

THÈSE POUR L'OBTENTION DU GRADE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

Sciences de la Vie et de la Santé / ICMV

Présentée et soutenue publiquement par

Audrey CARPENTIER

Le 28 septembre 2012

Modification du tropisme de vecteurs pseudoviraux dérivés des papillomavirus pour l'application aux thérapies pulmonaires

UMR1282 équipe VIRIM « Virologie Immunologie Moléculaire

THÈSE dirigée par :

Monsieur COURSAGET Pierre

Directeur de Recherches INSERM, Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur DERYCKERE François

MCU (HDR), Strasbourg

Monsieur PRÉTET Jean-Luc

MCU (HDR), Besançon

JURY :

Monsieur COURSAGET Pierre

Directeur de Recherches INSERM, Tours

Madame DEMERET Caroline

Chargée de Recherche (HDR) Institut Pasteur, Paris

Monsieur DERYCKÈRE François

MCU (HDR), Strasbourg

Monsieur DIOT Patrice

Professeur des Universités, Tours

Monsieur PRÉTET Jean-Luc

MCU (HDR), Besançon

Monsieur TOUZÉ Antoine

Professeur des Universités, Tours

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Pierre Coursaget pour m'avoir accueilli au sein du 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 tiens également à remercier sincèrement Monsieur le Professeur Antoine Touzé pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je tiens ensuite à témoigner ma reconnaissance à Monsieur Jean-Luc Prétet et à Monsieur François Deryckère, 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 remercie Madame Caroline Demeret et Monsieur Patrice Diot d'avoir accepté d'être membre du jury de ma thèse, qu'ils soient assurés ici de toute ma reconnaissance.

Je remercie également Patrice Diot, et les membres de son équipe, Laurent Vecellio, Sandrine Leguellec et Jérôme Montharut, pour leur compétence dans le domaine des aérosols et leur aide pour la nébulisation des préparations de pseudovirions, ainsi que pour les expérimentations chez le rat.

Je tiens à remercier vivement le Laboratoire de Microscopie Electronique de la faculté de Médecine de TOURS, et plus particulièrement Pierre-Yves Sizaret et Julien Gaillard pour tout le temps passé en microscopie (même pour les projets ne figurant pas dans cette thèse), leurs conseils, leur très grande disponibilité et leur sympathie.

Je remercie également l'association Vaincre la Mucoviscidose pour avoir financé l'intégralité de mon projet de thèse.

Résumé

La mucoviscidose est une maladie héréditaire monogénique grave en rapport avec une mutation du gène codant pour la protéine CFTR et dont la morbidité est due principalement aux atteintes pulmonaires. La greffe pulmonaire développée depuis quelques années semble être la seule thérapie curative efficace. Toutefois, la rareté des greffons disponibles, justifie de développer d'autres thérapies comme la thérapie génique.

Les pseudovirions de papillomavirus sont capables de transférer des gènes dans de nombreuses lignées cellulaires. Cependant, le tropisme naturel des papillomavirus est l'épithélium malpighien et ces pseudovirions sont peu efficaces pour les cellules de l'épithélium pulmonaire. Afin de modifier le tropisme de nos pseudocapsides de papillomavirus, la première étape de mon travail a été d'identifier de nouveaux motifs de ciblage pulmonaire. La technique de phage display a permis l'identification des motifs PHPNRAQ et VDRLQKK par sélection sur les cellules épithéliales bronchique IB3-1 et S9.

Les 2 motifs identifiés (P4 = PHPNRAQ et P5 = VDRLQKK) ainsi que 3 autres séquences de ciblage pulmonaire décrits dans la littérature, THALWHT, P2 = RFDSLKV et P3 = GHPRQMSHVY ont été insérées par mutagenèse dirigée dans 3 des boucles antigéniques de la protéine majeure de capsid L1 du papillomavirus de type 16. L'efficacité du transfert a été optimisée par l'utilisation d'un nouveau plasmide d'expression de la luciférase et par l'utilisation de pseudovirions composés des protéines majeure et mineure de capsid (L1 et L2).

L'efficacité de transduction des pseudovirions chimériques ainsi réalisés a été étudiée en utilisant 3 lignées de cellules pulmonaires (IB3-1, S9 et 16HBe14o-) en comparaison avec une lignée de cancer du col de l'utérus (SiHa). Une augmentation du transfert de gène a été observée pour la plupart des constructions chimériques, mais elle semble peut spécifique du type cellulaire. Toutefois, un ciblage pulmonaire important a été observé pour deux des mutants réalisés correspondant à une augmentation du taux de transfert en cellules pulmonaires et à une diminution du taux de transfert en cellules SiHa.

Les capacités de transfert de gène de deux des pseudovirions réalisés ont également été étudiées *in vivo* chez le rat. La stratégie retenue consiste à vacciner avec des pseudovirions codant pour la protéine de capsid du virus de l'hépatite E, déposés au niveau pulmonaire par génération d'un aérosol. Le transfert de gène de nos pseudovirions au niveau pulmonaire se mesurant par la réponse immunitaire induite contre le transgène (anti-HEV). Dans une étape préliminaire, nous avons étudié la résistance des pseudovirions à différents procédés de génération des aérosols. Les augmentations de transfert de gène observées *in vitro* et *in vivo*, sont faibles, mais similaires à celles observées avec d'autres vecteurs. Si nous avons réalisé des pseudovirions chimériques de papillomavirus qui possèdent une efficacité de transduction plus grande dans les cellules pulmonaires que le type sauvage, il n'est pas envisageable de les utiliser en thérapie génique humaine du fait de l'efficacité faible de transduction comparé à d'autres vecteurs. Cependant, les résultats obtenus *in vivo* chez le rat montrent qu'une application en vaccination pulmonaire est possible.

Mots clés : Papillomavirus, VLPs, motifs de ciblage, aérosol, ciblage pulmonaire, pseudovirions, transfert de gène.

Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive genetic disorder caused by mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein. Lung transplantation developed in recent years is the only effective curative treatment. However, due to the limitation in organ donors, it is necessary to develop other therapies such as gene therapy.

Papillomavirus pseudovirions have the potential to deliver genes into different cells. However, the natural tropism of HPV is directed to the cervical epithelial cells and these pseudovirions have low transduction efficacy in pulmonary epithelial cells. The purpose of this thesis was to retarget and optimize the HPV-16 pseudovirions tropism to airway cells by insertion of short amino acid sequences within the major capsid protein L1.

Using a phage display technique, two new ligands (PHPNRAQ and VDRLQQK) have been identified by selection on bronchial epithelial cells IB3-1 and S9. These two new sequences (P4 = PHPNRAQ and P5 = VDRLQQK) and three amino acid sequences reported as airway cell ligands (P1 = THALWHT, P2 = RFDSLKV and P3 = GHPRQMSHVY) were inserted into 3 different external loops of L1 protein. The gene transfer efficiency of the pseudovirions was optimized using a new luciferase expression plasmid and with pseudovirions containing the minor capsid protein L2 in addition to the L1 capsid proteins.

Chimeric pseudovirions were investigated *in vitro* for their ability to transduce human airway cells *in vitro*, and *in vivo* for their ability to deliver a gene into the lung by aerosol immunization. The transduction efficiency of chimeric pseudovirions produced was investigated using three human airway epithelial cell lines (IB3-1, S9 and 16HBe14o-) in comparison with a cervical cancer cell line (SiHa). An increase in gene transfer was observed for most of the chimeric pseudovirions. In addition, a significant lung targeting was observed for two mutants, corresponding to an increase in gene transfer in lung cells and a decrease in transfer in SiHa cells.

The gene transfer capacity of two chimeric pseudovirions was also investigated *in vivo* in rats by aerosol immunization with pseudovirions encoding the capsid protein of hepatitis E virus (HEV). Gene transfer was assessed by measuring the immune response against the transgene (anti-HEV). In a preliminary step, the decrease in gene transfer efficacy according to different aerosol generating devices was investigated. Using the mycosprayer* device, a two to three fold increase in gene transfer was observed *in vivo* using the chimeric pseudovirions.

Increase in gene transfer observed *in vitro* and *in vivo* due to insertion of lung targeting peptides is limited, but similar to that observed in other viral and non-viral vectors. If chimeric papillomavirus pseudovirions evidenced a greater transduction efficacy in lung cells than the wild type, this increase is not sufficient, compared to other viral vectors efficiency, for use in human gene therapy. However, the results obtained *in vivo* in rats indicate that such chimeric HPV pseudovirions could be used for aerosol immunization.

Keywords: Papillomavirus, VLPs, targeting peptides, aerosol, lung, pseudovirions, gene transfer.

Abréviations

aa: acide aminé	EDTA: acide éthylène diamine tetra acétique
AAV: adeno-associated-virus	EGTA: acide éthylène glycol-bis(beta-aminoéthyle ether)-N,N,N',N'-tétra acétique
ADAP : <i>as different as possible</i>	ELISA: enzyme linked immunosorbant assay
ADN: acide désoxyribonucléique	ENac: <i>epithelial Na channel</i>
Ad: adénovirus	GP: glycoprotéine
ADP: acide di-phosphate	GSK: GlaxoSmithKline
AMPc: adénosine monophosphate cyclique	Hd-AD: <i>helper-dependant adenovirus</i>
APS: persulfate d'ammonium	HEV: virus de l'hépatite E
ARN: acide ribonucléique	HN: hémagglutinine neuraminidase
ASO4: hydroxyde d'aluminium	HPV: papillomavirus humain
ATP: acide tri-phosphate	HR: haut risque
BCPIP: bromo chloro indoyle phosphate	HS70: heat shock protein 70
BR: bas risque	HSPG: héparane sulfate proteoglycane
BSA: <i>serum albumin bovine</i>	ICAM: Intercellular adhesion molecule
BPV: papillomavirus bovin	Ig: Immunoglobuline
CaCC: canal chlorure calcium dépendant	IL: interleukine
CIN: lésions intraépithéliales cervicales	IPTG: iso-propyl- β -D-thiogalactoside
CFTR: <i>cystic fibrosis conductance regulator</i>	IST: infection sexuellement transmissible
CsCl: chlorure de césium	JRSV: Jaagsiekte sheep retrovirus
DBD: domaine de liaison à l'ADN	kDA: kilo Dalton
DDP: différence de potentiel	kpb: kilo paire de base
DMSO : diméthyle sulfoxyde	L1: protéine majeure de capsid
dNTP : désoxy-ribonucléotides	L2: protéine mineure de capsid
DO : densité optique	LB: Luria-Bertani
DTT : dithiotretiol	

LBA: lavage broncho-alvéolaire

LCR: *Long Control Region*

LPO: Lactoperoxydase

L2SA: L2-streptactine

LV: lentivirus

MET: microscopie électronique à transmission

MT: marqueur de taille

MSD: *membrane spanning domain*

MCS: site de multiclonaage

NBT: nitro blue tetrazolium

NBD: *nucleotide binding domain*

ND10: domaine nucléaire 10

NFκB: *nuclear factor-kappa B*

NLS: signal de localisation nucléaire

NP-40: nonidet P -40

ORCC: *outwardly rectifying chloride channel*

ORF: Phase ouverte de lecture

PBS: tampon phosphate

PK: protéine kinase

PCR: réaction de polymérisation en chaine

PEG: poly-éthylène glycol

Ph: phage

PIV: parainfluenza virus

PN: polynucléaires neutrophiles

PsV: pseudovirions

pRB: protéine supresseur de tumeur du rétinoblastome

PSa: *Pseudomonas aeruginosa*

RANTES: *regulated upon activation normal T-cell expressed, and secreted*

RE: réticulum endoplasmique

RLU: *Relative Light Units*

SDS : sodium dodécyl-sulfate

SeV: Sendai virus

Sf : *Spodoptera frugiperda*

SVF: sérum de vœu foetal

SV40: virus simien 40

TAE: tris acétate EDTA

TEMED: N-N-N-N-tétraméthylènediamine

TNF-α: *tumor necrosis factor-alpha*

UFP: Unité formant plaque

UI: unité internationale

V: volume

VIF: virus de l'immunodéficience féline

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

VLP: particule pseudo-virale (*Virus-like Particles*)

VP: protéine virale

VRS: Virus Respiratoire Syncytial

VSV: *Vesicular stomatitis virus*

VVr: Virus de la vaccine recombinant

wt: sauvage (*wild-type*)

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside

Sommaire

Introduction	5
Introduction Bibliographique	7
Partie 1 : La Mucoviscidose	8
1. Historique de la maladie	8
2. Epidémiologie de la maladie	10
3. Etiologie de la maladie	11
3.1 Le CFTR, du gène à la protéine	11
3.2 Les mutations du CFTR	12
4. Descriptif clinique de la maladie	15
5. Les traitements	19
5.1 Prise en charge digestive et nutritionnelle	20
5.2 Prise en charge respiratoire	20
5.3 Transplantation pulmonaire	21
6. Thérapeutique à l'étude	22
6.1 Thérapie protéique	22
6.1.1 Thérapeutiques spécifiques de mutations	23
• <i>Mutations de classe I</i>	23
• <i>Mutations de classe II</i>	23
• <i>Mutations de classe III, IV et V</i>	24
6.1.2 Thérapeutiques non spécifiques de mutations	25
6.2 Thérapie génique	26
Partie 2 : Thérapie génique	29
1. Essais Clinique de thérapie génique pulmonaire	30
2. Thérapie génique contre la mucoviscidose	30
2.1 les stratégies géniques du CFTR à vectoriser	30
2.2 Les problèmes liés à l'organe cible	31
2.3 Les vecteurs utilisés en thérapie génique	33
2.3.1 Adénovirus en thérapie génique contre la mucoviscidose	33
2.3.2 AAV en thérapie génique contre la mucoviscidose	35
2.3.3 vecteurs non-viraux en thérapie génique contre la mucoviscidose	37
2.4 Vecteurs en cours de développement	39
2.4.1 les rétrovirus	40
2.4.2 les virus para influenza (PIV)	42
2.4.3 les polyomavirus, exemple du SV40.	43
Partie 3 : Modification du tropisme des vecteurs de transfert de gène	45
1. Incorporation de motifs de ciblage	45
1.1 Insertion d'un motif connu	45
1.2 Insertion d'une séquence aléatoire	46
2. Identification de motifs de ciblage pulmonaire	46
2.1 Principe du phage display	47

