactéries DH10Bac ont été transformées avec les différents plasmides pFastBacDual recombinants. La transposition des gènes a été vérifiée par PCR à l'aide des amorces M13/pUC forward et M13/pUC Reverse. Pour la construction L1 16h-BAP-DE, une bande d'environ 4000 pb a été visualisée sur le gel, pour hBirA-L1 16h-BAP-DE, environ 5000 pb, pour L1 16h-BAP-HI, environ 4000 pb, pour hBirA-L1 16h-BAP-HI, environ 5000 pb, pour HBc-BAP, environ 3100 pb et pour hBirA-HBc-BAP, environ 4100 pb (résultats non présentés). Les différents bacmides ont été utilisés pour transfecter des cellules d'insectes Sf21.

2.2 Purification et caractérisation des protéines d'intérêts, analyse de l'auto-assemblage en VLP.

Afin de vérifier la production des protéines L1 et HBc, une analyse en western-blot a été réalisée. La présence d'une bande de 60 kDa pour les protéines L1 (Figure 58) et 21 kDa pour les protéines HBc, détectées respectivement à l'aide de l'anticorps CAMVIR-1 et un sérum de patient

infecté par l'HBV (résultats non présentés), confirme la production des protéines d'intérêts par les cellules infectées par les baculovirus recombinants. Les échantillons ont ensuite été analysés par ELISA afin de tester leur réactivité vis-à-vis d'anticorps reconnaissant les principaux épitopes conformationnels des protéines L1 et HBc.

La bonne conformation des VLP L1 de l'HPV 16 est vérifiée à l'aide de l'anticorps monoclonal neutralisant H16.V5 reconnaissant un épitope conformationnel situé sur la boucle antigénique majeure FG. La faible réactivité observée en ELISA semble indiquer que l'assemblage en VLP des différentes protéines L1, contenant l'insertion BAP, semble être compromis (résultat non présenté). De plus, les échantillons visualisés en microscopie électronique (Figure 59), ne montrent aucun assemblage sous forme de pseudoparticules virales.

La conformation des VLP HBc a été vérifiée, d'une part par ELISA (Figure 60), et d'autre part, en microscopie électronique (Figure 61). Le sérum de sujet utilisé en ELISA peut reconnaître des épitope linéaires et/ou conformationnels. La réactivité en ELISA indique une forte production de la protéine HBc-BAP. Les photographies de microscopie électronique ne présentent pas de structures similaires à des VLP constituées de l'HBc mais un grand nombre de capsomères de petite taille, d'environ 15 nm.

3. Assemblage des structures HBc-BAP avec les protéines de fusion L2-SA

Afin de valider le système de fixation, la protéine L2SA, ainsi que les protéines de fusion L2$_{13\text{-}78}$-SA et L2$_{17\text{-}36}$-SA ont été mises en contact avec les structures HBc-BAP et HBc-BAP biotinylées par l'enzyme BirA. Un contrôle négatif d'association a été réalisé avec les VLP constituées de protéine HBc sauvages (HBc WT). Les interactions ont été réalisées en mélangeant 10 µg d'HBc et 20 µg de protéine de fusion (rapport molaire 1 protéine HBc pour 3 protéine L2SA). Après sédimentation des complexes HBc/L2-SA par ultracentrigation pendant 1h à 60000 rpm dans un rotor SW60 (Beckman), ces derniers ont été analysés en ELISA et en Western-Blot. La détection d'une bande à 21 kDa correspondant à la protéine HBc confirme la sédimentation de ces structures (résultat non présenté). L'analyse par ELISA des complexes formés a montré une forte réactivité vis-à-vis de la protéine L2 pour les interactions L2/HBc-BAP biotinylé par l'enzyme BirA. L'interaction de la protéine L2SA n'a été mise en évidence que pour les particules HBc-BAP obtenues par co-expression avec l'enzyme bactérienne BirA (Figure 62). Le défaut d'assemblage des capsides d'HBc ne nous ont pas permis d'envisager l'utilisation de tels complexes dans un protocole d'immunisation.

B.3 Réalisation de capside chimérique de papillomavirus par biotinylation chimique

Pour palier au défaut d'assemblage des protéines de capside présentant un motif de biotinylation et au manque d'affinité de la streptactine pour le StrepTagII, la dernière stratégie envisagée est de biotinyler chimiquement les VLP de papillomavirus. Malgré le fait que cette biotinylation ne soit pas ciblée, elle permet de conserver la conformation des VLP et d'induire de forts titres en anticorps contre la protéine fixée (Chackerian *et al.*, 2002). La protéine de fusion L2SA pourra se fixer sur ces VLP biotinylées.

1. Formation des complexes VLP-L2SA

1.1 Biotinylation des VLP L1 HPV 16

Le système *EZ-Link® NHS-Biotin Reagents* (455 Da) permet de fixer de manière covalente des biotines sur le groupement amines primaires de la chaine latérale des lysines et sur le groupement amino terminal des protéines. La protéine L1 de l'HPV 16 présente 21 amines primaires dont 12 sont présentes dans les boucles antigéniques externes de la protéine (Chen *et al.*, 2000). La protéine L1 a une taille de 60 kDa, ainsi le rapport massique recommandé VLP : NHS-biotine de 1 : 2 correspond à un rapport molaire en large excès de 260 biotines par protéine L1. L'interaction entre la biotine et les VLP est réalisée en PBS 1X de manière à assurer un pH de réaction de 7,3. Après biotinylation, les VLP sont sédimentées par d'ultracentrifugation à 28000 rpm pendant 4h dans un rotor Beckman SW28 et un lavage du culot est effectué pour éliminer la biotine libre résiduelle.

La biotinylation des VLP L1 de l'HPV 16 est révélée en ELISA grâce à la streptavidine-péroxydase. Un contrôle négatif de fixation de la streptavidine-péroxydase sur des VLP L1 HPV 16 non biotinylées est effectué. Les résultats obtenus montrent que les VLP L1 HPV 16 sont effectivement biotinylées (Figure 63).

Afin d'éliminer la possibilité que la réactivité observée soit due à de la biotine résiduelle, le surnageant de lavage du culot a également été analysé et aucune réactivité n'a été détectée dans le surnageant.

Afin de s'assurer de l'intégrité des VLP après biotinylation, celles-ci ont été observées en microscopie électronique à transmission. Les résultats indiquent que le traitement n'altère pas les VLP (Figures 64A et 64B).

1.2 Fixation de la L2SA sur les VLP L1 HPV 16 biotinylées

La protéine L2SA a été mis en contact par interaction directe dans du PBS 1X en mélangeant la L2SA (élution 1 et 2) avec les VLP biotinylées. Un contrôle négatif d'interaction a été réalisé avec des VLP non biotinylées (VLP L1/16-NB-L2). Les témoins et les complexes VLP HPV16 biotinylées associées à la protéine L2SA (VLP L1/16-B-L2) sont sédimentés par ultracentrifugation à 28000 rpm pendant 4h dans un rotor SW 28 et un lavage du culot est effectué.

L'association des VLP avec la L2SA est analysée par ELISA en utilisant l'anticorps polyclonal de lapin anti-L2 de l'HPV 16. Les résultats obtenus indiquent que les VLP 16/L1-B présentent une réactivité anti-L2 2,5 fois plus élevées que celles des VLP L1/16-NB, la protéine L2SA se fixe donc préférentiellement sur les VLP biotinylées (Figure 65).

L'observation des VLP en microscopie électronique à transmission, après interaction avec la L2SA (Figure 64C) indique que le protocole d'interaction n'altère pas l'intégrité des VLP.

En tenant compte de ces résultats, nous nous sommes ensuite intéressés à caractériser la capacité de la protéine de fusion L2SA à se fixer sur les VLP L1/16-B-L2 en ELISA. Onze rapports molaires VLP biotinylées : L2SA (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 1:12, 1:14, 1:16, 1:18 et 1:20) ont été testés dans le but de saturer les VLP biotinylées avec la protéine L2SA. Les complexes formés sont purifiés par sédimentation comme précédemment, remis en suspension dans du NaCl 0,15M puis déposés dans les puits d'une plaque ELISA (Figure 66). Les résultats obtenus avec le sérum polyclonal de lapin anti-L2 montrent une augmentation de la réactivité anti-L2 des complexes formés en fonction de la quantité de L2 mis en présence des VLP biotinylés. Contrairement aux autres systèmes testés précédemment, les résultats obtenus permettent de mettre en évidence une saturation du système avec la protéine L2SA avec un rapport molaire de une VLP biotinylée pour 14 L2SA.

C. Analyse de la réponse cross-neutralisante obtenue par immunisation avec différentes formulations de la protéine L2

Le but de cette partie est de définir la meilleure forme de présentation de la protéine L2 au système immunitaire afin d'augmenter la réponse cross-neutralisante dans le but de développer un vaccin capable de neutraliser un large spectre de papillomavirus. Pour cela différentes préparations vaccinales ont été testées : (i) protéine L2SA seule, (ii) la protéine L2SA fixée sur des VLP L1STII, (iii) des VLP constituées des protéines L1 et L2 de l'HPV 16 et des VLP constituées des protéines L1 et L2 de l'HPV 31 (iv) le gène de la protéine L2 de l'HPV 31 et enfin (v) l'immunisation à l'aide de PsV composés des protéines L1 et L2 de l'HPV 58 vectorisant un plasmide codant le gène de la protéine L2 de l'HPV 31. A titre de contrôle, des souris ont été immunisées avec des PsV de l'HPV 31 vectorisant le gène codant l'ORF2 du virus de l'hépatite E et avec des PsV de l'HPV 58 vectorisant le gène de la GFP. Les résultats présentés dans cette partie ont donné lieu à une publication (Publication 1) dans « Journal of Translational Medicine » (Combelas *et al.*, 2010).

1. PsV vectorisant le gène de la protéine L2

Des PsV composés des protéines L1 et L2 de l'HPV 58 contenant le plasmide pIRES contenant le gène codant la protéine L2 de l'HPV 31 délétée de ces séquences N- et C- terminale (pIRES/L2ΔNLS) (Maxime Fleury, résultats non publiés) ont été produits (PsV58-31L2) selon le même protocole que celui décrit précédemment (chapitre résultats, partie A 1.1), le plasmide contenant le gène de la protéine de l'HPV 31 remplaçant le plasmide rapporteur luciférase. Des cellules COS-7 ont été transduites avec ces PsV et cultivées pendant 2 jours. La présence des protéines L1 et L2 dans le stock PsV a été analysée par immuno-empreinte. Une bande de 60 kDa correspondant à la protéine L1 est révélée après incubation avec l'anticorps CamVir-1 (Figure 67A). Après incubation en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-L2 de l'HPV16, une bande de 80 kDa correspondant à la protéine L2 est également observée (Figure 67A). Afin d'analyser l'expression du gène de la protéine L2ΔNLS encapsidé dans les PsV et d'éliminer la possibilité que la protéine L2 détectée dans les cellules COS-7 soit due à la protéine L2 présente dans la structure des PsV, des cellules COS-7 ont également été transduites avec des PsV contenant le gène de la GFP. L'analyse de l'expression de la protéine L2 par immuno-empreinte révèle une bande immunoréactive de 80 kDa uniquement dans la fraction nucléaire des cellules infectées par les PsV58-31L2 (Figure 67B).

2. Immunisation de souris Balb/c et analyse de la réponse immune

Onze lots de 8 souris Balb/c ont reçu 3 injections aux jours 0, 7 et 21, en absence d'adjuvant.

Un ou 10 µg de plasmide pIRES/ L2ΔNLS, 10 µg de protéine L2SA et 10 µg de VLP L1L2 16 sont injectés lors de l'immunisation. Les PsV58 L1L2 encapsidant soit le gène L2ΔNLS de l'HPV 31 (PsV58-31L2), soit le gène de la GFP (PsV58-GFP) ainsi que les PsV31 L1L2 encapsidant l'ORF2 de l'HEV (PsV31-HEV) ont été injectés après avoir déterminé une quantité équivalente de protéine L1 par comparaison avec des VLP L1L2 16 par immuno-empreinte. Après dépôt de volumes identiques de PsV58-31L2, de PsV58-GFP ou de PsV31-HEV et de VLP L1L2 16 ou de VLP L1L2 31 sur gel d'acrylamide puis transfert sur membrane, la protéine L1 est révélée grâce à l'anticorps CamVir-1. Des intensités similaires sont observées pour les bandes correspondant à la protéine L1 des PsV dilués au 1/27 et des VLP diluées au 1/9 ; les PsV sont 3 fois plus concentrés et ce rapport permet de déterminer la concentration des PsV58-31L2, des résultats similaires ont été obtenus pour les 2 autres types de PsV testés (résultats non présentés).

L'antigène injecté et le nombre de souris immunisées sont présentés pour chaque lot dans le Tableau IX. Le premier lot a reçu des injections de solution saline et constitue donc notre lot témoin. Les injections sont réalisées par voie sous-cutanée pour les lots 4, 5, 6, 7, 8 recevant des protéines seules et par voie intra-musculaire pour les lots 2, 3, 9, 10, 11 recevant de l'ADN nu ou encapsidé dans des PsV.

Les sérums ont été prélevés au jour 33 et leurs réactivités vis à vis de VLP homologues à la préparation vaccinale ont été analysées par ELISA.

2.1 Analyse de la réponse en anticorps anti-VLP homologue par ELISA

Afin d'analyser la réponse L1L2 homologue, les sérums de souris immunisées avec les PsV58-31L2 et les PsV58-GFP ont été testés vis à vis des VLP L1L2 du type 58, les sérums de souris immunisées avec des VLP L1L2 16 ont été testés sur ces mêmes VLP et les sérums de souris immunisées avec des PsV31-HEV (Renoux *et al.*, 2008), par des VLP L1 ou L1L2 de l'HPV 31 sont testés sur des VLP L1L2 31 (résultats non présentés). Les titres homologues en anticorps des souris immunisées avec des VLP L1L2 16 et avec des VLP L1L2 31 sont élevés (12800 à 13718). Les titres en anticorps des souris immunisées avec les PsV sont aussi relativement élevés allant de 4850 pour les souris du lot 9 à 5970 et 6500 pour les souris du lot 10 et 11, respectivement.

2.2 Analyse de la réponse anti-L2 par ELISA

Afin de comparer l'immunogénicité des différentes formes de l'antigène L2, le titre en anticorps anti-L2, exprimés en TMG, de l'ensemble des sérums a également été déterminé par ELISA en utilisant comme antigène la protéine recombinante L2SA (résultats non présentés). Aucune des souris immunisées avec 1 ou 10 µg du plasmide L2 (groupe 6 et 7) n'a développé d'anticorps contre la protéine L2. Le sérum des souris immunisées avec les différentes préparations de VLP, VLP L1L2SA (groupe 5), VLP L1L2 16 (groupe 6), VLP L1L2 31 (groupe 8) présentent des titres équivalents de 1055, 1100, et 1160, respectivement. Les souris du lot 4, immunisées avec la protéine L2SA, présentent des titres faibles (348) environ 4 fois inférieurs à ceux obtenus avec les sérums de souris immunisées avec les différentes préparations de VLP. Les souris des lots 9 et 10, immunisées à l'aide des PsV31-HEV et des PsV-GFP, présentent des titres en ELISA de 855 et 1212 (p=0,459) comparables à ceux obtenus chez les souris immunisées avec les VLP L1L2SA (groupe 5), L1L2 16 (groupe 6), L1L2 31 (groupe 8). En comparaison avec ces PsV contrôles, le titre en anticorps anti-L2 est plus élevé (TMG= 2600) (p=0,001 et p=0,101, respectivement) dans le lot de souris immunisées avec les PsV58-31L2 (groupe 11) (Tableau IX).

2.3 Analyse de l'activité neutralisante des anticorps induits par les différentes préparations vaccinales de L2

La capacité neutralisante des sérums de souris immunisées avec les différentes préparations vaccinales a été analysée à l'aide des PsV homologues : type 16 pour les lots 4 à 6, 31 pour les lots 7, 8, 9 et type 58 pour les lots 10 et 11 (Tableau X). Les sérums sont considérés neutralisants s'ils inhibent au moins 50 % de l'activité luciférase codée par les PsV. La capacité neutralisante des sérums issus des lots 2 (ADN L2 1µg) et 3 (ADN L2 10µg) n'a pas été évaluée, aucune souris n'a développé d'anticorps dirigés contre la protéine L2.

Aucune souris des lots 4 (protéine L2SA seule) et 5 (VLP L1L2SA) n'a développé d'anticorps neutralisant les PsV de l'HPV 16. En revanche, les souris immunisées avec des VLP L1L2 16 développent des anticorps neutralisants avec un TMG de 2500 ± 360.

Une réponse neutralisante homologue vis à vis des PsV de l'HPV 31 est détectée pour l'ensemble des souris immunisées avec les VLP L1 de l'HPV31 (groupe 7), ou les VLP L1L2 de l'HPV 31 (groupe 8) et les PsV31-HEV (groupe 9) avec des TMG de 2,800 ± 2360, 3,400 ± 460 et 5,198 ± 900, respectivement (TMG ± SEM) (Figure 68).

Aucune souris immunisée avec la protéine L2SA seule ou les différentes préparations de VLP (groupe 4 à 8) n'a développé d'anticorps neutralisant les HPV de types 16 et 18 détectables. De faibles titres en anticorps neutralisant l'HPV58 ont été détectés uniquement chez les souris

immunisées à l'aide des VLP L1L2 de l'HPV 31 et des PsV31-HEV avec des TMG de 65 et 54, respectivement (Figure 68).

Enfin, de forts titres en anticorps neutralisant les types homologues sont détectés chez les souris immunisées aves les PsV58 (groupe 10 et 11) avec un TMG de 4,650 ± 980 et 5,382 ± 2240, respectivement. Les souris immunisées avec les PsV58-GFP ont développé un faible titre en anticorps neutralisant l'HPV 31 (TMG = 50 ± 315), ce titre est augmenté d'un facteur 10 (TMG de 733 ± 190) chez les souris immunisées avec les PsV58-31L2. De plus, la présence d'anticorps neutralisant les HPV 16 et 18 n'est mise en évidence que chez les souris immunisées avec les PsV58-31L2, avec des TMG de 60 et 400, respectivement (Figure 68). L'expression du gène L2 de l'HPV 31 encapsidé dans les PsV58 L1L2 semble avoir un rôle crucial dans l'induction d'anticorps cross-neutralisants car seulement le groupe de souris immunisé à l'aide de ces PsV développent des anticorps contre l'HPV 16 et contre l'HPV 18, types encore plus éloignés phylogénétiquement et appartenant à l'espèce alpha-7.

Discussion

Les vaccins anti-papillomavirus formulés avec des VLP constituées de la protéine L1 des 2 principaux types haut risque, HPV 16 et 18, ont démontré une protection efficace à 5 ans pour le vaccin quadrivalent (Munoz *et al.*, 2010) et jusqu'à 6,4 ans pour le vaccin bivalent (Romanowski *et al.*, 2009) contre les lésions associées aux types 16 et 18 retrouvés dans 70% des cancers du col de l'utérus. Ces vaccins induisent de forts titres d'anticorps neutralisants longtemps considérés comme spécifiques de type. En effet, des études récentes ont démontré que ces vaccins permettent l'induction d'anticorps capables de protéger contre des types de papillomavirus non inclus dans ces vaccins (Brown *et al.*, 2009; Paavonen *et al.*, 2009). Cependant, cette neutralisation de types hors des valences vaccinales reste restreinte à des papillomavirus phylogénétiquement proches et ne permettent pas de couvrir efficacement les 13 autres types de papillomavirus HR retrouvés dans 30% des cancers. De plus, les titres induits sont faibles, inférieurs de 1 à 2 log par rapport à ceux induits contre les types vaccinaux. Les études récentes montrent que l'efficacité des vaccins de 70% n'est augmentée que de 10% en tenant compte des cross-protections observées. Les études s'orientent désormais vers le développement de vaccins dits « de seconde génération » capables de neutraliser le plus grand nombre possible de papillomavirus HR.

L'utilisation de la protéine L2, protéine mineure de capside des papillomavirus, semble être un candidat de choix pour obtenir une protection croisée contre l'ensemble des papillomavirus humains (Karanam *et al.*, 2009).

Afin d'utiliser le potentiel de la protéine L2 pour le développement de vaccins de seconde génération, la solution la plus simple serait d'utiliser des VLP composées des protéines L1 et L2. Cependant, cette solution a rapidement été abandonnée car il a été montré que l'immunogénicité de la protéine L2 est limitée par l'immunodominance de la L1, probablement pour des raisons stoechiométriques et à cause de son enchâssement par ces parties N et C-terminales dans la capside, ne laissant apparaitre qu'une faible partie de la région centrale à la surface des VLP (Roden *et al.*, 2000b; Trus *et al.*, 1997). La majorité des épitopes décrits comme cross-neutralisants ne semblent donc pas être accessibles dans le contexte d'une VLP.

Les travaux de ma thèse s'inscrivent dans cette thématique et s'articulent autour de 3 axes.

Dans un premier temps des PsV-luciférase des HPV 31, 58, 16 et 18 ont été construits en système cellulaire et acellulaire afin de développer des tests de neutralisation dans le but de mesurer la réponse cross-neutralisante induite par des vaccins de seconde génération. Ces tests de neutralisation ont tout d'abord été utilisés pour mesurer les anticorps neutralisants présents chez des femmes Colombiennes issues de la population générale ainsi que pour analyser les cross-neutralisations induites par le vaccin quadrivalent anti-HPV chez 65 femmes Colombiennes.

Dans une seconde partie, différents systèmes d'exposition de la protéine L2 ont été évalués afin de lever l'immunodominance de la protéine L1 et d'augmenter la densité de la protéine L2 présentée au système immunitaire dans le but d'induire des anticorps cross-neutralisants.
Enfin, la dernière partie de ma thèse s'inscrit dans une stratégie vaccinale dans laquelle les cross-neutralisations induites par différentes formulations de la protéine L2 ont été évaluées en modèle souris.

A. Développement des tests de neutralisation des HPV HR et recherche des anticorps cross-neutralisants chez des femmes Colombiennes vaccinées avec le vaccin quadrivalent

Afin de pouvoir analyser les réponses neutralisantes et cross-neutralisantes la première étape de mon travail a été de produire des PsV des HPV 16, 18, 31 et 58.
Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'utilisation de séquences, dont l'usage des codons étaient optimisées, permet d'augmenter la quantité de protéines de capside produite et par conséquent la quantité de PsV. En effet, il a été démontré que l'optimisation des gènes L1 et L2 permettait d'augmenter de 17 fois la production de ces protéines (Fleury *et al.*, 2008; Mossadegh *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation d'un système comprenant des plasmides contenant l'origine de réplication du SV40 et de cellules 293FT exprimant l'antigène T permet l'amplification des plasmides et ainsi l'augmentation de la production des PsV conduisant à des tests de détection des anticorps neutralisants très sensibles. La capacité de transduction du gène de la luciférase des PsV31 par transfection de cellules 293FT est augmentée d'un facteur 8 par rapport à la méthode de dissociation-réassociation de VLP en présence du plasmide à encapsider (Fleury *et al.*, 2008). Nous avons donc souhaité produire les PsV des types 16, 18 et 58 en utilisant cette stratégie.
Ainsi, des PsV de l'HPV 58 ont été produits en système cellulaire par co-transfection du plasmide pGL3-luciférase et du plasmide pIRES-L1L2. Leur capacité à transduire le gène de la luciférase dans des cellules COS-7 s'est révélée être 10 fois supérieure à celle des PsV de l'HPV 31. Cette très forte capacité de transduction a été confirmée lors de la détermination du titre infectieux des PsV58. Ces derniers présentent un titre infectieux de 10^{10} contre 10^{7}/ml pour les PsV31, les PsV58 représentent ainsi candidat de choix pour le développement de tests de neutralisation très sensibles mais également un potentiel vecteur pour transférer un gène d'intérêt dans le cadre d'une vaccination génique.

Suite à ces résultats satisfaisants, nous avons tenté de produire des PsV des HPV 16 et 18 avec la même stratégie. Malgré l'expression des protéines L1 et L2 en cellules 293FT, aucune transduction du gène rapporteur n'a pu être mise en évidence. Cependant, afin de disposer de ces PsV pour pouvoir analyser les anticorps neutralisants induits contre ces 2 types majeurs d'HPV HR, une solution alternative consiste à les produire en utilisant la méthode de dissociation-réassociation optimisée par l'ajout de Zn^{2+} (Bousarghin *et al.*, 2009b). Ces PsV sont obtenus à partir de VLP constituées des protéines L1 et L2 des HPV 16 ou 18 qui ont encapsidé un plasmide rapporteur codant la luciférase. Bien que l'obtention de PsV en système acellulaire ne requière pas spécifiquement la présence de la protéine L2 au sein de la capside contrairement au système cellulaire, nous avons choisi de conserver la protéine L2 dans la structure des VLP. En effet, l'incorporation de la protéine L2 au sein des VLP permet d'obtenir un transfert de gène plus efficace qu'avec des VLP constituées de la protéine L1 seule (El Mehdaoui *et al.*, 2000; Kawana *et al.*, 1998; Malboeuf *et al.*, 2007). Des études ont également montré que la protéine L2 joue un rôle dans l'assemblage des capsomères, réellement adapté pour l'étape de réassociation des capsomères en VLP (Ishii *et al*., 2005). La protéine L2 facilite le transfert de gène grâce à la sortie du génome viral ou du plamide encapsidé des endosomes grâce à une séquence de 23 aa identifiée dans la partie C-terminale de la protéine L2 (Kamper *et al.*, 2006; Malboeuf *et al.*, 2007).

Le développement de ces outils nous a permis dans un premier de temps de rechercher des anticorps cross-neutralisants chez des femmes Colombiennes issues de la population générale ainsi que chez 65 femmes Colombiennes vaccinées avec le vaccin quadrivalent. La Colombie présente l'une des plus fortes incidence de cancer du col dans le monde avec 48 cas de cancer pour 100 000 femmes par an (Parkin *et al.*, 1999). Les types les plus souvent retrouvés associés au cancer du col de l'utérus sont les types 16 et 58 (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001; Molano *et al.*, 2002). Nous nous sommes donc intéressés à la prévalence des anticorps neutralisant l'HPV 58 chez 320 femmes issues de la population générale Colombienne. La détection d'anticorps dans la population générale est un marqueur important car la présence d'anticorps dirigés contre la protéine L1 témoigne d'une infection ancienne et/ou persistante par des papillomavirus HR alors que la détection de l'ADN viral ne renseigne que sur les infections en cours (Vaccarella *et al.*, 2010). Les résultats obtenus montrent une corrélation entre la prévalence des anticorps anti-HPV 58 et le nombre de partenaires sexuels ainsi qu'avec l'âge des sujets étudiés. Ces résultats confirment ceux obtenus lors d'une étude antérieure menée au laboratoire (Combita *et al.*, 2002).

Dans un second temps et dans le but d'évaluer les cross-neutralisations induites par le vaccin quadrivalent anti-HPV, nous avons recherché les anticorps cross-neutralisant les HPV 31 et 58, 2

types de papillomavirus HR n'étant pas inclus dans la formulation du vaccin quadrivalent, chez 65 femmes Colombiennes vaccinées à l'aide de 3 doses de ce vaccin. Les analyses se sont portées sur la présence de ces anticorps avant la vaccination ainsi qu'un mois après la dernière injection du schéma vaccinal (Mois 7). Les résultats obtenus indiquent que la vaccination permet d'induire, chez les 65 femmes ADN négatives et séronégatives pour les HPV 31 et 58, des anticorps cross-neutralisant l'HPV 58 chez 10 femmes (24%) et l'HPV 31 chez 15 femmes (33%). Ces résultats confirment l'existence d'épitopes capables d'induire des anticorps cross-neutralisants au sein de la protéine L1. En effet, des épitopes conformationnels et linéaires ont été décrits au sein de la boucle FG de la protéine L1 de l'HPV 16 (Fleury *et al.*, 2006). Ces épitopes sont capables de générer des anticorps présentant des réactivités croisées (H31.F7 reconnaissant un épitope linéaire ; H31 C19 reconnaissant un épitope conformationnel). Ces résultats sont également en accord avec l'une des rares études sur la recherche d'anticorps cross-neutralisants au cours de laquelle la vaccination avec le vaccin quadrivalent chez 10 femmes, toutes ADN et anticorps négatives au début de l'étude, développent des anticorps neutralisant l'HPV 45, type de papillomavirus non inclus dans la composition du vaccin quadrivalent (Smith *et al.*, 2007a). Enfin, les études cliniques de phase III ont mis en évidence l'existence d'une cross-protection contre des types hétérologues ou non inclus chez les sujets vaccinés à l'aide du vaccin quadrivalent (Brown *et al.*, 2009) et du vaccin bivalent (Paavonen *et al.*, 2009). Plusieurs questions restent cependant non résolues, comme le niveau d'anticorps minimum pour assurer une protection efficace et durable, ainsi que la relation entre le titre en anticorps développé contre l'HPV 16 et l'existence des cross-neutralisations. C'est sur cette dernière question que s'est portée notre analyse. En effet, les réponses immunes dirigées contre les HPV des types 31 ou 58 semblent être corrélées à la réponse induite par les VLP de l'HPV 16 incluses dans le vaccin quadrivalent. Les titres en anticorps neutralisant l'HPV 16 chez les femmes vaccinées initialement séro-négatives pour les HPV 31 et 58 et qui ont développé des anticorps neutralisant l'un ou ces 2 types de papillomavirus à la fin du calendrier vaccinal ont donc été comparés. Les résultats semblent suggérer que les femmes présentant les titres en anticorps neutralisants anti-HPV 16 les plus élevés présentent également des anticorps neutralisant l'HPV 31 ou l'HPV 58. Cependant, les titres en anticorps neutralisant les types hétérologues restent inférieurs de 1 à 2 log au titre en anticorps neutralisant l'HPV 16.

B. Réalisation de capsides chimériques de papillomavirus afin d'exposer à leur surface la protéine mineure de capside L2

Afin de compenser les cross-neutralisations limitées aux types phylogénétiquement proches induits par les vaccins commerciaux, de nouvelles stratégies doivent donc être développées dans le but d'assurer une protection contre le plus grand nombre possible de papillomavirus dans le cadre du développement de vaccin de seconde génération idéalement pan-HPV.

L'exposition de la protéine L2 à la surface de VLP permettrait une présentation plus directe aux cellules du système immunitaire, la répétition d'un motif antigénique au sein d'une structure organisée permettant ainsi d'augmenter la réponse des lymphocytes B (Chackerian *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus au cours de cette étude indiquent que la réponse immune la plus importante est observée lorsque les VLP sont saturées à 50 ou 100% mais que cette réponse diminue fortement pour des pourcentages de saturations moins importants, supposant ainsi que le système immunitaire est capable de réagir rapidement contre des antigènes présentant des épitopes espacés de 5 à 10 nm (Bachmann & Zinkernagel, 1997). Ce type d'espacement est fréquemment retrouvé à la surface des bactéries comme par exemple avec la flagelline (Feldmann & Easten, 1971) mais également à la surface de nombreuses capsides virales (Schodel *et al.*, 1993). Les lymphocytes B pourraient donc reconnaitre de telle structure répétée et définir leur espacement comme un élément étranger présentant un danger potentiel.

Pour lever l'immunodominance de la protéine L1 dans le contexte de la capside et augmenter la réponse immune dirigée contre la protéine L2, le but de mon travail a été d'exposer la protéine L2 à forte densité en surface des VLP.

Afin de réaliser ce complexe VLP-L2, différents systèmes d'exposition basés sur l'intéraction streptavidine/biotine, interaction biologique non covalente la plus forte avec un K_d de 10^{-14} M, ont été testés. Le premier système retenu se compose d'un motif peptidique mimant le domaine d'intéraction de la biotine avec la streptavidine, le StrepTagII, et d'une protéine recombinante la Streptactine, streptavidine modifiée afin d'augmenter son affinité pour le motif StrepTagII (Voss & Skerra, 1997). Les donnés accumulées au laboratoire indiquent qu'il est possible d'insérer des motifs hétérologues de 6 à 8 aa dans la boucle DE entre les aa 140-141 sans affecter la capacité d'auto-assemblage et l'aspect des VLP (Sadeyen *et al.*, 2003; Slupetzky *et al.*, 2001; Varsani *et al.*, 2003). Une étude récente a également démontré qu'il était possible d'insérer, au sein de la boucle DE, des motifs peptidiques d'une taille pouvant aller jusqu'à 39 aa sans altérer la conformation des VLP (Schellenbacher *et al.*, 2009).

En prenant en compte l'ensemble de ces données, nous avons choisi d'insérer le motif StrepTagII (WSHPQFEK), mimotope de la biotine, dans la boucle DE de la protéine L1 de l'HPV 16. Le choix de cette capside porteuse permet de conserver le potentiel prophylactique contre ce

génotype responsable de plus de 50% des cancers du col de l'utérus. Cette stratégie permet donc d'obtenir directement des VLP biotinylées. La constante de dissociation décrite entre le motif StrepTagII et la streptavidine (K_d=13 µM), n'est pas assez faible pour assurer une fixation stable entre ces deux composants. C'est pourquoi une streptavidine modifiée par les mutations introduites en positions 44, 45 et 47, la Streptactine, a été développée afin d'augmenter son interaction avec le peptide StrepTagII (Voss & Skerra, 1997). Le K_d décrit pour ce complexe est alors de 1 µM. Ce système a été développé à l'origine comme un outil pour la purification de protéines étiquetées avec le motif StrepTagII par gel filtration à l'aide de colonne de streptactine.

La protéine L1STII présentant le motif StrepTagII entre les aa 140-141 a été exprimée dans le système baculovirus/cellules d'insecte. L'insertion de ce motif au niveau de la boucle DE n'a pas altéré l'auto-assemblage des VLP. De nombreuses VLP d'une taille de 50 nm et d'une morphologie semblable aux VLP sauvages ont été observées en microscopie électronique. La présence de la séquence StrepTagII a été vérifiée par ELISA à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre le StrepTagII. De plus, les épitopes conformationnels majeurs inducteurs d'anticorps neutralisants sont toujours présents sur ces VLP, ce qui permet de conserver l'aspect prophylactique de notre stratégie vaccinale et de profiter de la forte immunogénicité de telles structures.

Afin de pouvoir être exposée à l'extérieur des VLP, la protéine L2 délétée des séquences NLS N- et C- terminales a été fusionnée à la Streptactine. La délétion des NLS a été choisie dans le but de minimiser les interactions avec l'ADN et faciliter la purification (Bousarghin *et al.*, 2003). Malgré la délétion des séquences NLS, la protéine L2SA est toujours retrouvée dans les fractions nucléaires des cellules d'insectes. Ce résultat est en accord avec une étude menée sur la protéine L2 pour laquelle un NLS non-canonique supplémentaire a été mis en évidence autour de la région 300-330 (Becker *et al.*, 2003). La fusion de la protéine L2 en amont de la Streptactine permet de ne pas contraindre la région amino-terminale de la protéine L2. Des études précédentes ont montré que plusieurs épitopes induisant des anticorps cross-neutralisants sont présents dans la région 11-200 de la protéine L2 de l'HPV 16 (Kawana *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2007; Roden *et al.*, 2000b). Afin de disposer de l'ensemble des épitopes induisant des neutralisations croisées, notre étude s'est donc portée tout d'abord sur l'utilisation de la protéine L2 de l'HPV 16 délétée de ces NLS.