2.1.1 Morphologie du Bactériophage	47
2.1.2 Présentation et sélection des motifs	48
2.2 Nouveaux motifs de ciblage pulmonaire identifiés	50
Partie 4 : les papillomavirus	52
1. La famille des Papillomaviridae	52
2. Génome des Papillomavirus	54
3. Cycle viral	56
4. Mécanisme d'entrée des papillomavirus	57
4.1 Attachement du virus à la cellule	57
4.2 Internalisation des papillomavirus.	59
4.3 Transport vers le noyau	61
5. Capsides et pseudoparticules virales de papillomavirus	62
6. Les pseudoparticules virales comme vecteur de gène	67
6.1 Les systèmes de formation cellulaire des PsV	67
• Formation de PsV en utilisant le virus de la vaccine recombinant	67
• Formation de PsV par transfection de gènes optimisés des protéines de capside	67
6.2 Les systèmes acellulaires de formation des PsV	68
• Obtention de PsV de papillomavirus par dissociation-réassociation	68
	70
Matériels et méthodes	
1. Identification d'un nouveau ligand spécifique des cellules pulmonaires par la technique « phage display »	72
2. Insertion des motifs dans la séquence de la protéine L1 de l'HPV-16	73
2.1. Mutagenèse dirigée	73
2.2. Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	74
2.3. Purification des fragments d'ADN à partir de gel d'agarose	74
2.4. Clonage des produits de PCR dans le vecteur pCR 2.1-TOPO	74
2.5. Transformation bactérienne	75
2.6. Mini-préparation d'ADN plasmidique	76
2.7. Séquençage d'ADN	76
3. Production des pseudovirions chimériques	77
3.1. Système d'expression baculovirus/cellules d'insecte	77
3.2. Clonage des gènes d'intérêt dans le plasmide pFastBacDual	78
3.3. Transformation des bactéries DH10Bac	78
3.4. Mini-préparation d'ADN bacmidique	80
3.5. Vérification de la présence du gène d'intérêt dans les bacmides	80
3.6. Transfection des cellules d'insecte et production des protéines d'intérêt	81
3.6. 1 Les cellules d'insecte	81
3.6. 2 Transfection des cellules d'insecte Sf21	81
3.6. 3 Titration des baculovirus et productions des protéines recombinantes	81
4. Purification des pseudo-particules virales de papillomavirus	82
4.1. Extraction des protéines nucléaires	82
4.2. Purification de protéines par gradient de densité	82
4.3. Observation des VLP en microscopie électronique	82
4.4. Dosage des protéines totales	83
4.5. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide dénaturant	84
4.6. Caractérisation des protéines par immuno-empreinte	84
5. Production des PsV par la technique de dissociation-réassociation et vérification de l'encapsidation.	85

5.1 Production des PsV par la technique de dissociation-réassociation	85
5.2 Vérification de l'encapsidation du plasmide pGL4.13 par les pseudovirions	86
6. Tests de transfert de gène pour les HPV16 mutants	86
6.1 Culture Cellulaire	86
6.2 Transduction des cellules à l'aide des pseudovirions sauvages et chimériques	86
6.2.1 Infection des lignées cellulaires	87
6.2.2 Révélation de l'expression luciférase	87
7. Vaccination par aérosol à l'aide des pseudovirions sauvage et chimériques en modèle rat	88
7.1 Les dispositifs d'aérosols	88
7.2 La mesure du dépôt de l'aérosol dans les poumons de rats	89
7.3 Immunisation des rats	89
7.4 Evaluation du transfert de gène par mesure des Ac anti-HEV par ELISA	90
7.5 L'analyse statistique	91
Résultats	93
1. Identification de nouveaux ligands spécifiques des cellules pulmonaires par la technique de « phage display ».	95
2. Modification de la protéine de capsid L1 de l'HPV-16 par insertion d'un motif de ciblage dans les boucles antigéniques DE, EF ou FG	95
2. 1 Insertion des nouveaux ligands P4 et P5 dans la boucle DE de l'HPV16 L1	97
2. 2 Production des baculovirus codant les HPV16 L1 P4DE et HPV16 L1 P5DE	99
3. Production des pseudo-particules virales chimériques.	100
4. Optimisation du transfert de gène	102
4. 1 Utilisation du plasmide pGL4.13 luc	102
4. 2 Incorporation de la L2 dans les pseudovirions	103
4. 2.1. Production des VLP L1/L2	103
4. 2.2 ; Efficacité de transfert de gène des pseudovirions L1/L2	104
5. Evaluation de l'efficacité du transfert de gène des PsVs chimériques L1/L2 in vitro sur les lignées de cellules pulmonaires	106
6. Evaluation in vitro du ciblage sur lignée de cellules pulmonaires des PsVs chimériques L1/L2	108
7. Evaluation de l'efficacité du transfert de gène in vivo à l'aide de pseudovirions	109
7. 1 Résistance des PsV de papillomavirus aux procédés de génération d'aérosols	109
7. 2 Efficacité de transfert de gène pulmonaire par vaccination aérosol en modèle rat	111
7. 2. 1 Production de VLP d'HEV	111
7. 2. 2 Evaluation du transfert de gène par ELISA	112
	115
Conclusion –Discussion	
Références bibliographiques	123
Annexes	140
Liste des figures	142
Liste des tableaux	145
Liste des publications	146
Liste des communications	151

Introduction

La mucoviscidose est une maladie héréditaire monogénique grave, en rapport avec une mutation du gène codant pour la protéine CFTR. Les mutations présentes sur le gène CFTR entraînent une altération des échanges hydro électrolytiques au niveau des cellules épithéliales des voies aériennes. La prise en charge des différentes manifestations cliniques de la mucoviscidose a permis une avancée majeure dans la thérapeutique de cette maladie constamment mortelle, avec un allongement de l'espérance de vie d'environ 40 ans. La greffe pulmonaire développée depuis quelques années semble être la seule thérapie curative efficace. Mais son application est limitée par la rareté des greffons disponibles. La thérapie génique est l'une des autres thérapies envisageables en corrigeant au moins partiellement le déficit d'expression de la protéine CFTR fonctionnelle afin de réduire les effets délétères de la protéine CFTR mutée.

Les pseudovirions de papillomavirus sont capables de transférer des gènes dans de nombreuses lignées cellulaires. Cependant, le tropisme naturel des papillomavirus est l'épithélium malpighien et ces pseudovirions sont peu efficaces pour les cellules de l'épithélium pulmonaire. L'objectif de ma thèse a été de développer de nouveaux vecteurs de gène dérivés des papillomavirus et avec un tropisme amélioré pour les cellules pulmonaires.

La première étape de mon travail a été d'identifier de nouveaux motifs de ciblage pulmonaire en utilisant une technique de phage display utilisant des phages présentant un peptide contraint. Deux des séquences identifiées par cette technique et 3 autres séquences de ciblage pulmonaire décrites dans la littérature ont été insérées par mutagenèse dirigée dans 3 des boucles antigéniques de la protéine majeure de capsid L1 du papillomavirus de type 16. L'efficacité du transfert a été optimisée par l'utilisation d'un nouveau plasmide d'expression de la luciférase et par l'utilisation de pseudovirions composés de la protéines majeure de capsid L1 et mineure L2.

L'efficacité de transduction des pseudovirions chimériques ainsi réalisés a été étudiée en utilisant 3 lignées de cellules pulmonaires en comparaison avec une lignée de cancer du col de l'utérus. Une augmentation du transfert de gène a été observée pour la plupart des

constructions chimériques, mais elle ne semble pas spécifique du type cellulaire. Toutefois, un ciblage pulmonaire important a été observé pour deux des mutants réalisés correspondant à une augmentation du taux de transfert en cellules pulmonaires et à une diminution du taux de transfert en cellules SiHa.

Les capacités de transfert de gène de deux des pseudovirions réalisés ont également été étudiées *in vivo* chez le rat. La stratégie retenue consiste à vacciner avec des pseudovirions codant pour la protéine de capsid du virus de l'hépatite E déposés au niveau pulmonaire par génération d'un aérosol. La qualité du transfert de gène de nos pseudovirions se mesurant par la réponse immunitaire induite contre le transgène (anti-HEV). Dans une étape préliminaire nous avons étudié la résistance des pseudovirions à différents procédés de génération des aérosols.

Les augmentations de transfert de gène observées *in vitro* et *in vivo*, sont faibles, mais similaires à ceux observés avec d'autres vecteurs. Si nous avons réalisé des pseudovirions chimériques de papillomavirus qui possèdent une efficacité de transduction plus grande dans les cellules pulmonaires que le type sauvage, il n'est pas envisageable de les utiliser en thérapie génique humaine du fait de l'efficacité faible de transduction comparé à d'autres vecteurs. Cependant, les résultats obtenus *in vivo* chez le rat montrent qu'une application en vaccination pulmonaire est possible.

Introduction bibliographique

Partie I : La Mucoviscidose

1. Historique de la maladie

Dès le Moyen Âge, le « baiser salé » sur le front des nourrissons prédisait déjà la mort de celui-ci dans l'année. En 1905, Landsteiner identifie l'iléus méconial, qui est une obstruction intestinale néonatale présente chez certains enfants. Apparaissent ensuite les premières observations associant maladie pulmonaire, diarrhée et anomalie pancréatique avec plusieurs cas dans une même famille. Ce n'est qu'en 1936, dans une thèse présidée par Guido Fanconi, que cette pathologie fut nommée pour la 1ère fois « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie ». Cependant la mucoviscidose ne fut considérée comme une entité pathologique distincte qu'en 1938 par la pédiatre américaine Dorothy Hansine Andersen. Elle publia un article intitulé « fibrose kystique du pancréas et ses relations avec la maladie cœliaque » (Davis, 2006), avec une description des caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie, notamment l'obstruction intestinale néonatale, les complications respiratoires et digestives et les lésions histologiques spécifiques du pancréas.

En 1943, apparaît pour la première fois le terme de mucoviscidosis, créé à partir des termes « mucus » et « visqueux ». En effet, le docteur Sydney Farber émit l'hypothèse que la maladie était due à une diffusion généralisée de mucus visqueux et voulait corriger la dénomination employée par Dorothy Andersen, centrée sur le pancréas (Farber *et al.*, 1943). Le terme de mucoviscidosis reste très employé dans le monde, et notamment en France. Cependant, le terme de « Fibrose Kystique du pancréas » (Cystic Fibrosis ou CF pour les anglophones) est celui qui demeure le plus utilisé par la communauté scientifique internationale. Quel que soit le nom donné à la maladie, il s'agit toujours d'une exocrinopathie généralisée dont le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif furent suggérés (Anderson and Hodges, 1946).

Les anomalies électrolytiques dans la sueur des malades (augmentation importante du chlore, du sodium et moins marquée du potassium) furent découvertes et décrites en 1953 par le docteur Paul di Sant' Agnese (Di Sant' Agnese *et al.*, 1953) , qui permit d'envisager un

diagnostic spécifique de la maladie : le test de la sueur. De réalisation difficile, la technique fut par la suite simplifiée par la méthode de l'iontophorèse à la pilocarpine décrite en 1959 par Gibson et Cooke, puis améliorée en 1967 par Shwachman et standardisée en 1996 chez l'enfant par Legrys (Gibson and Cooke, 1959; LeGrys, 1996; Schwiebert *et al.*, 1999a). Le test de la sueur devint et reste jusqu'à ce jour le test le plus fiable pour établir le diagnostic, en dehors de l'analyse génétique qui ne fut disponible que bien plus tard.

Au début des années 1980, le lien physiopathologique fut fait entre l'anomalie de la sécrétion de mucus, entraînant des obstructions glandulaires avec anomalies histologiques et l'anomalie de la sueur, entraînant des sécrétions salées sans anomalie histologique. Knowles *et al.* proposent un examen qui consiste à mesurer la différence de potentiel (DDP) de l'épithélium nasal et permet l'exploration *in vivo* des transports ioniques transépithéliaux. Ils découvrirent une différence de potentiel élevée au niveau de la muqueuse nasale chez les patients mucoviscidosiques (3 fois plus négative que chez les sujets sains) reflétant une absorption accrue du sodium et la déshydratation à la surface de l'épithélium (Knowles *et al.*, 1981). Cette découverte faisait le lien physiologique entre les poumons, le pancréas et les glandes sudoripares expliquant que l'atteinte des différents organes était due à des anomalies électrolytiques et que le mucus visqueux n'était que l'une des conséquences et non la cause.

En 1985, Tsui *et al.* localisent le gène impliqué dans la maladie sur le bras long du chromosome 7 grâce à un marqueur RLFP (Tsui *et al.*, 1985), puis l'anomalie génique en 1989 par les équipes de Lap-Chi Tsui, Collins et Riordan (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). Il s'agit d'une mutation d'un gène localisé en 7q31 codant une protéine transmembranaire appelée cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*cftr*) composée de 1480 acides aminés. Ce n'est qu'un peu plus tard, en 1991, qu'Anderson *et al.* apportèrent les preuves que le CFTR était bien un canal chlore (Anderson *et al.*, 1991a). La découverte de l'anomalie génétique permit par la suite d'ajouter le génotypage au protocole diagnostique, et d'envisager le traitement par la thérapie génique.

2. Epidémiologie de la maladie

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies sévères, autosomiques récessives, chez les individus caucasiens. Il est généralement admis une incidence d'environ 1 cas pour 2 500 naissances, correspondant 1 porteur hétérozygote pour 25 sujets. En réalité, selon les origines ethniques, l'incidence varie de 1/1 700 à 1/8 000 dans les populations européenne. La mucoviscidose est présente dans toutes les populations du globe, mais avec des prévalences variables. Il existe ainsi très peu de cas dans les populations africaines et encore moins dans les populations asiatiques (tableau 1).

Tableau 1 : Données épidémiologiques : incidence de la mucoviscidose et fréquence des porteurs en fonction de l'origine de la population (D'après Monaghan and Feldman, 1999).

Origine de la population	Incidence pour 100 000 naissances	Fréquence des hétérozygotes
Caucasiens	40	1/25
Moyen-Orient	23	1/33
Hispaniques	12	1/46
Afro-américains / Africains	5	1/70
Asiatiques	3	1/90

En 2010, 5792 cas ont été recensés en France avec une incidence d'un enfant atteint toutes les 4850 naissances ("Registre Français de la Mucoviscidose," 2012). Deux millions de sujets sont de porteurs sains (hétérozygotes) avec un sex ratio d'environ 1.

Le pronostic vital a été largement amélioré au cours des 20 dernières années. En effet, l'espérance de vie à la naissance, qui n'était que de 5 ans dans les années 1970, atteint 39 ans en 2001 (Durieu and Josserand, 2008). En 2002, la France est le premier pays à mettre en place le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose. Ainsi, avec une meilleure prise en charge des patients, l'espérance de vie à la naissance a atteint 47 ans en 2005. Cependant, plus de 50% des patients ont moins de 18 ans et meurent en moyenne à l'âge de 25 ans ("Haute Autorité de Santé," 2012).

3. Etiologie de la maladie

3.1. Le CFTR, du gène à la protéine

Le gène *cftr*, situé en 7q31, est un gène de 230 kb composé de 27 exons qui est transcrit en un ARNm de 6,5 kb. Il code la glycoprotéine CFTR de 1480 acides aminés et de masse moléculaire estimée entre 135 kDa quand elle est immature et 170 kDa lorsqu'elle est mature, entièrement glycosylée. La protéine CFTR est insérée dans la membrane plasmique, *via* deux motifs répétés et symétriques, constitués chacun d'un domaine hydrophobe transmembranaire contenant 6 hélices α : MSD1 et MSD2 (Membrane-Spanning Domains) et d'une région hydrophile cytoplasmique NBD1 et NBD2 (Nucléotide Binding Domain) capables de fixer l'ATP. Ces deux motifs sont reliés par un domaine régulateur R qui expose à sa surface plusieurs sérines phosphorylables par les protéines kinases A et C (figure 1). La protéine CFTR, par sa structure moléculaire appartient à la super famille des transporteurs membranaires ABC (ATP Binding Cassette), seul le domaine R est unique au CFTR.

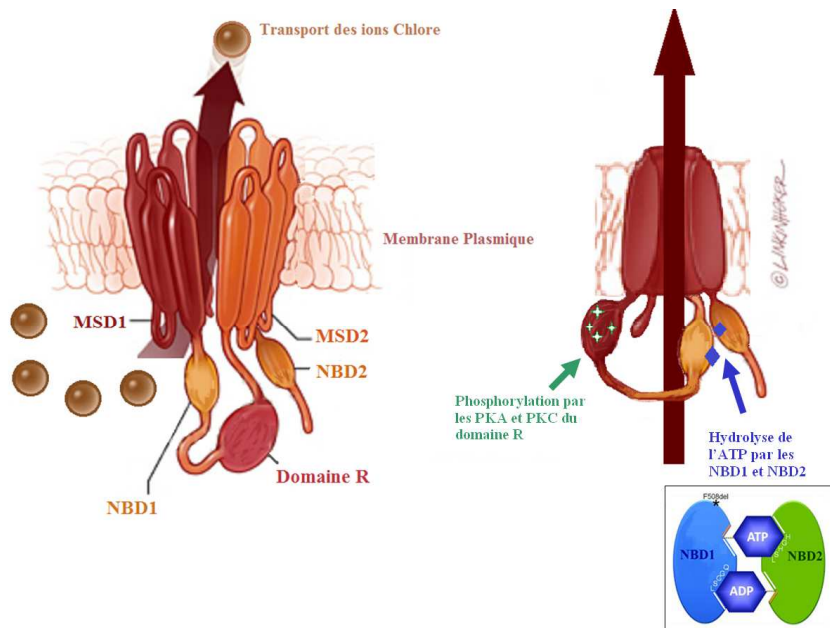


Figure 1 : Schéma représentant l'activité du canal CFTR. Le flux de chlorure à travers le pore du canal CFTR est régulé par phosphorylation AMPc-dépendante au niveau du domaine R qui va induire des cycles de liaison à l'ATP et d'hydrolyse en ADP au niveau des NBD permettant l'ouverture du pore et la sortie des ions Chlorure. (Adapté de Hwang and Sheppard, 2009 et "Johns Hopkins CF Center | What is CF? | Basic Science | CFTR | Structure," 2012)

La maturation de CFTR a lieu dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Une glycosylation correcte est indispensable pour assurer sa localisation membranaire et sa fonctionnalité (Cheng *et al.*, 1990).

Le CFTR est un canal chlore de faible conductance, régulé par la voie de l'AMP cyclique (AMPC)(Anderson *et al.*, 1991). La phosphorylation par les PKA et les PKC d'une ou plusieurs des sérines régulatrices du domaine R permet la fixation de l'ATP sur NBD1 et NBD2. L'hydrolyse de l'ATP aux domaines NBD1 puis NBD2 provoque la modification de la protéine qui ouvre le pore. Si le domaine R n'est que partiellement phosphorylé, l'ATP hydrolysé se dissocie rapidement de NBD1 et le canal reprend sa forme fermée. Si toutes les sérines sont phosphorylées, une molécule d'ATP peut se fixer sur NBD2 et le canal restera ouvert plus longtemps, la fixation de cette seconde molécule stabilisant le canal dans sa conformation ouverte (Hwang *et al.*, 1994; Gadsby *et al.*, 2006; Hwang and Sheppard, 2009). Les ions chlorures passent à travers ce pore selon un gradient électro-chimique. Dans les cellules bronchiques, le gradient favorise le passage du milieu intracellulaire vers la lumière ; à l'inverse dans les cellules sudoripares, la sécrétion se fait de la lumière vers la cellule.

Le CFTR est situé au pôle apical de l'ensemble des cellules épithéliales de l'organisme (voies aériennes, épithélium intestinal, pancréas exocrine, voies biliaires, tractus génital, glandes sudorales) forme un canal ionique sélectif aux anions, tels que l'ion chlorure (Cl^-) et le thiocyanate (SCN^-), selon un gradient électrochimique. Ainsi, un défaut de CFTR a pour conséquence la rétention d'ions Cl^- dans les cellules épithéliales bronchiques. Ceci s'accompagne d'une rétention passive d'eau, d'une déshydratation du film hydrique de surface et donc d'une diminution de la clairance muco-ciliaire avec finalement une obstruction des petites voies aériennes par des sécrétions peu mobiles créant ainsi un milieu favorable au développement d'agents infectieux (Wine, 1999). A l'inverse, au niveau sudoripare, ceci se solde par le maintien d'une sécrétion sudorale riche en chlorure de sodium et en eau.

Le CFTR agit également comme régulateur des échanges hydro-électrolytiques transmembranaires, ainsi il est capable de réguler divers canaux ioniques tels que les canaux chlore ORCC, les canaux sodiques épithéliaux ENaC, les canaux potassiques ROMK, les canaux calcique CaCC ou les échangeurs ions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. En effet, le CFTR serait capable d'activer directement les canaux potassiques ROMK *via* des interactions, mais aussi d'inhiber les canaux sodiques ENaC par interaction avec le cytosquelette d'actine. Le CFTR pourrait activer les canaux calcique CaCC et chlorique ORCC la *via* l'activation des récepteurs purinergiques P_2Y_2 ATP dépendants. Les ions Cl^- ainsi relarguer dans la lumière par le CFTR et le canal ORCC vont pouvoir activer l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Schwiebert *et al.*, 1999)

(figure 2). Ses fonctions sont multiples et probablement incomplètement connues. Ainsi il joue un rôle dans le transport d'anions autres que les ions chlorure tels que les ions Iodure (I⁻), Bromure (Br⁻) et pseudohalogène thiocyanate (SCN⁻), la régulation du pH des organelles intracellulaires, la stimulation de l'endocytose et de l'exocytose, la régulation de la sécrétion de glycoprotéines et de mucines, le transport de l'ATP et du glutathion, la régulation de la production de certaines cytokines pro- et anti-inflammatoires (Edelman, 2005; Mehta, 2005)

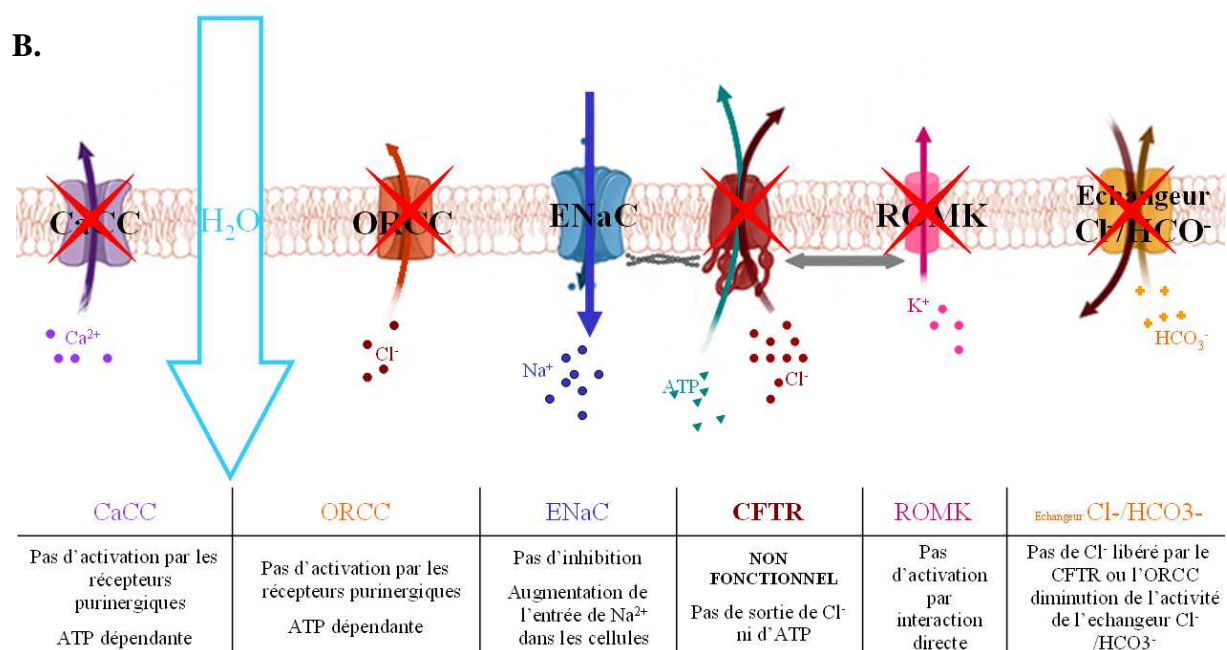
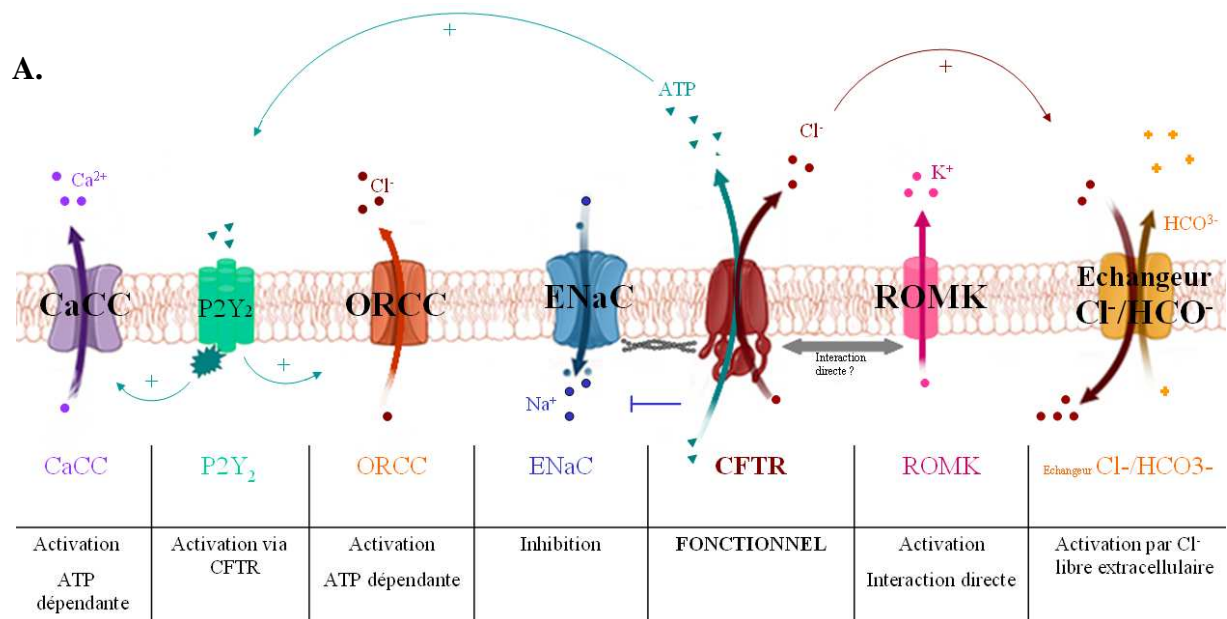


Figure 2 : CFTR, une protéine multifonctionnelle, A. Quand le canal CFTR est fonctionnel, il régule la fonction d'autres canaux ioniques situés au sein de la membrane cellulaire. B. Impact sur l'activation CFTR dépendante des autres canaux quand le CFTR est non fonctionnel.