L'analyse par immuno-empreinte de l'expression de la protéine de fusion L2SA à l'aide d'un sérum polyclonal anti-L2 d'HPV 16 indique la production d'une protéine de 115 kDa (Combelas *et al.*, 2010). Le poids moléculaire apparent est supérieur à celui attendu. En effet, la protéine L2 présente un poids moléculaire de 80 kDa, alors que la séquence codante du gène L2 n'a le potentiel que de coder une protéine de 50 kDa (Jin *et al.*, 1989), et la streptactine seule présente une taille d'environ

13 kDa. Des modifications post-traductionnelles pourraient être responsables de la taille plus élevée de notre protéine de fusion. Bien que cette taille apparaisse dans l'ensemble des études portant sur la protéine L2, la cause de cette différence entre la taille apparente et la taille réelle reste inconnue.
La purification de la protéine L2SA a été réalisée en utilisant de l'iminobiotine immobilisée sur des billes d'agarose. L'iminobiotine est un analogue de la biotine mais présente une affinité plus faible pour la Streptactine, ce qui permet une élution dans des conditions physico-chimiques moins drastiques et permet ainsi de ne pas dénaturer la protéine L2SA lors de la purification.
L'interaction entre le StrepTagII et la Streptactine repose sur des interactions hydrophobes et des ponts salins. Des conditions spécifiques de pH et de salinité sont donc nécessaires pour induire la liaison du StrepTagII/Streptactine. Cette fixation a été visualisée après sédimentation par ultracentrifugation des complexes et analyse par immuno-empreinte à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-L2. Afin d'apprécier la stoechiométrie de cette interaction, différents rapports molaires ont été réalisés. Ainsi, les rapports molaires VLP L1STII : protéine de fusion L2SA allant de 1: 0,5 à 1:8 ont été mis en œuvre, et les complexes formés ont été analysés par ELISA, après sédimentation par ultracentrifugation. Les résultats obtenus montrent une augmentation proportionnelle de la quantité de L2 fixée en fonction de la quantité de L2 apportée. Malheureusement, nous n'avons pu mettre en évidence la saturation de nos motifs STII exposés, la faible affinité de l'interaction StrepTagII Streptactine semblant être la cause de cette mauvaise interaction.

Le premier système testé semble présenter une affinité trop faible pour exposer la protéine L2 à forte densité. Nous avons donc évalué des systèmes présentant une affinité plus forte pour permettre une meilleure exposition de la protéine L2.

Dans un second temps, nous avons choisi de présenter à la surface de VLP, composées de protéine L1 de l'HPV16 ou de l'HBc, protéine de capside de l'HBV, des peptides de la protéine L2. La séquence du peptide BAP permet de contrôler les sites de biotinylation grâce à l'utilisation de l'enzyme bactérienne BirA, capable de fixer spécifiquement une biotine sur la
lysine présente dans ce motif (GLNDIFEAQKIEWHE). Le motif BAP d'une taille de 15 aa a donc été inséré, d'une part au niveau des boucles antigéniques DE ou HI de la protéine L1 et d'autre part dans la boucle antigénique de la protéine HBc.

Les différents gènes chimériques HPV16 L1-BAP et HBc-BAP ont été obtenus et les protéines correspondantes exprimées dans le système baculovirus/cellules d'insecte. Malheureusement, malgré l'expression des protéines L1 modifiées, l'insertion du motif BAP ne

permet pas l'assemblage des protéines L1 sous forme de VLP. La protéine HBc-BAP s'assemble quant à elles en une structure d'environ 15 nm qui ne correspond pas à la taille attendue pour des VLP d'HBc (environ 35 nm). Ces structures pourraient correspondre à des pseudo-particules obtenues par assemblage de six dimères d'HBc selon un modèle décrit par Bringas (Bringas, 1997). Les défauts d'auto-assemblage des protéines sous-unitaires de capside dans les deux modèles indiquent que le motif BAP perturbe l'assemblage en VLP. La taille du motif peut être mise en cause. En effet, l'insertion d'une séquence trop longue au niveau des boucles antigéniques affecte la capacité d'auto-assemblage des VLP dans les deux modèles (Slupetzky *et al.*, 2001; Touzé *et al.*, 1999). Cependant, des peptides d'au moins 20 aa ont été insérés au niveau de la boucle HI de la protéine L1 de l'HPV16 (Kondo *et al.*, 2008) de la boucle DE de l'HPV 16, et d'une taille de 238 aa dans une étude au cours de laquelle la GFP additionnée d'espaceurs a été insérée au niveau de la boucle antigénique de la protéine HBc (Kratz *et al.*, 1999), sans perturber l'assemblage en VLP. Le site d'insertion au niveau des boucles antigéniques peut également jouer un rôle dans l'assemblage (Carpentier *et al.*, 2005; Kondo *et al.*, 2008). Cependant, les conséquences des insertions au niveau des boucles antigéniques de la protéine L1 de l'HPV16 ne sont pas prévisibles quant à la formation de pseudoparticules virales (Schellenbacher *et al.*, 2009). Les propriétés physico-chimiques des aa constituant le motif BAP peuvent être responsables du défaut d'assemblage. L'analyse de la séquence BAP montre la présence de cinq aa chargés : quatre chargés négativement (D et E) et un seul chargé positivement (K). La charge globalement négative de cette séquence pourrait être à l'origine des défauts d'assemblages observés (Kusov *et al.*, 2007). Néanmoins, les structures obtenues par assemblage des protéines HBc-BAP étant présentes en forte quantité, nous avons évalué la fixation, en complément de la protéine L2SA préalablement obtenue, de différents peptides de la protéine L2 fusionnés à la SA à leur surface.

Les séquences peptidiques de la protéine L2 choisies afin d'être exposées à la surface de VLP se situent toutes dans la partie N-terminale qui est très conservée entre de nombreux types de papillomavirus HR. Le peptide 13-200 contient la partie N-terminale décrite comme inductrice d'anticorps cross-neutralisants. Le peptide 13-78 a été choisi car il permet de regrouper au sein d'une même séquence peptidique le peptide 17-36 décrit par Gambhira (Gambhira *et al.*, 2007), induisant des anticorps neutralisant les HPV 5, 6, 16, 18, 31, 45, 52, 58 et le BPV 1, et le peptide 56-75 décrit par Kondo (Kondo *et al.*, 2007), induisant des anticorps neutralisant les HPV 16, 18, 31, 52, 58. Enfin, le peptide 17-36 cible spécifiquement l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal RG-1 et représente à ce jour la séquence induisant la meilleure réponse cross-neutralisante. Comme il a été observé pour la protéine L2SA, le poids moléculaire apparent des

peptides $L2_{13\text{-}78}SA$ et $L2_{17\text{-}36}SA$, présentant des tailles de 28 kDa et 25 kDa, respectivement, est différent du poids moléculaire attendu qui devrait être de 20 kDa et 15 kDa.
La fixation spécifique des protéines L2 sur les structures HBc-BAP a été mise en évidence après interaction, sédimentation des complexes et analyse par immuno-empreinte. Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure avec certitude de l'expression de l'enzyme BirA. Cependant, une augmentation de la biotinylation du site BAP a été mise en évidence lors de l'analyse de la fixation des protéines de fusion L2SA à la surface des VLP HBc. En effet, les résultats indiquent que les protéines de fusion L2 se fixent préférentiellement sur les structures HBc-BAP lorsque ces dernières sont biotinylées par l'enzyme BirA co-exprimée en système baculovirus.

Les 2 premiers systèmes de fixation présentent des défauts au niveau de l'affinité dans le premier cas et au niveau de l'assemblage des protéines porteuses pour le 2nd système. Il est possible de biotinyler chimiquement les protéines. Cependant, cette stratégie ne permet pas un contrôle précis de la densité de marquage. Malgré cet inconvénient, cette technique a été retenue par Chackerian (Chackerian *et al.*, 2002) pour fixer une protéine de fusion streptavidine-TNFα, afin de moduler l'activité de cette cytokine inflammatoire dont la surexpression joue un rôle majeur dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde. Ainsi, la dernière stratégie adoptée repose donc sur la biotinylation chimique de VLP constituées de la protéine L1 de l'HPV16. La biotinylation chimique des capsides porteuses a été menée avec succès. Les observations en microscopie électronique à transmission ont également montré que la structure des VLP n'est pas altérée au cours de la réaction de biotinylation avec le système NHS. La fixation du conjugué streptavidine-péroxydase nous a permis de montrer que les VLP L1 de l'HPV 16 sont effectivement biotinylées. Ces résultats sont en adéquation avec des travaux du laboratoire portant sur la fixation de CFDA-SE sur des VLP d'HPV avec une chimie équivalente pour des études de l'internalisation cellulaire (Bousarghin *et al.*, 2005).

Les études préliminaires de fixation de la L2SA aux VLP biotinylées ont été menées en utilisant un rapport molaire de une VLP L1 biotinylées pour une L2SA. Afin de mieux caractériser la capacité de la protéine L2SA à se fixer aux VLP biotinylées, onze rapports molaires VLP biotinylées : L2SA variant de 1 :1 à 1 :20 ont été testés et analysés par ELISA. Ces études ont montré que les VLP biotinylées sont capables de fixer la protéine L2SA tout en conservant leur conformation et ont permis, contrairement aux autres systèmes testés, de mettre en évidence la saturation de notre système pour un rapport molaire de une L1 pour 14 protéines L2SA. Ce résultat semble correspondre à un total de 14 sites de fixation potentiellement biotinylés et donc occupés par une

protéine L2. En effet, le système EZ-Link® NHS-Biotine Reagents (455 Da), utilisé pour la biotinylation de nos VLP, est capable de fixer de manière covalente des biotines sur les amines primaires des lysines et sur le groupement amino-terminal des protéines. La protéine L1 de l'HPV 16 présente 13 lysines présentes dans les boucles antigéniques de la protéine L1 (Chen *et al.*, 2000).

Contrairement aux résultats attendus, nous avons également observé une fixation de la protéine L2SA sur les VLP constituées de protéines L1 non biotinylées. Ce résultat peut néanmoins s'expliquer par le fait que ces protéines sont, par nature, conçues pour interagir et s'auto-assembler entre elles. En effet, au niveau de sa partie C-terminale de la protéine L2, un domaine de liaison à la protéine L1 de 44 aa a été mis en évidence et cette interaction stabiliserait la capside virale (Finnen *et al.*, 2003).

Afin de déterminer l'immunogénicité et les capacités d'induction d'anticorps neutralisants, des complexes VLP L1 d'HPV 16 avec la protéine L2SA, des expériences d'immunisation menées chez la souris sont en cours. Le protocole d'immunisation prévoit 4 injections aux jours 0, 7, 14 et 28. Les souris auront été immunisées avec des VLP d'HPV 16 biotinylées complexées avec la protéine L2SA, des VLP L1 de l'HPV 16, des VLP L1/L2 de l'HPV 16 et de la L2SA seule. Ces différents antigènes seront adjuvantés avec de l'hydroxyde d'aluminium. Les anticorps dirigés contre la protéine L2SA ainsi que contre la protéine L1 de l'HPV 16 seront titrés par ELISA. La réponse neutralisante et surtout cross-neutralisante sera analysée à l'aide des PsV disponibles au laboratoire (HPV16, 18, 31 et 58).

C. Analyse de la réponse cross-neutralisante à partir de différentes formulations de la protéine L2

La dernière partie de mon travail avait pour objectif de tester différentes stratégies de vaccination pour induire des anticorps cross-neutralisants. Différentes formes antigéniques de la protéine L2, protéique, protéique fixée à des VLP STII, plasmidique et plasmidique encapsidée dans des PsV ont été évaluées.

Une stratégie visant à augmenter indirectement la quantité d'antigène vaccinal a été choisie en immunisant des souris avec des PsV58-31L2 qui permettront l'expression la protéine L2ΔNLS après transduction des cellules de la souris. Les PsV choisis sont ceux dérivés de l'HPV 58 car leur

capacité de transduction est 10 fois plus élevée que celle des autres types de PsV produits au laboratoire. Les PsV de l'HPV 58 sont donc des vecteurs potentiels pour transférer un gène d'intérêt dans le cadre d'une vaccination génique. En effet, ces vecteurs sont synthétiques et non réplicatifs et représentent donc un système sûr pour la vectorisation de gène. L'avantage des PsV sur les autres vecteurs vivants est qu'ils sont composés de VLP encapsidant un plasmide et ne présentent donc aucun danger de conversion sous une forme virulente. Des essais de vaccination au laboratoire ont démontré leur efficacité pour l'immunisation de souris contre le virus de l'hépatite E à l'aide de PsV de l'HPV 31 encapsidant le gène de l'$ORF2_{112\text{-}660}$ ou le gène de l'$ORF2_{112\text{-}608}$ (Renoux *et al.*, 2008). Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent des réponses immunes 4 fois supérieures lorsque les souris sont immunisées à l'aide des PSV31-HEV comparé à celles obtenues après immunisation à l'aide de VLP de l'HEV.

Les résultats obtenus au cours de notre étude suggèrent que même en absence d'adjuvant, l'immunisation à l'aide de VLP (groupe 6) ou de PsV codant des gènes irrelevants (groupe 9 et 10) constitués des protéines L1 et L2 permet d'induire des anticorps cross-neutralisants par comparaison à l'immunisation effectuée à partir de VLP L1 seule (groupe 7) et ce, même si la réponse immune dirigée contre la protéine L2 reste faible (TGM allant de 855 à 1212). Les titres d'anticorps dirigés contre la protéine L2 sont généralement plus faibles que ceux dirigés contre la protéine L1 obtenus après vaccination à l'aide de VLP (Chandrachud *et al.*, 1995). Cependant, il a été démontré que de faibles titres en anticorps anti-L2 pouvaient être suffisants pour assurer une protection, ceci pouvant être du à la cinétique lente d'entrée des papillomavirus dans les cellules (Christensen *et al.*, 1991).

L'analyse de la réponse immune dirigée contre la protéine L2 est effectuée après immunisation de souris avec 10 µg de protéine L2SA (groupe 4). Les titres en anticorps anti-HPV 16 L2 mesurés dans ce lot restent très faibles (TGM=348) et seulement 3 souris sur 8 ont développé une faible réponse neutralisante. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans une étude antérieure (Roden *et al.*, 2000b) dans laquelle l'immunisation de lapins avec une dose plus forte de protéines L2 (100 µg) en combinaison avec l'adjuvant de Freund incomplet permet l'induction d'anticorps neutralisant des types de papillomavirus hétérologues. De plus, cette étude princeps attribuant à la protéine L2 une faible immunogénicité dans le contexte d'une VLP présente des biais tant au niveau de la quantité de la protéine L2 administrée que du choix du protocole de vaccination. En effet, des moutons ont été utilisés dans cette étude afin d'être immunisé avec 100 µg de protéine L2 recombinante purifiée des HPV 6, 16 et 18 en combinaison avec de l'adjuvant complet de Freund lors de la première injection et incomplet lors des rappels. L'activité neutralisante et cross-neutralisante de ces sérums a été évaluée par comparaison à celle de sérums obtenus après

immunisation de lapins avec 300 µg des VLP constituées des protéines L1 et L2 des HPV 6, 16 et 18 dans lesquelles la protéine L2 ne représente que 10 µg de la préparation vaccinale et ce, en absence d'adjuvant. L'induction d'anticorps cross-neutralisants après immunisation à l'aide de VLP 31 L1L2 (groupe 8) laisse suggérer que l'incorporation de VLP L1L2 d'un nombre limité de génotype dans la composition des vaccins est une solution plus raisonnable que la génération d'un vaccin multivalent composé de VLP L1 (Gasparic *et al.*, 2007). En effet, l'augmentation de valences complique le développement de vaccin et augmente le coût. De plus, la compétition antigénique peut potentiellement compliquer la sélection de dose ou limiter la quantité de protéines qui peut être injectée (Huh & Roden, 2008).

Cette hypothèse est supportée par une étude récente qui vise à évaluer l'apparition d'une compétition antigénique dans des vaccins anti-HPV multivalents. Au cours de cette étude, des singes ont reçu des formulations octo et nona-valentes et l'effet sur l'immunogénicité des HPV 6, 11, 16 et 18 contenus dans ces formulations a été évaluée. Une formulation tetra-valente a été utilisée comme contrôle (HPV 6/11/16/18). La formulation octo-valente (HPV 6/11/16/18/31/45/52/58) et une formulation nona-valente (HPV 6/11/16/18/31/33/45/52/58) contiennent des VLP L1 combinées à du sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium amorphe comme adjuvant. Ces doses vaccinales ont été administrées par voie intramusculaire aux mois 0, 1 et 6. Les réponses contre les HPV 6, 11, 16 et 18 obtenues avec les formulations octo- et nona-valentes peuvent être inférieures d'un log sur une valence par rapport à la formulation tétravalente.

Les PsV d'HPV 16, 18, 31 et 58 utilisés pour l'analyse des anticorps neutralisants et cross-neutralisants ont été produits dans 2 systèmes différents conduisant ainsi à des titres infectieux et des rapports de particules infectieuses différents. Les différences entre les systèmes de production utilisés et entre les PsV peuvent induire une différence de sensibilité des différents tests de neutralisation, altérant ainsi la cohérence des résultats obtenus. En effet, la sensibilité du test de neutralisation réalisé à l'aide des PsV de l'HPV 16 produits par la méthode de dissociation-réassociation (Bousarghin *et al.*, 2009b) semble être diminuée par comparaison avec les tests de neutralisation réalisés à partir des PsV des HPV 31 et 58 produits en cellules de mammifère. Afin d'évaluer cette différence de sensibilité, nous nous sommes intéressés à la sensibilité relative de nos tests de neutralisations en comparant les rapports entre les titres obtenus en neutralisation homologue et ceux obtenus en réponse homologue en ELISA pour chacun des types. Des rapports de 0,22 ; 0,93 et 0,71 ont été obtenus pour les HPV 16, 31 et 58, respectivement. Ces résultats indiquent que le test de neutralisation réalisé avec les PsV de l'HPV 16 est 3,5 fois moins sensible que le test de neutralisation réalisé avec les PsV de l'HPV 58 et 4,2 fois moins sensible que celui

réalisé avec les PsV de l'HPV 31. Ces différences de sensibilité peuvent expliquer l'absence de détection d'anticorps neutralisant l'HPV16 dans le groupe de souris immunisées à l'aide de VLP ou de PsV L1L2 de l'HPV 31 (groupe 8 et 9) pour lequel des titres en anticorps neutralisant l'HPV 58 sont retrouvés avec un TGM de 65 et 54, respectivement. Cela peut également expliquer le faible titre en anticorps neutralisant l'HPV16 observé chez les souris immunisées avec les PsV58-31L2 (groupe 11) par comparaison avec les titres obtenus pour les HPV 18 et 31. Bien que l'intensité de la réponse cross-neutralisante n'est pas directement comparable à celle observée dans d'autres études, nos résultats démontrent clairement que le plus haut niveau d'anticorps cross-neutralisants est obtenu chez les souris immunisées à l'aide de PsV de l'HPV 58 codant le gène de la protéine L2 de l'HPV 31.

Cependant, les rapports des titres d'anticorps neutralisants dirigés contre des types hétérologues comparés à ceux dirigés contre les types homologues représentent 1% chez les souris immunisées à l'aide de VLP L1L2 ou de PsV contrôles, contre 10% chez les souris immunisées à l'aide des PsV58-31L2. Ce dernier rapport est comparable à celui observé dans les études basées sur l'immunisation de lapins avec des peptides de la protéine L2 en combinaison avec de puissants adjuvants (KLH et Pam2Cys-P25, respectivement) (Alphs *et al.*, 2008; Gambhira *et al.*, 2007).

L'expression du gène L2 de l'HPV 31 encapsidé dans les PsV semble jouer un rôle crucial dans l'induction d'anticorps cross-neutralisants. En effet, des anticorps neutralisants dirigés contre l'HPV 16 et contre l'HPV 18, phylogénétiquement distants de l'espèce des alpha-7, sont détectés uniquement chez les souris immunisées avec les PsV58-31L2 (groupe 11) et non chez les souris immunisées avec les PsV de l'HPV 58 codant le gène de la GFP (groupe 10). De plus, le plus fort titre en anticorps neutralisant l'HPV 31 observé dans le groupe 11 semble être du à la production de protéine L2 à partir de la transduction du plasmide HPV 31 L2 encapsidé dans les PsV car les souris du groupe 10 immunisées à l'aide des PsV GFP présentent un TMG de seulement 50 ($p < 0,001$). Ce résultat corrobore le fait que les plus forts titres en anticorps neutralisant l'HPV16 sont observés chez les souris présentant les plus forts titres en anticorps neutralisants et la cross-neutralisation la plus large.

La synthèse de la protéine L2 codée par le plasmide encapsidé dans les PsV pourrait entrainer un biais dans les résultats de neutralisation observés si l'on considère qu'elle est capable de participer à la structure des PsV. La protéine L2 de l'HPV 31 a été délétée des séquences NLS N- et C-terminales afin d'empêcher sa localisation au noyau, lieu d'assemblage des PsV. Cependant, après purification et analyse des fractions nucléaires et cytoplamiques des cellules 293FT, la protéine L2 est toujours retrouvée dans le noyau. Ce résultat n'est pas surprenant et est en accord avec des études antérieures car la protéine L2 utilisée au cours de cette étude possède toujours les aa compris

dans la zone 300-330 et identifiée comme un 3ème NLS au sein de la protéine L2 (Becker *et al.*, 2003). De plus, il nous est impossible de différencier la présence possible de la protéine L2 de l'HPV 31 au sein des capsides des PsV de l'HPV 58. Cependant, la protéine L2 de l'HPV 31 devrait être exclue de la capside des PsV, cette protéine L2 ne possédant plus le NLS C-terminal décrit comme strictement nécessaire pour intéragir avec la protéine L1 *in vivo* dans le modèle du BPV 1 (Okun *et al.*, 2001). L'ensemble de ces données sont en faveurs de la formation d'une capside uniquement constituée de la protéine L2 de l'HPV 58 au sein de laquelle le gène L2 de l'HPV 31 est encapsidé, offrant l'avantage de pouvoir injecter des PsV exprimant 2 types de protéines L2 de façon indépendantes.

Les résultats obtenus confirment que la protéine L2 dans le contexte de la capside est moins immunogène que les VLP constituées de la protéine L1 seule. L'incorporation de la protéine L2 dans la structure des VLP permet cependant d'induire une meilleure réponse cross-neutralisante que les VLP constituées de la protéine L1 seule. Les plus hauts niveaux d'anticorps cross-neutralisants sont obtenus après immunisation avec les PsV58 encapsidant le gène L2 de l'HPV 31 qui permettent d'induire des anticorps neutralisant les HPV 16, 31 et 58 et l'HPV 18, type phylogénétiquement le plus éloigné.

Bibliographie

Alonso, L. G., Garcia-Alai, M. M., Smal, C., Centeno, J. M., Iacono, R., Castano, E., Gualfetti, P. & de Prat-Gay, G. (2004). The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers. *Biochemistry* **43**, 3310-3317.

Alphs, H. H., Gambhira, R., Karanam, B., Roberts, J. N., Jagu, S., Schiller, J. T., Zeng, W., Jackson, D. C. & Roden, R. B. (2008). Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5850-5855.

Ault, K. A., Giuliano, A. R., Edwards, R. P., Tamms, G., Kim, L. L., Smith, J. F., Jansen, K. U., Allende, M., Taddeo, F. J., Skulsky, D. & Barr, E. (2004). A phase I study to evaluate a human papillomavirus (HPV) type 18 L1 VLP vaccine. *Vaccine* **22**, 3004-3007.

Bachmann, M. F. & Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu Rev Immunol* **15**, 235-270.

Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A. & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **61**, 962-971.

Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowsert, L. M., Olson, C. & Brown, J. C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* **60**, 1445-1456.

Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R. & Vousden, K. H. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* **9**, 153-160.

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

Barr, S. M., Keck, K. & Aposhian, H. V. (1979). Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsids and DNA. *Virology* **96**, 656-659.

Bastos, R., Pante, N. & Burke, B. (1995). Nuclear pore complex proteins. *Int Rev Cytol* **162B**, 257-302.

Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C. & Sapp, M. (2003). Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology* **314**, 161-167.

Bell, J. A., Sundberg, J. P., Ghim, S. J., Newsome, J., Jenson, A. B. & Schlegel, R. (1994). A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology* **62**, 194-198.

Belnap, D. M., Olson, N. H., Cladel, N. M., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Kreider, J. W., Christensen, N. D. & Baker, T. S. (1996). Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol* **259**, 249-263.

Bernard, C., Mougin, C., Laurent, R. & Lab, M. (1994). Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. *Cancer Detect Prev* **18**, 273-282.

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

Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. & Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68**, 729-777.

Birley, H. D., Hart, C. A. & Stacey, S. N. (1995). Human papillomaviruses and the genital tract: old virus, new developments. *J Med Microbiol* **43**, 81-84.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.

Blanton, R. A., Coltrera, M. D., Gown, A. M., Halbert, C. L. & McDougall, J. K. (1992). Expression of the HPV16 E7 gene generates proliferation in stratified squamous cell cultures which is independent of endogenous p53 levels. *Cell Growth Differ* **3**, 791-802.

Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. & Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* **87**, 796-802.

Bossis, I., Roden, R. B., Gambhira, R., Yang, R., Tagaya, M., Howley, P. M. & Meneses, P. I. (2005). Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection. *J Virol* **79**, 6723-6731.

Bousarghin, L., Combita-Rojas, A. L., Touzé, A., El Mehdaoui, S., Sizaret, P. Y., Bravo, M. M. & Coursaget, P. (2002). Detection of neutralizing antibodies against human papillomaviruses (HPV) by inhibition of gene transfer mediated by HPV pseudovirions. *J Clin Microbiol* **40**, 926-932.

Bousarghin, L., Hubert, P., Franzen, E., Jacobs, N., Boniver, J. & Delvenne, P. (2005). Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells. *J Gen Virol* **86**, 1297-1305.

Bousarghin, L., Touze, A., Gaud, G., Iochmann, S., Alvarez, E., Reverdiau, P., Gaitan, J., Jourdan, M. L., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. L. (2009a). Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Mol Cancer Ther* **8**, 357-365.

Bousarghin, L., Touzé, A., Gaud, G., Iochmann, S., Alvarez, E., Reverdiau, P., Gaitan, J., Jourdan, M. L., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. L. (2009b). Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Mol Cancer Ther* **8**, 357-365.

Bousarghin, L., Touzé, A., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. (2003). Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* **77**, 3846-3850.

Breitburd, F. & Coursaget, P. (1999). Human papillomavirus vaccines. *Semin Cancer Biol* **9**, 431-444.

Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J. T. & Lowy, D. R. (1995). Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* **69**, 3959-3963.

Bringas, R. (1997). Folding and assembly of hepatitis B virus core protein: a new model proposal. *J Struct Biol* **118**, 189-196.

Brink, A. A., Meijer, C. J., Wiegerinck, M. A., Nieboer, T. E., Kruitwagen, R. F., van Kemenade, F., Fransen Daalmeijer, N., Hesselink, A. T., Berkhof, J. & Snijders, P. J. (2006). High concordance of results of testing for human papillomavirus in cervicovaginal samples collected by two methods, with comparison of a novel self-sampling device to a conventional endocervical brush. *J Clin Microbiol* **44**, 2518-2523.

Brown, D. R., Kjaer, S. K., Sigurdsson, K., Iversen, O. E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Koutsky, L. A., Tay, E. H., Garcia, P., Ault, K. A., Garland, S. M., Leodolter, S., Olsson, S. E., Tang, G. W., Ferris, D. G., Paavonen, J., Steben, M., Bosch, F. X., Dillner, J., Joura, E. A., Kurman, R. J., Majewski, S., Munoz, N., Myers, E. R., Villa, L. L., Taddeo, F. J., Roberts, C., Tadesse, A., Bryan, J., Lupinacci, L. C., Giacoletti, K. E., Sings, H. L., James, M., Hesley, T. M. & Barr, E. (2009). The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naive women aged 16-26 years. *J Infect Dis* **199**, 926-935.

Brown, D. R., Pratt, L., Bryan, J. T., Fife, K. H. & Jansen, K. (1996). Virus-like particles and E1-E4 protein expressed from the human papillomavirus type 11 bicistronic E1-E4-L1 transcript. *Virology* **222**, 43-50.

Bubb, V., McCance, D. J. & Schlegel, R. (1988). DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein. *Virology* **163**, 243-246.

Buck, C. B., Cheng, N., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Steven, A. C., Schiller, J. T. & Trus, B. L. (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* **82**, 5190-5197.

Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* **78**, 751-757.

Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2005a). Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* **119**, 445-462.

Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y. Y., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2005b). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* **79**, 2839-2846.

Burkhardt, A., DiMaio, D. & Schlegel, R. (1987). Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J* **6**, 2381-2385.

Campos, S. K. & Ozbun, M. A. (2009). Two highly conserved cysteine residues in HPV16 L2 form an intramolecular disulfide bond and are critical for infectivity in human keratinocytes. *PLoS One* **4**, e4463.

Carpentier, G. S., Fleury, M. J., Touze, A., Sadeyen, J. R., Tourne, S., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. (2005). Mutations on the FG surface loop of human papillomavirus type 16 major capsid protein affect recognition by both type-specific neutralizing antibodies and cross-reactive antibodies. *J Med Virol* **77**, 558-565.

Carter, J. J., Wipf, G. C., Benki, S. F., Christensen, N. D. & Galloway, D. A. (2003). Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. *J Virol* **77**, 11625-11632.

Carter, J. J., Wipf, G. C., Madeleine, M. M., Schwartz, S. M., Koutsky, L. A. & Galloway, D. A. (2006). Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera. *J Virol* **80**, 4664-4672.

Cason, J., Patel, D., Naylor, J., Lunney, D., Shepherd, P. S., Best, J. M. & McCance, D. J. (1989). Identification of immunogenic regions of the major coat protein of human papillomavirus type 16 that contain type-restricted epitopes. *J Gen Virol* **70 (Pt 11)**, 2973-2987.

Chackerian, B., Lenz, P., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2002). Determinants of autoantibody induction by conjugated papillomavirus virus-like particles. *J Immunol* **169**, 6120-6126.

Chan, S. Y., Delius, H., Halpern, A. L. & Bernard, H. U. (1995). Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* **69**, 3074-3083.

Chandrachud, L. M., Grindlay, G. J., McGarvie, G. M., O'Neil, B. W., Wagner, E. R., Jarrett, W. F. & Campo, M. S. (1995). Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus-4. *Virology* **211**, 204-208.

Chen, E. Y., Howley, P. M., Levinson, A. D. & Seeburg, P. H. (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* **299**, 529-534.

Chen, G. & Stenlund, A. (1998). Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J Virol* **72**, 2567-2576.

Chen, G. & Stenlund, A. (2000). Two patches of amino acids on the E2 DNA binding domain define the surface for interaction with E1. *J Virol* **74**, 1506-1512.

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

Chen, S. L., Hsieh, T. B., Tsao, Y. P., Han, C. P. & Yang, Y. F. (1996a). Coincidental expression of E5a and c-jun in human papillomavirus type 6/11-infected condylomata. *J Gen Virol* **77 (Pt 6)**, 1145-1149.

Chen, S. L., Lin, Y. K., Li, L. Y., Tsao, Y. P., Lo, H. Y., Wang, W. B. & Tsai, T. C. (1996b). E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol* **70**, 8558-8563.

Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G. & Harrison, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**, 557-567.

Chiang, C. M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5799-5803.

Christensen, N. D., Cladel, N. M., Reed, C. A., Budgeon, L. R., Embers, M. E., Skulsky, D. M., McClements, W. L., Ludmerer, S. W. & Jansen, K. U. (2001). Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. *Virology* **291**, 324-334.

Christensen, N. D., Dillner, J., Eklund, C., Carter, J. J., Wipf, G. C., Reed, C. A., Cladel, N. M. & Galloway, D. A. (1996a). Surface conformational and linear epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 virus-like particles as defined by monoclonal antibodies. *Virology* **223**, 174-184.

Christensen, N. D., Kirnbauer, R., Schiller, J. T., Ghim, S. J., Schlegel, R., Jenson, A. B. & Kreider, J. W. (1994). Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* **205**, 329-335.

Christensen, N. D. & Kreider, J. W. (1990). Antibody-mediated neutralization in vivo of infectious papillomaviruses. *J Virol* **64**, 3151-3156.

Christensen, N. D. & Kreider, J. W. (1991). Neutralization of CRPV infectivity by monoclonal antibodies that identify conformational epitopes on intact virions. *Virus Res* **21**, 169-179.

Christensen, N. D., Kreider, J. W., Kan, N. C. & DiAngelo, S. L. (1991). The open reading frame L2 of cottontail rabbit papillomavirus contains antibody-inducing neutralizing epitopes. *Virology* **181**, 572-579.

Christensen, N. D., Reed, C. A., Cladel, N. M., Hall, K. & Leiserowitz, G. S. (1996b). Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6. *Virology* **224**, 477-486.

Christensen, N. D., Reed, C. A., Cladel, N. M., Han, R. & Kreider, J. W. (1996c). Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J Virol* **70**, 960-965.

Ciechanover, A., Shkedy, D., Oren, M. & Bercovich, B. (1994). Degradation of the tumor suppressor protein p53 by the ubiquitin-mediated proteolytic system requires a novel species of ubiquitin-carrier protein, E2. *J Biol Chem* **269**, 9582-9589.

Clavel, C., Cucherousset, J., Lorenzato, M., Caudroy, S., Nou, J. M., Nazeyrollas, P., Polette, M., Bory, J. P., Gabriel, R., Quereux, C. & Birembaut, P. (2004). Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high-grade cervical lesions. *Br J Cancer* **90**, 1803-1808.

Clavel, C., Masure, M., Putaud, I., Thomas, K., Bory, J. P., Gabriel, R., Quereux, C. & Birembaut, P. (1998). Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* **51**, 737-740.

Clemens, K. E., Brent, R., Gyuris, J. & Munger, K. (1995). Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* **214**, 289-293.

Clertant, P. & Seif, I. (1984). A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* **311**, 276-279.

Cohen, B. D., Goldstein, D. J., Rutledge, L., Vass, W. C., Lowy, D. R., Schlegel, R. & Schiller, J. T. (1993). Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol* **67**, 5303-5311.

Colomar, M. C., Degoumois-Sahli, C. & Beard, P. (1993). Opening and refolding of simian virus 40 and in vitro packaging of foreign DNA. *J Virol* **67**, 2779-2786.

Combelas, N., Saussereau, E., Fleury, M. J., Ribeiro, T., Gaitan, J., Duarte-Forero, D. F., Coursaget, P. & Touzé, A. (2010). Papillomavirus pseudovirions packaged with the L2 gene induce cross-neutralizing antibodies. *J Transl Med* **8**, 28.

Combita, A. L., Touzé, A., Bousarghin, L., Christensen, N. D. & Coursaget, P. (2002). Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol* **76**, 6480-6486.

Combita, A. L., Touzé, A., Bousarghin, L., Sizaret, P. Y., Munoz, N. & Coursaget, P. (2001). Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 183-188.

Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T. & Wang, T. S. (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* **274**, 2696-2705.

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

Crum, C. P., Barber, S., Symbula, M., Snyder, K., Saleh, A. M. & Roche, J. K. (1990). Coexpression of the human papillomavirus type 16 E4 and L1 open reading frames in early cervical neoplasia. *Virology* **178**, 238-246.

Culp, T. D., Budgeon, L. R. & Christensen, N. D. (2006a). Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology* **347**, 147-159.

Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G. & Christensen, N. D. (2006b). Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol* **80**, 8940-8950.

Culp, T. D. & Christensen, N. D. (2004). Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology* **319**, 152-161.

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

Cuzick, J., Sasieni, P., Davies, P., Adams, J., Normand, C., Frater, A., van Ballegooijen, M. & van den Akker, E. (1999). A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess* **3**, i-iv, 1-196.

Cuzick, J., Szarewski, A., Terry, G., Ho, L., Hanby, A., Maddox, P., Anderson, M., Kocjan, G., Steele, S. T. & Guillebaud, J. (1995). Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* **345**, 1533-1536.