(Adapté de "Johns Hopkins CF Center | What is CF? | Basic Science | Other Ion Channels," 2012)

3.2 Les mutations du *cftr*

En 2012, on dénombre 1911 mutations du gène *cftr* ("Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics," 2012)). La mutation la plus fréquente est la mutation $\Delta F508$ représentant environ 70% des mutations dans le monde. Mais il existe des variations de prévalence selon les populations étudiées. Seule quatre autres mutations, hors $\Delta F508$, représentent plus de 1% des cas, il s'agit de G542X (2,6%), N1303K (1,6%), G551D (1,5%) and W1282X (1,0%). Toutes les autres mutations sont rares, voire exceptionnelles, uniquement retrouvées au sein d'une seule famille. En France, les génotypes retrouvés sont : $\Delta F508$ - $\Delta F508$ (homozygote) 50%, $\Delta F508$ - autre mutation (hétérozygote composite) 40% et autre mutation - autre mutation 10%.

Les mutations du gène *cftr* sont regroupées en 6 classes en fonction des conséquences fonctionnelles qu'elles occasionnent. Ces mutations entraînent des anomalies quantitatives ou qualitatives sur la protéine CFTR.






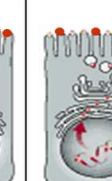
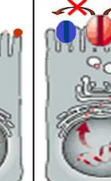
Classification des mutations	Normal	I	II	III	IV	V	VI
							
Effet sur le CFTR		Pas de synthèse	CFTR bloqué pendant la maturation	Défaut d'activation du CFTR	Conductance altérée/ selectivité ionique	Quantité de CFTR diminuée	Défaut de la capacité du CFTR à réguler les autres canaux
Types de mutations		les mutations non-sens (W1282X), l'apparition d'un codon stop prématuré (G542X)	altérant l'adressage du CFTR ($\Delta F508$, N1303K)	G551D et G551S situées dans le domaine NBD1 et S1255P et G1349D dans le domaine NBD2	R117H	altération du promoteur ou de l'épissage de l'ARNm (A445E)	Q1412X

Figure 3 : Représentation des différentes classes de mutation de la protéine CFTR, le types de mutation dans le gène et l'impact sur les fonctions de la protéine (adapté Zielenski and Tsui, 1995).

Les mutations de classe 1 altèrent la production de la protéine CFTR. Cette classe inclut les anomalies d'épissage et mutations décalant la phase de lecture : les mutations non-sens (ex : W1282X), l'apparition d'un codon stop prématuré (ex : G542X) et dans certains cas, conduit à un ARNm instable. Ces mutations vont entraîner soit une non production soit la production d'une protéine tronquée ou aberrante qui sera dégradée dans la plupart des cas. Sur le plan fonctionnel, ces mutants devraient conduire à une perte de la conductance au chlore du canal CFTR dans les épithéliums atteints.

Les mutations de classe 2 perturbent le processus de maturation cellulaire de la protéine CFTR en altérant l'adressage du CFTR (ex : delta F508, N1303K). Ainsi, la protéine est soit absente, soit en quantité réduite à la membrane apicale. Cette classe représente la majorité des mutations.

Les mutations de classe 3 perturbent la régulation du canal chlorure. Elles vont modifier la liaison ou l'hydrolyse de l'ATP et la phosphorylation du domaine R (ex : G551D). Les mutations de classe 4 altèrent la conduction du canal chlorure. Ces mutations interviennent dans le domaine transmembranire et modifient la conductance du CFTR et/ou la sélectivité ionique (ex : R117H).

Les mutations de classe 5 conduisent à une expression réduite de protéine CFTR fonctionnelle en provoquant une altération du promoteur ou de l'épissage de l'ARNm (ex : A445E).

Les mutations de classe 6 modifient la stabilité de la protéine mature. Elles interviennent souvent en C terminal et vont rendre le CFTR instable et diminuer le nombre de protéines fonctionnelles (ex : Q1412X) ce qui va entraîner un défaut de régulation ionique.

4. Descriptif clinique de la maladie

La mucoviscidose est une maladie polymorphe qui touche le tissu épithélial des glandes exocrines de l'organisme, retrouvées dans de nombreux organes comme les voies respiratoires (bronches, cavités nasales...), le pancréas, le foie et les voies biliaires, l'intestin grêle, les canaux déférents des organes génitaux masculins, les glandes sudoripares de la peau (figure 4). La sévérité de la maladie va être fonction de la mutation du gène *cftr*. La mucoviscidose se caractérise par une anomalie des transports ioniques avec une absorption massive de sodium et d'eau, et une diminution de sécrétion de chlore. En effet, le CFTR

dysfonctionnel ne va plus pouvoir inhiber l'activité des ENaC ni compenser par une activation des canaux Cl⁻.

Le déséquilibre ionique, visualisé par une augmentation de la DDP transépithéliale, conduit à la déshydratation du mucus. Cette augmentation de la viscosité du mucus bloque la clairance muco-ciliaire (élimination du mucus par les mouvements ciliaires des cellules épithéliales), ce qui va conduire à son accumulation notamment dans les voies respiratoires et digestives (Edelman, 2005)

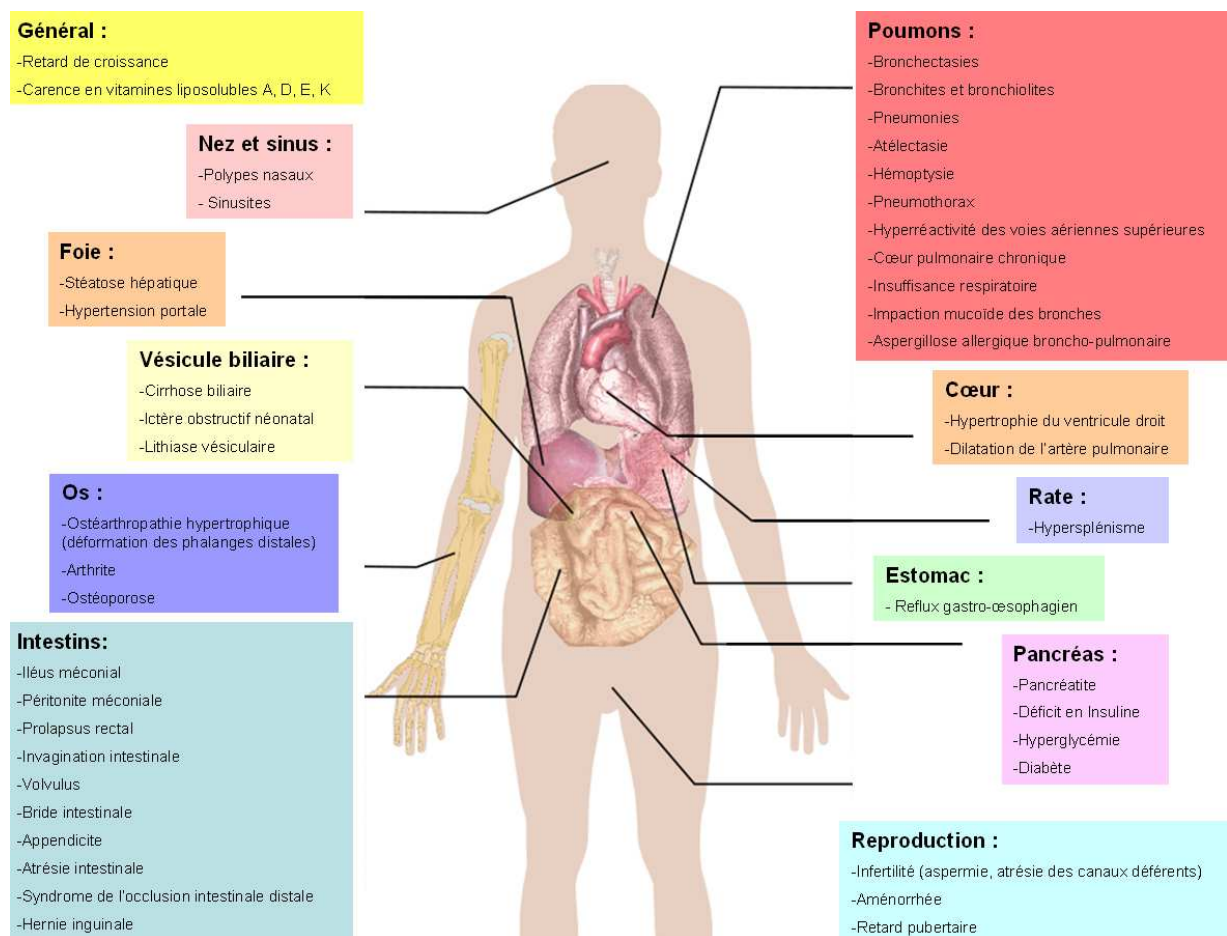


Figure 4 : Manifestations cliniques de la Mucoviscidose.

Les cellules épithéliales ont la capacité de sécréter des ions bicarbonate (HCO_3^-) en particulier les cellules du pancréas exocrine, du foie, de l'intestin, des reins et des poumons. Ce bicarbonate joue un rôle essentiel dans le tractus gastro-intestinal puisqu'il va créer l'environnement nécessaire à l'activité enzymatique, tamponner les sécrétions gastriques acides, mais aussi lubrifier la muqueuse intestinale. Au niveau apical, l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ est couplé au CFTR et son dysfonctionnement va, entre autres, provoquer des ulcérations au

niveau du duodénum, des obstructions intestinales et une malabsorption intestinale (Becq, 2003).

L'iléus méconial est dans 10 % des cas la manifestation initiale de la maladie. C'est une occlusion néonatale aiguë due à une insuffisance de sécrétion protéolytique par le pancréas et les glandes intestinales au cours de la vie fœtale.

Au niveau du pancréas, les enzymes comme la lipase et la trypsine, qui servent à la digestion, sont mal excrétées dans la lumière intestinale, les canaux pancréatiques étant obstrués du fait d'une sécrétion trop épaisse. Les enzymes agressent alors directement le tissu pancréatique, entraînant une inflammation locale qui va détruire le tissu. Par un processus de réparation chronique, un excès de tissu conjonctif fibreux dans l'organe va conduire à la fibrose pancréatique et à la formation de kystes (d'où le terme « Fibrose kystique du pancréas »). Le déficit en enzymes pancréatiques et l'environnement intestinal défavorable aux enzymes entraînent un syndrome de malabsorption notamment des graisses (avec apparition de diarrhée grasseuse) et des vitamines liposolubles A, D, E et K (des carences en vitamine K entraînant des hémorragies), mais aussi de malnutrition se répercutant sur le développement staturo-pondéral de l'enfant. La fibrose pancréatique conduit à la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans, entraînant un défaut de sécrétion d'insuline et donc un diabète secondaire.

Au niveau hépatobiliaire, les canaux qui transportent la bile vont s'obstruer à cause de ces sécrétions trop épaisses. La répétition de ces obstructions entraîne une hépatomégalie puis des phénomènes de cirrhose localisées. Les conséquences habituelles de la cirrhose biliaire sont les mêmes chez le patient mucoviscidosique que dans le reste de la population ; l'hypertension portale, les hémorragies digestives et l'insuffisance hépatocellulaire pouvant nécessiter une greffe hépatique.

Le CFTR, canal sélectif des anions, est aussi impliqué dans le relargage du thiocyanate (SCN^-) nécessaire à la défense immunitaire antimicrobienne du poumon. En effet, dans les voies respiratoires, le CFTR fonctionne en couple avec le système Duox (Dual Oxydases) de l'épithélium de surface. Ils secrètent du thiocyanate et du peroxyde d'oxygène (H_2O_2) dans le liquide de surface des voies respiratoires. La lactoperoxydase (LPO), sécrétée principalement par les glandes submucosales catalyse l'oxydation du thiocyanate par le peroxyde pour former l'hypothiocyanite (OSCN^-) bactéricide. Le transport du SCN^- , passant par le canal CFTR,

étant bloqué, la concentration en SCN^- extracellulaire, et donc en antimicrobien OSCN^- , est fortement diminuée dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose (Pedemonte *et al.*, 2007). L'inactivation de la protéine CFTR est susceptible de causer de multiples anomalies dans les voies respiratoires modifiant ainsi l'immunité innée locale (Childers *et al.*, 2007).

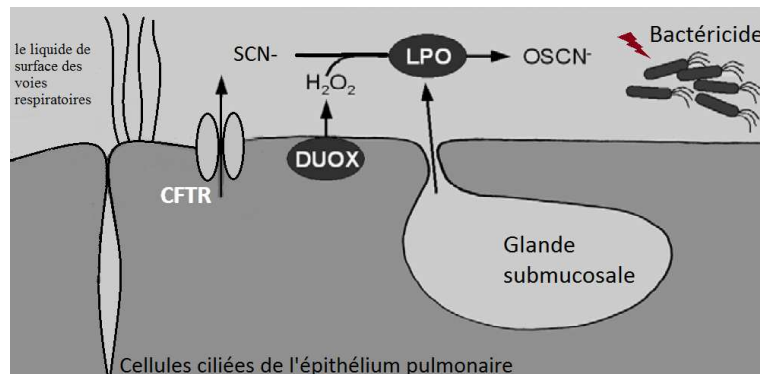


Figure 5 : Rôle du CFTR et du système Duox (Dual Oxydases) dans la formation d'hypothiocyanite (OSCN^-) par oxydation du thiocyanate (SCN^-) par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) catalysé par la lactoperoxydase (LPO). (Adapté de l'illustration de Pilewski and Frizzell, 1999).