Dahiya, A., Gavin, M. R., Luo, R. X. & Dean, D. C. (2000). Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol* **20**, 6799-6805.

Daniels, P. R., Sanders, C. M. & Maitland, N. J. (1998). Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6-associated protein in insect and human cells. *J Gen Virol* **79 (Pt 3)**, 489-499.

Darshan, M. S., Lucchi, J., Harding, E. & Moroianu, J. (2004). The l2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol* **78**, 12179-12188.

Davy, C. E., Jackson, D. J., Raj, K., Peh, W. L., Southern, S. A., Das, P., Sorathia, R., Laskey, P., Middleton, K., Nakahara, T., Wang, Q., Masterson, P. J., Lambert, P. F., Cuthill, S., Millar, J. B. & Doorbar, J. (2005). Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol* **79**, 3998-4011.

Davy, C. E., Jackson, D. J., Wang, Q., Raj, K., Masterson, P. J., Fenner, N. F., Southern, S., Cuthill, S., Millar, J. B. & Doorbar, J. (2002). Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* **76**, 9806-9818.

Day, P. M., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**, 1-11.

Day, P. M., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2008). Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol* **82**, 12565-12568.

Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* **72**, 142-150.

de Villiers, E. M. (1994). Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**, 1-12.

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

de Villiers, E. M., Whitley, C. & Gunst, K. (2005). Identification of new papillomavirus types. *Methods Mol Med* **119**, 1-13.

Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M. & Thierry, F. (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* **71**, 9343-9349.

Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. & Thierry, F. (1998). The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology* **242**, 378-386.

Demeret, C., Yaniv, M. & Thierry, F. (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol* **68**, 7075-7082.

Deng, W., Lin, B. Y., Jin, G., Wheeler, C. G., Ma, T., Harper, J. W., Broker, T. R. & Chow, L. T. (2004). Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* **78**, 13954-13965.

Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. & Thierry, F. (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J* **16**, 504-514.

DiMaio, D., Guralski, D. & Schiller, J. T. (1986). Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1797-1801.

Dong, G., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1994). Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* **68**, 1115-1127.

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

Doorbar, J., Coneron, I. & Gallimore, P. H. (1989). Sequence divergence yet conserved physical characteristics among the E4 proteins of cutaneous human papillomaviruses. *Virology* **172**, 51-62.

Doorbar, J., Elston, R. C., Napthine, S., Raj, K., Medcalf, E., Jackson, D., Coleman, N., Griffin, H. M., Masterson, P., Stacey, S., Mengistu, Y. & Dunlop, J. (2000). The E1E4

protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J Virol* **74**, 10081-10095.

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824-827.

Doorbar, J., Evans, H. S., Coneron, I., Crawford, L. V. & Gallimore, P. H. (1988). Analysis of HPV-1 E4 gene expression using epitope-defined antibodies. *EMBO J* **7**, 825-833.

Doorbar, J. & Gallimore, P. H. (1987). Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol* **61**, 2793-2799.

Doorbar, J., Medcalf, E. & Napthine, S. (1996). Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. *Virology* **218**, 114-126.

Dowhanick, J. J., McBride, A. A. & Howley, P. M. (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* **69**, 7791-7799.

Durst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R. T., Boukamp, P., Fusenig, N. E. & Gissmann, L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**, 251-256.

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-937.

El Mehdaoui, S., Touzé, A., Laurent, S., Sizaret, P. Y., Rasschaert, D. & Coursaget, P. (2000). Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* **74**, 10332-10340.

Embers, M. E., Budgeon, L. R., Pickel, M. & Christensen, N. D. (2002). Protective immunity to rabbit oral and cutaneous papillomaviruses by immunization with short peptides of L2, the minor capsid protein. *J Virol* **76**, 9798-9805.

Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K. & McMillan, N. A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**, 2449-2456.

Evans, T. G., Bonnez, W., Rose, R. C., Koenig, S., Demeter, L., Suzich, J. A., O'Brien, D., Campbell, M., White, W. I., Balsley, J. & Reichman, R. C. (2001). A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* **183**, 1485-1493.

Favre, M., Orth, G., Croissant, O. & Yaniv, M. (1975). Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4810-4814.

Fay, A., Yutzy, W. H. t., Roden, R. B. & Moroianu, J. (2004). The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol* **78**, 13447-13454.

Feldmann, M. & Easten, A. (1971). The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response. *J Exp Med* **134**, 103-119.

Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S. & Garcea, R. L. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **77**, 4818-4826.

Fleury, M. J., Touzé, A., Alvarez, E., Carpentier, G., Clavel, C., Vautherot, J. F. & Coursaget, P. (2006). Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31. *Arch Virol* **151**, 1511-1523.

Fleury, M. J., Touze, A., de Sanjose, S., Bosch, F. X., Klaustermeiyer, J. & Coursaget, P. (2008). Detection of human papillomavirus type 31-neutralizing antibodies from naturally infected patients by an assay based on intracellular assembly of luciferase-expressing pseudovirions. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 172-175.

Fleury, M. J., Touzé, A., Maurel, M. C., Moreau, T. & Coursaget, P. (2009). Identification of neutralizing conformational epitopes on the human papillomavirus type 31 major capsid protein and functional implications. *Protein Sci* **18**, 1425-1438.

Flores, E. R. & Lambert, P. F. (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* **71**, 7167-7179.

Florin, L., Becker, K. A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R. E. & Sapp, M. (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *J Virol* **80**, 6691-6696.

Florin, L., Becker, K. A., Sapp, C., Lambert, C., Sirma, H., Muller, M., Streeck, R. E. & Sapp, M. (2004). Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol* **78**, 5546-5553.

Gambhira, R., Jagu, S., Karanam, B., Gravitt, P. E., Culp, T. D., Christensen, N. D. & Roden, R. B. (2007). Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of human papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. *J Virol* **81**, 11585-11592.

Garland, S. M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Harper, D. M., Leodolter, S., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Bryan, J., Taddeo, F. J., Railkar, R., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J., Sattler, C., Barr, E. & Koutsky, L. A. (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* **356**, 1928-1943.

Gasparic, M., Rubio, I., Thones, N., Gissmann, L. & Muller, M. (2007). Prophylactic DNA immunization against multiple papillomavirus types. *Vaccine* **25**, 4540-4553.

Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B. & Tommasino, M. (2009). The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* **40**, 1-13.

Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. (2001a). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**, 1565-1570.

Giroglou, T., Sapp, M., Lane, C., Fligge, C., Christensen, N. D., Streeck, R. E. & Rose, R. C. (2001b). Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* **19**, 1783-1793.

Goldmann, C., Petry, H., Frye, S., Ast, O., Ebitsch, S., Jentsch, K. D., Kaup, F. J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T. & Luke, W. (1999). Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol* **73**, 4465-4469.

Goodwin, E. C., Naeger, L. K., Breiding, D. E., Androphy, E. J. & DiMaio, D. (1998). Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **72**, 3925-3934.

Gorlich, D. (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J* **17**, 2721-2727.

Hagensee, M. E., Olson, N. H., Baker, T. S. & Galloway, D. A. (1994). Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol* **68**, 4503-4505.

Hagensee, M. E., Yaegashi, N. & Galloway, D. A. (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **67**, 315-322.

Han, Y., Loo, Y. M., Militello, K. T. & Melendy, T. (1999). Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J Virol* **73**, 4899-4907.

Hanslip, S. J., Zaccai, N. R., Middelberg, A. P. & Falconer, R. J. (2006). Assembly of human papillomavirus type-16 virus-like particles: multifactorial study of assembly and competing aggregation. *Biotechnol Prog* **22**, 554-560.

Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C., Ferris, D. G., Jenkins, D., Schuind, A., Zahaf, T., Innis, B., Naud, P., De Carvalho, N. S., Roteli-Martins, C. M., Teixeira, J., Blatter, M. M., Korn, A. P., Quint, W. & Dubin, G. (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* **364**, 1757-1765.

Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C. M., Moscicki, A. B., Romanowski, B., Roteli-Martins, C. M., Jenkins, D., Schuind, A., Costa Clemens, S. A. & Dubin, G. (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* **367**, 1247-1255.

Harro, C. D., Pang, Y. Y., Roden, R. B., Hildesheim, A., Wang, Z., Reynolds, M. J., Mast, T. C., Robinson, R., Murphy, B. R., Karron, R. A., Dillner, J., Schiller, J. T. & Lowy, D. R. (2001). Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* **93**, 284-292.

Heino, P., Dillner, J. & Schwartz, S. (1995). Human papillomavirus type 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki Forest virus assemble into virus-like particles. *Virology* **214**, 349-359.

Heino, P., Zhou, J. & Lambert, P. F. (2000). Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virology* **276**, 304-314.

Hildesheim, A., Herrero, R., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Solomon, D., Bratti, M. C., Schiller, J. T., Gonzalez, P., Dubin, G., Porras, C., Jimenez, S. E. & Lowy, D. R. (2007). Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* **298**, 743-753.

Hindmarsh, P. L. & Laimins, L. A. (2007). Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virol J* **4**, 19.

Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 215-223.

Hofmann, K. J., Cook, J. C., Joyce, J. G., Brown, D. R., Schultz, L. D., George, H. A., Rosolowsky, M., Fife, K. H. & Jansen, K. U. (1995). Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in Saccharomyces cerevisiae. *Virology* **209**, 506-518.

Huh, W. K. & Roden, R. B. (2008). The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecol Oncol* **109**, S48-56.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. (1993). Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 4918-4927.

Iftner, A., Klug, S. J., Garbe, C., Blum, A., Stancu, A., Wilczynski, S. P. & Iftner, T. (2003). The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res* **63**, 7515-7519.

Iftner, T. & Villa, L. L. (2003). Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 80-88.

Ishii, Y., Tanaka, K. & Kanda, T. (2003). Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids. *Virology* **308**, 128-136.

Jagu, S., Karanam, B., Gambhira, R., Chivukula, S. V., Chaganti, R. J., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Roden, R. B. (2009). Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines. *J Natl Cancer Inst* **101**, 782-792.

Jarrett, W. F., Smith, K. T., O'Neil, B. W., Gaukroger, J. M., Chandrachud, L. M., Grindlay, G. J., McGarvie, G. M. & Campo, M. S. (1991). Studies on vaccination against

papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology* **184**, 33-42.

Jin, X. W., Cowsert, L. M., Pilacinski, W. P. & Jenson, A. B. (1989). Identification of L2 open reading frame gene products of bovine papillomavirus type 1 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **70 (Pt 5)**, 1133-1140.

Joura, E. A., Kjaer, S. K., Wheeler, C. M., Sigurdsson, K., Iversen, O. E., Hernandez-Avila, M., Perez, G., Brown, D. R., Koutsky, L. A., Tay, E. H., Garcia, P., Ault, K. A., Garland, S. M., Leodolter, S., Olsson, S. E., Tang, G. W., Ferris, D. G., Paavonen, J., Lehtinen, M., Steben, M., Bosch, X., Dillner, J., Kurman, R. J., Majewski, S., Munoz, N., Myers, E. R., Villa, L. L., Taddeo, F. J., Roberts, C., Tadesse, A., Bryan, J., Lupinacci, L. C., Giacoletti, K. E., Lu, S., Vuocolo, S., Hesley, T. M., Haupt, R. M. & Barr, E. (2008). HPV antibody levels and clinical efficacy following administration of a prophylactic quadrivalent HPV vaccine. *Vaccine* **26**, 6844-6851.

Joura, E. A., Leodolter, S., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Koutsky, L. A., Garland, S. M., Harper, D. M., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Jones, R. W., Bryan, J., Taddeo, F. J., Bautista, O. M., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J. W., Sattler, C., Barr, E. & Paavonen, J. (2007). Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet* **369**, 1693-1702.

Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U. & Keller, P. M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* **274**, 5810-5822.

Kaikkonen, M. U., Viholainen, J. I., Narvanen, A., Yla-Herttuala, S. & Airenne, K. J. (2008). Targeting and purification of metabolically biotinylated baculovirus. *Hum Gene Ther* **19**, 589-600.

Kamper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H. C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J. T. & Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* **80**, 759-768.

Karanam, B., Jagu, S., Huh, W. K. & Roden, R. B. (2009). Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol Cell Biol* **87**, 287-299.

Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. & Kanda, T. (1998). In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J Virol* **72**, 10298-10300.

Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. & Kanda, T. (1999). Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. *J Virol* **73**, 6188-6190.

Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. & Kanda, T. (2001). Human papillomavirus type 16 minor capsid protein l2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* **75**, 2331-2336.

Kines, R. C., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Day, P. M. (2009). The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20458-20463.

Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 12180-12184.

Kirnbauer, R., Chandrachud, L. M., O'Neil, B. W., Wagner, E. R., Grindlay, G. J., Armstrong, A., McGarvie, G. M., Schiller, J. T., Lowy, D. R. & Campo, M. S. (1996).

Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* **219**, 37-44.

Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Wheeler, C. M., Becker, T. M., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1994). A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* **86**, 494-499.

Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* **67**, 6929-6936.

Klug, A. & Caspar, D. L. (1960). The structure of small viruses. *Adv Virus Res* **7**, 225-325.

Knight, G. L., Grainger, J. R., Gallimore, P. H. & Roberts, S. (2004). Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis. *J Virol* **78**, 13920-13933.

Kondo, K., Ishii, Y., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H. & Kanda, T. (2007). Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* **358**, 266-272.

Kondo, K., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H. & Kanda, T. (2008). Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. *J Med Virol* **80**, 841-846.

Korndorfer, I. P. & Skerra, A. (2002). Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Sci* **11**, 883-893.

Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M. & Jansen, K. U. (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347**, 1645-1651.

Kratz, P. A., Bottcher, B. & Nassal, M. (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1915-1920.

Kreider, J. W., Howett, M. K., Leure-Dupree, A. E., Zaino, R. J. & Weber, J. A. (1987). Laboratory production in vivo of infectious human papillomavirus type 11. *J Virol* **61**, 590-593.

Kusov, Y., Gauss-Muller, V. & Morace, G. (2007). Immunogenic epitopes on the surface of the hepatitis A virus capsid: Impact of secondary structure and/or isoelectric point on chimeric virus assembly. *Virus Res* **130**, 296-302.

Lazcano-Ponce, E., Herrero, R., Munoz, N., Cruz, A., Shah, K. V., Alonso, P., Hernandez, P., Salmeron, J. & Hernandez, M. (2001). Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* **91**, 412-420.

Le Cann, P., Coursaget, P., Iochmann, S. & Touzé, A. (1994). Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol Lett* **117**, 269-274.

Le Cann, P., Touzé, A., Enogat, N., Leboulleux, D., Mougin, C., Legrand, M. C., Calvet, C., Afoutou, J. M. & Coursaget, P. (1995). Detection of antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 virions by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant HPV 16 L1 capsids produced by recombinant baculovirus. *J Clin Microbiol* **33**, 1380-1382.

Li, M., Cripe, T. P., Estes, P. A., Lyon, M. K., Rose, R. C. & Garcea, R. L. (1997). Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in Escherichia coli: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol* **71**, 2988-2995.

Lin, Y. L., Borenstein, L. A., Selvakumar, R., Ahmed, R. & Wettstein, F. O. (1992). Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. *Virology* **187**, 612-619.

Liu, X., Clements, A., Zhao, K. & Marmorstein, R. (2006). Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* **281**, 578-586.

Lorincz, A. T. (1996). Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res* **22**, 629-636.

Ludmerer, S. W., Benincasa, D. & Mark, G. E., 3rd (1996). Two amino acid residues confer type specificity to a neutralizing, conformationally dependent epitope on human papillomavirus type 11. *J Virol* **70**, 4791-4794.

Ludmerer, S. W., Benincasa, D., Mark, G. E., 3rd & Christensen, N. D. (1997). A neutralizing epitope of human papillomavirus type 11 is principally described by a continuous set of residues which overlap a distinct linear, surface-exposed epitope. *J Virol* **71**, 3834-3839.

Ludmerer, S. W., McClements, W. L., Wang, X. M., Ling, J. C., Jansen, K. U. & Christensen, N. D. (2000). HPV11 mutant virus-like particles elicit immune responses that neutralize virus and delineate a novel neutralizing domain. *Virology* **266**, 237-245.

Ma, T., Zou, N., Lin, B. Y., Chow, L. T. & Harper, J. W. (1999). Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 382-387.

Malboeuf, C. M., Simon, D. A., Lee, Y. E., Lankes, H. A., Dewhurst, S., Frelinger, J. G. & Rose, R. C. (2007). Human papillomavirus-like particles mediate functional delivery of plasmid DNA to antigen presenting cells in vivo. *Vaccine* **25**, 3270-3276.

Manz, R. A., Hauser, A. E., Hiepe, F. & Radbruch, A. (2005). Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* **23**, 367-386.

Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P. & Romanos, M. A. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* **72**, 7407-7419.

McBride, A. A., Schlegel, R. & Howley, P. M. (1988). The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity. *EMBO J* **7**, 533-539.

McCarthy, M. P., White, W. I., Palmer-Hill, F., Koenig, S. & Suzich, J. A. (1998). Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *J Virol* **72**, 32-41.

McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* **23**, 487-513.

McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R. & Laimins, L. A. (1993). Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol* **67**, 3142-3150.

McLean, C. S., Churcher, M. J., Meinke, J., Smith, G. L., Higgins, G., Stanley, M. & Minson, A. C. (1990). Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol* **43**, 488-492.

Mechold, U., Gilbert, C. & Ogryzko, V. (2005). Codon optimization of the BirA enzyme gene leads to higher expression and an improved efficiency of biotinylation of target proteins in mammalian cells. *J Biotechnol* **116**, 245-249.

Merle, E., Rose, R. C., LeRoux, L. & Moroianu, J. (1999). Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin alpha2beta1 heterodimers. *J Cell Biochem* **74**, 628-637.

Molano, M., Posso, H., Weiderpass, E., van den Brule, A. J., Ronderos, M., Franceschi, S., Meijer, C. J., Arslan, A. & Munoz, N. (2002). Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* **87**, 324-333.

Mossadegh, N., Gissmann, L., Muller, M., Zentgraf, H., Alonso, A. & Tomakidi, P. (2004). Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV 11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. *Virology* **326**, 57-66.

Munger, K. (1995). The molecular biology of cervical cancer. *J Cell Biochem Suppl* **23**, 55-60.

Munoz, N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* **19**, 1-5.

Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**, 518-527.

Munoz, N., Kjaer, S. K., Sigurdsson, K., Iversen, O. E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Brown, D. R., Koutsky, L. A., Tay, E. H., Garcia, P. J., Ault, K. A., Garland, S. M., Leodolter, S., Olsson, S. E., Tang, G. W., Ferris, D. G., Paavonen, J., Steben, M., Bosch, F. X., Dillner, J., Huh, W. K., Joura, E. A., Kurman, R. J., Majewski, S., Myers, E. R., Villa, L. L., Taddeo, F. J., Roberts, C., Tadesse, A., Bryan, J. T., Lupinacci, L. C., Giacoletti, K. E., Sings, H. L., James, M. K., Hesley, T. M., Barr, E. & Haupt, R. M. (2010). Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst* **102**, 325-339.

Nakahara, T., Nishimura, A., Tanaka, M., Ueno, T., Ishimoto, A. & Sakai, H. (2002). Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol* **76**, 10914-10920.

Nasseri, M., Hirochika, R., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1987). A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. *Virology* **159**, 433-439.

Naucler, P., Ryd, W., Tornberg, S., Strand, A., Wadell, G., Elfgren, K., Radberg, T., Strander, B., Johansson, B., Forslund, O., Hansson, B. G., Rylander, E. & Dillner, J. (2007). Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* **357**, 1589-1597.

Nelson, L. M., Rose, R. C., LeRoux, L., Lane, C., Bruya, K. & Moroianu, J. (2000). Nuclear import and DNA binding of human papillomavirus type 45 L1 capsid protein. *J Cell Biochem* **79**, 225-238.

Okun, M. M., Day, P. M., Greenstone, H. L., Booy, F. P., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Roden, R. B. (2001). L1 interaction domains of papillomavirus l2 necessary for viral genome encapsidation. *J Virol* **75**, 4332-4342.

Olson, C., Luedke, A. J. & Brobst, D. F. (1962). Induced immunity of skin, vagina, and urinary bladder to bovine papillomatosis. *Cancer Res* **22**, 463-468.

Olson, C., Segre, D. & Skidmore, L. V. (1959). Immunity to bovine cutaneous papillomatosis produced by vaccine homologous to the challenge agent. *J Am Vet Med Assoc* **135**, 499-502.

Olsson, S. E., Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Malm, C., Iversen, O. E., Hoye, J., Steinwall, M., Riis-Johannessen, G., Andersson-Ellstrom, A., Elfgren, K., von Krogh, G., Lehtinen, M., Paavonen, J., Tamms, G. M., Giacoletti, K., Lupinacci, L., Esser, M. T., Vuocolo, S. C., Saah, A. J. & Barr, E. (2007). Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine* **25**, 4931-4939.

Orth, G., Favre, M. & Croissant, O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* **24**, 108-120.

Paavonen, J., Jenkins, D., Bosch, F. X., Naud, P., Salmeron, J., Wheeler, C. M., Chow, S. N., Apter, D. L., Kitchener, H. C., Castellsague, X., de Carvalho, N. S., Skinner, S. R., Harper, D. M., Hedrick, J. A., Jaisamrarn, U., Limson, G. A., Dionne, M., Quint, W., Spiessens, B., Peeters, P., Struyf, F., Wieting, S. L., Lehtinen, M. O. & Dubin, G. (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against

infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **369**, 2161-2170.

Paavonen, J., Naud, P., Salmeron, J., Wheeler, C. M., Chow, S. N., Apter, D., Kitchener, H., Castellsague, X., Teixeira, J. C., Skinner, S. R., Hedrick, J., Jaisamrarn, U., Limson, G., Garland, S., Szarewski, A., Romanowski, B., Aoki, F. Y., Schwarz, T. F., Poppe, W. A., Bosch, F. X., Jenkins, D., Hardt, K., Zahaf, T., Descamps, D., Struyf, F., Lehtinen, M., Dubin, G. & Greenacre, M. (2009). Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* **374**, 301-314.

Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M. R. & Mohr, I. J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8700-8704.

Parkin, D. M., Pisani, P. & Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* **80**, 827-841.

Pastrana, D. V., Buck, C. B., Pang, Y. Y., Thompson, C. D., Castle, P. E., FitzGerald, P. C., Kruger Kjaer, S., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2004). Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* **321**, 205-216.

Pastrana, D. V., Gambhira, R., Buck, C. B., Pang, Y. Y., Thompson, C. D., Culp, T. D., Christensen, N. D., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Roden, R. B. (2005). Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology* **337**, 365-372.

Piccini, A., Storey, A., Romanos, M. & Banks, L. (1997). Regulation of human papillomavirus type 16 DNA replication by E2, glucocorticoid hormone and epidermal growth factor. *J Gen Virol* **78 (Pt 8)**, 1963-1970.

Popescu, N. C. & DiPaolo, J. A. (1990). Integration of human papillomavirus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalized human keratinocyte lines. *Cancer Res* **50**, 1316-1323.

Raj, K., Berguerand, S., Southern, S., Doorbar, J. & Beard, P. (2004). E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* **78**, 7199-7207.

Rapp, L. & Chen, J. J. (1998). The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1378**, F1-19.

Renoux, V. M., Fleury, M. J., Bousarghin, L., Gaitan, J., Sizaret, P. Y., Touze, A. & Coursaget, P. (2008). Induction of antibody response against hepatitis E virus (HEV) with recombinant human papillomavirus pseudoviruses expressing truncated HEV capsid proteins in mice. *Vaccine* **26**, 6602-6607.

Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1522-1527.

Richart, R. M. (1987). Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* **60**, 1951-1959.

Riethmuller, D., Gay, C., Bertrand, X., Bettinger, D., Schaal, J. P., Carbillet, J. P., Lassabe, C., Arveux, P., Seilles, E. & Mougin, C. (1999). Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* **8**, 157-164.

Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G. D., Kreider, J. W. & Gallimore, P. H. (1993). Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* **197**, 176-187.

Roden, M., Anderwald, C., Furnsinn, C., Waldhausl, W. & Lohninger, A. (2000a). Effects of short-term leptin exposure on triglyceride deposition in rat liver. *Hepatology* **32**, 1045-1049.

Roden, R. B., Day, P. M., Bronzo, B. K., Yutzy, W. H. t., Yang, Y., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2001). Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol* **75**, 10493-10497.

Roden, R. B., Greenstone, H. L., Kirnbauer, R., Booy, F. P., Jessie, J., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1996a). In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J Virol* **70**, 5875-5883.

Roden, R. B., Hubbert, N. L., Kirnbauer, R., Christensen, N. D., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1996b). Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J Virol* **70**, 3298-3301.

Roden, R. B., Weissinger, E. M., Henderson, D. W., Booy, F., Kirnbauer, R., Mushinski, J. F., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1994). Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **68**, 7570-7574.

Roden, R. B., Yutzy, W. H. t., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2000b). Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* **270**, 254-257.

Rogel-Gaillard, C., Pehau-Arnaudet, G., Breitburd, F. & Orth, G. (1993). Cytopathic effect in human papillomavirus type 1-induced inclusion warts: in vitro analysis of the contribution of two forms of the viral E4 protein. *J Invest Dermatol* **101**, 843-851.

Romanowski, B., de Borba, P. C., Naud, P. S., Roteli-Martins, C. M., De Carvalho, N. S., Teixeira, J. C., Aoki, F., Ramjattan, B., Shier, R. M., Somani, R., Barbier, S., Blatter, M. M., Chambers, C., Ferris, D., Gall, S. A., Guerra, F. A., Harper, D. M., Hedrick, J. A., Henry, D. C., Korn, A. P., Kroll, R., Moscicki, A. B., Rosenfeld, W. D., Sullivan, B. J., Thoming, C. S., Tyring, S. K., Wheeler, C. M., Dubin, G., Schuind, A., Zahaf, T., Greenacre, M. & Sgriobhadair, A. (2009). Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6.4 years. *Lancet* **374**, 1975-1985.

Ronco, G., Segnan, N., Giorgi-Rossi, P., Zappa, M., Casadei, G. P., Carozzi, F., Dalla Palma, P., Del Mistro, A., Folicaldi, S., Gillio-Tos, A., Nardo, G., Naldoni, C., Schincaglia, P., Zorzi, M., Confortini, M. & Cuzick, J. (2006). Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* **98**, 765-774.

Rose, R. C., Reichman, R. C. & Bonnez, W. (1994). Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. *J Gen Virol* **75 (Pt 8)**, 2075-2079.

Roseto, A., Pothier, P., Guillemin, M. C., Peries, J., Breitburd, F., Bonneaud, N. & Orth, G. (1984). Monoclonal antibodies to the major capsid protein of human papillomavirus type 1. *J Gen Virol* **65 (Pt 8)**, 1319-1324.

Rubio, I., Bolchi, A., Moretto, N., Canali, E., Gissmann, L., Tommasino, M., Muller, M. & Ottonello, S. (2009). Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20 -- 38) peptide displayed on bacterial thioredoxin. *Vaccine* **27**, 1949-1956.

Sadeyen, J. R., Tourne, S., Shkreli, M., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. (2003). Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope. *Virology* **309**, 32-40.

Sandalon, Z., Dalyot-Herman, N., Oppenheim, A. B. & Oppenheim, A. (1997). In vitro assembly of SV40 virions and pseudovirions: vector development for gene therapy. *Hum Gene Ther* **8**, 843-849.

Sapp, M. & Day, P. M. (2009). Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* **384**, 400-409.

Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J. R. & Streeck, R. E. (1998). Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol* **72**, 6186-6189.

Sapp, M. & Selinka, H. C. (2005). Generation and applications of HPV pseudovirions using vaccinia virus. *Methods Mol Med* **119**, 463-482.

Sasagawa, T., Inoue, M., Lehtinen, M., Zhang, W., Gschmeissner, S. E., Hajibagheri, M. A., Finch, J. & Crawford, L. (1996). Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**, 403-410.

Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Gschmeissner, S. E., Hajibagheri, M. A., Finch, J., Crawford, L. & Tommasino, M. (1995). Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Virology* **206**, 126-135.

Schafer, F., Florin, L. & Sapp, M. (2002). DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in vivo. *Virology* **295**, 172-181.

Schellenbacher, C., Roden, R. & Kirnbauer, R. (2009). Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad-spectrum human papillomavirus vaccines. *J Virol* **83**, 10085-10095.

Schiffman, M. H. & Brinton, L. A. (1995). The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* **76**, 1888-1901.

Schlegel, R., Wade-Glass, M., Rabson, M. S. & Yang, Y. C. (1986). The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science* **233**, 464-467.

Schodel, F., Peterson, D., Zheng, J., Jones, J. E., Hughes, J. L. & Milich, D. R. (1993). Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *J Biol Chem* **268**, 1332-1337.

Sedman, S. A., Barbosa, M. S., Vass, W. C., Hubbert, N. L., Haas, J. A., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* **65**, 4860-4866.

Sedman, T., Sedman, J. & Stenlund, A. (1997). Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* **71**, 2887-2896.

Seif, I. (1984). Sequence homology between the large tumor antigen of polyoma viruses and the putative E1 protein of papilloma viruses. *Virology* **138**, 347-352.

Selinka, H. C., Florin, L., Patel, H. D., Freitag, K., Schmidtke, M., Makarov, V. A. & Sapp, M. (2007). Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *J Virol* **81**, 10970-10980.

Selinka, H. C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N. D. & Sapp, M. (2003). Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J Virol* **77**, 12961-12967.

Selinka, H. C., Giroglou, T. & Sapp, M. (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**, 279-287.

Seo, Y. S., Muller, F., Lusky, M. & Hurwitz, J. (1993). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 702-706.

Shafti-Keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K. & Kirnbauer, R. (2003). Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* **77**, 13125-13135.

Shirasawa, H., Tomita, Y., Sekiya, S., Takamizawa, H. & Simizu, B. (1987). Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol* **68 (Pt 2)**, 583-591.

Slupetzky, K., Gambhira, R., Culp, T. D., Shafti-Keramat, S., Schellenbacher, C., Christensen, N. D., Roden, R. B. & Kirnbauer, R. (2007). A papillomavirus-like particle

(VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vaccine* **25**, 2001-2010.

Slupetzky, K., Shafti-Keramat, S., Lenz, P., Brandt, S., Grassauer, A., Sara, M. & Kirnbauer, R. (2001). Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops. *J Gen Virol* **82**, 2799-2804.

Smith, J. F., Brownlow, M., Brown, M., Kowalski, R., Esser, M. T., Ruiz, W., Barr, E., Brown, D. R. & Bryan, J. T. (2007a). Antibodies from women immunized with Gardasil cross-neutralize HPV 45 pseudovirions. *Hum Vaccin* **3**, 109-115.

Smith, J. L., Campos, S. K. & Ozbun, M. A. (2007b). Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol* **81**, 9922-9931.

Song, S., Pitot, H. C. & Lambert, P. F. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* **73**, 5887-5893.

Sparkowski, J., Mense, M., Anders, J. & Schlegel, R. (1996). E5 oncoprotein transmembrane mutants dissociate fibroblast transforming activity from 16-kilodalton protein binding and platelet-derived growth factor receptor binding and phosphorylation. *J Virol* **70**, 2420-2430.

Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C. & Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One* **3**, e3313.

Sun, Y. N., Lu, J. Z. & McCance, D. J. (1996). Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* **216**, 219-222.

Suzich, J. A., Ghim, S. J., Palmer-Hill, F. J., White, W. I., Tamura, J. K., Bell, J. A., Newsome, J. A., Jenson, A. B. & Schlegel, R. (1995). Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11553-11557.

Terry, G., Ho, L., Londesborough, P., Cuzick, J., Mielzynska-Lohnas, I. & Lorincz, A. (2001). Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *J Med Virol* **65**, 155-162.

Thorner, L. K., Lim, D. A. & Botchan, M. R. (1993). DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol* **67**, 6000-6014.

Tidy, J. (1992). Conservative treatment of mild/moderate cervical dyskaryosis. *Lancet* **339**, 1293-1294.

Touzé, A. & Coursaget, P. (1998). In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res* **26**, 1317-1323.

Touzé, A., Enogat, N., Buisson, Y. & Coursaget, P. (1999). Baculovirus expression of chimeric hepatitis B virus core particles with hepatitis E virus epitopes and their use in a hepatitis E immunoassay. *J Clin Microbiol* **37**, 438-441.

Touzé, A., Mahe, D., El Mehdaoui, S., Dupuy, C., Combita-Rojas, A. L., Bousarghin, L., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. (2000). The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiol Lett* **189**, 121-127.

Trus, B. L., Roden, R. B., Greenstone, H. L., Vrhel, M., Schiller, J. T. & Booy, F. P. (1997). Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 A resolution. *Nat Struct Biol* **4**, 413-420.

Unckell, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. (1997). Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol* **71**, 2934-2939.

Vaccarella, S., Franceschi, S., Snijders, P. J., Herrero, R., Meijer, C. J. & Plummer, M. (2010). Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**, 503-510.

Van Ranst, M., Kaplan, J. B. & Burk, R. D. (1992). Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* **73 (Pt 10)**, 2653-2660.

Varsani, A., Williamson, A. L., de Villiers, D., Becker, I., Christensen, N. D. & Rybicki, E. P. (2003). Chimeric human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16. *J Virol* **77**, 8386-8393.

Volpers, C., Schirmacher, P., Streeck, R. E. & Sapp, M. (1994). Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* **200**, 504-512.

Voss, S. & Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* **10**, 975-982.

Vousden, K. (1993). Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J* **7**, 872-879.

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. & Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**, 12-19.

Wallin, K. L., Wiklund, F., Angstrom, T., Bergman, F., Stendahl, U., Wadell, G., Hallmans, G. & Dillner, J. (1999). Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* **341**, 1633-1638.

Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., Davy, C., Masterson, P. J., Walker, P. A., Laskey, P., Omary, M. B. & Doorbar, J. (2004). Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* **78**, 821-833.

Wentzensen, N., Vinokurova, S. & von Knebel Doeberitz, M. (2004). Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* **64**, 3878-3884.

Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76-79.

White, W. I., Wilson, S. D., Bonnez, W., Rose, R. C., Koenig, S. & Suzich, J. A. (1998). In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16. *J Virol* **72**, 959-964.

White, W. I., Wilson, S. D., Palmer-Hill, F. J., Woods, R. M., Ghim, S. J., Hewitt, L. A., Goldman, D. M., Burke, S. J., Jenson, A. B., Koenig, S. & Suzich, J. A. (1999). Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J Virol* **73**, 4882-4889.

Wiener, H. G., Klinkhamer, P., Schenck, U., Arbyn, M., Bulten, J., Bergeron, C. & Herbert, A. (2007). European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for cytology laboratories. *Cytopathology* **18**, 67-78.

Williams, K. J. & Fuki, I. V. (1997). Cell-surface heparan sulfate proteoglycans: dynamic molecules mediating ligand catabolism. *Curr Opin Lipidol* **8**, 253-262.

Yang, R., Day, P. M., Yutzy, W. H. t., Lin, K. Y., Hung, C. F. & Roden, R. B. (2003). Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol* **77**, 3531-3541.

Yeager, M. D., Aste-Amezaga, M., Brown, D. R., Martin, M. M., Shah, M. J., Cook, J. C., Christensen, N. D., Ackerson, C., Lowe, R. S., Smith, J. F., Keller, P. & Jansen, K. U. (2000). Neutralization of human papillomavirus (HPV) pseudovirions: a novel and efficient approach to detect and characterize HPV neutralizing antibodies. *Virology* **278**, 570-577.

Zhao, K. N., Sun, X. Y., Frazer, I. H. & Zhou, J. (1998). DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology* **243**, 482-491.

Zhou, J., Doorbar, J., Sun, X. Y., Crawford, L. V., McLean, C. S. & Frazer, I. H. (1991a). Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* **185**, 625-632.