Les modifications des propriétés du mucus, son accumulation, et notamment l'augmentation de sa viscosité, conduit à une obstruction chronique des bronches ainsi qu'à la non évacuation des poussières et bactéries. Les propriétés antibactériennes du mucus étant diminuées par l'absence de sécrétion de SCN^- , cet environnement va favoriser l'apparition d'une infection précoce devenant rapidement chronique et associée à une réaction inflammatoire marquée. Cependant les mécanismes responsables de l'inflammation de l'épithélium bronchique ne sont pas complètement élucidés. Il n'est pas encore tranché que cette inflammation soit directement consécutive à la colonisation bactérienne du mucus.

Les études physiopathologiques se concentrent sur les autres fonctions de la protéine CFTR, qui aurait un rôle dans la régulation de l'inflammation, voire un rôle dans la destruction de *Pseudomonas aeruginosa* (Psa). Ainsi Su *et al.* et Xu *et al.*, ont montré que le déficit en CFTR fonctionnel des polynucléaires neutrophiles (PN) et des macrophages alvéolaires entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires (l'interleukine-8 et le facteur alpha de nécrose tumorale, $\text{TNF-}\alpha$) *via* l'activation de NF- κ B, aggravant l'inflammation pulmonaire (Xu *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011). Et Painter *et al.* font le lien entre la diminution de CFTR fonctionnel des PN et la diminution de la synthèse d'acide

hypochloreux (HOCl) entraînant une diminution de l'activité microbicide notamment de Psa (Painter *et al.*, 2008).

Des lavages broncho-alvéolaires réalisés chez des nourrissons atteints de mucoviscidose, en dehors de toute infection, montrent en effet un taux de polynucléaires neutrophiles 100 fois supérieur à celui des témoins non malades ainsi qu'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL1b , IL6, IL8) et une nette diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Ce déséquilibre de la balance cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires aboutit à une suractivation du polynucléaire neutrophile avec surproduction d'élastase leucocytaire. Il en découle l'augmentation de la synthèse de mucus et son hyperviscosité, une inflammation muqueuse chronique avec constitution d'un épithélium dysplasique où les récepteurs bactériens sont à découvert, permettant ainsi l'adhésion bactérienne, la pérennisation de l'infection et finalement la destruction. Le mécanisme de la mucoviscidose ne peut se résumer à la seule altération des mouvements ioniques. En effet, des études récentes ont notamment montré l'élévation de concentration en chlorure de sodium et le caractère non systématique de diminution du contenu en eau du liquide de surface bronchique, alors qu'on s'attendrait au contraire compte tenu des modèles énoncés ci-dessus (Matsui *et al.*, 1998). De plus, la faible expression de CFTR au niveau pulmonaire, alors que c'est l'atteinte de cet organe qui fait le pronostic de la maladie, laisse penser que d'autres facteurs interviennent dans la physiopathologie.

À terme, l'inflammation et l'infection chronique entretiennent un cercle vicieux et entraînent des lésions du tissu pulmonaire conduisant à un tableau de broncho-pneumopathie chronique obstructive.

Les atteintes respiratoires sont prédominantes dans la maladie et représentent l'essentiel de la morbidité. En effet, la dilatation progressive des bronches reste la 1^{ère} cause de morbidité pour environ 90% des patients (Goss and Rosenfeld, 2004; "Registre Français de la Mucoviscidose," 2012)

5. Les traitements

Il n'y a pas de traitement curatif de la mucoviscidose : le traitement, à vie, est contraignant. Ce n'est qu'un traitement symptomatique.

5. 1. Prise en charge digestive et nutritionnelle (insuffisance pancréatique, hépato-biliaire)

La prise en charge digestive et nutritionnelle passe par l'établissement d'un régime nutritionnel adapté (hyper protéiné, hypo lipidique et hypercalorique) et complétement en vitamines liposolubles (A, D, E et K), fer, triglycérides (Lipocil®, Triceme®) et oligoéléments ainsi qu'en enzymes pancréatiques. Ce régime alimentaire permet de compenser la probable anomalie métabolique cellulaire responsable d'une dépense énergétique de base plus élevée, de la malabsorption digestive, enfin de l'augmentation des dépenses énergétiques liée à l'infection et à l'atteinte respiratoire. En cas de grande chaleur, l'alimentation doit être enrichie en sel afin de palier la perte importante en chlorure de sodium par la sueur.

Les études consistent à mettre au point des thérapies capables de pallier au dysfonctionnement exocrine notamment par l'administration de pancréatine (amylase, lipase et protéases extraites de pancréas porcins (Eurobiol®, CREON®)).

Dans ce sens, le groupe Meristem Therapeutics a développé une lipase recombinante Merispase® extraite de feuille de tabac ou du grain de maïs. Celle-ci a reçu le statut de médicament orphelin en juillet 2003 délivré par l'Agence Européenne du Médicament. La Merispase® est actuellement en phase d'optimisation de la formulation : plusieurs formulations sont testées *in vitro*, en utilisant un modèle de tube digestif artificiel dans le but d'améliorer la pharmacocinétique et l'activité de la Merispase®.

La société ProteaBio Europe SAS, en partenariat avec la société pharmaceutique européenne Mayoly-Spindler a annoncé le succès de l'essai clinique de phase I/II sur une nouvelle lipase recombinante MS1819. Les deux entreprises prévoient de débiter l'essai clinique de phase II en 2012.

5.2. Prise en charge respiratoire

La stagnation du mucus crée un environnement favorable à la colonisation bactérienne et au développement de processus inflammatoires des tissus. Le traitement palliatif de l'atteinte des voies respiratoires a deux objectifs principaux : faciliter la clairance muco-ciliaire et contrôler l'infection. La thérapeutique associe la kinésithérapie respiratoire, à des traitements par bronchodilatateurs (β_2 agoniste des muscles lisses : salmeterol, salbutamol), anticholinergiques (oxitropium, ipratropium), anti-inflammatoires (non stéroïdiens : ibuprofène et stéroïdiens : corticothérapie), fluidifiants bronchiques (mucolytiques : N-acetylcysteine, DNaseI, mucorégulateur : bromhexine) et antibiotiques. L'administration

d'antibiotiques par aérosols au long cours et à domicile est de plus en plus utilisée en complément des cures par voie veineuse afin d'en prolonger les effets et d'en diminuer la fréquence.

Les germes prédominants sont *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres germes sont aussi retrouvés, avec notamment *Haemophilus influenzae*, et *Burkholderia cepacia*. Les antibiotiques utilisés appartiennent essentiellement à trois familles : les β -lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones et sont utilisés par voie orale, intraveineuse ou par aérosol. Cependant, l'émergence de résistance aux antibiotiques nécessite sans cesse le développement de nouvelles molécules.

Les laboratoires Alaxia ont développé un médicament orphelin, le Mévéol®, (hypothiocyanite/lactoferrine), sous forme inhalée, capable de restaurer l'activité microbicide formé par le thiocyanate et H_2O_2 normalement régulé par le CFTR.

Plusieurs molécules capables de stimuler des canaux ioniques autres que le CFTR sont testées (l'amiloride bloquant les canaux sodiques et les nucléotides tri phosphate activant les canaux chlore non CFTR). Le rétablissement des équilibres ioniques au niveau de l'épithélium respiratoire permettrait de fluidifier le mucus et ainsi faciliter son élimination. Enfin, certains travaux étudient la structure du mucus afin de mettre au point des outils capables de réduire sa viscosité.

Le vaccin antigrippal est recommandé tous les ans.

5.3. Transplantation pulmonaire

Des avancées chirurgicales ont permis, dans les cas les plus sévères, d'envisager une greffe pulmonaire ou cœur-poumon et ainsi prolonger la vie du patient mais sans permettre de guérir la maladie. Dans le cas de la mucoviscidose, 4 techniques sont envisagées : la greffe cœur-poumon, bi-pulmonaire, unipulmonaire (avec l'exérèse du second poumon malade) mais aussi bi-lobaire (un lobe par poumon) à partir de donneur vivant. Sur 231 greffes pulmonaires réalisées en 2009, 71 ont concerné des patients atteints de mucoviscidose (chiffre pour la France qui correspond aux statistiques mondiales) dont 70% des transplantations concernent la tranche des 11 – 17 ans ; les greffes bi-pulmonaires étant largement majoritaires.

La technique de référence est donc la transplantation bi-pulmonaire et ses résultats et complications sont comparables à ceux observés dans d'autres indications. La plupart des patients reçoivent par la suite une triple thérapie immunosuppressive à vie. À court terme, la principale complication est l'infection du greffon, à moyen et long terme le rejet chronique du

greffon, qui se manifeste par une bronchiolite oblitérante. La survie après greffe pulmonaire est d'environ 70 % à 1 an, 45 % à 5 ans et 15 % à 10 ans, ces chiffres s'améliorant au fil des années. Pour l'instant, la transplantation pulmonaire reste le recours ultime. L'intervention n'est envisagée que si le risque de décès est tenu supérieur à 50% dans les deux ans qui suivent. Le nombre de transplantations pulmonaires ne cesse pourtant de diminuer : le nombre de patients en attente ayant doublé avec une pénurie de greffons.

Ces traitements, non exhaustifs, visent à traiter les symptômes et contribuent à l'amélioration des conditions de vie des patients. Cependant, tous les patients doivent suivre un traitement lourd ; en période de surinfection pulmonaire, il peut atteindre 6 heures de soin par jour et nécessiter la prise quotidienne de 40 comprimés. Malgré l'amélioration de la prise en charge des patients ainsi que l'efficacité des traitements symptomatiques, il n'existe aucun traitement curatif à ce jour.

6. Thérapeutique à l'étude

Aucun traitement curatif n'est encore efficace à ce jour, cependant 3 principales pistes sont envisagées. Deux stratégies de recherche ciblent directement l'étiologie de la mucoviscidose. La première cherche à corriger la protéine CFTR altérée : la thérapie protéique. La seconde stratégie consiste à corriger la mutation du gène CFTR : la thérapie génique. Enfin, la thérapie cellulaire est une piste récente de recherche qui vise à reconstituer des tissus lésés à partir de cellules souches (cette partie ne sera pas abordée).

6.1 Thérapie protéique

Plusieurs modes d'action sont envisagés. L'administration d'agents « correcteurs » permet d'augmenter le nombre de protéines CFTR fonctionnelles au niveau des membranes cellulaires. Les agents « potentialisateurs » permettent d'en améliorer le fonctionnement. Ces 2 types de molécules ciblent une ou plusieurs mutations spécifiques. En effet, une mutation de classe I entraînant une absence de synthèse de CFTR ne pourra pas être corrigée de la même façon qu'une mutation de classe IV concernant un défaut de conductance. D'autres molécules

en cours visent à pallier l'absence de protéine CFTR fonctionnelle, indépendamment des mutations, en activant les autres canaux non CFTR.

6.1.1 Thérapeutiques spécifiques de mutations

- **Mutations de classe I**

Ces mutations de CFTR, appelées « mutations stop », engendrent un arrêt prématuré dans la lecture de l'ARNm, empêchant ainsi la formation d'une protéine CFTR fonctionnelle. Certains aminosides comme la gentamycine, sont capables de se complexer à l'ARNm, au niveau d'un codon stop au sein du ribosome, permettant la poursuite de la traduction (through-reading)(Howard *et al.*, 1996). Cependant ces antibiotiques ont le désavantage de ne pas pouvoir être administrés *per os* et possèdent une ototoxicité et néphrotoxicité importantes. Le PTC 124 (Ataluren®), qui peut être administré oralement, fonctionne de la même manière. L'essai de phase II a montré que l'administration orale de PTC 124 a permis de restaurer la synthèse et le fonctionnement de CFTR (O'Sullivan and Freedman, 2009). Ces résultats doivent être confirmés en essai de phase III (débuté en août 2010) et confortent les espoirs d'obtenir une thérapie efficace chez les patients présentant une mutation stop. Cependant la liaison de la molécule active au codon stop va permettre la poursuite de la traduction en incorporant un acide aminé aléatoire ce qui peut donc correspondre à une conversion d'une mutation de classe I vers une mutation de classe II à VI (Kerem, 2005, 2006).

- **Mutations de classe II**

De nombreuses molécules semblent pouvoir intervenir sur la maturation de la protéine $\Delta F508$ -CFTR (la mutation la plus fréquente et qui représente en France, 75 % des patients) et empêcher son blocage prématuré au niveau de l'appareil de Golgi. Ainsi, l'augmentation du nombre de protéines CFTR atteignant la paroi apicale des cellules ciliées, va permettre une restauration complète ou partielle de la fonction du canal chlore. Ces composés sont appelés correcteurs. Il en existe trois types : les chaperonnes chimiques (composés qui miment les effets des chaperonnes moléculaires naturelles), les pharmaco-chaperonnes (identiques aux précédents composés mais spécifiques d'une cible) et les composés qui ciblent les chaperonnes moléculaires naturelles en modifiant leurs niveaux d'expression ou leurs capacités d'interaction avec la protéine déficiente (Amaral and Kunzelmann, 2007).

Parmi les chaperonnes chimiques, on peut citer le glycérol, le myo-inositol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), la taurine et la bétaine. Ces composés ne sont pas spécifiques et nécessitent de fortes doses pour exercer leur action, ce qui empêche leur utilisation comme médicament.

Le miglustat est testé depuis septembre 2007 dans un essai clinique de phase II comme inhibiteur de l'enzyme de glycosylation de la protéine F508del-CFTR. La glycosylation entraînant une dégradation accélérée de la protéine par le réticulum endoplasmique, son inhibition permet de laisser le CFTR, même muté, prendre ses fonctions sur la membrane apicale de la cellule ciliée (Norez *et al.*, 2006). Cependant, ces tests n'ont pas donné les résultats escomptés.

Vertex Pharmaceuticals a annoncé des résultats encourageants pour l'essai clinique de phase II du Vx809, un correcteur de la protéine CFTR. Quatre-vingts neuf patients atteints de mucoviscidose et porteurs de la mutation $\Delta F508$ ont participé à cette étude aux Etats-Unis. La molécule a été bien tolérée par les patients aux 4 doses testées et prises oralement pendant 28 jours. La prise du Vx809 aux 2 doses les plus élevées a permis de diminuer de manière significative la concentration de chlore dans la sueur (test de la sueur), un effet généralement attribué à une correction de l'activité du CFTR. D'autres paramètres mesurés sont en cours d'analyse.

Ces premiers résultats ont permis de débiter en octobre 2010 un essai clinique qui vise à tester l'effet combiné du Vx809 avec l'activateur de CFTR, Vx770, chez des patients porteurs de la mutation $\Delta F508$. Des études *in vitro* ont montré que l'utilisation combinée de ces 2 molécules avait un effet sur l'activité de CFTR plus importante que par l'application d'une seule de ces molécules.

- **Mutations de classe III, IV et V**

La compagnie américaine Vertex Pharmaceuticals a annoncé en février 2011 que l'étude clinique de phase III montrait une amélioration clinique significative de la fonction respiratoire, une diminution de la concentration d'ions chlorures dans la sueur, une diminution significative de la survenue d'exacerbations et une prise de poids chez les patients porteurs d'une mutation G551D et recevant le Vx-770, activateur du CFTR, pendant 24 et 48 semaines.

La mutation G551D concerne 2 à 4% (selon les pays) des patients atteints de mucoviscidose. Ces résultats constituent une étape décisive pour la recherche sur la mucoviscidose. En effet,

cette étude démontre pour la première fois qu'une intervention pharmacologique sur la protéine défectueuse permet une amélioration clinique significative des patients.

6.1.2 Thérapeutiques non spécifiques de mutations

Le denufosol (Inspire Pharmaceuticals) est un composé agoniste des récepteurs purinergiques P2Y₂ des cellules épithéliales respiratoires (Deterding *et al.*, 2007; Kellerman *et al.*, 2008). Des études préalables ont montré que la liaison de cette molécule avec son récepteur membranaire permettait de stimuler les transports ioniques, de réhydrater les voies aériennes et de stimuler la clairance mucociliaire. Le denufosol stimule l'activité des canaux chlorure non-CFTR et inhibe le canal sodium ENaC dans ces cellules. Les premières études de phase III appelées TIGER-1 (TIGER = Transport of Ions to Generate Epithelial Rehydration, que l'on peut traduire par Transports des ions pour créer une réhydratation de l'épithélium) montraient une amélioration significative de la fonction respiratoire après 24 semaines de traitement chez des adolescents atteints d'une forme légère de mucoviscidose. Le denufosol est classé comme un nouveau régulateur de canal ionique administré par inhalation qui hydrate le mucus bronchopulmonaire pour en faciliter la désobstruction. Cependant, les résultats de l'étude de phase III terminée en décembre 2010, TIGER-2, se sont avérés décevants et n'ont pas confirmé les résultats pourtant prometteurs de l'étude précédente (TIGER-1).

Le lancovutide (Moli 1901®, laboratoire AOP Orphan Pharmaceuticals AG) est un peptide polycyclique issu de *Streptomyces cinnamoneum* (duramycine) qui, en augmentant le calcium intracellulaire, active une voie alternative pour le transport transépithélial de chlore (canal Chlore calcium dépendant) et augmente le volume de liquide à la surface des voies aériennes : confirmation par l'étude *in vivo* de Zeitlin *et al.*, chez des volontaires sains et des patients ayant une mucoviscidose (Zeitlin *et al.*, 2004). Les études de phase II ont fait la preuve de leur efficacité sur la fonction respiratoire, dès 4 semaines de traitement, et ont démontré une efficacité optimale dans la population présentant une forme modérée de mucoviscidose (Grasemann *et al.*, 2007). Néanmoins, ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs et les résultats en sous-groupes laissent supposer que certaines "catégories" de patients sont susceptibles de répondre plus favorablement au médicament. Sur la base de ces dernières analyses et afin d'identifier avec précision cette population de "répondeurs", un nouveau protocole de phase III a été mis en place en Europe fin 2010.

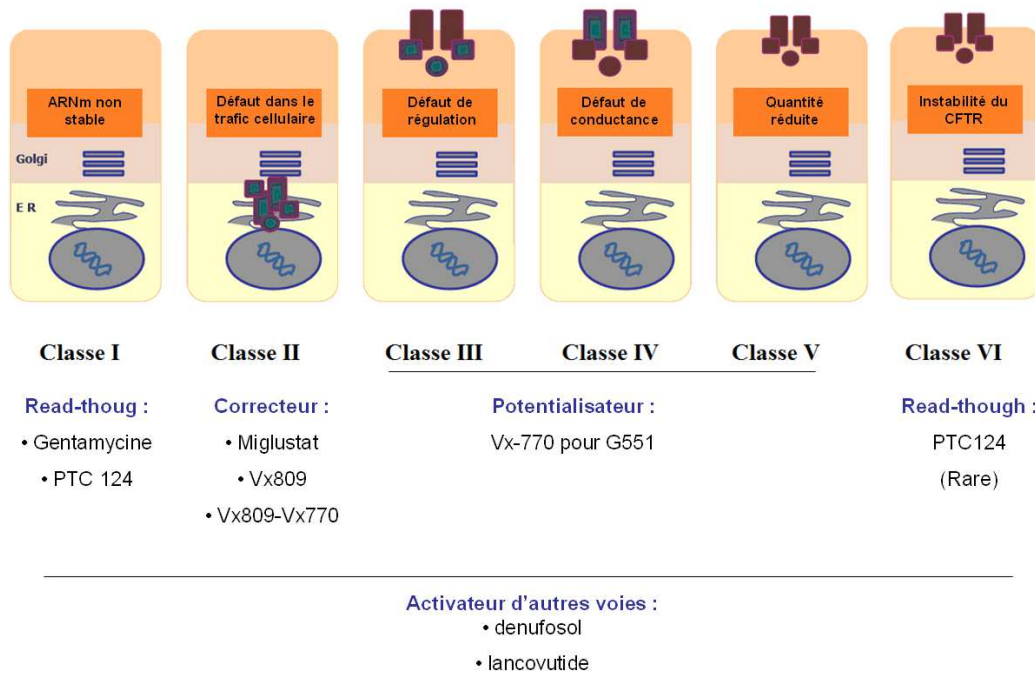


Figure 6 : Récapitulatif des thérapeutiques à l'essai, développées en fonction des anomalies phénotypiques du CFTR (spécifique des mutations de classe I à VI).

6.2. Thérapie génique

La mucoviscidose est une maladie monogénique et récessive, ce qui suggère que la perte de fonction puisse être corrigée par l'introduction d'une copie fonctionnelle du gène. Le principe de la thérapie génique somatique est de réintroduire dans le génome cellulaire le gène codant une protéine CFTR de fonction normale. L'acheminement du gène sain vers les cellules cibles nécessite l'utilisation de vecteurs qui sont des transporteurs de matériel génétique. Ce vecteur doit permettre une expression durable du gène sain spécifiquement dans les cellules ciblées, sans engendrer de toxicité ou de réaction immunitaire de la part de l'hôte. Deux grands types de vecteurs sont étudiés : les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques.

Dans le cadre de la mucoviscidose, ce sont d'abord les cellules épithéliales respiratoires qu'il faut corriger, ce qui constitue la première difficulté. L'épithélium pulmonaire est une barrière naturelle contre les agents toxiques ou infectieux de l'environnement. Dans un contexte mucoviscidosique, la transduction des cellules

pulmonaires est d'autant plus difficile qu'il faut pallier à la présence de mucus épais mais aussi à l'inflammation préexistante.

À ce jour, il y a eu un total de 34 études de phase I et seulement 8 qui ont abouti à des essais cliniques de phase II de thérapie génique pulmonaire dans le cadre de la mucoviscidose. Huit essais comportaient l'administration d'aérosols comme élément clé de l'étude (Griesenbach and Alton, 2009). Seulement 3 agents de transfert de gène, 2 viraux et 1 non viral, ont montré des résultats encourageants : l'adénovirus recombinant (Ad) (Perricone *et al.*, 2001), l'adeno-associated virus (AAV) (Moss *et al.*, 2007) et le GL67A/pGM169, qui est un complexe composé de liposome cationique GL67A (pour Genzyme Lipid 67A) et de l'ADN plasmidique pGM169 exprimant le CFTR (Alton *et al.*, 1999). Cependant, des imperfections, telles qu'une efficacité amoindrie à doses répétées et des réactions immunitaires vis-à-vis des vecteurs viraux ou une dégradation du vecteur lors de la nébulisation pour le non viral, sont à corriger. Grâce à un nouveau procédé de préparation et une meilleure formulation du GL67A, le UK CF Gene Therapy Consortium a initié un essai clinique de phase I/II fin 2011, toujours en cours.

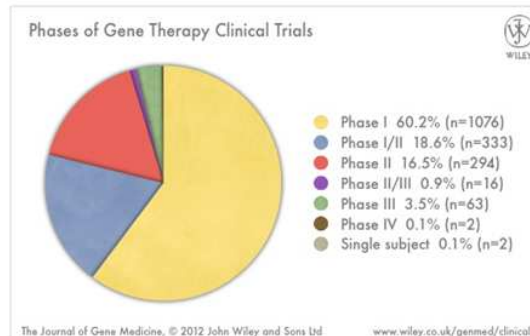
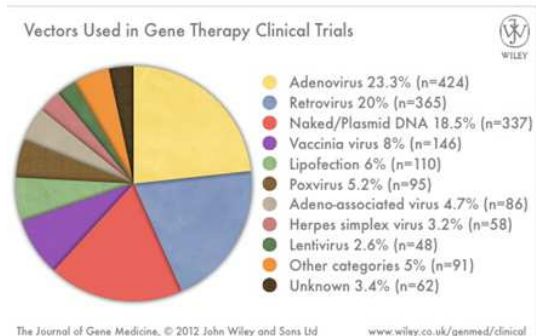
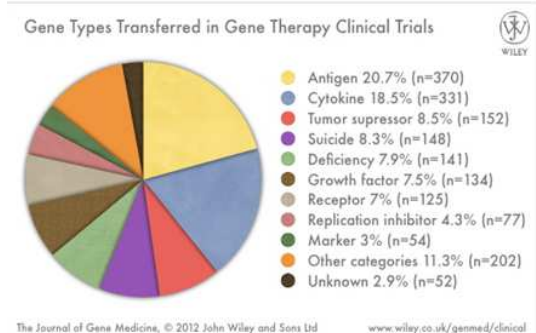
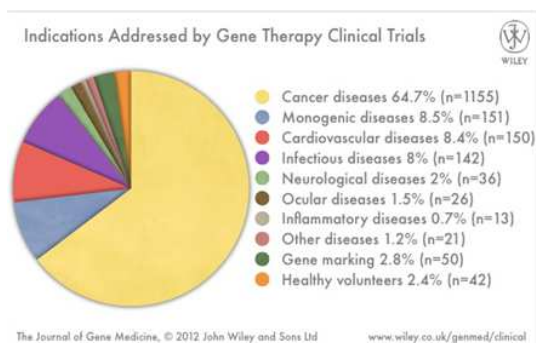


Figure 7 : Représentation des caractéristiques des essais cliniques mondiaux (indications, types de gène, vecteurs, types de phase clinique et nombre d'essais cliniques par année) répertoriés par Journal of gene medicine ("Gene Therapy Clinical Trials Worldwide," 2012).

Partie 2 : Thérapie génique

La thérapie génique est l'insertion, la modification ou la suppression de gènes dans les cellules d'un individu afin de prévenir, traiter ou corriger les gènes défectueux responsables du développement d'une pathologie. La forme la plus commune de la thérapie génique consiste en l'expression d'un ADN exogène afin de compenser/restaurer l'expression d'un gène muté. Cette technique n'était envisagée que pour des maladies qui sont la conséquence d'un seul gène défaut, comme la mucoviscidose, l'hémophilie, la dystrophie musculaire ou la drépanocytose. Cependant le spectre d'action de la thérapie génique ne cesse de s'étendre et vise aujourd'hui des affections telles que le cancer, les immunodéficiences, les affections articulaires inflammatoires et même certaines affections neurologiques telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer.

Bien que cette technologie ne soit pas encore tout à fait maîtrisée, elle fait l'objet d'un véritable engouement. La première stratégie est de compenser la déficience d'un gène existant défaillant en introduisant une copie fonctionnelle du gène de façon « classique », additive dans une localisation génomique indéterminée où le gène endogène déficient reste présent à l'identique. Actuellement des efforts existent pour corriger le gène in situ (recombinaison homologue, modification du messenger...) : « chirurgie du gène » soit, ajouter une fonction positive (qui peut contrecarrer un processus pathologique) : « ADN médicament » soit conférer une fonction négative à la cellule cible (par exemple dans le traitement de cancers).

La plupart (60,2%) des essais cliniques chez l'homme sont en phase I, c'est à dire que seules l'innocuité et la tolérance sont évaluées, et uniquement 3,5 % des essais cliniques concerne une phase III, c'est à dire un traitement effectif d'une maladie par thérapie génique. La majorité des études (67%) utilise des vecteurs viraux dans leurs essais, avec 23,3% d'adénovirus et 20% de rétrovirus, et concerne à 64,7% des thérapies anticancéreuses.