Zhou, J., Stenzel, D. J., Sun, X. Y. & Frazer, I. H. (1993). Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *J Gen Virol* **74 (Pt 4)**, 763-768.

Zhou, J., Sun, X. Y., Stenzel, D. J. & Frazer, I. H. (1991b). Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* **185**, 251-257.

Figures

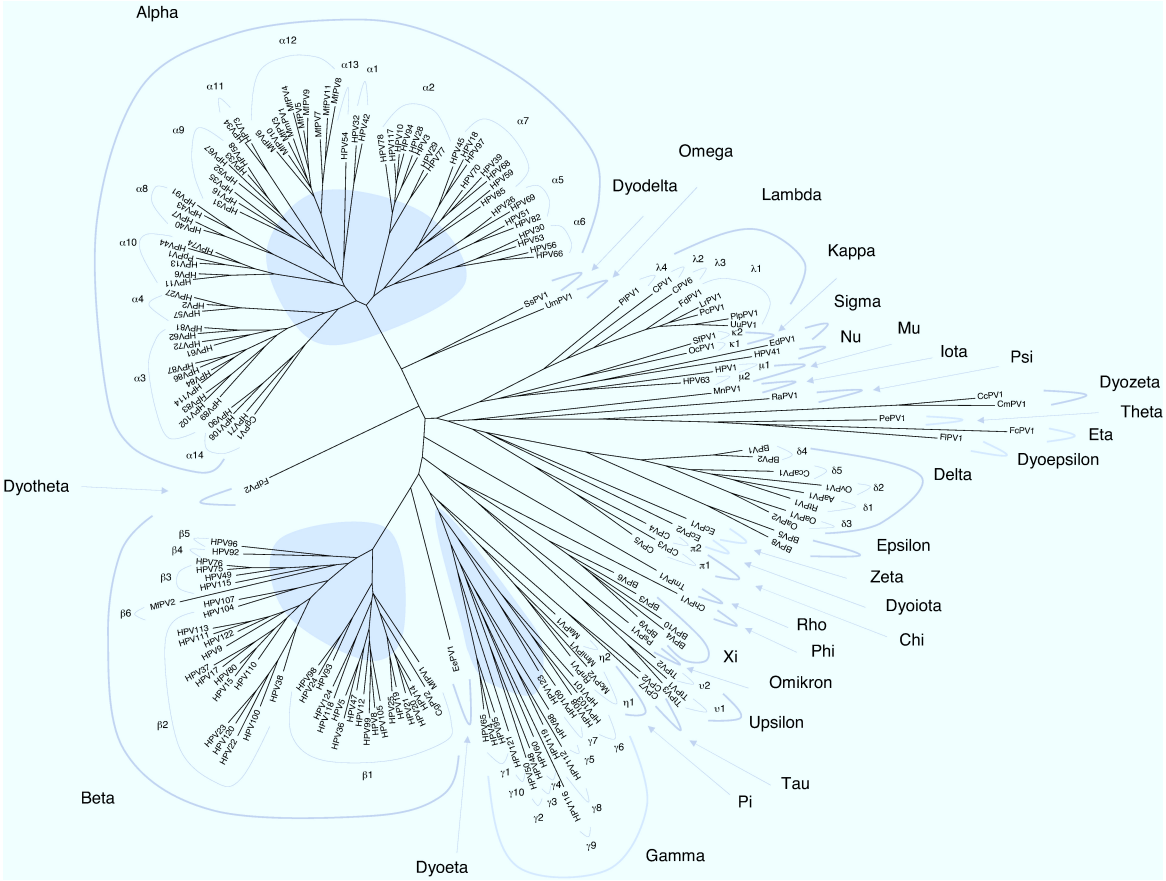


Figure 1. Arbre phylogénétique de 118 types de papillomavirus construit par l'analyse de séquences partielles du gène L1 (d'après Bernard *et al*, 2010).

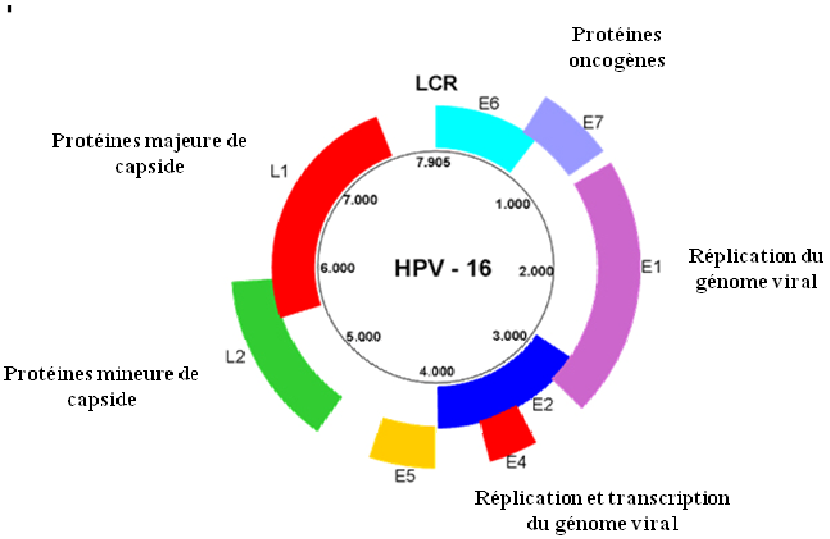


Figure 2. Organisation du génome de l'HPV 16 et fonctions des protéines codées par les différents ORFs

E1 : Liaison à l'origine de réplication et activité hélicase

E2 : Régulateur transcriptionnel négatif de l'expression de protéines E6 et E7

E4 : Rôle dans la libération du virus dans l'environnement, dans la réplication et l'assemblage

E5 : Oncogène (activation des facteurs de croissance et diminution de l'expression du CMH I)

E6 : Oncogène (inactive p53 et active la télomérase)

E7 : Oncogène (inactive pRb et active la télomérase)

E8 : Absent de la majorité des papillomavirus, pas de protéine traduite

L1 : Protéine majeure de capside

L2 : Protéine mineure de capside

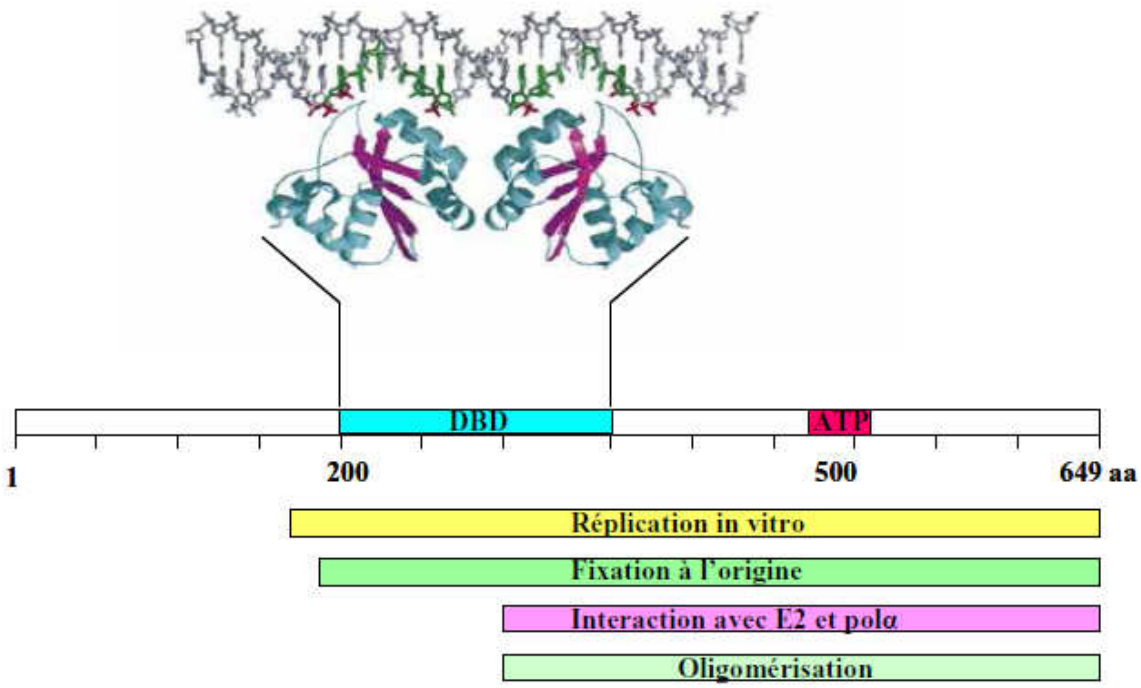


Figure 3. Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine E1 : domaine de fixation à l'ADN (DBD) dont la structure du co-cristal est représentée (d'après Enemark *et al.*, 2000), domaine de fixation à l'ATP et les régions de E1 impliquées dans les différentes fonctions de la protéine (d'après White *et al.*, 2001).

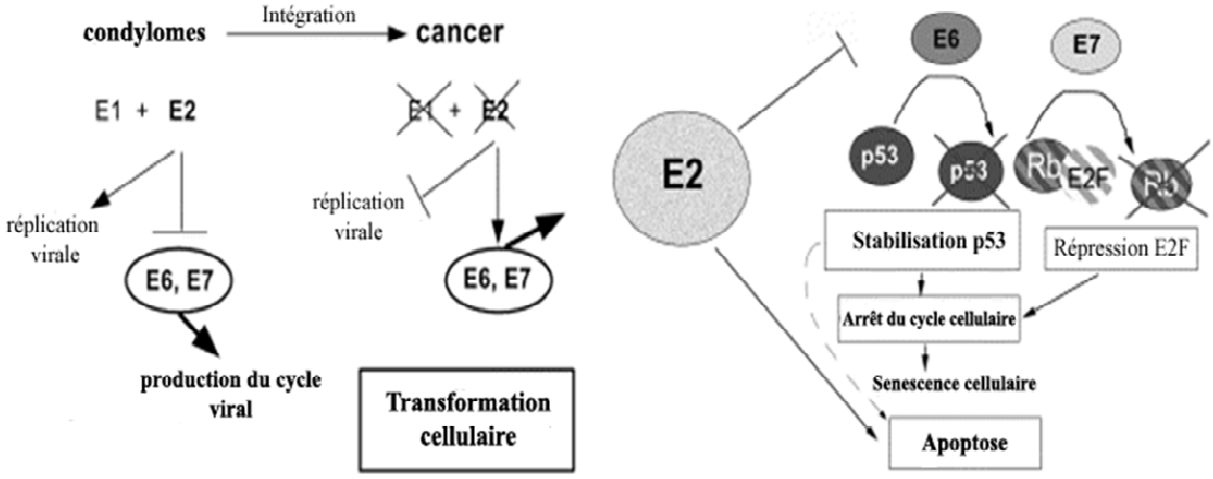


Figure 4. Rôle de la protéine E2 dans le cycle viral et la progression vers un cancer du col de l'utérus. A gauche, régulation du cycle cellulaire par E2 dans le cas d'infection par un HPV à haut risque au début de l'infection. Au cours du cycle viral, l'accumulation de la protéine E2 permettrait à la fois une amplification de l'ADN viral en coopération avec la protéine E1 et une répression transcriptionnelle des oncoprotéines E6 et E7 entraînant la stabilisation de p53 provoquant un arrêt de cycle en G1 et une mort cellulaire par apoptose. La protéine E2 pourrait agir au stade final de la différenciation cellulaire et permettrait la libération du virus dans le milieu extérieur. **A droite**, modification de la régulation des protéines E6 et E7 des HPV à haut risque. Dans les carcinomes cervicaux associés à HPV, la protéine E2 est absente du fait de l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire avec rupture de la POL E2. Le complexe Rb/E2F se dissocie et libère le facteur E2F qui va permettre la trans-activation des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, ce qui a pour conséquence une prolifération cellulaire incontrôlée (d'après Desaintes *et* Demeret, 1996).

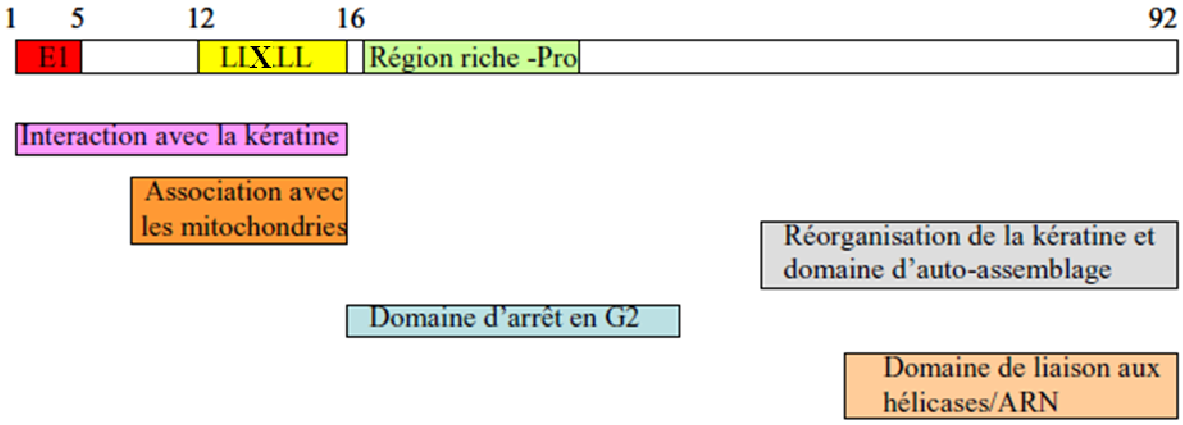


Figure 5. Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine de fusion E1^E4.

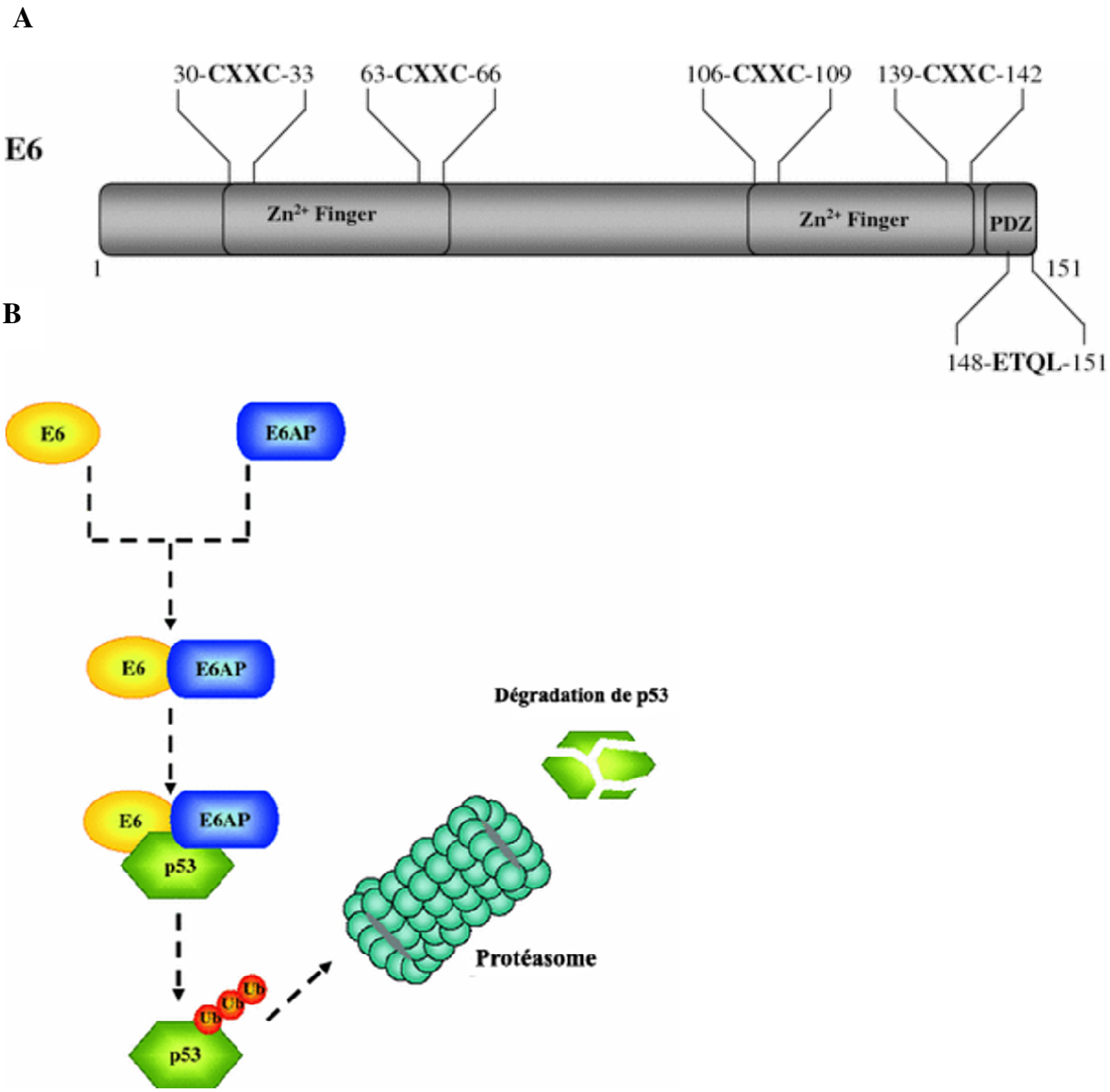


Figure 6. Effet de la protéine E6 sur le cycle cellulaire (adapté de Doorbar et Sterling, 2001). La protéine E6 des HPV à haut risque induit la dégradation de la protéine p53 en présence de la protéine cellulaire E6-AP. La perte de p53 conduit à un état d'instabilité génétique pouvant conduire à la prolifération anormale des cellules.

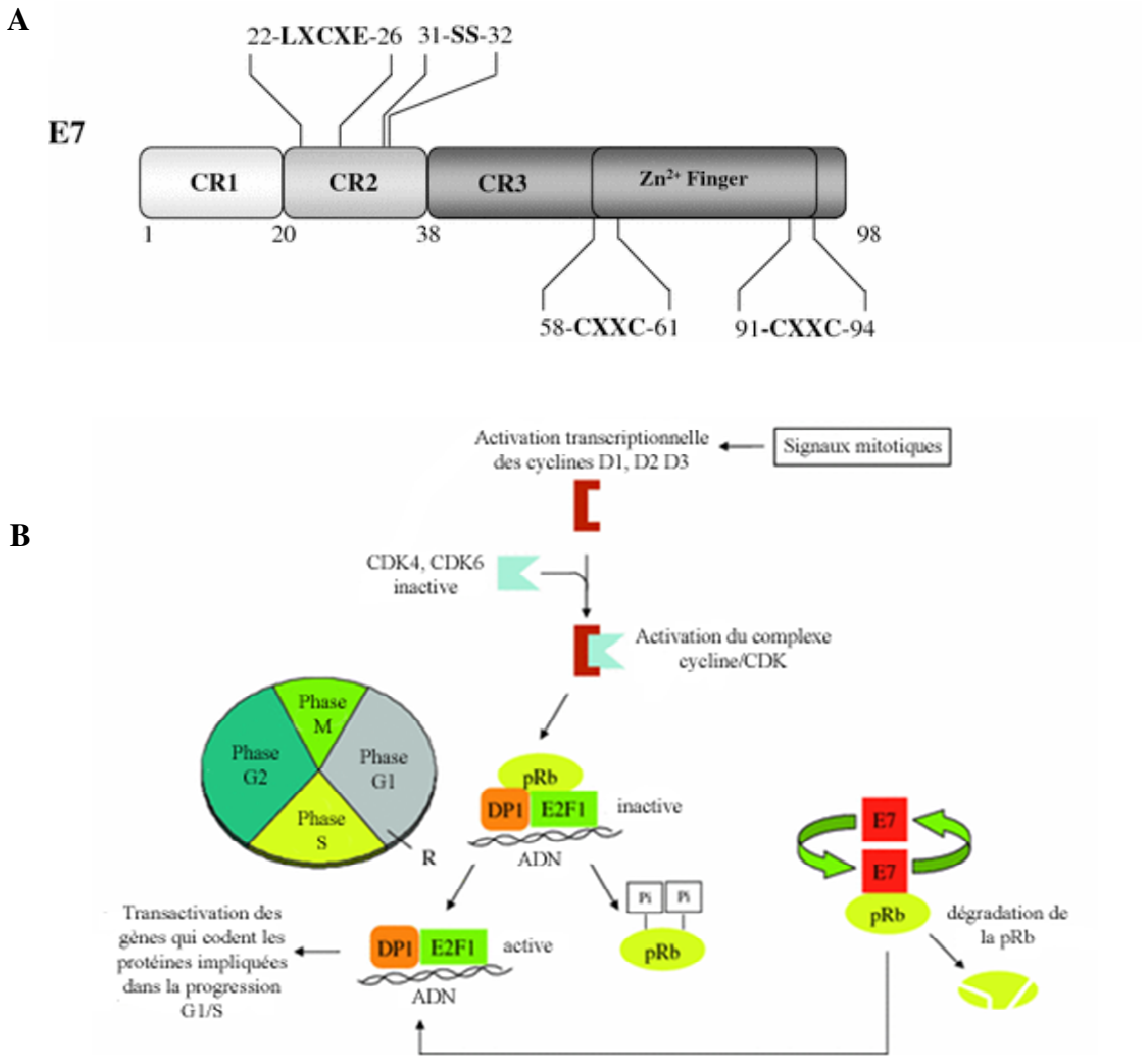


Figure 7. Représentation schématique de la protéine E7 et son effet sur le cycle cellulaire.

(A) La protéine E7 contient 2 motifs CXXC en doigts de zinc et présente 3 régions conservées homologues à celles de l'adénovirus EA1 (CR1, CR2, CR3). La région CR2 comprend un motif de liaison à la pRb de types LXCXE et 2 sérines en position 31 et 32 qui sont phosphorylées par la caséine kinase II (CKII).

(B) La protéine E7 dérégule le cycle. Le facteur de transcription E2F forme des complexes d'hétérodimères avec la protéine DP1 et régule la transcription de certains gènes durant le cycle cellulaire. Dans les cellules quiescentes, la protéine Rb est présente sous forme phosphorylée et associée à E2F inhibant ainsi son activité transcriptionnelle. Quand les cellules quiescentes sont exposées aux signaux mitotiques, les gènes codant les cyclines D (D1, D2 et D3) spécifiques de la phase G1 sont activés. Les cyclines s'associent alors avec une sous-unité catalytique CDK4 ou CDK6 et après le transport au noyau, les complexes de kinases phosphorylent pRb en milieu de phase G1, causant la sortie des complexes d'hétérodimères E2F/DP1 et la progression vers le point de restriction (R). E7 se lie à la pRb mimant ainsi sa phosphorylation. Ainsi les cellules exprimant la protéine E7 peuvent entrer en phase S, et ce, en absence de signal mitogénique.

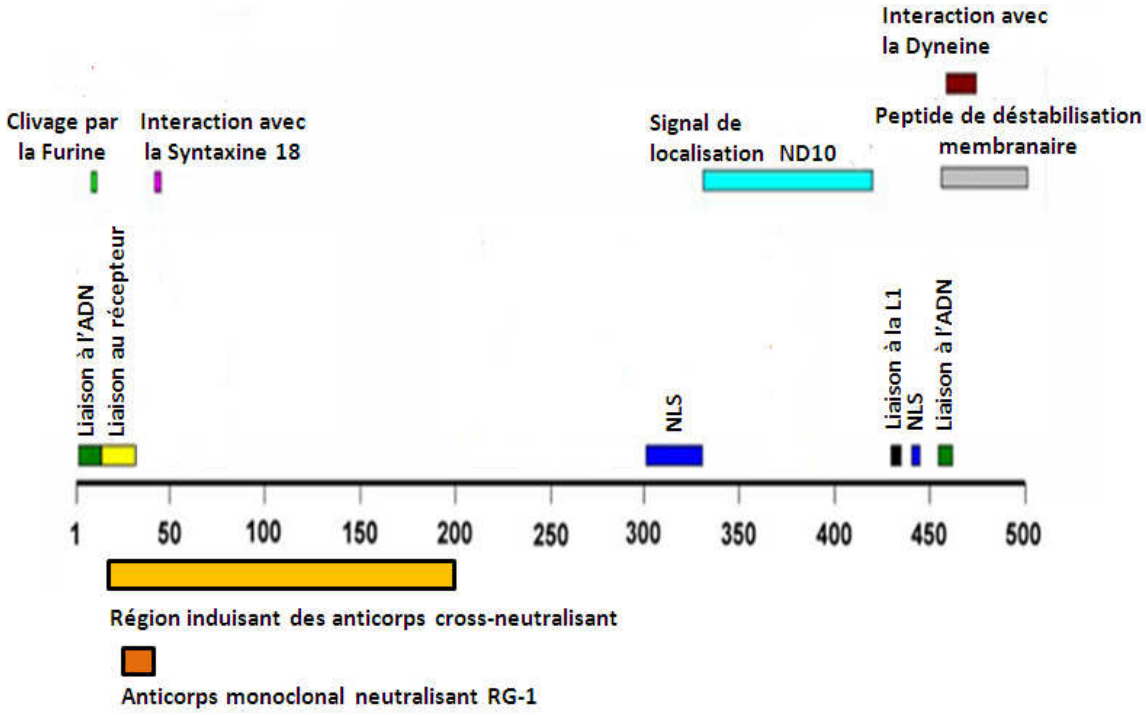


Figure 8. Présentation des différentes régions fonctionnelles de la protéine L2 de l'HPV 16 (adapté de Karanam *et al*, 2009)**.**

Les domaines de liaison à l'ADN : 1–13 et 454–462, le site de clivage par la furine : 8–11, le site de liaison au récepteur : 13–31, la région d'interaction avec la syntaxine-18 : 43–47, les sites de localisation nucléaire : 300–330 et le signal de localisation dans les ND10 : 330–420, le domaine de liaison à la protéine L1 : 412–455, aussi décrit en NLS au niveau des acides aminés 440–445, région d'interaction avec la dynéine : 457–473, le peptide de déstabilisation membranaire : 454–500.

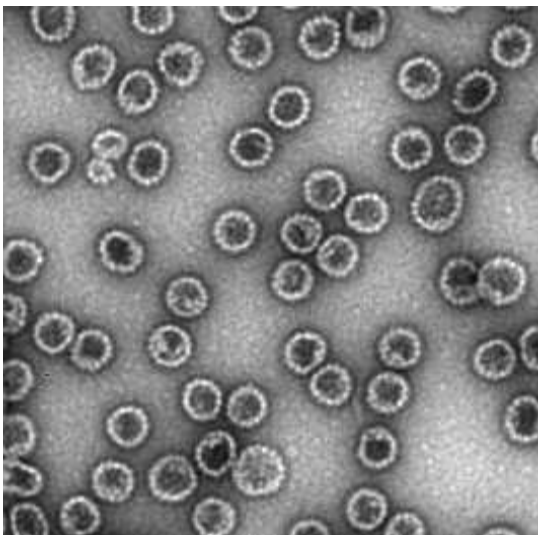


Figure 9. Pseudo-particules virales d'HPV 31 obtenues par expression de la protéine L1 en système baculovirus/cellules d'insecte (d'après Touzé et Sizaret, travaux du laboratoire). La barre représente 50 nm.

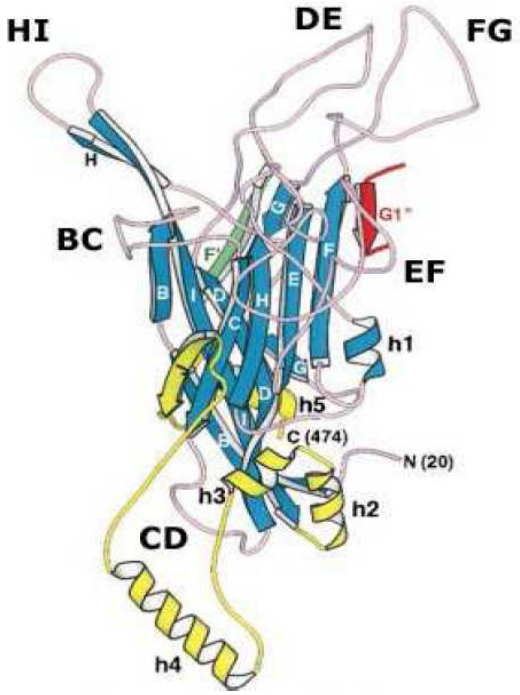


Figure 10. Représentation schématique de la structure tertiaire de la protéine L1 de l'HPV 16 (d'après Chen *et al*., 2000). La protéine L1 possède 6 boucles antigéniques. Les boucles BC, DE, EF, FG et HI sont orientées vers l'extérieur de la capside, la boucle CD est orientée vers l'intérieur.

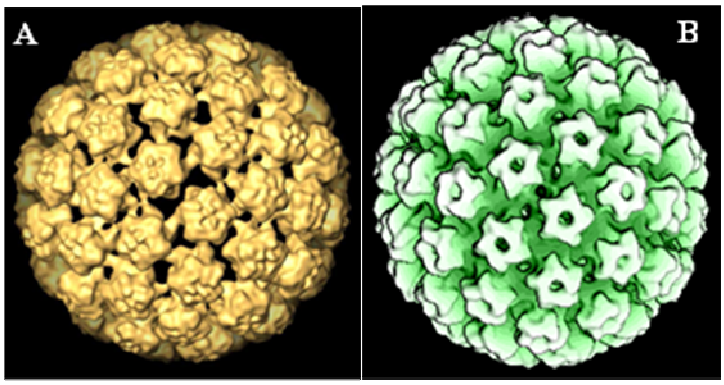


Figure 11. Reconstruction d'image après cryomicroscopie électronique des structures tridimensionnelles des pseudoparticules virales d'HPV. A. Capside de l'HPV 31 composée de protéines L1(d'après James Conway, travaux non publiés). **B.** Capside l'HPV 1 composée de protéines L1 (d'après Hagensee *et al.*, 1994).

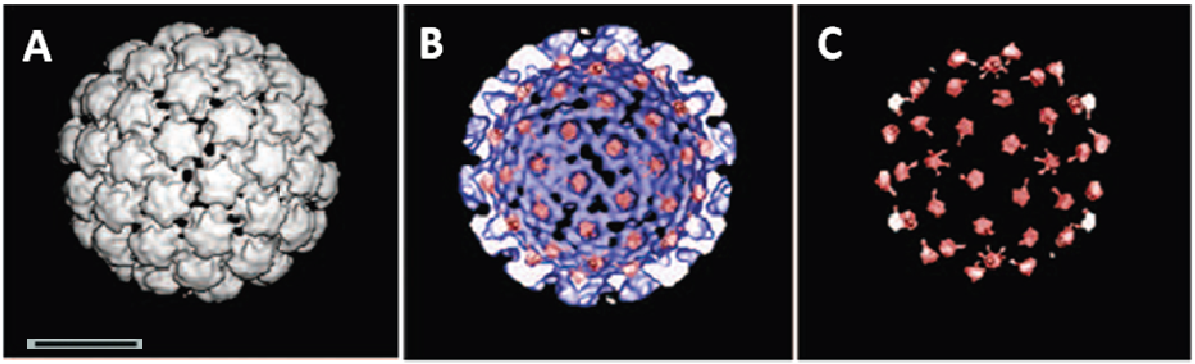


Figure 12. Reconstitution 3D de pseudoparticules virales d'HPV 16 obtenue par expression des protéines L1 et L1+L2 par cryomicroscopie électronique (d'après Buck et al., 2008)**.**

A/ Représentation de la capside constituée des protéines L1 et L2 de l'HPV 16.

B/ Représentation en coupe de l'intérieur de la capside virale avec la protéine L1 en bleu et la protéine L2 en rouge

C/ la protéine L2 seule en rouge. Barre = 200 Å

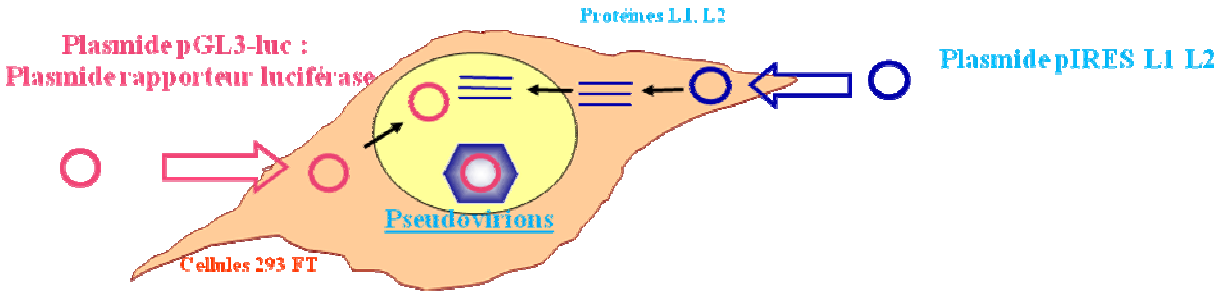


Figure 13. Représentation schématique de la production de pseudovirions en système cellulaire 293FT. Les cellules 293FT sont co-transfectées à l'aide de 2 plasmides : en bleu le plasmide pIRES codant les protéines L1 et L2 d'un type d'HPV, et en rose le plasmide rapporteur pGL3-luc codant le gène de la luciférase. Les protéines L1 et L2 vont s'autoassembler autour du plasmide rapporteur formant ainsi des pseudovirions.

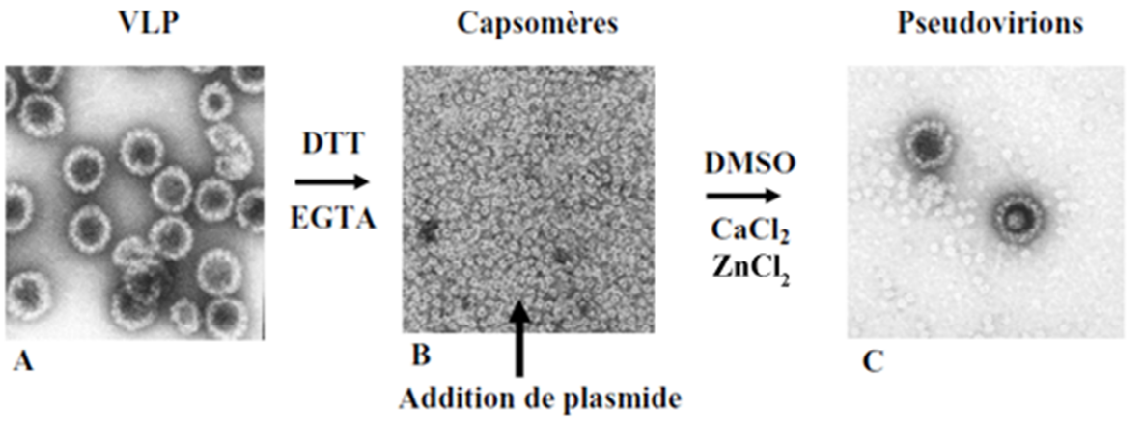


Figure 14. Observation en microscopie électronique de la formation de pseudovirions par la méthode de dissociation-association

Les VLP L1 d'HPV 16 (**A**) sont dissociées en capsomères (**B**), le plasmide contenant le gène rapporteur est mis en présence des capsomères (**B**). Des complexes ADN/VLP se forment (**C**) en présence de $CaCl_2$ (D'après Touzé *et* Coursaget, 1998).

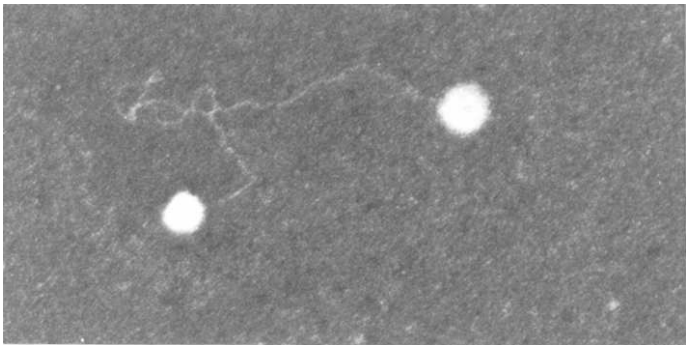


Figure 15. Obtention de pseudovirions d'HPV 31 L1 par la méthode d'interaction directe observés en microscopie électronique (d'après Bousarghin *et al.*, 2002).