1. Essais cliniques de thérapie génique pulmonaire

Dans le cas des cancers du poumon, les essais cliniques réalisés sont au nombre de 54 dont seulement 3 en phase III. La grande majorité de ces essais (50) concerne des carcinomes non à petites cellules. Les vecteurs viraux sont utilisés dans 33 essais (28 avec l'Adénovirus) et les vecteurs synthétiques (exclusivement des lipides cationiques) dans seulement 6.

Dans le cas de la mucoviscidose, les essais thérapeutiques chez des patients ont débuté en 1993. Aujourd'hui, 35 essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours dont 3 en phase II. 21 essais concernent des vecteurs viraux, dont 13 avec des Adénovirus recombinants et 9 avec des virus associés à l'Adénovirus (AAV). Les vecteurs non viraux, uniquement des lipides cationiques, sont utilisés dans 11 essais. Dans tous ces essais, les protocoles prévoient l'administration des particules ADN/vecteur par les voies aériennes.

2. Thérapie génique contre la mucoviscidose

2.1 Les stratégies géniques du *cftr* à vectoriser

Tout d'abord, transférer une copie du gène humain entier avec ses éléments de régulation, tel que le gène *cftr* qui mesure environ 250kb est inconcevable avec la technologie actuelle. C'est pourquoi, l'essentiel des travaux s'est penché sur l'utilisation de l'ADNc du gène humain qui mesure 7,5kb. Cependant, peu de vecteurs sont capables d'encapsider 7,5kb en plus d'une région régulatrice. Des stratégies pour réduire la taille du transgène se sont donc développées. Les premiers essais montrent que l'élimination des quatre premiers segments transmembranaires (M1-M4) de MBD1, qui pourraient fonctionner comme codons d'initiation, permet de conserver une fonction des canaux chlore régulés par AMPc avec une sélectivité d'ions identiques au type sauvage, mais avec une probabilité de CFTR ouvert réduite et la conductance d'un canal unique. L'élimination d'autres segments transmembranaires n'a pas permis de conserver la fonction du canal chlore. Ces données suggèrent que les segments M1-M4 ne sont pas des éléments essentiels dans la conduction du pore ou le filtre de sélectivité formé par la protéine CFTR (Carroll *et al.*, 1995).

De plus, Ostedgaard *et al.*, ont développé une série de variants CFTR avec des domaines de R raccourci (entre les résidus 708 et 835) et les ont exprimés en culture

différenciée de cellules d'épithélium pulmonaire *cf-*. Tous les variants ont montré une biosynthèse, un ciblage à la membrane apicale normale et un transport chlore transépithélial de type sauvage dans les épithéliums *cf-*. La comparaison des comportements des différents variants suggèrent que la longueur du domaine R, la présence de sites de phosphorylation, et d'autres facteurs contribuent à canaliser l'activité. Ces données fournissent un aperçu de la structure et la fonction du domaine R et d'identifier les régions qui peuvent être supprimées sans modifier la fonction (Ostedgaard *et al.*, 2002). Le vecteur AAV5 contenant le transgène *cftr* delta R a montré que, délivré à la surface apicale de l'épithélium différencié des voies respiratoires, une correction partielle du transport chlore à deux à quatre semaines (Ostedgaard *et al.*, 2005).

D'un autre côté, la mutation $\Delta F508$ du CFTR est la plus fréquemment retrouvée et la protéine présente un défaut de repliement qui affecte sa maturation et altère la fonction du canal chlore. La transduction de fragments *cftr* (1-633 and 1-614) d'environ la moitié de la taille de type sauvage et complémentaire de la partie de la protéine CFTR portant la mutation, permettrait la restauration du transport de chlore *in vitro* dans les cellules épithéliales bronchiques humaines CFBE41o- (deltaF508-*cftr*). Plus important encore, *in vivo*, l'administration nasale d'un adénovirus exprimant le fragment CFTR complémentaire a restauré un certain degré d'activité du CFTR dans les voies nasales des souris homozygotes deltaF508 (Cormet-Boyaka *et al.*, 2009). Ces résultats permettent d'identifier des fragments de protéines comme une solution viable pour corriger certaines mutations du CFTR *in vivo*.

L'équipe de Song *et al.* a supposé une stratégie de trans-épissage, où deux vecteurs AAV doivent délivrer les moitiés 5' et 3' d'ADNc du gène *cftr* où les deux pré-ARNm vont former un ARNm complet ainsi qu'une protéine CFTR fonctionnelle. En effet, l'utilisation de segments trans-épissés en 5' donneur et 3' accepteur divise l'ADNc du CFTR entre 14a et 14b exons, la co-transfection de plasmides donneurs et accepteurs conduit à la restauration de la conductance du CFTR dans les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines IB3-1 (*cf-*) (Song *et al.*, 2009).

2.2 Les problèmes liés à l'organe cible

L'épithélium respiratoire est la principale cible de la thérapie génique dans un contexte de mucoviscidose, puisque son atteinte est responsable de 90% de la morbidité de la maladie. Il recouvre la structure tubulaire des voies aériennes, de la cavité nasale à l'arbre bronchique

en passant par la trachée. Il comporte plusieurs types de cellules épithéliales, incluant les cellules de Goblet sécrétrices de mucus et les cellules ciliées impliquées dans l'élimination des bactéries pathogènes et autres particules microscopiques. Dans les bronches et les bronchioles, les cellules Clara sécrètent des peptides et des protéines régulant les réponses inflammatoires. Les glandes sous-muqueuses produisent un mélange de sécrétions muqueuses et séreuses, qui est extrêmement important pour le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Enfin, l'épithélium comporte aussi des cellules basales et neuroendocrines, ainsi que des cellules non-épithéliales : des macrophages et des cellules dendritiques. L'épithélium respiratoire repose sur une matrice, la membrane basale, qui est produite par les cellules mésenchymateuses. Les interactions entre l'épithélium respiratoire et le tissu mésenchymateux peuvent aboutir à une altération de l'épithélium, la fibrose, qui joue un rôle clé dans la mucoviscidose. Les différents types cellulaires expriment la protéine CFTR à différents niveaux (Jiang and Engelhardt, 1998). L'hétérogénéité du tissu, la présence d'un mucus et un système immunitaire local en font un organe difficilement transfectable.

Cependant, il semble y avoir plusieurs types de cellules épithéliales dans les poumons qui fournissent des fonctions progénitrices, offrant la possibilité à long terme de correction si ces cellules peuvent être ciblées avec des vecteurs d'intégration (Liu *et al.*, 2009). Il existe une controverse au sujet des cellules à cibler pour la thérapie génique. Les arguments à l'appui peuvent être avancés pour corriger les cellules de l'épithélium de surface, les glandes sous-muqueuses, ou les deux (Lee and Foskett, 2010).

Des études pré-cliniques réalisées peu après le clonage du gène *cfr* ont été réalisées *ex vivo* et *in vivo* chez la souris pour tester l'efficacité d'un transfert de gène. Ces études ont montré la capacité de restorer un niveau physiologique de sécrétion de Cl⁻ chez des souris transgéniques (*cf/cf*) (Alton *et al.*, 1993; Hyde *et al.*, 1993) mais surtout qu'un niveau d'expression du gène *cfr* de seulement 5 % par rapport à la normale permet une survie de 100% des animaux avec une correction de la fonction de transport ionique de seulement 50 % (Dorin *et al.*, 1996). Sur des cellules humaines, la sécrétion de Cl⁻ d'un épithélium bronchique polarisé *cf^{fl}* peut aussi être restorer (Olsen *et al.*, 1992). Il a été montré que 6 et 10% de complémentation suffisent à la fonction normale de transport de Cl⁻ par le canal CFTR (Johnson *et al.*, 1992), et que le transport mucosal était rétabli avec une restauration de 25% de la surface épithéliale bronchique (Zhang *et al.*, 2009).

Cependant plusieurs facteurs sont importants pour arriver à un effet thérapeutique du gène délivré comme l'efficacité du transfert de gènes (nombre de cellules modifiées génétiquement et le niveau d'expression du transgène), la durée de l'expression transgénique, l'obtention d'une protéine fonctionnelle, le ciblage cellulaire, la régulation tissu-spécifique du transgène et l'innocuité de la méthode de transfert de gènes pour l'individu et son environnement, sans oublier la réponse immunitaire qui constitue la majorité des contraintes.

Pour des applications de thérapie génique, les vecteurs viraux ont toutes les faiblesses potentielles, telles que l'immunogénicité, le tropisme et l'expression transitoire du transgène. Le succès dans l'exploitation des vecteurs viraux dépendra de la capacité à surmonter ces limitations.

2.3 Les vecteurs utilisés en thérapie génique

- **Utilisation des Adénovirus en thérapie génique de la mucoviscidose**

L'adénovirus recombinant fut le premier vecteur viral, utilisé pour le traitement de la mucoviscidose dans un essai clinique en avril 1993 (Crystal *et al.*, 1994), mais aussi le vecteur le plus employé dans des essais cliniques. En effet, le tropisme naturel de ce pathogène bénin pour les voies aériennes, en fait un candidat idéal. Le génome de l'adénovirus (30-40 kb) et la fonction de ses gènes ont été abondamment étudiés, ce qui a permis d'insérer le gène CFTR et d'éliminer les gènes viraux indésirables. Il est utilisé dans 13 essais cliniques sur 35. Quatre des essais cliniques ont été menés sur l'épithélium nasal (Zabner *et al.*, 1993, 1996; Hay *et al.*, 1995; Knowles *et al.*, 1995), six autres sur l'épithélium bronchique (Hay *et al.*, 1995; Bellon *et al.*, 1997; Harvey *et al.*, 1999; Zuckerman *et al.*, 1999; Perricone *et al.*, 2001; Ben-Gary *et al.*, 2002) et trois sur les deux épithéliums (Wilson *et al.*, 1994; Crystal *et al.*, 1995; Joseph *et al.*, 2001). Lors d'un essai clinique de phase I, l'utilisation du vecteur adénoviral s'est révélée être faiblement toxique chez l'un des 4 patients traités (Crystal *et al.*, 1995). Il apparaît que l'administration du vecteur adénoviral semble pourtant être bien tolérée à faibles ($< 10^9$ UFP) et moyennes doses (entre 10^9 et 10^{11} particules adénovirales)(Harvey *et al.*, 1999). En accord avec les tests effectués sur l'épithélium nasal, le transfert de gène avec un adénovirus au niveau de l'épithélium bronchique entraîne une réponse immunitaire humorale (Crystal *et al.* 1994) et une réponse immunitaire cellulaire

lymphoproliférative chez tous les patients traités. De plus, il a été montré au cours de ces essais que moins de 1% des cellules bronchiques prélevées pour étude avaient été transduites par le vecteur adénoviral (Zuckerman *et al.*, 1999). L'analyse de ces cellules transduites a révélé que 97% de ces cellules n'étaient pas de nature épithéliale (Perricone *et al.*, 2001).

Les tests de transfert de gène à l'aide de vecteurs adénoviraux ont mis en évidence : l'apparition d'une inflammation locale dose-dépendante ; une forte décroissance de l'efficacité du transfert de gène lors de ré-administrations répétées due à la production d'anticorps neutralisants ; une efficacité de transduction moyenne ; et une faible spécificité de transduction. Ces obstacles rendent nécessaire une réduction de l'immunogénicité du vecteur adénoviral dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose.

Afin d'améliorer les performances et la sécurité des vecteurs d'autres stratégies ont été envisagées. Le développement de vecteurs dits de troisième génération ou « helper-dependent Adénovirus », HD-Ad, presque entièrement évidé du génome viral. Ces vecteurs n'expriment pas les séquences virales et permettrait de réduire les réponses immunitaires à médiation cellulaire, induites avec les générations précédentes de vecteurs Ad. Cependant, les protéines de capsid restent des cibles pour les anticorps neutralisants et peuvent déclencher des réponses immunitaires innées de cytokines par les cellules effectrices. Récemment, Cao *et al.* a démontré que l'immunosuppression transitoire considérablement amélioré l'efficacité de l'expression du transgène et facilité ré-administration du vecteur HD-Ad dans les poumons de souris (Cao *et al.*, 2011). En plus de l'immunosuppression, l'utilisation d'autres sérotypes semble être une solution pour se prémunir contre la réponse immunitaire anti-Ad5 préexistante (Bangari and Mittal, 2006). Granio *et al.* ont développé un vecteur adénoviral chimérique en utilisant le couple capsid/fibre de sérotypes différents, capsid du sérotpe 5 avec les fibres du sérotpe 35 : Ad5/F35. Ils ont observé que l'échange de fibres Ad5 avec le sérotpe 35 confère une efficacité de 30 fois plus élevé de la transduction et la correction canal chlorure CFTR dans les lignées cellulaires *cf-*, par rapport à Ad5/F5. *Ex vivo*, Ad5/F35 a la capacité de transduire efficacement l'épithélium reconstitué des patients atteints de mucoviscidose (CF-HAE) *via* la surface apicale, et restaurer la fonction canal chlorure à des doses relativement faibles vecteurs. De plus ils ont montré une expression relativement stable du CFTR transduit pendant plusieurs semaines. Ces données suggèrent que des vecteurs tels que Ad5 qui utilisent le récepteur adénovirus (CAR) sont moins efficaces pour transduire la surface apicale des cellules épithéliales des voies aériennes que les vecteurs de sérotypes CAR-indépendante tel que Ad35 (Granio *et al.*, 2010).

Toutes ces études qui évaluent l'utilisation de vecteur HD-Ad, d'immunosuppresseur, la commutation ou la sélection sérotypique des fibres sont autant de stratégies pour améliorer l'efficacité, la sécurité et la durée d'expression du transgène par le vecteur adénoviral pour le transfert de gènes dans les voies aériennes.