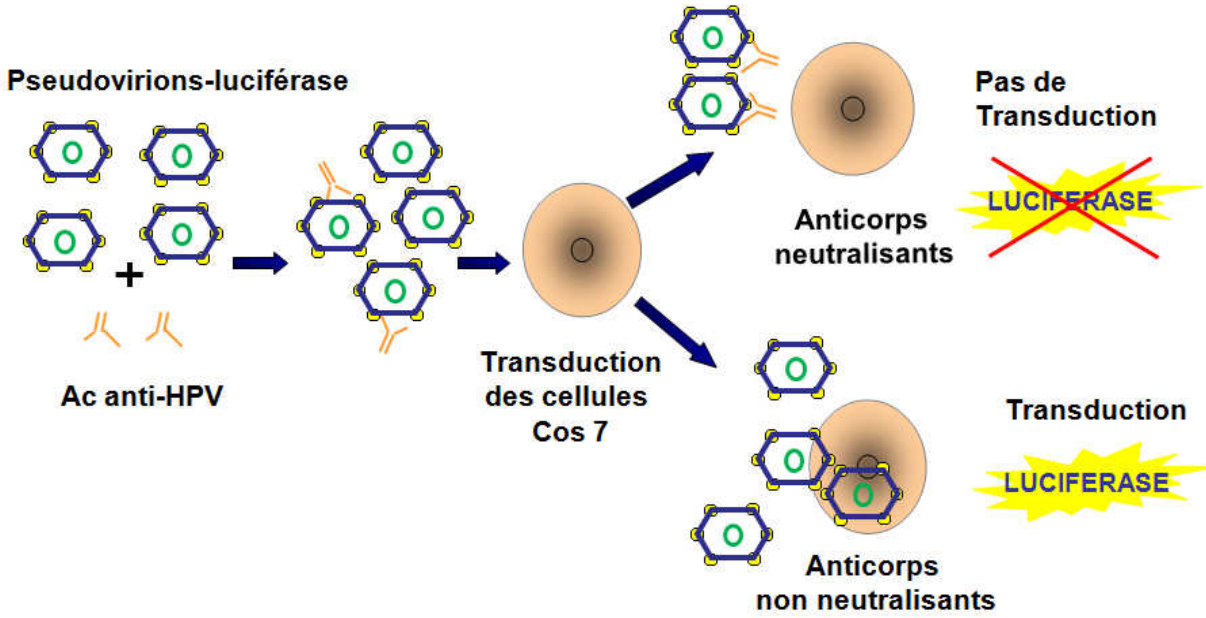


Figure 16. Représentation schématique de détection des anticorps neutralisants. Les pseudovirions contenant un plasmide codant pour le gène de la luciférase obtenus en système cellulaire 293FT sont mis en contact avec des anticorps pendant 1h à 37°C puis déposés sur des cellules COS-7. Après 2 jours de culture à 37°C, l'activité luciférase est révelée. Dans le cas d'anticorps neutralisants, une inhibition partielle ou totale de l'activité luciférase sera mesurée **(A).** Dans le cas d'anticorps non neutralisants, un signal luciférase maximal sera mesuré **(B).**

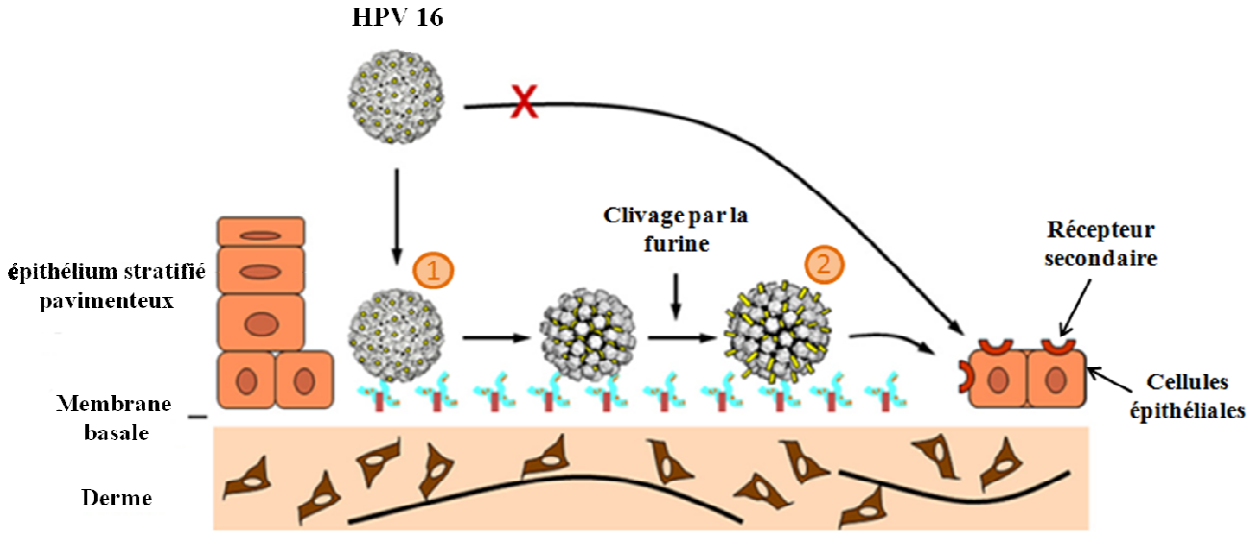


Figure 17. Modèle d'attachement des HPV à la cellule.

Les capsides interagissent avec les héparanes sulfates au niveau de la membrane basale. Cette interaction avec le récepteur primaire induit un changement de conformation de la capside qui permet de rendre accessible le site de clivage par la furine situé dans la partie N-terminale de la protéine L2 (1). Ce changement de conformation induit également une baisse d'affinité pour les héparanes sulfates. Le clivage par la furine permet l'exposition du peptide 17-36 au niveau de la membrane basale (2). Suite au changement de conformation, la capside peut se lier à un récepteur secondaire au niveau des cellules épithéliales. Ce transfert d'affinité s'opère par roulement de la capside vers les cellules de la membrane pendant le processus de cicatrisation (d'après Kines *et al.*, 2009).

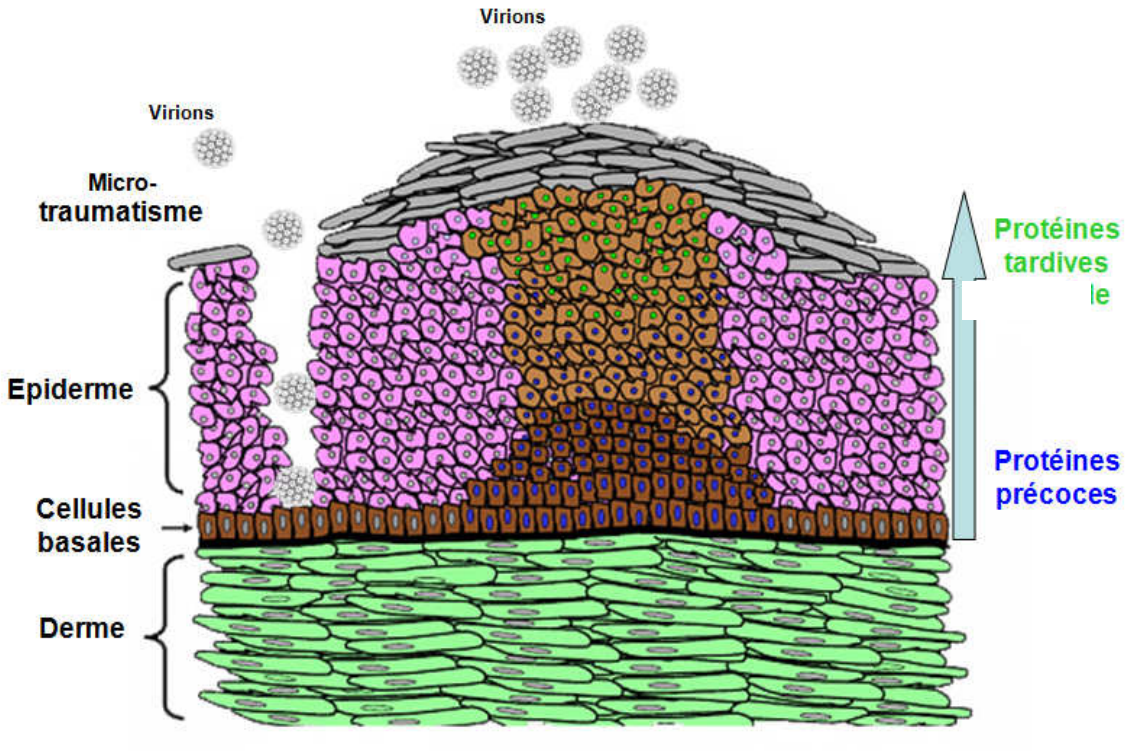


Figure 18. Représentation schématique du cycle viral des HPV dans un épithélium pluristratifié.

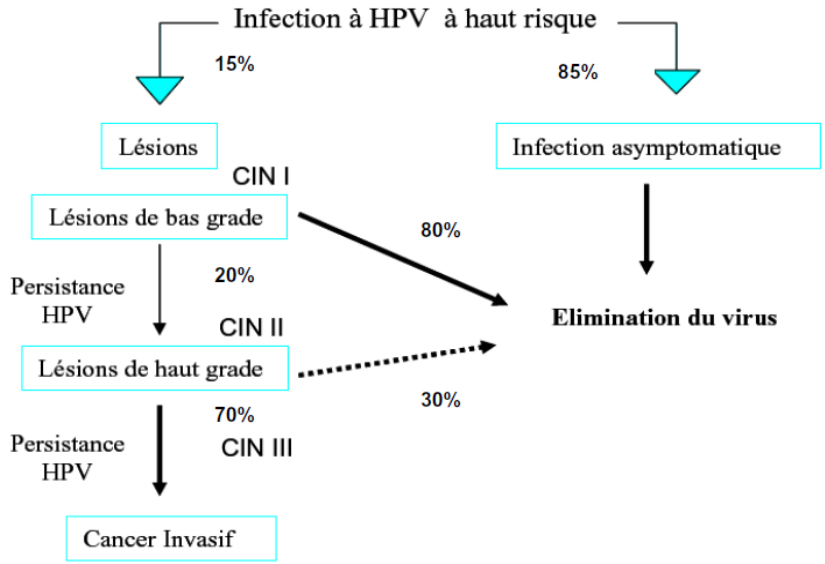
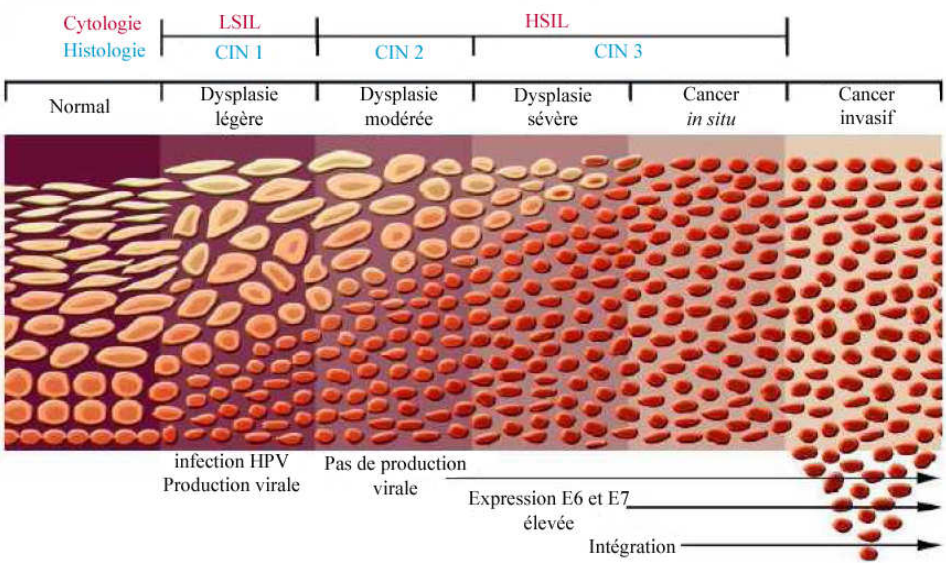


Figure 19. Histoire naturelle de l'infection par un HPV à haut risque (d'après Schiffman *et* Kjaer, 2003).

A



B

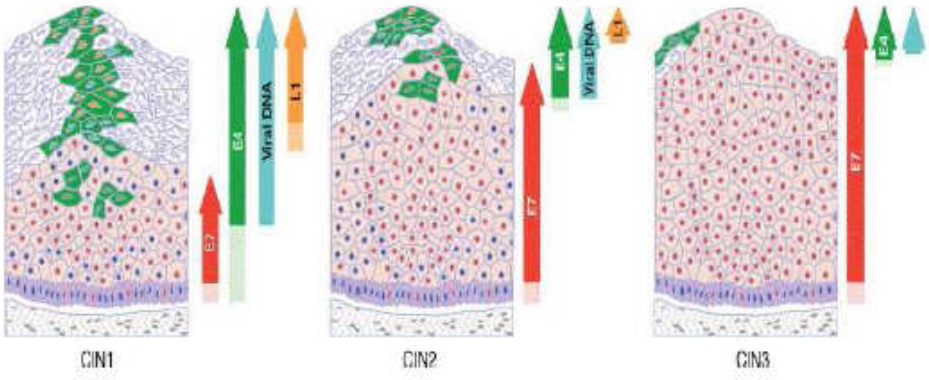


Figure 20. A. Représentation schématique des différents grades de lésions histologiques du col de l'utérus (d'après Lowy *et* Schiller, 2006) ; **B. Expression des protéines virales en fonction de la différenciation de l'épithélium** (d'après Doorbar, 2005).

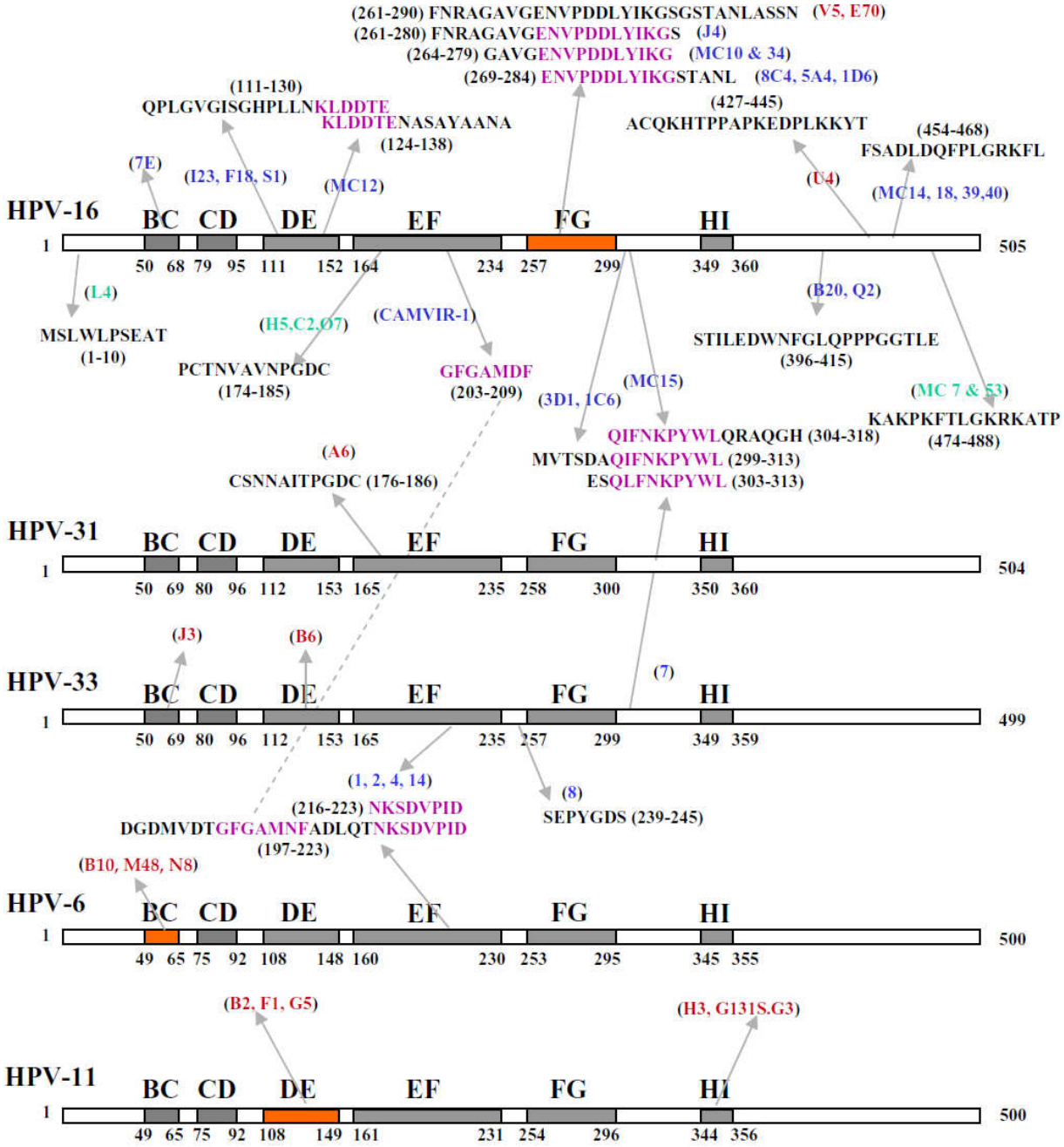


Figure 21. Représentation schématique de la carte épitopique de la protéine L1 des papillomavirus humains de types 6, 11, 16, 31 et 33. Boucle de la protéine L1. Boucle comportant un épitope immunodominant inducteur d'anticorps neutralisants. En **rouge**, anticorps reconnaissant un épitope conformationnel. En **bleu**, anticorps présentant des réactivités croisées reconnaissant un épitope linéaire. En **vert**, anticorps spécifique de type reconnaissant un épitope linéaire. En **rose**, séquence conservée reconnue par différents anticorps.

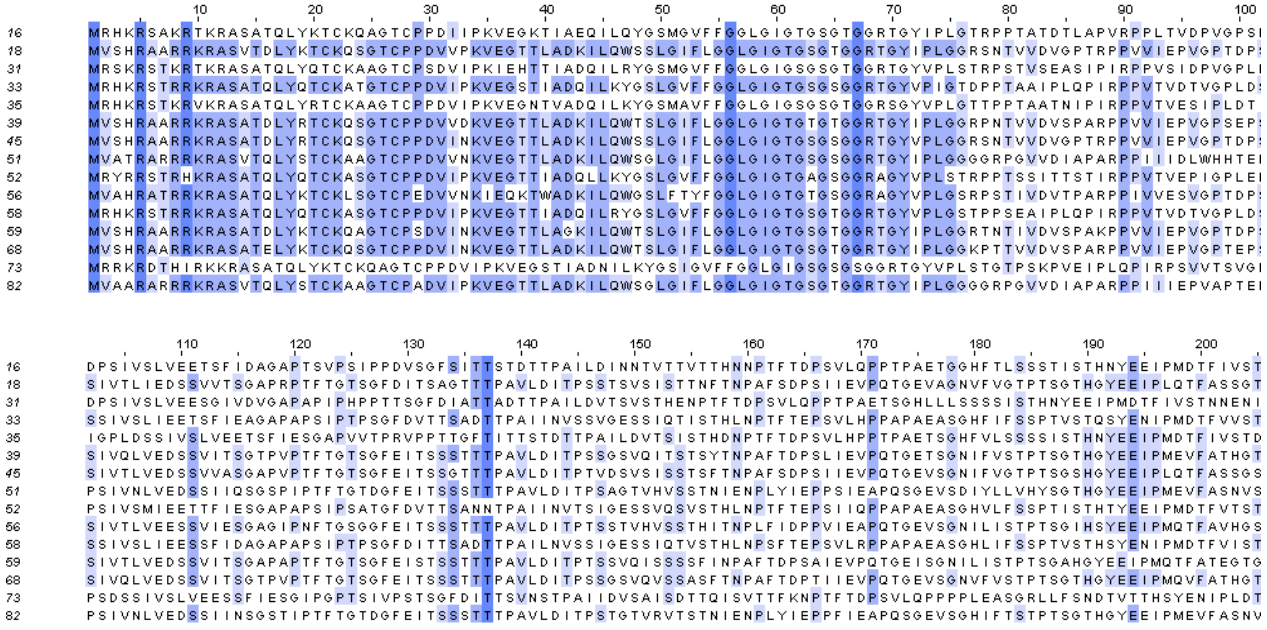


Figure 22. Alignement de la partie N-terminale de la protéine L2 : acide aminé 1-200 pour les 15 types de papillomavirus HR. Le pourcentage d'identité est représenté en dégradé de bleu (Réalisé avec Jalview 2.5.1).

Tableau I : Vaccination prophylactique anti-papillomavirus dans les modèles animaux.

MODÈLE ANIMAL	ANTIGÈNE UTILISÉ	PROTECTION	RÉFÉRENCES
Chien-COPV	Virions	+	Bell *et al.*, 1994
	Virions	+	Suzich *et al.*, 1995
	VLP L1	+	
	VLP L1 sans adjuvant	+	
	Sérum anti-VLP	+	
	VLP L1 dénaturées	-	
	VLP hétérologues (HPV 11)	-	
	Pentamères L1 sans adjuvant	+	Yuan *et al.*, 2001
	Gène L1	+	Moore *et al.*, 2002
Lapin-CRPV	VLP L1	+	Breitburd *et al.*, 1995
	VLP L1/L2	+	
	VLP L1/L2 dénaturées	-	
	VLP L1/L2 hétérologues (BPV)	-	
	VLP L1	+	Jansen *et al.*, 1995
	Virions	+	Christensen *et al.*, 1996c
	VLP L1 sans adjuvant	+	
	Gène L1	+	Donnelly *et al.*, 1996
	Protéine L2	+	Lin *et al.*, 1992 Palmer *et al.*, 2006
Bovin-BPV4	VLP L1	+	Kirnbauer *et al.*, 1996
	VLP L1/L2	+	
	Protéine L2	+	Chandrachud *et al.*, 1995 Campo *et al.*, 1997

Tableau II : Caractéristiques du vaccin quadrivalent Gardasil et du vaccin bivalent Cervarix conte le cancer du col de l'utérus.

	GARDASIL® [Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine]	Cervarix®
	HPV 6, 11, 16, 18	HPV 16, 18
Système d'expression	Levure (S. *cerevisae*)	Baculovirus/ Cellules d'insecte
Composition antigénique	20 µg HPV 6 40 µg HPV 11 40 µg HPV 16 20 µg HPV 18	20 µg HPV 16 20 µg HPV 18
Adjuvant	Sulfate d'hydroxyphosphate d'aluminium amorphe (225 µg)	ASO4 (500 µg d'hydroxyde d'aluminium + 50 µg MLP
Voie d'injection	0,5 mL Intramusculaire	0,5 mL Intramusculaire
Calendrier vaccinal	0, 2 et 6 mois	0, 1 et 6 mois

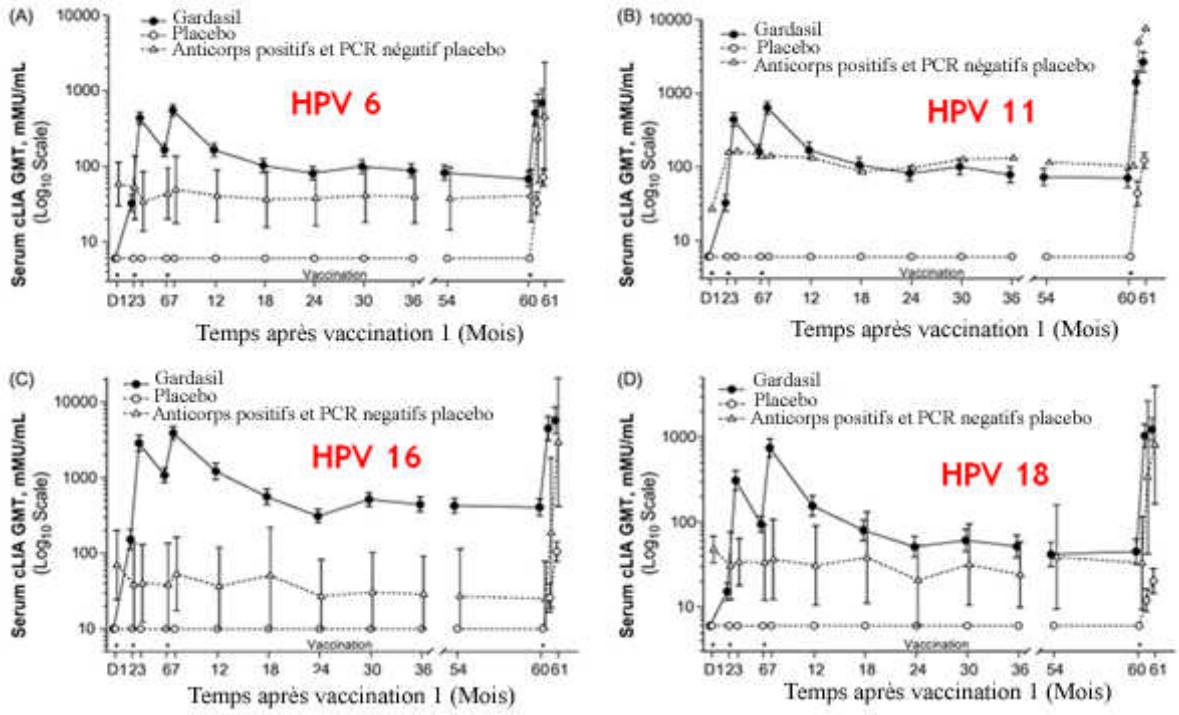


Figure 23. **Persistance de la réponse contre les papillomavirus des types 6, 11,16 et 18 chez des sujets ayant reçus 3 doses du vaccin quadrivalent ou du placebo**. Les sujets enrôlés dans l'étude étaient tous anticorps et ADN négatif pour les types inclus dans le vaccin. La barre d'erreur représente l'intervalle de confiance à 95%. (Olsson *et al.*, 2007).

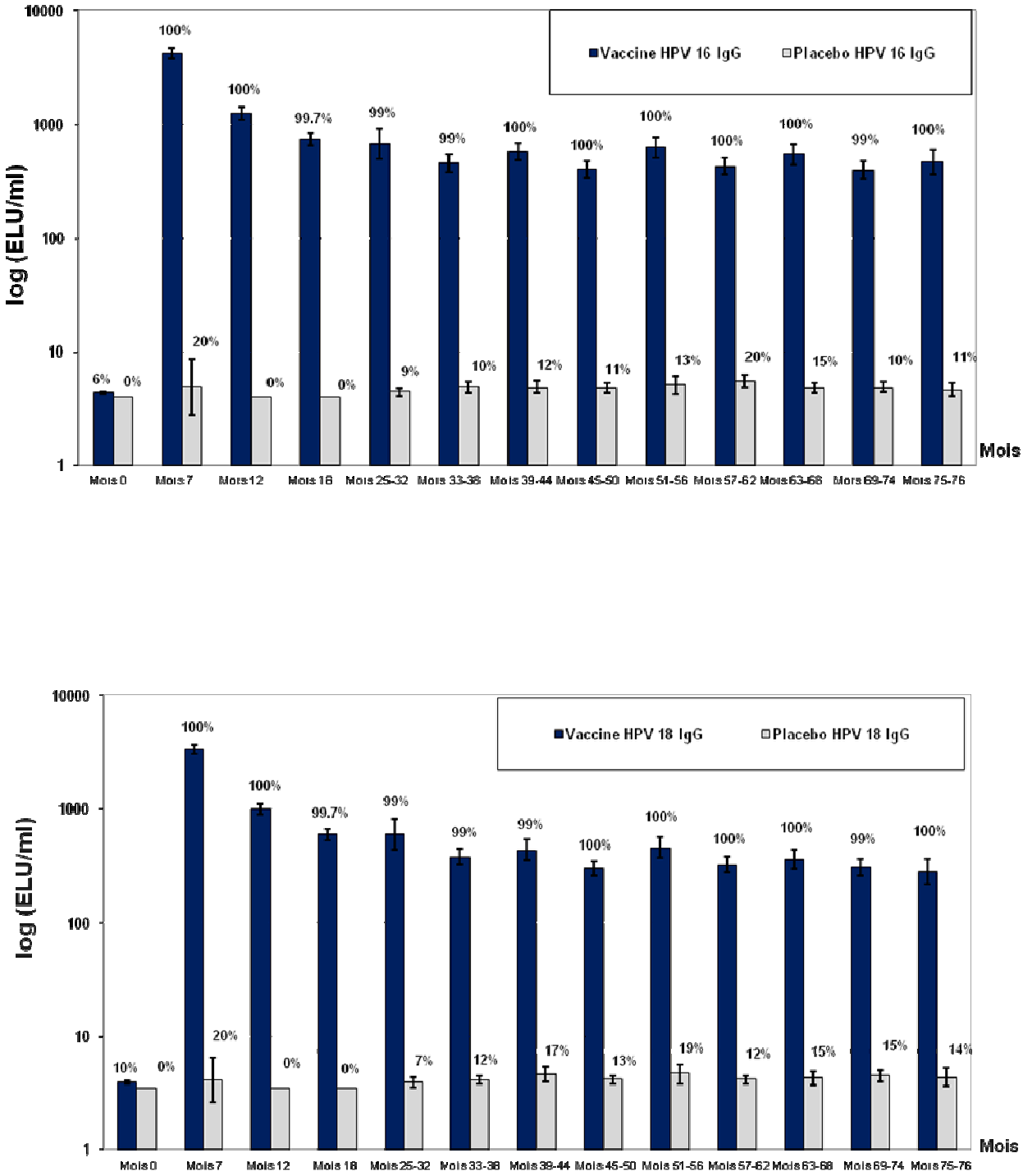


Figure 24. Persistance de la réponse contre les papillomavirus des types 16 et 18 chez des sujets ayant reçus 3 doses du vaccin bivalent ou du placebo. Les sujets enrôlés dans l'étude étaient tous anticorps et ADN négatif pour les types inclus dans le vaccin. La barre d'erreur représente l'intervalle de confiance à 95% (Romanowski *et al.*, 2009).

Tableau III : Résumé des essais de vaccination à l'aide de différentes formulations de la protéine L2

Vaccins	Antigènes L2	Types	Modèle	Adjuvant	Neutralisation	Référence
Peptides synthétiques	11-200	BPV 4	Bovins	$AlOH_3$	Protection type homologue	Chandrachud *et al*., 1995
	101-120 131-151 151-170			KLH	Protection cutanée, protection muqueux	Campos *et al*., 1997
	108-120	HPV 16	Souris	Toxine cholérique	HPV 11 HPV 16	Kawana *et al*., 2001
	1-88	BPV 1	Lapin	Freund incomplet	BPV 1, HPV 16 HPV 18, HPV 31, HPV 6, CRPV	Pastrana *et al*., 2005
	56-75	HPV 16	Lapin	KLH	HPV 16, 18, 31, 58	Kondo *et al*., 2007
	11-200	HPV 16	Lapin	RIBI	Protection ROPV CRPV	Gambhira *et al*., 2007
	17-36	HPV 16	Souris	KLH	HPV 5, 6, 16, 18, 31, 45, 52, 58	Gambhira *et al*., 2007
	17-36	HPV 16	Souris	Pam2Cys-P25	HPV 16, 18, 45, BPV 1	Alphs *et al*., 2008
Peptides insérés / site d'insertion	414-426	HPV 16/ VLP L1 Hélice h4	Souris	Freund incomplet	ND	Varsani *et al*., 2003
	108-120	HPV 16/ VLP L1 BPV4 boucle DE	Lapin	Freund incomplet	HPV 16 HPV 11	Slupetzky *et al*., 2007
	56-75	HPV 16/ VLP L1 HPV 16 boucle HI	Lapin	Freund complet	HPV 16, HPV 18 HPV 31, HPV 52 HPV 58	Kondo *et al*., 2008
	17-36	HPV 16/ VLP L1 HPV 16 boucle DE	Lapin	$AlOH_3$+MPL	HPV 16, HPV 18 HPV 31, HPV 45 HPV 52, HPV 58 HPV 5, HPV 6 HPV 11	Schellenbacher 2009
Polypeptides recombinants	(20-38) ×3	HPV 16	Souris	Thiorédoxine bactérienne	HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 58, HPV 6, HPV 5	Rubio et al., 2009
	(108-120) ×3 (11-88) ×5	HPV 6, 16, 18 HPV 1, 5, 6, 16,18	Souris	$AlOH_3$+1018 GPI 100	HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 58, HPV 6, HPV 5	Jagu et al., 2009

Tableau IV : Séquences des oligonucléotides utilisées pour la réalisation des VLP L1 STII et de la L2SA.

Nom	Séquence (5'→ 3')	Site de restriction
5'-L1hBamHI	GGATCCCACCATGAGCCTGTGGAGACCCAGC	Bam HI
3'-L1hHindIII	AAGCTTTCACTTCTTGGTTTTCTTCCGCTTG	HindIII
aval-Strep	CTTCTCGAACTGGGGGTGGCTCCAGTTCTCGGTGTCGTCCAGCTTGTTC	
amont -Strep	TGGAGCCACCCCCAGTTCGAGAAGGCCAGCGCCTACGCCGCCAACGCC	
3'L2SalI	GTCGACCATGTAGTAGCTGGGGTGCAGGATG	SalI
5'L2BamHI	CCGGATCCGCCACCATGGCCAGCGCCACCCAGCTG	BamHI
M13/pUC forward	GTTTTCCCAGTCACGAC	
M13/pUC reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	

Tableau V : Séquences des oligonucléotides utilisées pour la réalisation des VLP L1 BAP, L1 hBirA BAP, HBc BAP, HBc hBirA BAP et des différents peptides de la protéine L2 fusionnés à la Streptactine.

Nom	Séquence (5'→ 3')	Site de restriction
5'hBirA XhoI	CTCGAGGCCACCATGAAGGACAACACCGTGCC	XhoI
3' hBirA KpnI	GGTACCTACTTCTCTGCGCTTCTCA	KpnI
5'START BIOT	GGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATCGAGTGGCACGAG	
5'L1-16-BamHI	GGATCCGCCACCATGAGCCTGTGGCT	BamHI
3'L1-16-HindIII	AAGCTTCACAGCTTCCTTTTTTTCCGC	HindIII
3' START BIOT DE	TCGAAGATGTCGTTCAGGCCGCCGGCGTTGGCGGCGTAGG	
5' END BIOT DE	CCAGAAGATCGAGTGGCACGAGGTGGACAACCGGGAGTGCAT	
3'START BIOT HI	CCTCGAAGATGTCGTTCAGGCCCTCGCTGGTGCTGATGGCGG	
5' END BIOT HI	CCCAGAAGATCGAGTGGCACGAGACCACCTACAAGAACACCAA	
3'START Biot HBc	GCCTCGAAGATGTCGTTCAGGCCGTCTTCCAAATTACTTCCCA	
5' END BIOT HBc	CCAGAAGATCGAGTGGCACGAGTCCAGGGAATTAGTAGTCAG	
5'HBc BamHI	GGATCCGCCACCATGGACATTGACCCGTATAAAG	BamHI
3'HBc HindIII	AAGCTTCTAACATTGAGATTCCCGAGAT	HindIII
Amont L2 BamHI	CCGGATCCGCCACCATGGCCAGCGCCACCCAGCTG	BamHI
Aval 13-200	GTCGACGGTGTCCATGGGGATTTCCTCG	SalI
Aval 13-78	GTCGACTCTGGTGCCCAGGGGGATGTAGCC	SalI
Amont1 17/36	CCGGCACCTGCCCCCCTGACATCATCCCCAAGGTGCCCTCCAAGGACTCC AAGGC	
Amont2 17/36	GGATCCACCATGCAGCTGTACAAGACCTGCAAGCAGGCCGGCACCTGCC CCCCTGAC	BamHI
Aval hindIII-st	AAGCTTACTGCTGCACAGCGTCCAGGGG	HindIII
M13/pUC forward	GTTTTCCCAGTCACGAC	
M13/pUC reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	

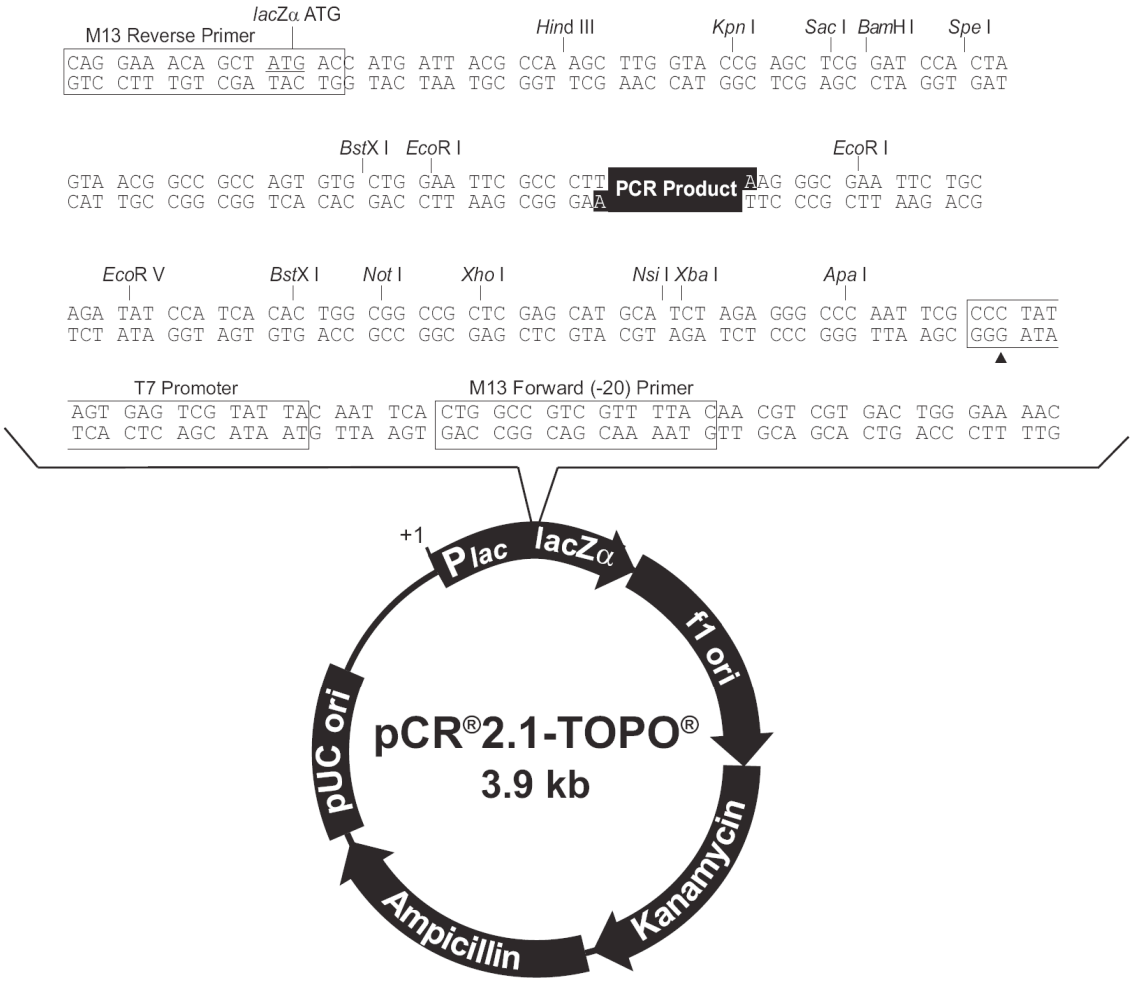


Figure 25 : Carte du plasmide PCR2.1-TOPO (Invitrogen)

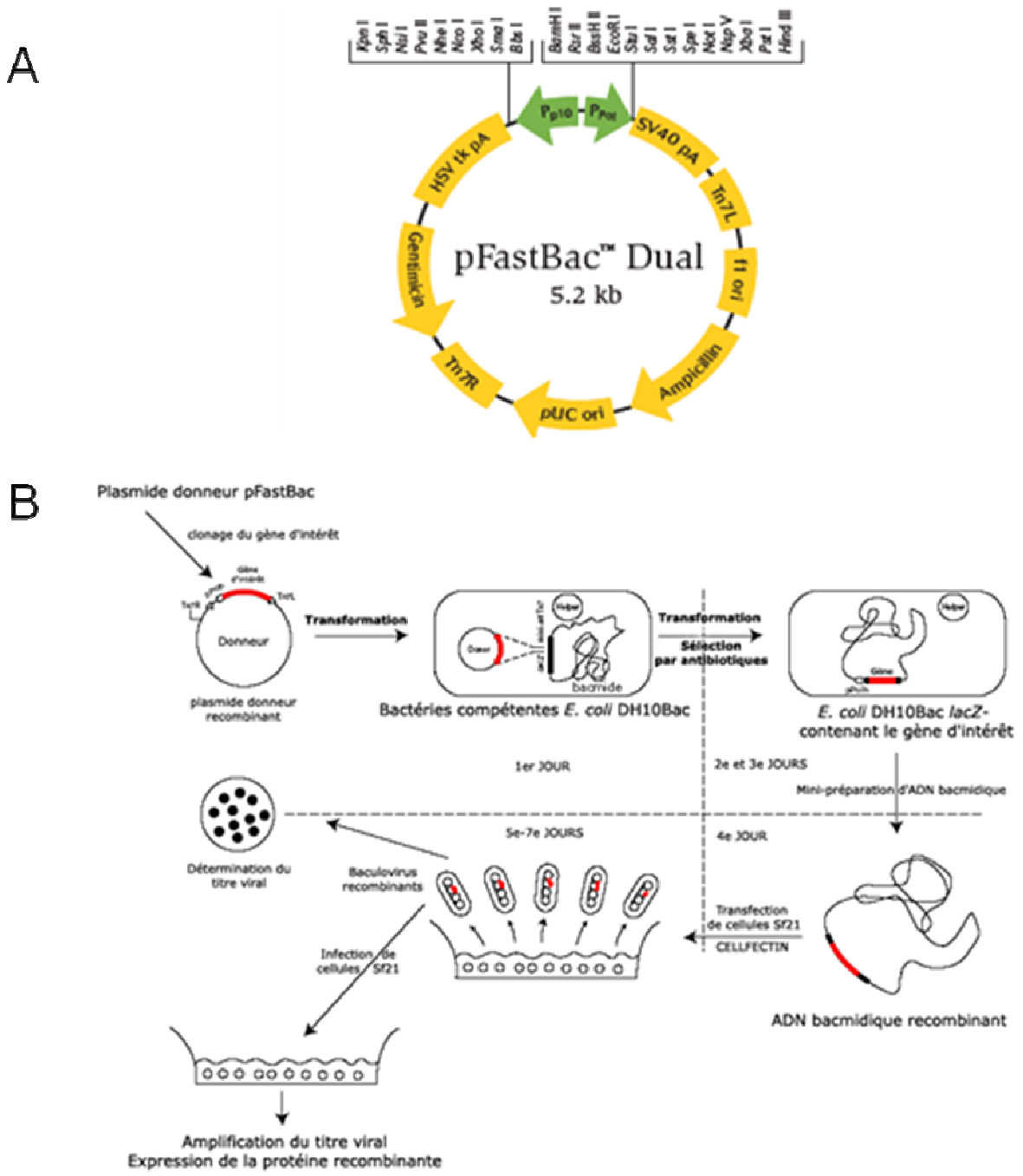


Figure 26. Carte de restriction du plasmide pFastBac1 et présentation du système Bac-to-Bac.

A : Carte de restriction du plasmide pFast BacDual, **B** : Schéma de la génération de baculovirus recombinants et de l'expression de gène d'intérêt dans le système Bac-to-Bac.

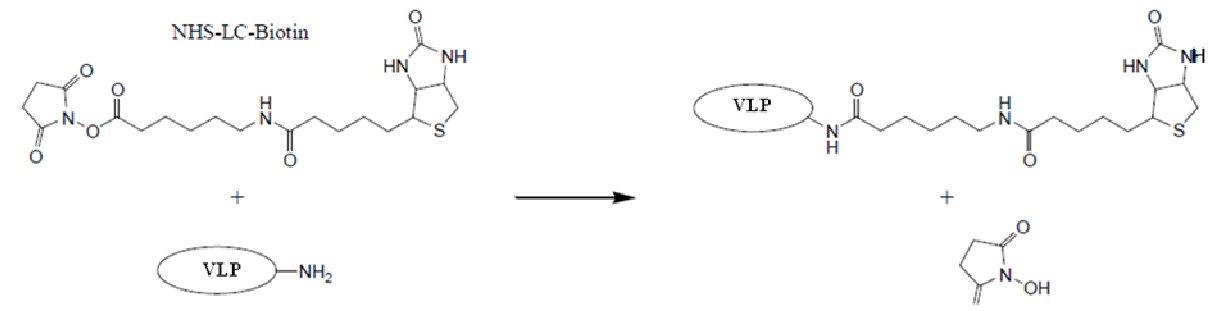


Figure 27. Fixation covalente de la biotine aux amines primaires des VLP.

Tableau VI : **Anticorps primaires utilisés.**

Nom	Protéine reconnue	Origine	Type	Nature de l'épitope reconnu	Source	Dilution utilisée
Anti-L2	L2	Lapin	Polyclonal	-	R.Roden, Baltimore	1/500
CamVir-1	L1	Souris	Monoclonal	Linéaire	BD Biosciences	1/1000
H16.V5	L1	Souris	Monoclonal	Conformationnel	N.Christensen Penn State	1/10000
H16.E 70	L1	Souris	Monoclonal	Conformationnel	N.Christensen Penn State	1/2000
Anti StrepTagII POD	StrepTagII	Souris	Monoclonal	-	BD Biosciences	1/4000
Anti-HBc	HBc	Humain	Polyclonal	-	Laboratoire	1/500
Anti-HBc IgG	HBc	Humain	Polyclonal	-	P.Roingeard	1/500

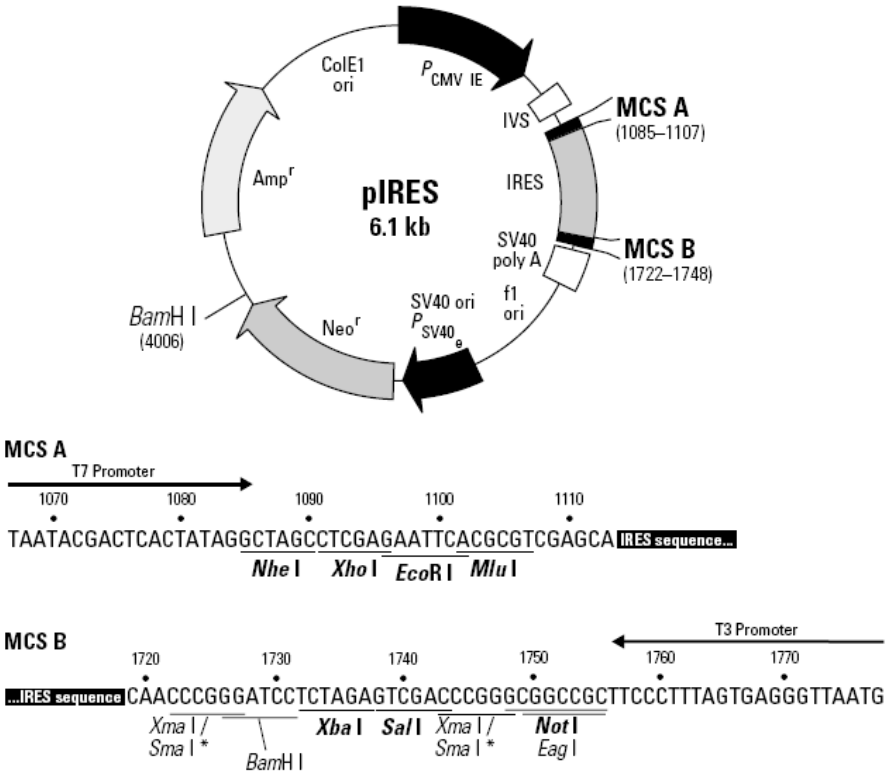


Figure 28. Carte du plasmide pIRES (Clontech)

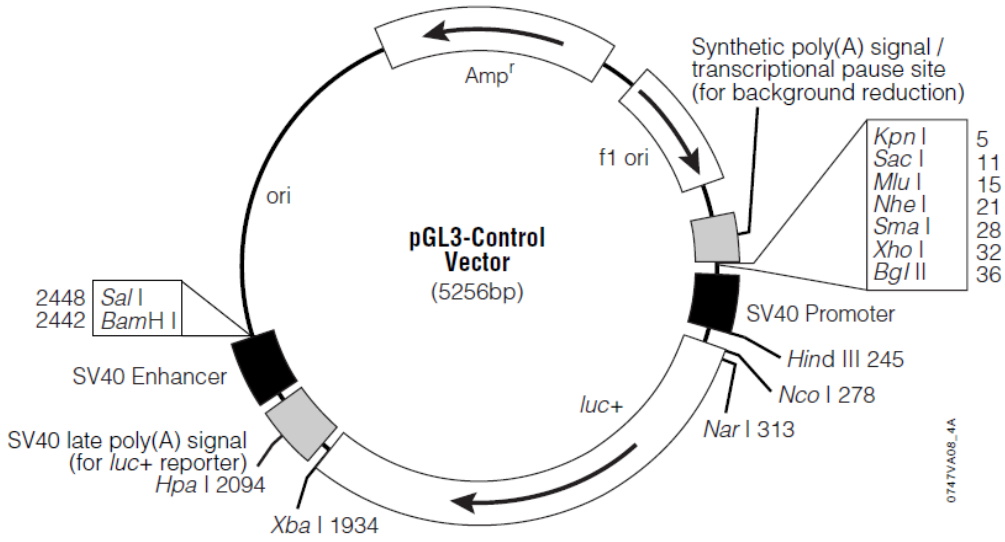


Figure 29. Carte de restriction du plasmide pGL3-luc (Promega)

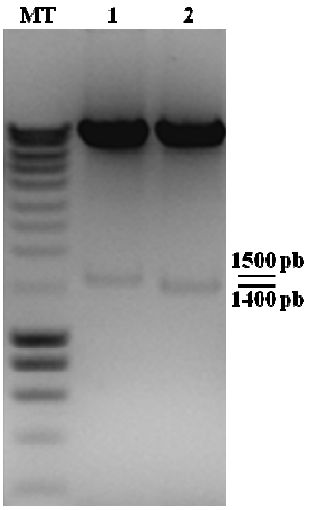


Figure 30. Construction du plasmide pIRES/L1L2 HPV 58

Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion enzymatique. Piste 1 : vérification de la présence du gène L1 après digestion avec les enzymes *Nhe*I et *Eco*RI, piste 2 : vérification de la présence du gène L2 après digestion avec les enzymes *Xba*I et *Not*I. MT : SmartLadder

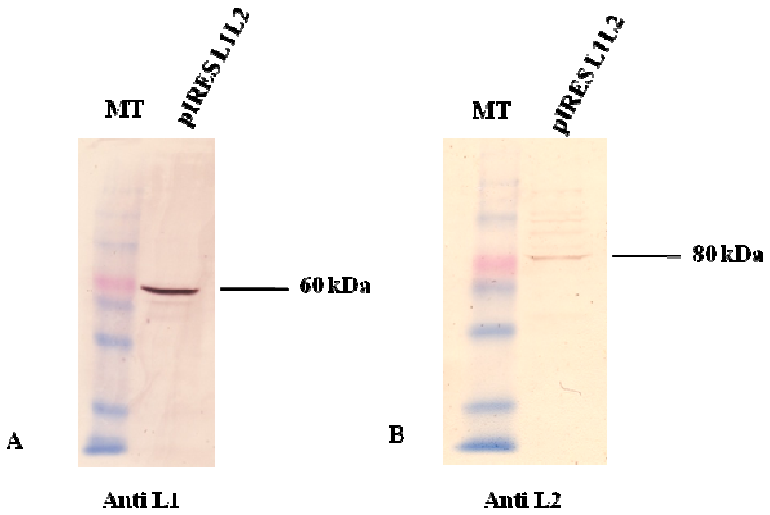


Figure 31. Analyse de l'expression des protéines L1 et L2 de l'HPV 58

Des cellules 293 FT ont été transfectées avec le plasmide pIRES/L1/L2. Après 72 h, la fraction nucléaire a été analysée par immuno-empreinte. La protéine L1 est révélée grâce à l'anticorps anti-L1 CamVir-1 dilué au 1/1000 (A) et la protéine L2 est révélée par un anticorps polyclonal anti-L2 de lapin dilué au 1/1000 (B).

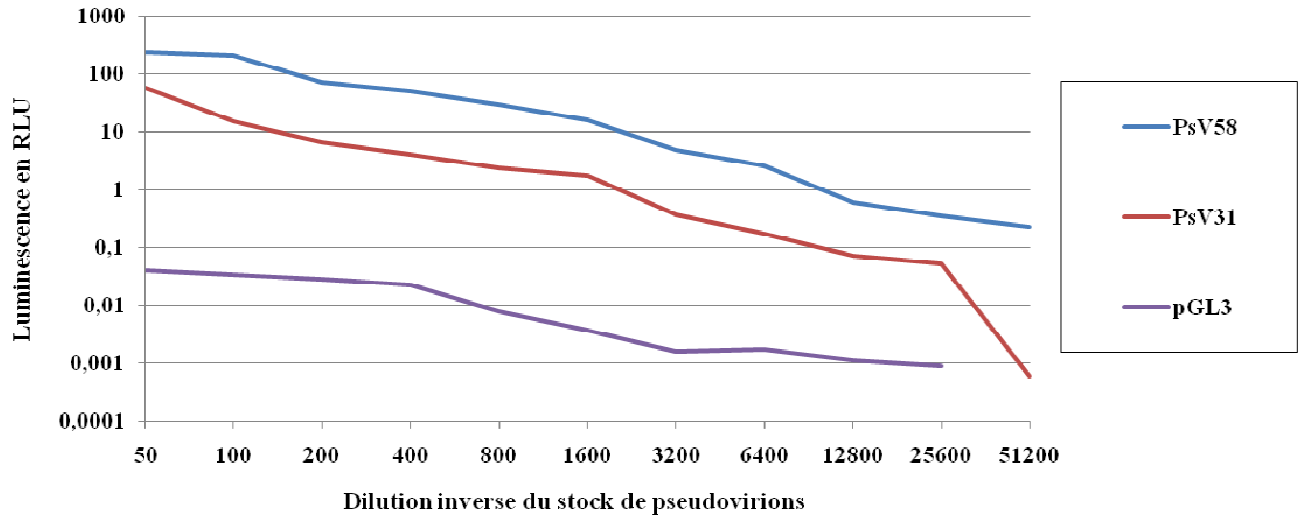


Figure 32. Efficacité de transduction des pseudovirions-luciférase des HPV 31 et 58

La luminescence résultant de l'activité luciférase après pseudo-infection de cellules COS-7 est mesurée pour chaque dilution des 2 types de pseudovirions.

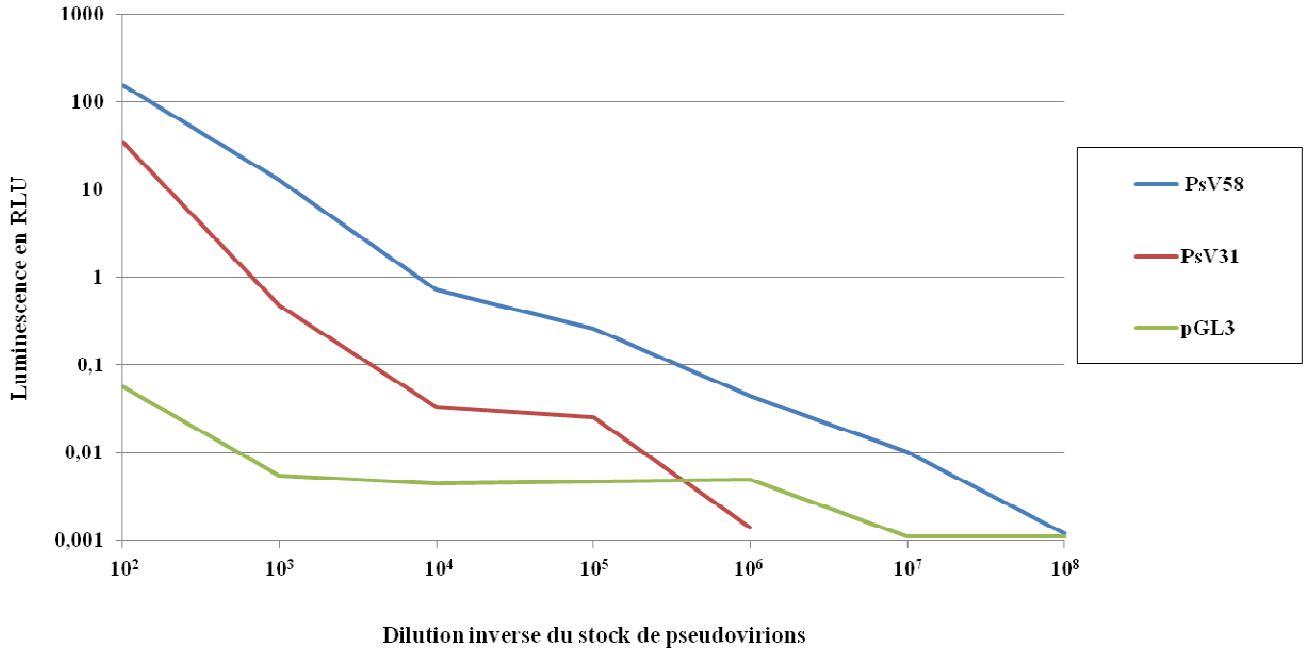


Figure 33. Infectiosité des pseudovirions-luciférase des HPV 31 et 58

Des cellules COS-7 ont été transduites par des pseudovirions 31 L1L2 et 58 L1L2 luciférase dilués de 10 en 10. L'activité luciférase est révélée 48h post-transfection. Le titre infectieux est alors défini comme la dernière dilution pour laquelle l'activité luciférase observée est supérieure à celle des cellules COS-7 non transduites.

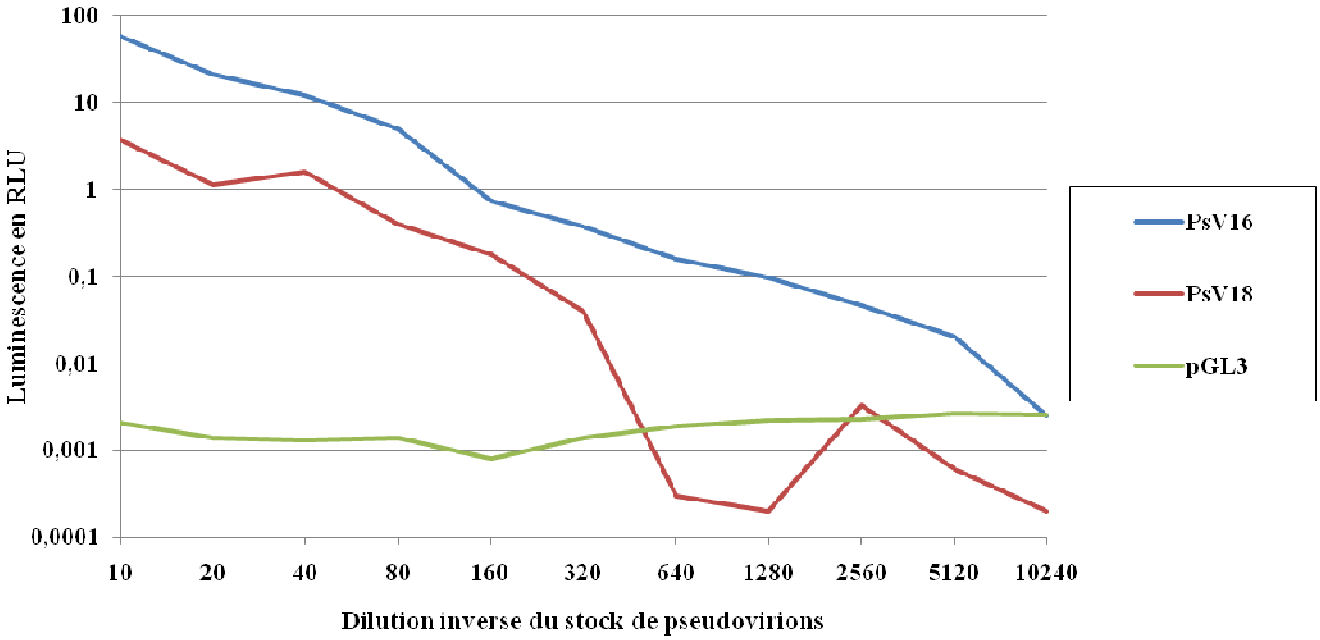


Figure 34. Efficacité du transfert de gène des pseudovirions-luciférase des HPV 16 et 18

Des cellules COS-7 ont été transduites par des pseudovirions 16 L1L2 et 18 L1L2 luciférase dilués de 2 en 2. La luminescence résultant de l'activité luciférase après pseudo-infection de cellules COS-7 est mesurée pour chaque dilution des 2 types de pseudovirions.

Tableau VII : Relation entre la présence d'ADN et la présence d'anticorps neutralisants anti HPV 58 chez des femmes issues de la population générale Colombienne.

PopulationGénérale			
	ADN HPV (N)	Anticorps neutralisants anti-HPV 58	(%)
HPV ADN -	161/ 320	13/161	8,1
HPV ADN +	49/320	11/49	22,4
HPV BR ADN +	17/320	4/17	23,5
HPV HR ADN +	40/320	9/40	22,5
HPV 58 ADN +	10/320	3/10	30

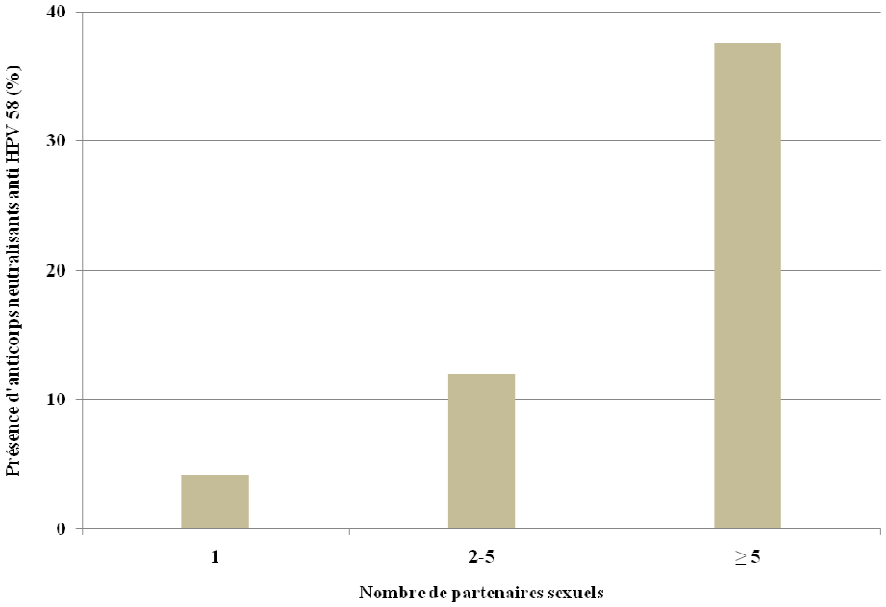


Figure 35. Relation entre la présence d'anticorps neutralisants anti HPV 58 et le nombre de partenaires sexuels chez 320 femmes issues de la population générale Colombienne.

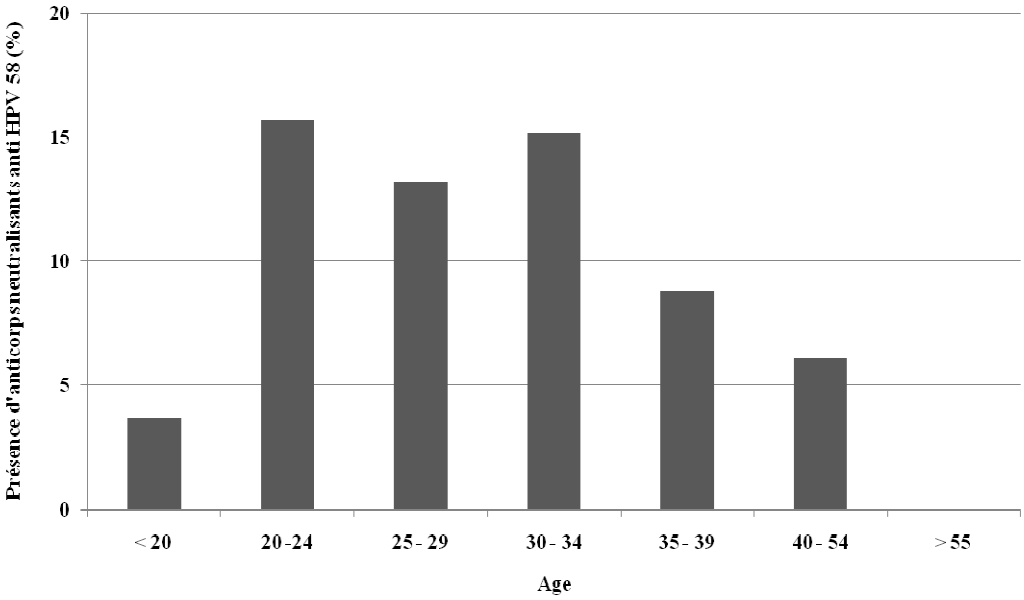


Figure 36 : Relation entre la présence d'anticorps neutralisants anti HPV-58 et l'âge chez 320 femmes issues de la population générale Colombienne.

Tableau VIII : Détection des anticorps cross neutralisants anti-HPV 31 et 58 chez 65 femmes Colombienne avant vaccination et 1 mois après la dernière injection du vaccin quadrivalent anti-HPV.

Anticorps neutralisants				
Avant vaccination			**Après vaccination**	
HPV 31	HPV 58	N	HPV 31	HPV 58
+	-	10	10 (100%) GMT= 1055	3 (30%) GMT= 126
-	+	11	4 (45%) GMT= 178	11 (100%) GMT= 355
-	-	44	15 (33%) GMT= 130	10 (23%) GMT= 170
Total		65	29 (45%) GMT=185	24 (37%) GMT= 167

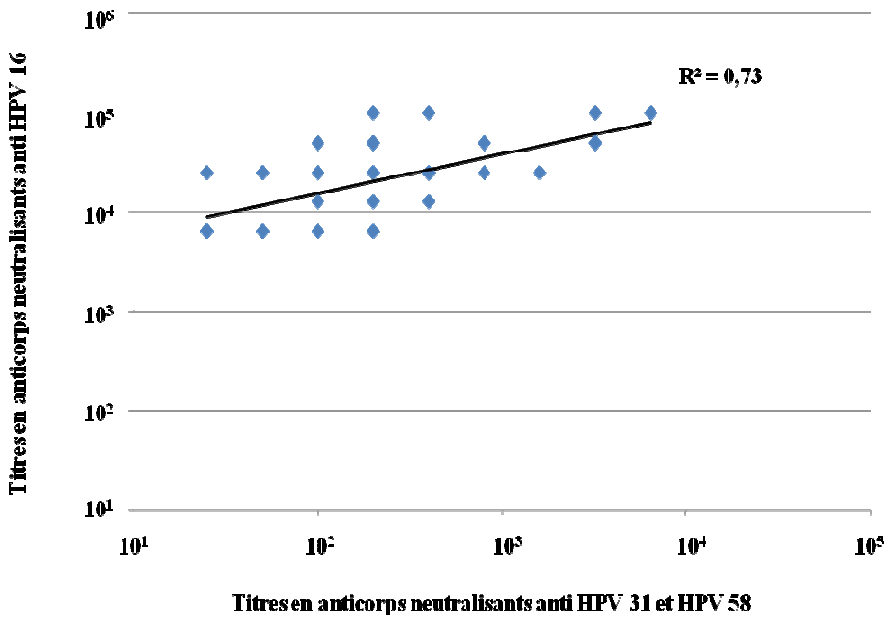


Figure 37. Correlation entre les titres en anticorps neutralisants anti HPV 31 ou anti HPV 58 avec les titres en anticorps neutralisants anti HPV 16 chez des femmes Colombiennes vaccinées par 3 doses du vaccin quadrivalent anti-HPV.

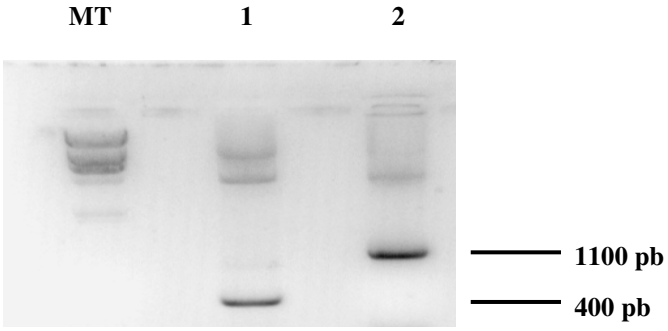


Figure 38. Construction par PCR du gène L116h StrepTagII (L1STII)

Piste 1 : analyse en gel d'agarose 0,8 % après obtention par PCR du fragment 5' **L1STII**. Piste 2 : analyse en gel d'agarose 0,8 % après obtention par PCR du fragment 3' **L1STII**. MT : λ *Hind*III

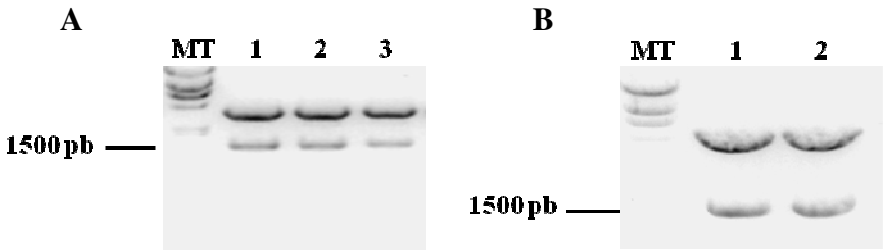


Figure 39 A/ Construction du plasmide pCR 2.1/L1STII

Analyse de 3 clones par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% après mini-préparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les clones positifs présentent un insert à 1500 pb. MT : λ HindIII **B/ Construction du plasmide pFastBacDual/L1STII**

Analyse de 2 clones par migration éléctrophorétique en gel d'agarose 0,8 % après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les clones positifs présentent un insert à 1500 pb. MT : λ *Hind*III

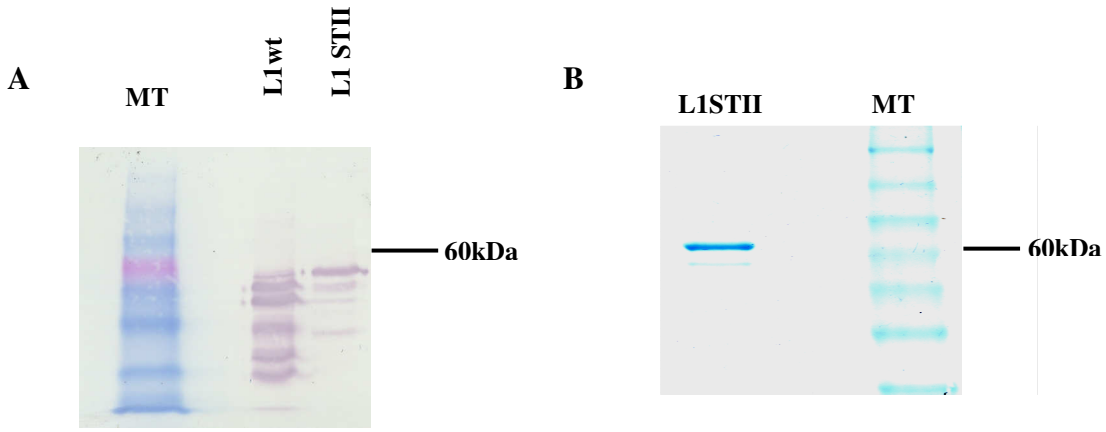


Figure 40. Analyse de l'expression de la protéine L1 STII.

Des cellules Sf21 ont été infectées pendant 3 jours avec le baculovirus recombinants L1STII ou L1 16wt comme contrôle, les cellules ont été lysées, séparés par SDS PAGE et la fraction nucléaire analysée par immuno-empreinte (**A**) en utilisant l'anticorps monoclonal anti-L1 CamVir-1. (**B**) Les extraits nucléaires de cellule Sf21 infectées avec le baculovirus recombinants L1STII sont purifiés sur gradient de ClCs. Coloration au bleu de coomassie d'un échantillon L1STII purifié

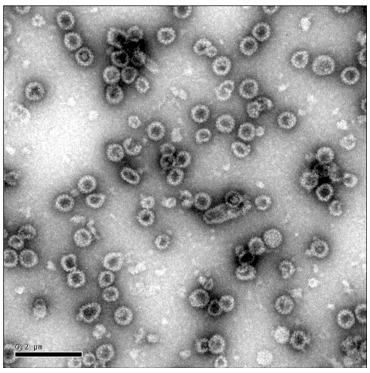


Figure 41. Observation en microscopie électronique à transmission de pseudo-particules virales L1STII

Les fractions nucléaires de cellules Sf21 infectées avec des baculovirus recombinant codant la protéine L1STII ont été séparées par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium. La fraction de densité 1,272g/mL est colorée négativement à l'acétate d'uranyle 1,5 %.

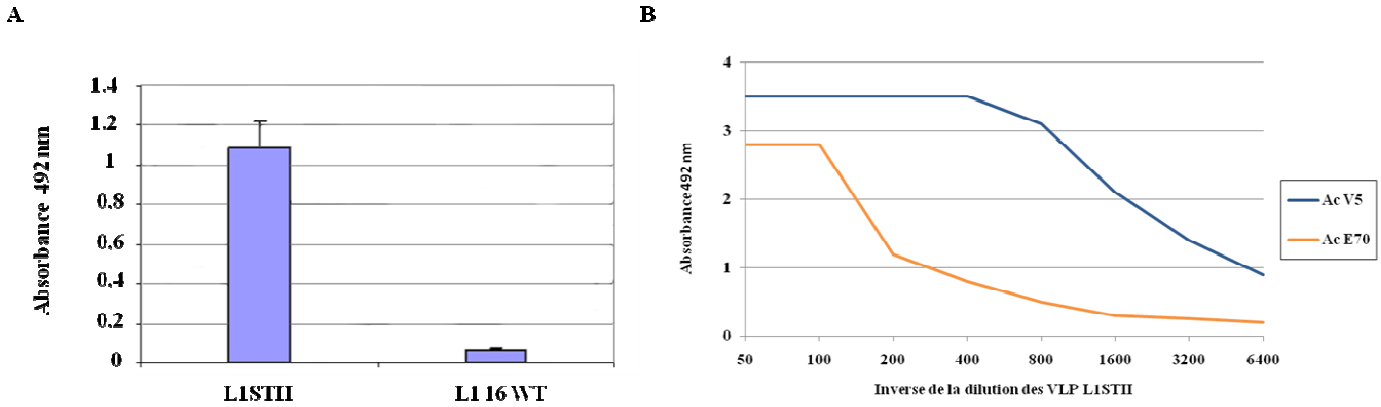


Figure 42. (A) Analyse par ELISA de la présence du motif StrepTagII et de l'antigénicité des VLP L1STII (B)

(A) Les VLP L1STII et les VLP L1 16 wt sont analysées à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre le motif StrepTagII couplé à la péroxydase (BD BioSciences) dilué au 1/4000. **(B)** La réactivité des VLP L1STII est analysée en utilisant deux anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes conformationnels de la boucle FG de la protéine L1 de l'HPV 16.

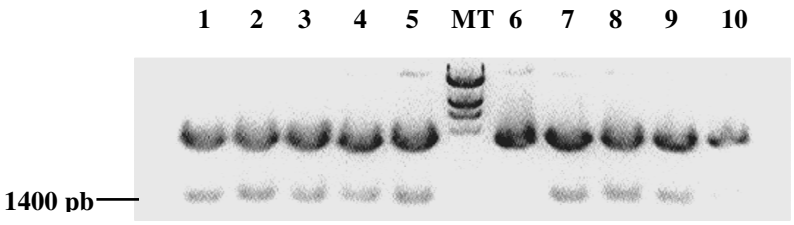


Figure 43. Construction du plasmide pCR 2.1-TOPO/L216h.

Analyse de 10 clones par migration éléctrophorétique en gel d'agarose 0,8 % après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Sal*I. Les clones positifs présentent un insert de 1400 pb. MT : λ *Hind*III

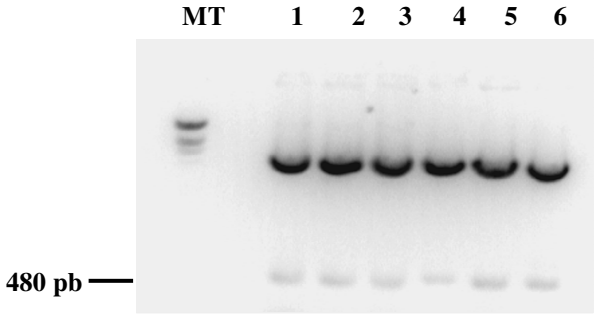


Figure 44. Construction du plasmide pFastBacDual/Streptactine.

Analyse de 6 clones par migration éléctrophorétique en gel d'agarose 0,8 % après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les clones positifs présentent un insert de 480 pb. MT : λ *Hind*III

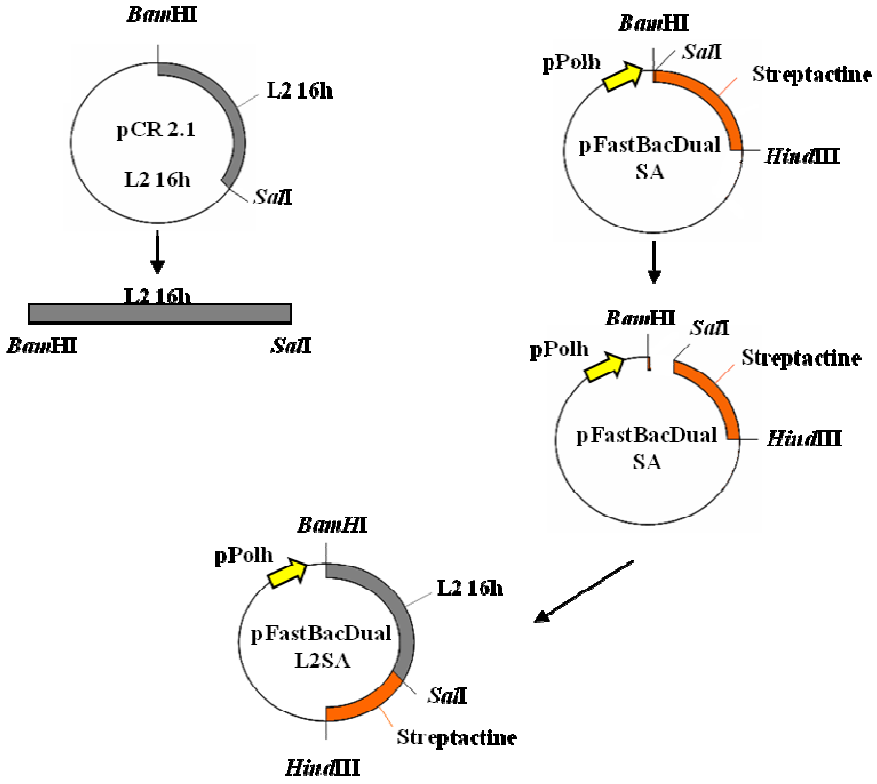


Figure 45. **Schéma de construction du plasmide pFastBacDual/L2 Streptactine (L2SA).**

Le plasmide pCR 2.1 contenant le gène codant la protéine L2h délété des séquences NLS et le plasmide pFastBacDual contenant le gène codant la protéine Streptactine sont digérés avec les enzymes *Bam*HI et *Sal*I. Le gène codant la protéine L2 16h est incorporé dans le plasmide pFastBacDual en amont et en phase avec le gène de la Streptactine entre les sites *Bam*HI et *Sal*I.

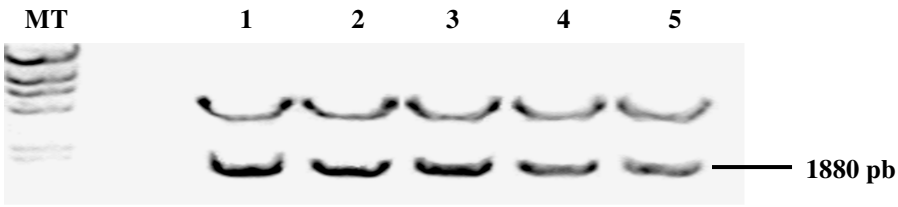


Figure 46. Construction du plasmide pFastBacDual/Streptactine-L2

Analyse de 5 clones par migration éléctrophorétique en gel d'agarose 0,8 % après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *BamH*I et *Hind*III. Les clones positifs présentent un insert de 1880 pb. MT : λ *Hind*III

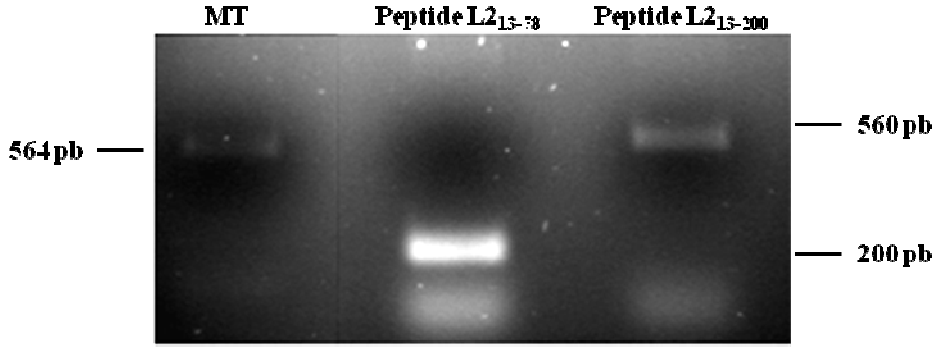


Figure 47. Amplification des séquences codant les peptides L213-78 et L213-200

Analyse par électrophorèse en gel d'agarose 2% après les deux étapes de PCR des fragments L213-78 et L213-200. Le peptide L213-78 présente une taille de 200 pb alors que le peptide L213-200, présentent une taille de 560 pb. MT : λ *Hind*III

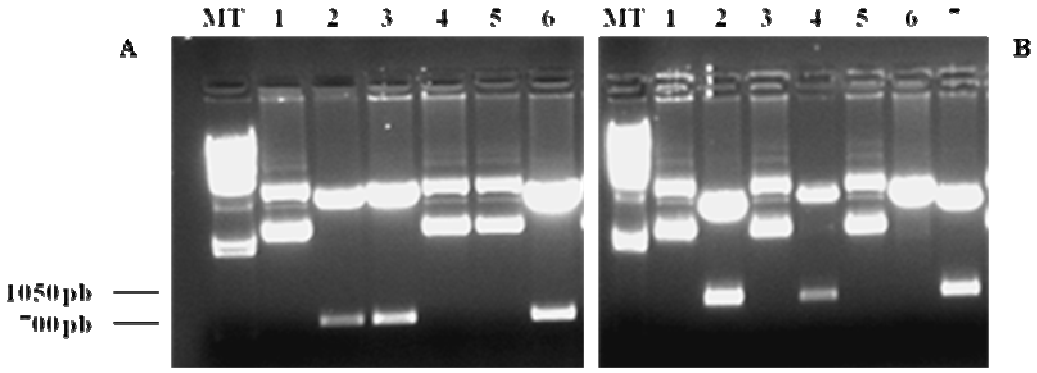


Figure 48. Construction des plasmides pFastBacDual L213-78-SA (A) et L213-200-SA (B).

Analyse de 13 clones par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les clones positifs présentent un insert de 700 pb et 1050 pb pour les constructions L213-78-SA et L213-200-SA, respectivement. MT : λ *Hind*III.

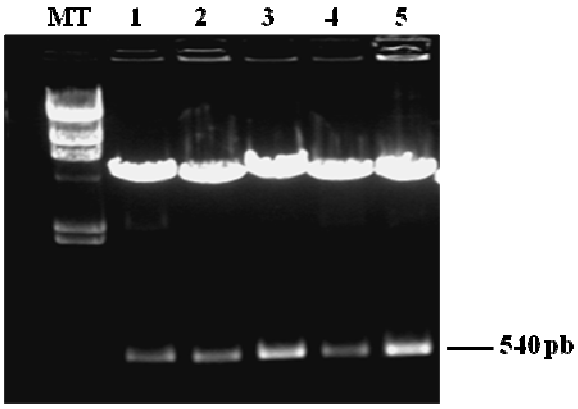


Figure 49. Construction du plasmide pFastBacDual L217-36-SA.

Analyse de 5 clones par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. MT : λ *Hind*III

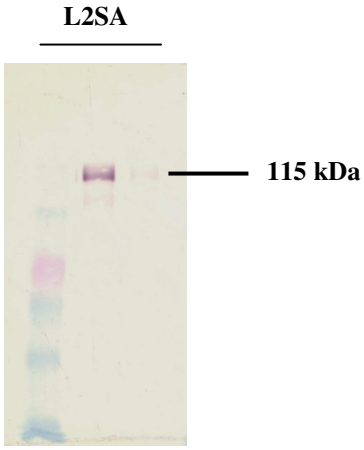


Figure 50 : Analyse de l'expression de la protéine de fusion L2SA.

Des cellules Sf21 ont été infectées pendant 3 jours avec le baculovirus recombinant codant la protéine L2SA. La fraction cellulaire est lysée puis analysée par immuno-empreinte en utilisant un sérum polyclonal anti L2 de lapin.

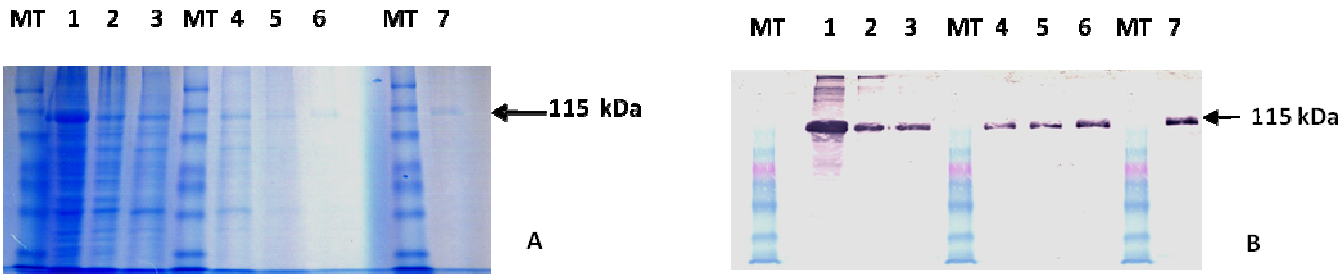


Figure 51. Analyse de l'expression de la protéine de fusion L2-Streptactine après purification.
Les échantillons ont été séparés par SDS PAGE puis coloré au bleu de Coomassie (**A)**, et analysée par immuno-empreinte en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine L2 de lapin (**B**). La protéine L2SA contenue dans le lysat nucléaire (500 µL) a été purifiée à l'aide d'iminobiotine immobilisée des billes d'agarose. Fraction nucléaire (1), le surnageant non fixé (2), surnageant de lavage (3-6), protéine purifiée (7).

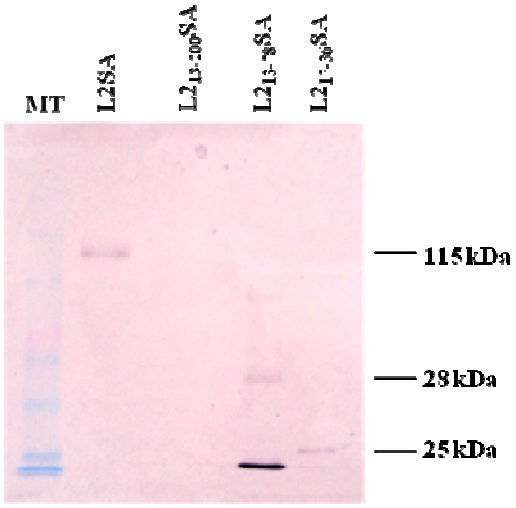


Figure 52. Analyse de l'expression des protéines de fusion L2$_{13-200}$-SA, L213-78-SA et L217-36-SA.
Des cellules Sf21 ont été infectées pendant 3 jours avec le baculovirus recombinants codant les différentes protéines. Les fractions cellulaires sont lysées puis analysée par immuno-empreinte en utilisant un sérum polyclonal anti-L2 de lapin. MT : Benchmark

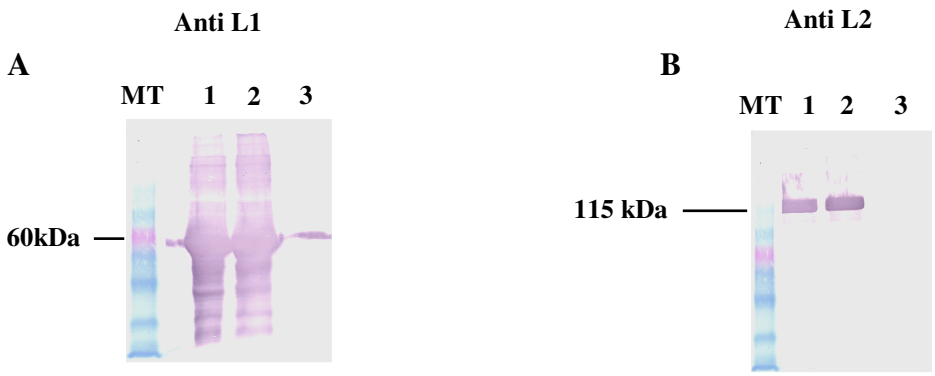


Figure 53. Mise en évidence des complexes VLP L1STII/L2SA

Cinq microgrammes de VLP L1STII ont été mélangées avec 5 µg de la protéine L2SA (rapport molaire 1:1). Les complexes sont sédimentés par ultracentrifugation et analysés par immunoempreinte après dénaturation. (A) Détection de la protéine L1STII (1,2) et de la protéine L1 16wt (3) à l'aide de l'anticorps monoclonal CamVir1 dilué au 1/1000. (B) Détection de la protéine de fusion L2SA à l'aide d'un sérum polyclonal anti-L2 dilué au 1/500. MT : Benchmark

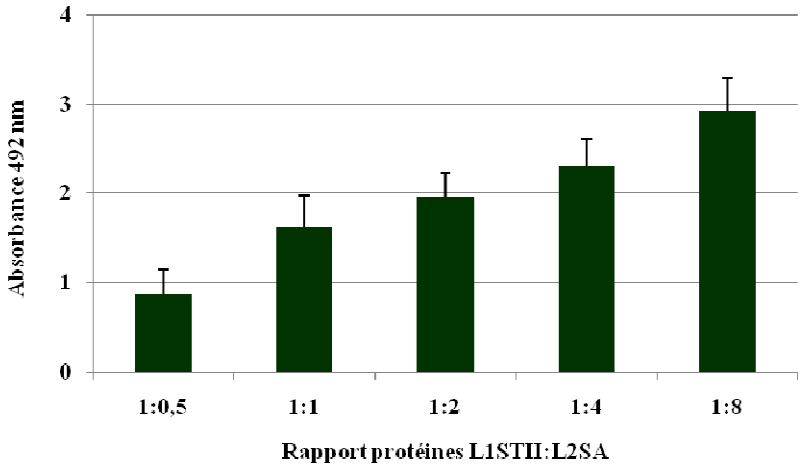


Figure 54. Stoechiométrie de l'interaction entre la protéine L2SA et les VLP L1STII.

Différents rapports molaires des protéines L1 STII et L2SA ont été mis en contact. Les complexes ont été sédimentés par ultracentrifugation puis déposés dans une microplaque. La détection de la protéine L2SA est effectuée par ELISA avec un sérum polyclonal de lapin anti L2.

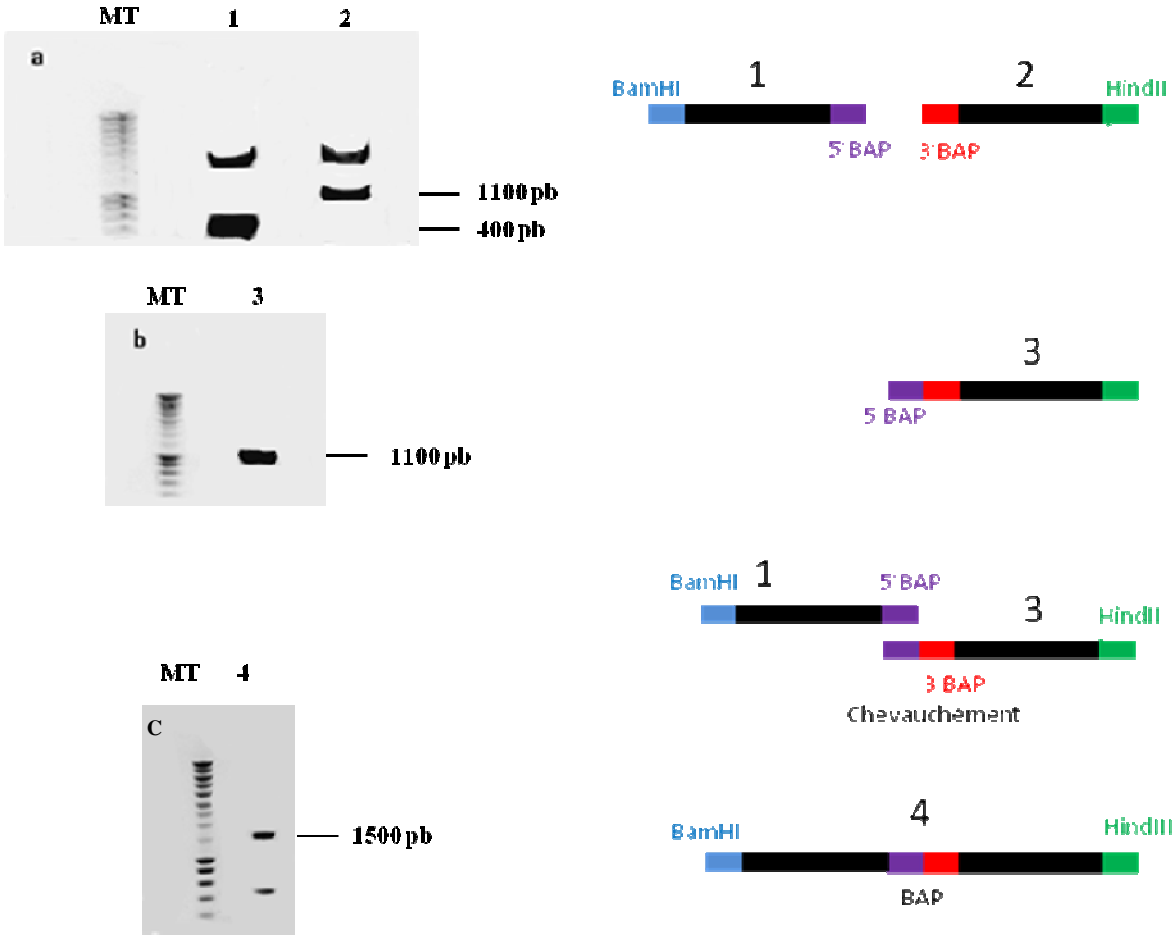


Figure 55. Construction par PCR du gène L1 16h-BAP-DE

Panel droit : représentation schématique de la stratégie utilisée.

Panel gauche : Analyse en gel d'agarose 0,8% des différents fragments de PCR L1 16h-BAP-DE: (a) PCR 1: amplification des fragments 1 et 2 de 1100 pb et 400 pb respectivement, (b) PCR 2: visualisation du fragment 3 de 1100 pb et (c) PCR 3: amplification du fragment 4 de 1500 pb.

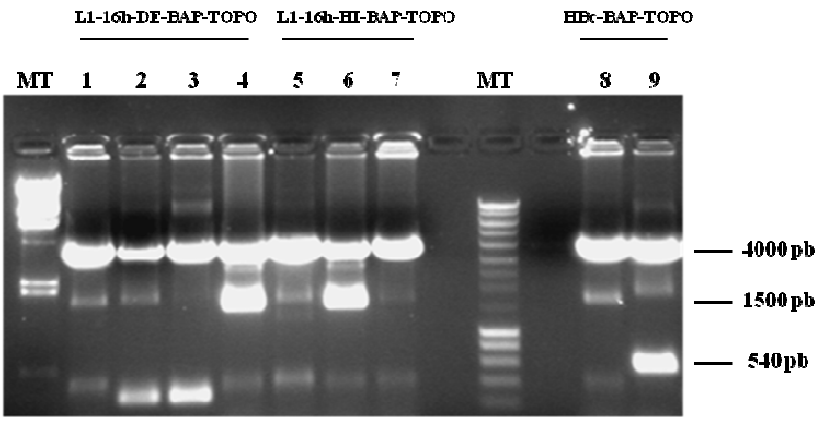


Figure 56. Clonage des gènes L1 16h-DE-BAP, L1 16h-HI-BAP et HBc-BAP dans le plasmide pCR2.1-TOPO.

Analyse de 9 clones par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les clones positifs présentent un insert de 1500 pb pour les constructions L1-DE-BAP (piste 4) et L1-HI-BAP (piste 6), et un insert de 500 pb pour HBc-BAP (piste 9). MT : λ *Hind*III

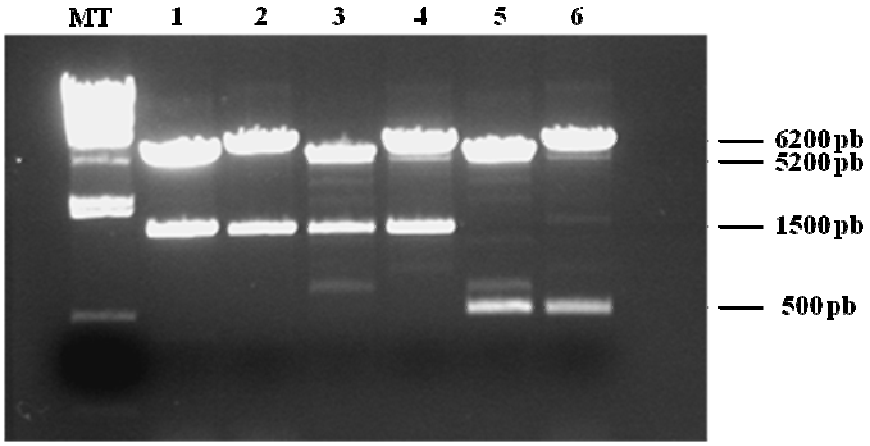


Figure 57. Construction du plasmide pFastBacDual-L1 16h-DE-BAP (1), -L1 16h-HI-BAP (3), –HBc-BAP (5) et hBirA-pFastBacDual-L1 16h-DE-bab (2), -L1 16h-HI-BAP (4), -HBc-BAP (6).

Electrophorèse en gel d'agarose 0,8% après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Les clones positifs présentent un insert de 1500 pb pour les constructions L1-DE-BAP et L1-HI-BAP, et un insert de 500 pb pour HBc-BAP. Les plasmides pFastBacDual seuls ont une taille d'environ 5000 pb alors que les pFastBacDual, dans lesquels le gène hBirA a été cloné, présente une taille d'environ 6000 pb. MT : λ *Hind*III

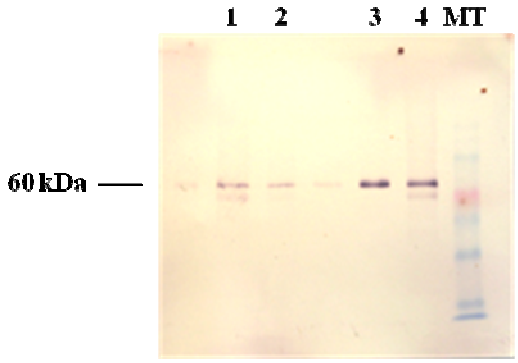


Figure 58. Analyse de l'expression des protéines L1 modifiées.

L1 16h-HI-BAP-hBirA (1), L1 16h-HI-BAP (2), L1 16h-DE-BAP-hBirA (3) et L1 16h-DE-BAP (4).

Des cellules Sf21 ont été infectées pendant 3 jours avec les baculovirus recombinants respectifs. Après lyse cellulaire, les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et analysées par immuno-empreinte en utilisant l'Ac monoclonal anti-L1 CamVir-1. MT : Benchmark

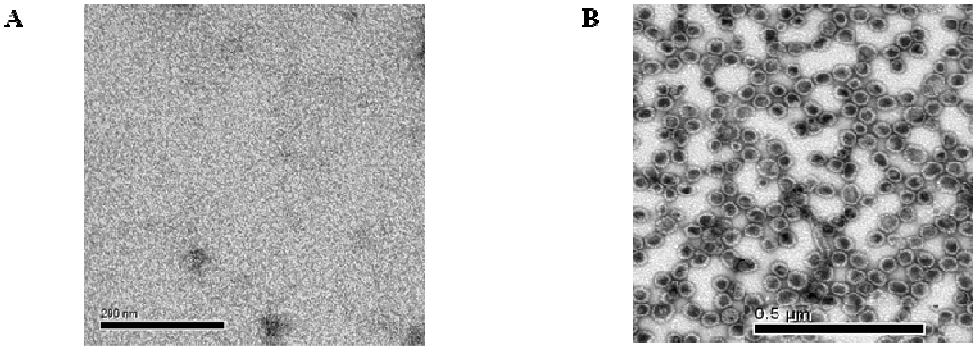


Figure 59. Pseudo-particules virales L1 16h-HI-BAP-hBirA et L1 16 wt. Les fractions nucléaires de cellules Sf21 infectées par des baculovirus recombinant exprimant les différentes protéines L116h-BAP et L1 16h-BAP-hBirA **(A)** ou la protéine L1 16 sauvage **(B)** ont été séparées par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium. La fraction de densité 1,272g/mL, colorée négativement à l'acétate d'uranyle 1,5 % et visualisées en microscopie électronique à transmission. **(A)** Le résultat présentés est représentatif des constructions L1 16h-HI-BAP-hBirA, L1 16h-HI-BAP, L1 16h-DE-BAP-hBirA et L1 16h-DE-BAP.

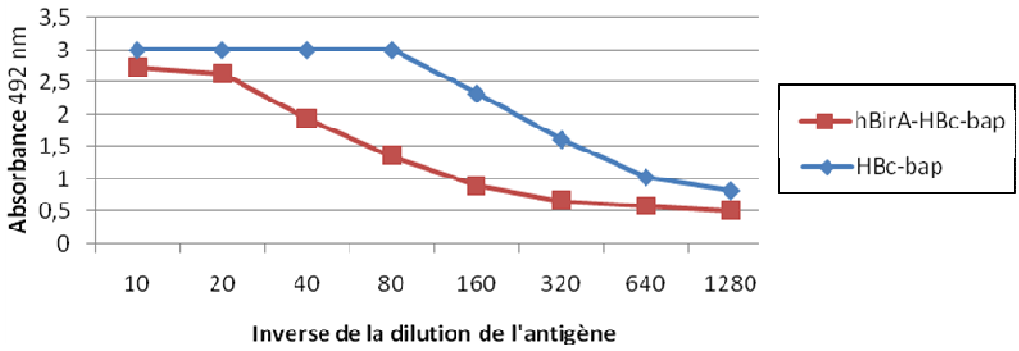


Figure 60. Antigénicité des VLP HBc-BAP et hBirA-HBc-BAP.

La réactivité des VLP HBc est analysée par ELISA en utilisant un sérum de sujet infecté par le virus de l'hépatite B.

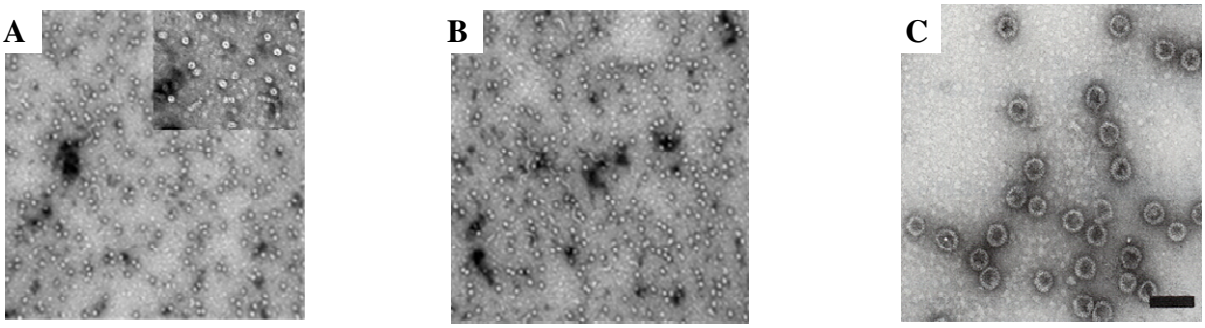


Figure 61. Pseudoparticules virales HBc-BAP, hBirA-HBc-BAP et HBc wt.

Les fractions cellulaires de cellules Sf21 infectées par des baculovirus recombinants exprimant la protéine HBc-BAP **(A)**, hBirA-HBc-BAP **(B)** et la protéine HBc sauvage **(C)** ont été séparées par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium. Les fractions de densité 1,272, colorées négativement à l'acétate d'uranyle 1,5% est visualisées en microscopie électronique à transmission (x150000).

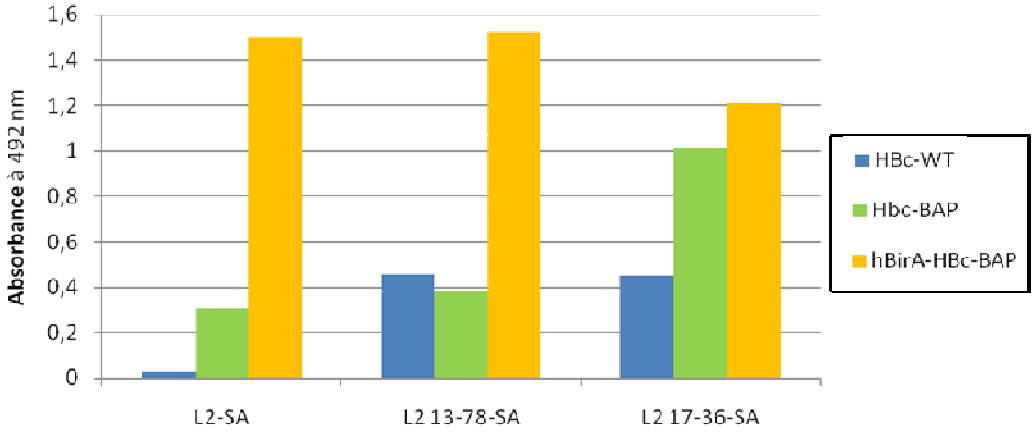


Figure 62. Analyse de la fixation des protéines de fusion L2SA à la surface des VLP HBc par ELISA.

Les complexes ont été sédimentés par ultracentrifugation. Les interactions entre les protéines de fusion L2 (L2-SA, L213-78-SA et L217-36-SA) et les VLP HBc-WT, HBc-BAP et hBirA-HBc-BAP sont analysées en ELISA par détection des protéines L2 avec un sérum polyclonal de lapin anti-L2

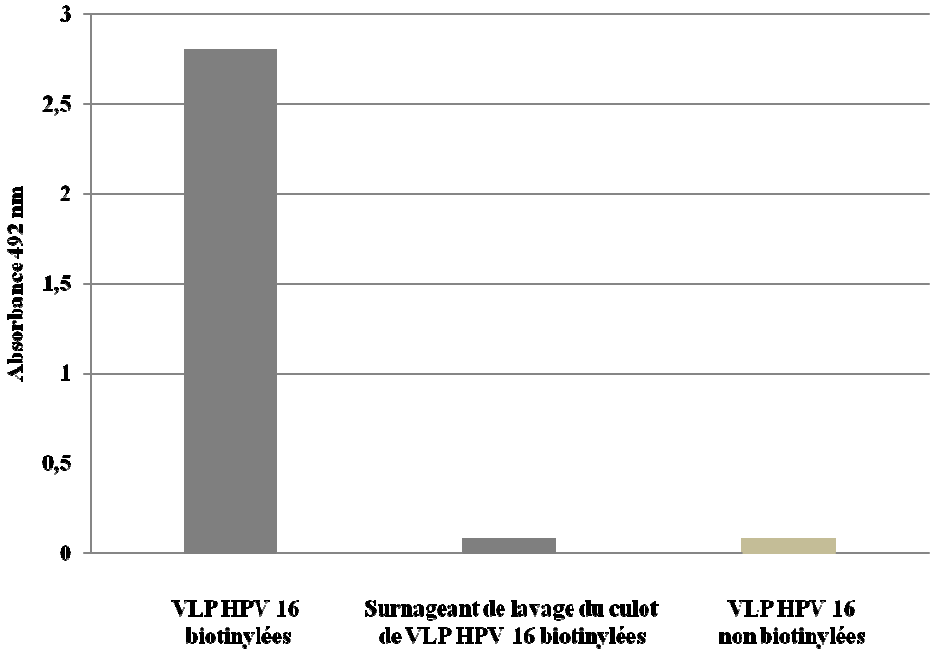


Figure 63. Analyse par ELISA de la biotinylation des pseudoparticules virales d'HPV16.

Les VLP sont biotinylées selon un ratio massique VLP : biotine de 1 : 2 et sédimentées par ultracentrifugation. Les VLP biotinylées ainsi que les VLP témoin non biotinylées sont analysées par ELISA à l'aide de la streptavidine-peroxydase diluée au 1/1000.

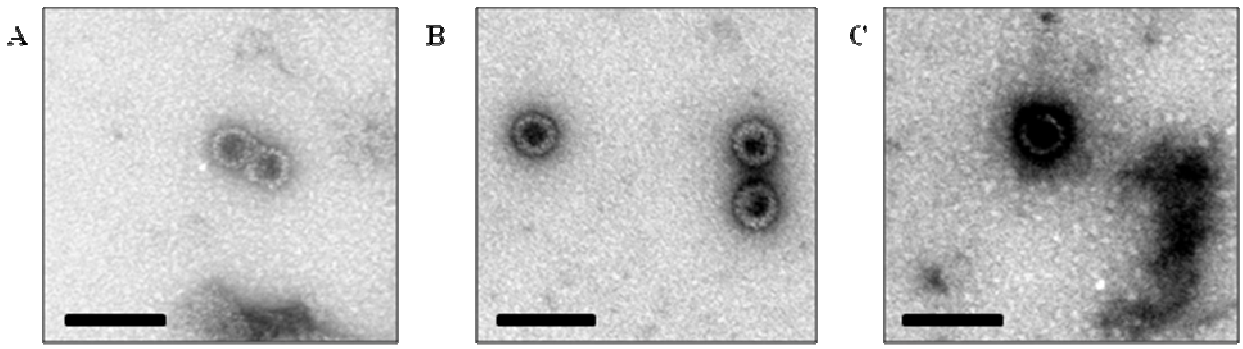


Figure 64. Pseudoparticules virales HPV16 au cours de la préparation des VLP biotinylées couplées à la L2-SA. Les culots d'ultracentrifugation sont repris en PBS1X et la présence de VLP est vérifiée en microscopie électroniques à transmission après coloration à l'acétate d'uranyle 1,5%. (**A**) VLP HPV16 purifiées non traitées. (**B**) VLP HPV16 biotinylées. (**C**) VLP HPV16 biotinylées ayant interagit avec la L2SA. Les barres représentent 100 nm.

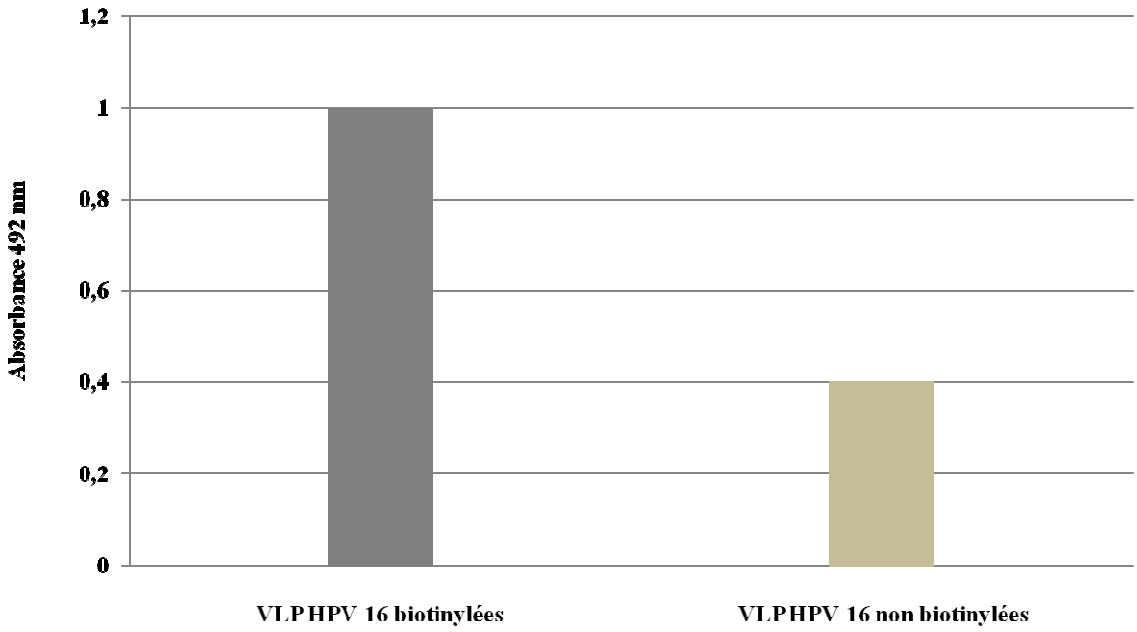


Figure 65. Analyse par ELISA de la fixation de la L2-SA sur les pseudo-particules virales d' HPV 16.

Les VLP interagissent avec la L2-SA est selon un ratio molaire VLP : L2-SA de 1 : 1. Les VLP sont sédimentées par ultracentrifugation. La biotinylation des VLP biotinylées ainsi que les VLP témoins non biotinylées est analysée par ELISA à l'aide de la streptavidine-peroxydase diluée au 1/1000.

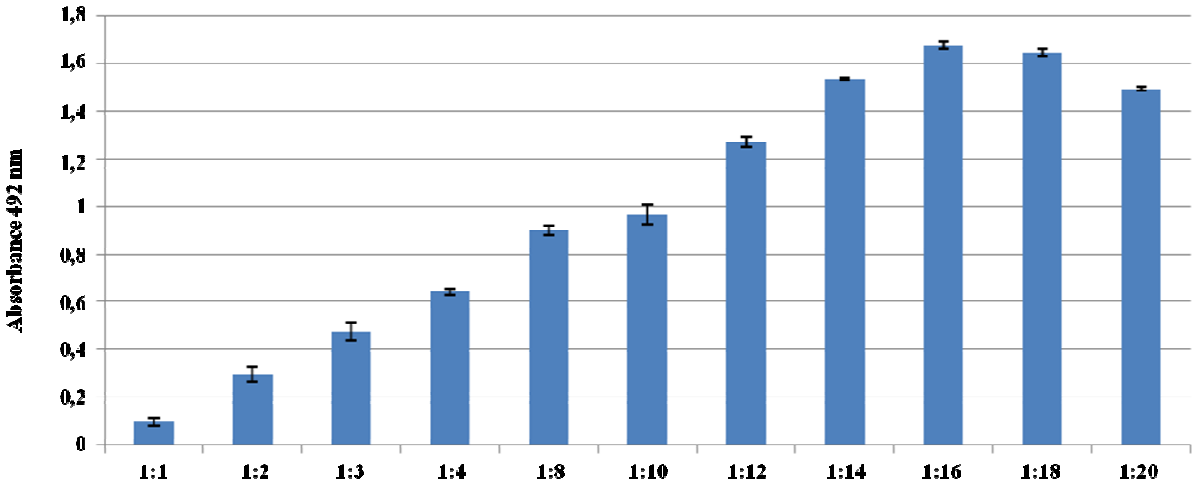


Figure 66 : Stoechiométrie de l'interaction entre la protéine L2SA et les VLP L1 16 biotinylées.

Différents rapports molaires des protéines VLP L1 16 biotinylées et L2SA ont été mis en contact. Les complexes ont été sédimentés par ultracentrifugation puis déposés dans une microplaque. La détection de la protéine L2SA est effectuée par ELISA avec un sérum polyclonal de lapin anti L2.

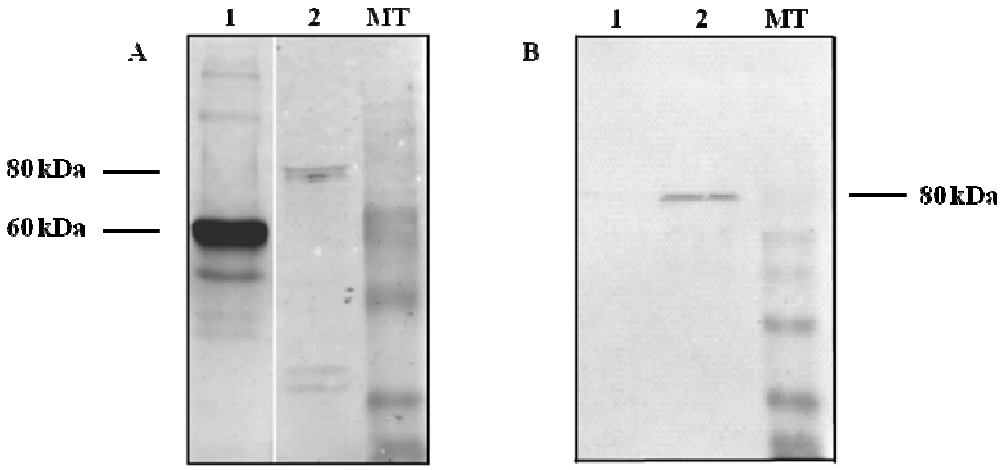


Figure 67. Analyse par immune-empreinte des PsV58-31L2.

A/ Analyse du stock de PsV58-31L2 après purification. La protéine L1 est détectée en utilisant l'anticorps monoclonal CamVir-1 (1). La protéine L2 est détectée en utilisant un serum polyclonal de lapin dirigée contre la protéine L2 de l'HPV 16 (2). **B/** Détection de la protein L2 en utilisant serum polyclonal de lapin dirigée contre la protéine L2 de l'HPV 16. Des cellules COS-7 ont été transduite pendant 48h avec des PsV 58-GFP (1) ou avec des pseudovirions de L1L2 de l'HPV 58 condant le gène L2 de l'HPV 31 (2). MT : Benchmark

Tableau IX : Préparations vaccinales utilisées et présentations des titres en anticorps anti-HPV 16 L2 mesurés en ELISA dans les différents groupes de souris immunisées. (SC : sous cutanée ; IM : intra-musculaire)

Groupe N°	Nom	Voie d'injection	Protéines		Gène	Titres anti-HPV 16 L2
			L1	L2		
1	Saline	SC	-	-	-	-
2	ADN L2 (1µg)	IM	-	-	HPV31 L2Δ	-
3	ADN L2 (10µg)	IM	-	-	HPV31 L2Δ	-
4	L2SA	SC	-	16	-	348
5	VLPs L1L2SA	SC	16	16	-	1055
6	VLPs L1L2	SC	16	16	-	1100
7	VLPs 31 L1	SC	31	-	-	-
8	VLPs 31 L1L2	SC	31	31	-	1160
9	PsV31-HEV	IM	31	31	HEV ORF2	855
10	PsV58-GFP	IM	58	58	GFP	1212
11	PsV58-31L2	IM	58	58	HPV31 L2Δ	**2600**

Tableau X : Préparations vaccinales utilisées et présentations des titres en anticorps neutralisants anti HPV 16, HPV 18, HPV 31 et HPV 58 obtenus dans les différents groupes de souris immunisées. (SC : sous cutanée ; IM : intra-musculaire)

Groupe N°	Nom	Voie d'injection	Protéines		Gène	Titres en anticorps neutralisants			
			L1	L2		**HPV16**	**HPV18**	**HPV31**	**HPV58**
1	Saline	SC	-	-	-	-	-	-	-
2	ADN L2 (1µg)	IM	-	-	HPV31 L2Δ	-	-	-	-
3	ADN L2 (10µg)	IM	-	-	HPV31 L2Δ	-	-	-	-
4	L2SA	SC	-	16	-	-	-	-	-
5	VLPs L1L2SA	SC	16	16	-	-	-	-	-
6	VLPs L1L2	SC	16	16	-	3100	-	**85**	-
7	VLPs 31 L1	SC	31	-	-	-	-	2,800	-
8	VLPs 31 L1L2	SC	31	31	-	-	-	3,400	**65**
9	PsV31-HEV	IM	31	31	HEV ORF2	-	-	5,198	**54**
10	PsV58-GFP	IM	58	58	GFP	-	-	50	4,650
11	PsV58-31L2	IM	58	58	HPV31 L2Δ	**60**	**400**	733	5,382

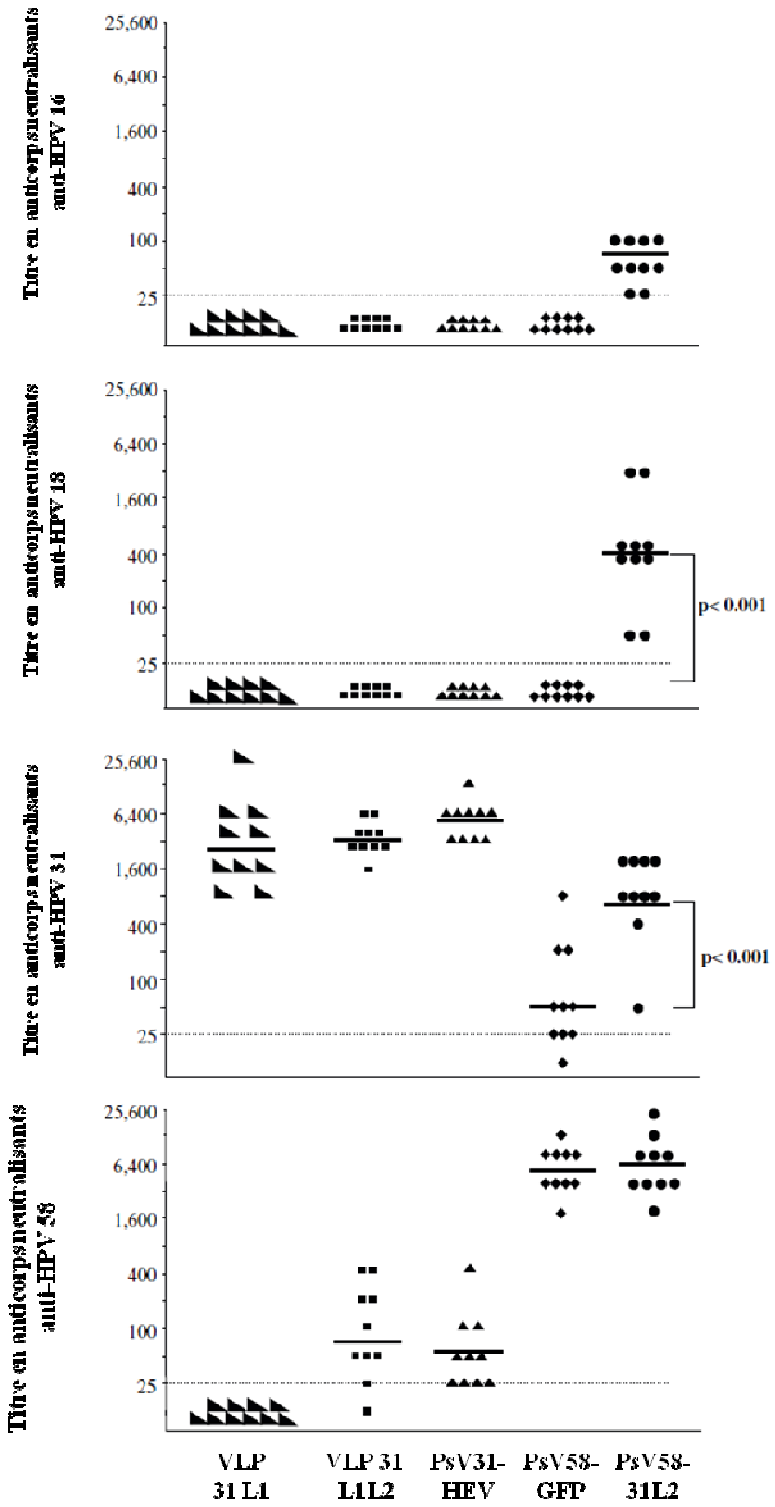


Figure 68. Détection des anticorps neutralisants anti-HPV16, HPV18, HPV31.

Le titre individuel de neutralisation de chacune des souris représente l'inverse de la dernière dilution qui donne de 50% d'inhibition de l'expression luciférase. Pour le calcul des TMG (représenté par les barres horizontales), un titre de 1 a été attribué aux souris ne présentant pas un titre en anticorps neutralisant détectable (< 25, représenté par les lignes pointillées).

Publications Internationales à comités de lecture

Combelas N, Saussereau E, Fleury MJ, Ribeiro T, Gaitan J, Duarte-Forero DF, Coursaget P, Touzé A. **Papillomavirus pseudovirions packaged with theL2 gene induce cross-neutralizing antibodies**. *J Transl Med*. 2010 Mar 24;8:28.

Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, **Combelas N**, Sizaret PY, Guyetant S, Maruani A, Baay M, Tognon M, Coursaget P. **Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies.** *J Clin Microbiol*. 2010 May; 48:1767-70

Communications dans des congrès et des colloques

Communications orales

Combelas N, Saussereau E, Fleury MJ, Coursaget P, Touzé A.
Les pseudovirions de papillomavirus vectorisant le gène de la protéine L2 induisent des anticorps cross-neutralisants.
Journée de l'IFR 136 Agents Transmissibles et Infectiologie, 22 et 23 mars 2010, Tours.

Combelas N, Saussereau E, Fleury MJJ, Coursaget P, Touzé A.
Anticorps cross-neutralisants après vaccination et vaccins L2.
3ème Journées Scientifiques de l'AFIPP (Association Francophone pour l'étude des Infections par les Papillomavirus et les Polyomavirus). 29 septembre, 30 septembre et 1er octobre 2010.

Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury M, **Combelas N,** Maruani A, Le Bidre E, Clavel C, Aubin F, Guyetant S, Lorette G, Coursaget P.
Détection du virus MCV et des anticorps anti-MCV
IIèmes Journées Scientifiques du Groupe Francophone de Recherche sur les Papillomavirus Malbuisson, 30 septembre – 2 Octobre 2009

Carpentier A, Alvarez E, Bousarghin L, Delannoy A, Fleury M, Combelas N, Touzé A, Coursaget P.

Modification du tropisme cellulaire de l'HPV16 par insertion de séquences de ciblage

IIèmes Journées Scientifiques du Groupe Francophone de Recherche sur les Papillomavirus Malbuisson, 30 septembre – 2 Octobre 2009

Communications affichées

Combelas N, Duarte DF, Molano M, Touzé A, Combita AL, Coursaget P .

Detection of HPV-31 and 58 cross-neutralizing antibodies in HPV-16 vaccinated subjects

26th International Papillomavirus conference and clinical worshop. 3 au 8 juillet 2010, Montréal, Canada

Combelas N, Saussereau E, Ribeiro T, Fleury M, Gaitan J, Duarte DF, Touzé A, Coursaget P**. Induction of neutralizing antibodies against heterologous human papillomaviruses by immunization with pseudovirons package with the L2 gene.**

25th International Papillomavirus conference and clinical worshop 8-14 Mai 2009 Malmö, Suède

Duarte DF, **Combelas N**, Martinez E, Molano M, Touzé A, Combita AL, Coursaget P.

Detection of HPV 58 neutralizing antibodies in an endemic HPV area.

25th International Papillomavirus conference and clinical worshop 8-14 Mai 2009 Malmö, Suède

Combelas N, Touzé A, Fleury M, Coursaget P.

Insertion of the L2 protein on the surface of HPV-16 VLPs increase their capacity to induce cross protection against high risk papillomavirus

24th International Papillomavirus conference and clinical worshop Beijing, China, 3-9 Novembre 2007

Combelas et al. Journal of Translational Medicine 2010, 8:28
http://www.translational-medicine.com/content/8/1/28

JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE

RESEARCH Open Access

Papillomavirus pseudovirions packaged with the L2 gene induce cross-neutralizing antibodies

Nicolas Combelas[1], Emilie Saussereau[1], Maxime JJ Fleury[1], Tatiana Ribeiro[1,3], Julien Galtan[1], Diego F Duarte-Forero[1,2], Pierre Coursaget[1*], Antoine Touzé[1]

Abstract

Background: Current vaccines against HPVs are constituted of L1 protein self-assembled into virus-like particles (VLPs) and they have been shown to protect against natural HPV16 and HPV18 infections and associated lesions. In addition, limited cross-protection has been observed against closely related types. Immunization with L2 protein in animal models has been shown to provide cross-protection against distant papillomavirus types, suggesting that the L2 protein contains cross-neutralizing epitopes. However, vaccination with L2 protein or L2 peptides does not induce high titers of anti-L2 antibodies. In order to develop a vaccine with the potential to protect against other high-risk HPV types, we have produced HPV58 pseudovirions encoding the HPV31 L2 protein and compared their capacity to induce cross-neutralizing antibodies with that of HPV L1 and HPV L1/L2 VLPs.

Methods: The titers of neutralizing antibodies against HPV16, HPV18, HPV31 and HPV58 induced in Balb/c mice were compared after immunization with L2-containing vaccines.

Results: Low titers of cross-neutralizing antibodies were detected in mice when immunized with L1/L2 VLPs, and the highest levels of cross-neutralizing antibodies were observed in mice immunized with HPV 58 L1/L2 pseudovirions encoding the HPV 31 L2 protein.

Conclusions: The results obtained indicate that high levels of cross-neutralizing antibodies are only observed after immunization with pseudovirions encoding the L2 protein. HPV pseudovirions thus represent a possible new strategy for the generation of a broad-spectrum vaccine to protect against high-risk HPVs and associated neoplasia.

Background

The fact that cervical cancer is the second most common cause of cancer deaths in women worldwide [1], and that virtually all cervical cancers are etiologically linked with infection by "high risk" human papillomavirus (HPV) [2], has encouraged the development of prophylactic vaccines to prevent genital infection. Fifteen of the HPV types infecting the mucosal epithelium cause cervical cancer, HPV16 and 18 being the most prevalent types detected in cervical carcinoma [1]. Papillomaviruses are small non-enveloped DNA viruses and their icosahedral capsid is constituted of L1 and L2 proteins, which encapsidate a closed circular, double-stranded DNA of about 8 kbp. The viral capsid of 50-60 nm in diameter contains 72 pentamers of L1 major protein and 12 to 72 copies of L2 minor capsid protein [3,4].

Immunization with L1 self-assembled into virus-like particles (VLPs) induces high titers of neutralizing antibodies and confers protection in animals against homologous experimental infection [5,6]. It has also been shown that protection is mediated by neutralizing antibodies directed against conformational epitopes. These results have led to the industrial development of vaccines against genital HPV types. Pre-clinical studies have shown that the neutralizing antibodies induced by L1 VLPs are predominantly type-specific [7,8]. However, low levels of cross-neutralization have been reported between HPV6 and 11 and HPV 16 and 31 [9-12] and higher levels between HPV18 and 45 [13]. Clinical trials have shown that the immune response is associated with protection against HPV16 and HPV18 infections and associated lesions [14,15].

* Correspondence: coursaget@univ-tours.fr
[1]Inserm U618 "Protéases et vectorisation pulmonaires", Tours; University François Rabelais, Tours, France and IFR 136 "Agents Transmissibles et Infectiologie", Tours, France

BioMed Central

© 2010 Combelas et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2010, p. 1767–1770 Vol. 48, No. 5
0095-1137/10/$12.00 doi:10.1128/JCM.01691-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Generation of Merkel Cell Polyomavirus (MCV)-Like Particles and Their Application to Detection of MCV Antibodies▽†

Antoine Touzé,[1] Julien Gaitan,[1] Françoise Arnold,[1] Raphaël Cazal,[1] Maxime J. Fleury,[1] Nicolas Combelas,[1] Pierre-Yves Sizaret,[2] Serge Guyetant,[3] Annabel Maruani,[4] Marc Baay,[5] Mauro Tognon,[6] and Pierre Coursaget[1]*

Université François Rabelais, INSERM U618, and IFR 136, Agents Transmissibles et Infectiologie, Tours, France[1]; Service de Microscopie Électronique, Université François Rabelais, INSERM U966, and IFR136, Tours, France[2]; Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, Tours, France[3]; Université François Rabelais, Service de Dermatologie, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, Tours, France[4]; University of Antwerp, Laboratory for Cancer Research and Clinical Oncology, Universiteitsplein 1, Wilrijk, Belgium[5]; and School of Medicine, University of Ferrara, Ferrara, Italy[6]

Received 31 August 2009/Returned for modification 22 January 2010/Accepted 12 February 2010

The genome of a new human polyomavirus, known as Merkel cell polyomavirus (MCV), has recently been reported to be integrated within the cellular DNA of Merkel cell carcinoma (MCC), a rare human skin cancer. To investigate MCV seroprevalence in the general population, we expressed three different MCV VP1 in insect cells using recombinant baculoviruses. Viruslike particles (VLPs) were obtained with only one of the three VP1 genes. High-titer antibodies against VP1 VLPs were detected in mice immunized with MCV VLPs, and limited cross-reactivity was observed with BK polyomavirus (BKV) and lymphotropic polyomavirus (LPV). MCV antibodies were detected in 77% of the general population, with no variations according to age.

Polyomaviruses are small, nonenveloped DNA viruses, with a double-stranded circular DNA genome of ~5 kbp packaged within a capsid about 45 nm in diameter. The polyomavirus capsid is composed of three structural proteins: VP1, the major capsid protein, and VP2 and VP3, the minor capsid proteins. Twenty members of the polyomavirus family have been identified to date (24) and, with the exception of the murine pneumotropic polyomavirus and the avian polyomavirus, primary infection is generally asymptomatic. Five polyomaviruses infect humans, including the ubiquitous BK polyomavirus (BKV) and JC polyomavirus (JCV), which cause persistent and/or latent infections and the recently identified KI and WU polyomaviruses isolated from pulmonary secretions (1, 6). A new polyomavirus, the Merkel cell polyomavirus (MCV), was recently discovered in human Merkel cell carcinomas (MCC) (4). MCC is a relatively rare skin cancer in elderly or immunosuppressed patients and is one of the most lethal skin cancers (8). The annual incidence rate of this aggressive primary cutaneous neuroendocrine carcinoma in the United States was reported to be 0.44 per 100,000 inhabitants in 2001 and tripled between 1986 and 2001 (8), and this trend is continuing (7). An incidence of 0.13 cases per 100,000 was recently reported in France (15). Clonal integration of the MCV genome within the tumor genome (4) and the deletions and/or mutations observed within the T antigen gene (17) have suggested a direct oncogenic role for MCV. However, the prevalence and pathogenicity of this newly discovered MCV have yet to be fully investigated.

The aim of the study was to produce MCV viruslike particles (VLPs) and to investigate the presence of MCV antibodies in the general population of Europe. MCV VLPs were obtained with only one of the three MCV VP1 strains investigated, and these VLPs were used to investigate cross-reactivity against other polyomaviruses and for the determination of the prevalence of MCV antibodies in the general European population.

MATERIALS AND METHODS

Generation of VLPs for MCV, BKV, and LPV polyomaviruses. Expression of the VP1 protein was performed using the MCC350 VP1 prototype sequence and the VP1 sequences amplified from two French MCC patients (MKT-21 and MKT-26) (EMBL FM864207 and FM864209, respectively) (21). MCC350 VP1 coding sequence was obtained by total synthesis with a codon usage adapted for expression in *Spodoptera frugiperda* cells (Geneart, Regensburg, Germany) (EMBL FN178624). The VP1 coding sequences were cloned under the control of the polyhedrin promoter between BamHI and HindIII restriction sites of the baculovirus double expression vector pFastBacDual. Recombinant baculoviruses were generated by using the Bac-to-Bac system (Invitrogen/Fisher Scientific, Illkirch, France). The production of BKV VP1 VLPs has been described previously (20), and the production of LPV VLPs was performed by expression of the LPV *Spodoptera frugiperda* codon-adapted VP1 sequence obtained by total synthesis (Geneart, EMBL FN178623). Sf21 cells, maintained in SF900II medium (Invitrogen), were infected with the different baculoviruses. VLPs were purified as described previously and the presence of VLPs was analyzed by electron microscopy (19, 20). The VLPs produced were quantified by determination of the mean number of particles observed per field (calculated from three to six micrographs).

Monoclonal and polyclonal antibodies. Sera from mice immunized with MCV MKT-21, BKV, and LPV VLPs and MCV350 VP1 were used to evaluate cross-reactivity among polyomaviruses. An anti-MCV VP1 monoclonal antibody (MAb) from a mouse immunized with MCC350 VP1 was used to detect VP1 proteins. This anti-MCC350 MAb was produced as previously described (5) and was directed against a linear cross-reactive epitope also present on BKV and JCV VP1 (data not shown).

Human serum and plasma samples. Plasma samples from 101 female students participating in a study on clearance of HPV performed at the Antwerp University,

* Corresponding author. Mailing address: INSERM U618, Faculté de Pharmacie Ph Maupas, Université François Rabelais, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France. Phone: 33-0247367256. Fax: 33-0247367188. E-mail: coursaget@univ-tours.fr.

† Supplemental material for this article may be found at http://jcm.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 24 February 2010.

Nicolas COMBELAS

INDUCTION D'UNE IMMUNITE CROSS-NEUTRALISANTE CONTRE LES PAPILLOMAVIRUS HUMAINS A HAUT RISQUE

Résumé

Les papillomavirus à « haut risque » (HR) sont les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus. Les vaccins prophylactiques actuels assurent une protection contre les lésions induites par les génotypes 16 et 18, responsables de 70% de ces cancers. Les lésions induites par les treize autres HPV HR responsables de 30% des cancers ne sont potentiellement pas prévenues par ces vaccins.

Les objectifs de ma thèse ont été d'évaluer la capacité du vaccin quadrivalent anti-HPV et des vaccins de seconde génération à induire une immunité cross-neutralisante contre les HPV HR. Tout d'abord, la capacité du vaccin quadrivalent anti-HPV à induire des anticorps neutralisant les HPV 31 et 58 a été analysée. L'induction d'anticorps neutralisant les HPV 31 et 58 a été mise en évidence, 1 mois après la dernière injection, chez 33% et 24% des femmes vaccinées, respectivement. Les pseudovirions (PsV) de l'HPV 58 produits en système cellulaire et utilisés pour cette étude présentent une capacité de transduction des cellules COS-7 10 fois supérieure à celle des PsV 31 et représente un vecteur de choix pour des applications en immunisation génique.

La deuxième partie de ma thèse s'est orientée sur le développement et l'analyse de la réponse immune induite par des vaccins de seconde génération basés sur la protéine L2. L'utilisation de la protéine L2, capable d'induire des anticorps cross-neutralisants, est un candidat de choix pour développer un vaccin protégeant contre l'ensemble des papillomavirus HR.

Afin d'augmenter la réponse anti-L2, trois systèmes reposant sur l'interaction streptavidine/biotine ont été évalués pour exposer la protéine L2 à de multiples copies à la surface de VLP.

Enfin, une stratégie reposant sur l'immunisation avec des PsV, composés des protéines L1 et L2 de l'HPV 58 contenant le gène de la protéine L2 de l'HPV 31, a également été évaluée. Les résultats obtenus indiquent que les PsV58-31L2 représentent la meilleur formulation de la protéine L2 et permet d'induire des anticorps neutralisants les HPV 16, 31,58 et surtout l'HPV 18, phylogénétiquement éloigné des valences vaccinales.

Mots clés : HPV, pseudovirions, L2, neutralisation croisée, streptavidine/biotine, immunisation

Résumé en anglais

High risk human papillomaviruses (HR HPV) are the etiologic agents of cervical cancer. Current prophylactic HPV vaccines have been shown to protect against natural infection and against the development of high-grade lesions associated with HPV 16 and 18, both responsible of 70% of cervical cancer. However, these vaccines have not the potential to protect against all the thirteen other HR HPV.

The aims of my PhD thesis were to evaluate the quadrivalent anti HPV vaccine and second generation vaccine capacity to induce cross-neutralizing antibodies against HR HPV.

First, we have investigated the neutralizing antibodies against HPV 58 and HPV 31 after immunization in a population of 65 vaccinated HPV 31 and HPV 58 DNA-negative Colombian women. The results have shown that 33% and 24% of the immunized women exhibited cross neutralizing antibodies against HPV 31 and HPV 58 one month after vaccination, respectively. HPV 58 pseudovirions generated in a cellular system and used in this study exhibit a 10 fold higher capacity to transduce COS-7 cells than those of the HPV 31 PsV and thus represent an interesting candidate for DNA immunization application.

The second and third parts of my work were to develop and analyze the immune response induced by second generation vaccine based on L2 protein. In fact, because L2 protein is able to induce cross-neutralizing antibodies, it represents a good alternative in order to develop broad-spectrum HPV vaccine.

In order to enhance the anti-L2 immune response, three systems based on the streptavidin/biotin interaction have been evaluated in order to decorate HPV 16 VLPs with multiple L2 protein.

Finally, we have produced HPV58 pseudovirions encoding the HPV31 L2 protein. Results obtained indicated that cross-neutralizing antibodies against HPV 16, 31, 58 and a more distant type HPV 18 are only obtained after immunization with pseudovirions encoding the L2 protein.

Key words: HPV, pseudovirions, L2, cross-neutralization, streptavidine/biotine, immunization