- **Utilisation des AAV en thérapie génique de la mucoviscidose**

Les virus adéno-associés, de la famille des parvovirus, sont les seuls virus avec les adénovirus à avoir été utilisés pour le transfert de gène pulmonaire dans des essais cliniques contre la mucoviscidose. Les tests pré-cliniques réalisés avec les AAV ont mis en évidence une expression à long terme du transgène dans des modèles animaux (Flotte and Carter, 1997; Rubenstein *et al.*, 1997), accompagnée d'une réponse inflammatoire de faible intensité. Ces résultats ont motivé l'utilisation des AAV dans le cadre de la thérapie génique sur l'Homme. Neuf essais cliniques réalisés avec un vecteur de type AAV ont été menés à ce jour. Dans huit essais, le vecteur employé est le vecteur tgAAV-*cftr* (Targeted Genetics) qui dérive de l'AAV-2 et contient l'intégralité de l'ADNc du gène *cftr* humain, sauf dans la dernière étude d'Aitken (non publiée), où le vecteur utilisé est l'AAV-6. Comme dans les études cliniques réalisées avec des vecteurs adénoviraux, les tests de transfert de gène à base d'AAV ont été menés sur l'épithélium nasal et bronchique.

Au cours de ces études, aucune inflammation majeure ou phénomène majeur de toxicité lié à la vectorisation de l'AAV-*cftr* n'a été décelé chez les patients. Seule une réponse humorale modérée a été observée contre la capsid de l'AAV (Wagner *et al.*, 1998, 1999, 2002; Aitken *et al.*, 2001). De plus, il a été observé une large distribution du vecteur dans les voies respiratoires supérieures (Aitken *et al.*, 2001). Les essais cliniques de phase II permet d'observer pour la première fois un transfert de gène, une réduction de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 mais sans détection de l'expression du transgène. Le vecteur AAV-2 portant sur l'intégralité du ADNc du gène *cftr* humain (tgAAVCF) ont été livrés à l'épithélium nasal, les sinus et les poumons de sujets atteints de mucoviscidose (Moss *et al.*, 2004). Bien que ces études indiquaient que l'instillation répétée de l'AAV était sûre et bien tolérée, ils ne démontrent pas, en phase clinique 2B, l'expression de la protéine CFTR fonctionnelle ou une amélioration statistiquement significative de la fonction dans les poumons chez les patient mucoviscidosique modéré (Moss *et al.*, 2007).

Les vecteurs AAV sont candidats prometteurs en raison des progrès dans la production de ces vecteurs, l'expression des transgènes relativement stable *in vitro* et l'absence d'inflammation induite par ces vecteurs *in vivo*, cependant ils nécessitent des améliorations quant à leur efficacité de transfert de gène.

Bien que le vecteur AAV-2, initialement proposé pour la thérapie génique pulmonaire, a démontré une certaine efficacité, il a aussi montré des limites dans l'expression du transgène. Afin d'éviter la reconnaissance immunitaire et d'augmenter l'efficacité de transduction, des vecteurs AAV d'autres sérotypes ont été construits. Plusieurs groupes ont maintenant démontré que les autres sérotypes tels que l'AAV-1, AAV-5, AAV-6, et AAV-9 montraient une efficacité de transfert de gène plus importante dans une variété de modèles d'épithélium pulmonaire. En effet, Zabner *et al.* ont montré une efficacité plus importante du transfert de gène de l'AAV-5 par rapport à l'AAV-2 *in vitro*, de 50 fois sur des cellules ciliées humaines d'épithélium respiratoire mais aussi *in vivo* dans l'épithélium des voies aériennes du poumon, chez la souris (Zabner *et al.*, 2000). En revanche, dans l'étude d'Halbert *et al.*, ce sont les vecteurs AAV-6 qui montrent une transduction plus efficace des cellules épithéliales des voies aériennes humaines, grandes et petites, jusqu'à 80% dans certaines transductions pulmonaires (Halbert *et al.*, 2001). Ceci est conforté par Limberis *et al.*, qui montrent des transductions plus élevées pour l'AAV-6 mais pas pour l'AAV-5 sur des cellules ciliées humaines d'épithélium respiratoire mais aussi *in vivo* dans l'épithélium des voies aériennes du poumon, chez la souris (Limberis *et al.*, 2009). Ces résultats, combinés avec la faible immunogénicité de l'AAV-6 par rapport à l'AAV-2, indiquent que le vecteur AAV-6 peut fournir des avantages significatifs. Cependant, AAV-1 s'est montré 100 fois plus efficace que l'AAV-2 et AAV-5 pour transduire des cellules épithéliales humaines des voies aériennes *in vitro* (Yan *et al.*, 2006). Et même si l'AAV-1 transduit *in vivo* avec une efficacité égale à celle de l'AAV-5 l'épithélium de la trachée respiratoire murine (Virella-Lowell *et al.*, 2005), Flotte *et al.* ont démontré dans les voies respiratoires des chimpanzés, les avantages de l'AAV-1 sur l'AAV5, en termes d'efficacité de transfert de gène, 20 fois plus importante à 90 jours, mais également une réduction de l'immunogénicité en réponse T cellulaire (Flotte *et al.*, 2010).

D'autres stratégies pour améliorer l'efficacité de la transduction des AAV dans l'épithélium pulmonaire visent à l'élaboration de mutants de capsid (mutation ponctuelle ou de capsides hybrides intégrant plusieurs sérotypes ayant une plus grande affinité pour les cellules épithéliales des voies aériennes). Lors de mutations au sens propre, comme le vecteur mutant AAV6.2 créé par la mutation d'une phénylalanine par une leucine en position 129

(F/L en 129), celle-ci lui confère une exposition améliorée du récepteur à l'héparine et une efficacité de transduction plus importante que tous les autres vecteurs AAV 1, 2, 5, 6, 7, 8 et 9 testés dans les voies respiratoires de la souris et dans des modèles d'épithélium respiratoire cilié humain (Limberis *et al.*, 2009).

D'autres nouvelles variantes de capside ont résulté du brassage des sérotypes suggérant que la co-infection améliorerait l'efficacité des vecteurs AAV *in vivo*. En effet, la génération d'une bibliothèque chimérique AAV a permis d'identifier 2 chimères de capside construites avec les AAV-1, AAV-6 et/ou AAV-9. Les efficacités de transduction des deux variants AAV pour l'épithélium respiratoire humain cilié ont été trois fois supérieures à celle de l'AAV-6 (Li *et al.*, 2009). La chimère AAV-2/9 a montré une expression des gènes 60 fois meilleure que celle obtenue avec l'AAV-2/5 mais aussi relativement stable, 9 mois, dans les voies aériennes du poumon murin, ce qui suggère que la population de cellules progénitrices des voies respiratoires a été transduites (Limberis and Wilson, 2006). Plus finement, les sérotypes, AAV-2 et AAV-5 qui l'utilisation des récepteurs distincts, l'héparane sulfate et l'acide sialique, respectivement ont permis d'élaborer une nouvelle variante d'AAV. L'AAV-2.5T, une chimère entre AAV-2 (AA1-128) et AAV-5 (aa129-725) qui voit une liaison accrue à la surface apicale de l'épithélium des voies respiratoires et un transfert de gènes améliorés (Dickey *et al.*, 2011). Une nouvelle approche de co-infection d'AAV consiste en l'infection de deux vecteurs, AAV-2 et AAV-6, complémentaires car exprimant chacun une séquence partielle du CFTR (transplicing) (Song *et al.*, 2009). Des essais de thérapie génique foetale ont aussi été menés chez la souris. L'injection intraamniotique d'un AAV-6/2 en intratrachéale de foetus murins ont révélé 17,5% des cellules épithéliales pulmonaires transduites avec une expression du transgène détectée jusqu'à 1 mois après la naissance (Carlson *et al.*, 2010).

En conclusion, les améliorations dans l'ingénierie des AAV, le choix de sérotypes différents, la conception de capsides mutantes et des méthodes de production ont fait du vecteur AAV un choix attrayant pour délivrer le *cftr* dans les voies aériennes.

- **Utilisation des vecteurs non-viraux en thérapie génique contre la mucoviscidose**

Depuis 1993, 11 essais de phase I / II utilisant des vecteurs non-viraux ont été réalisées. Les vecteurs non-viraux se décomposent en deux systèmes de transfert de gène : les systèmes à base de complexes ADN/lipides cationiques appelés lipoplexes ; et les systèmes à base de

complexes ADN/polymères cationiques appelés polyplexes (Felgner, 1997). Chez des souris invalidées (*cf/cf*), la vectorisation par lipoplexes du gène *cftr* a permis de restaurer partiellement une activité de transport des ions Cl⁻ (Alton *et al.*, 1993).

Quatre types de lipoplexes ont été testés : DC-Chol-DOPE, DOTAP, GL-67TM, EDMPC-cholesterol et un polyplexe : la poly-L-lysine substituée avec du PEG. Comme pour les essais cliniques des vecteurs viraux, les essais de vectorisation du gène *cftr* ont été réalisés sur l'épithélium nasal et/ou l'épithélium bronchique. Les premières études ont mis en évidence la capacité des lipoplexes à transférer *in vivo* un gène dans des cellules épithéliales nasales (Caplen *et al.*, 1995; Gill *et al.*, 1997; Porteous *et al.*, 1997; Zabner *et al.*, 1997; Ziady *et al.*, 2003), et cellules épithéliales bronchiques (Alton *et al.*, 1999). Il a également été observé qu'une ré-administration répétée d'un lipoplexe n'entraîne pas de diminution de l'efficacité de transfert de gène (Hyde *et al.*, 2000). Néanmoins, l'efficacité de transfert de gène par les lipoplexes se révèle faible et insuffisante en l'état pour assurer un effet thérapeutique (Noone *et al.*, 2000) .

Seul le GL67TM (cholest-5-ène-3-ol(3b)-3-[(3-aminopropyl)[4-(3-aminopropyl)amino]butyl]carbamate) a émergé comme un vecteur non-viral prometteur pour la transfection des poumons efficaces basés sur des études de structure-fonction (Lee *et al.*, 1996). Cependant, Zabner *et al.* ont montré que l'ADN nu codant pour la protéine CFTR a été au moins aussi efficaces que le complexe ADN-GL67TM pour transfecter l'épithélium nasal (Zabner *et al.*, 1997). En revanche, Alton *et al.* ont démontré que la nébulisation du complexe ADN-GL67 complexes dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose a conduit à un degré significatif de correction du transport de Cl⁻, alors que les patients ayant reçu le placebo (GL67 seul) a montré aucun (Alton *et al.*, 1999). Par ailleurs, tous les patients montrés grippaux légers symptômes pendant quelques heures suite après la nébulisation. Cette évolution défavorable a été attribuée aux séquences putatives pro-inflammatoires (îlots CpG) présents dans l'ADN bactérien. En accord avec cette idée, un plasmide CpG-libre, complexé avec GL67, a été évalué *in vivo* et l'ARNm du *cftr* a été détecté dans le poumon de souris pendant au moins 56 jours après l'administration de l'aérosol sans susciter une réaction inflammatoire (Hyde *et al.*, 2008). La durée de l'expression de la protéine CFTR, qui dure généralement de 1-4 semaines, peut être étendue en y substituant un promoteur d'entretien ménager de l'Homme pour les promoteurs viraux couramment utilisés. En effet, l'utilisation du promoteur de l'ubiquitine C, a étendu la durée de l'expression du CFTR à 6 mois ou plus

après une administration pulmonaires unique chez la souris (Gill *et al.*, 2001; Hyde *et al.*, 2008).

D'autres études ont permis d'augmenter l'efficacité de ce vecteur. En effet, l'utilisation de carboxyméthylcellulose 0,5% et l'augmentation du temps de contact entre l'ADN et le GL67-A ont conduit à une augmentation globale de 25 fois le transfert de gène initial. Fait intéressant, cela ne conduit pas à la correction des anomalies du transport ionique dans l'épithélium nasal de la souris *cf-*, ni à une quantification immunohistochimique de l'expression du CFTR (Griesenbach *et al.*, 2010). Cependant lors d'études sur des modèles grands animaux, le vecteur cationique (GL67A) a été comparé au vecteur polyéthylèneimine (PEI) et à la nouvelle technologie des nanoparticules formulées avec du polyéthylène glycol-lysine dans une évaluation pré-clinique. Tous les vecteurs ont donné des preuves de transfert de gène et d'expression un jour après le traitement administrés par aérosol aux poumons des moutons (n = 8 par groupe), seulement le GL67A a donné les plus hauts niveaux d'expression. La protéine CFTR a été détectée dans les cellules épithéliales des petites voies aériennes chez deux sur huit animaux traités avec GL67A associée à l'inflammation locale et systémique bénigne. McLachlan G *et al.* concluent que le GL67A a été le meilleur vecteur non-viral actuellement disponibles pour l'administration par aérosol (McLachlan *et al.*, 2011).

Un essai clinique est actuellement en cours, initié par le UK cystic fibrosis gene therapy consortium et financé par la Cystic Fibrosis Trust. La première partie de l'essai clinique a évalué l'innocuité à dose unique et la durée d'expression chez les patients, puis une évaluation à doses multiples contrôlé par placebo (environ 100 patients) permettra de déterminer si le niveau de transfert de gène médié par GL67 et la répétition du traitement (12 doses sur 12 mois) est suffisant pour améliorer les paramètres cliniques des patients (Griesenbach and Alton, 2009). Cet essai clinique a débuté à l'automne 2011 (Sinn *et al.*, 2011).

2.4 Vecteurs en cours de développement

Dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose, seuls quatre vecteurs ont été utilisés : les adénovirus, les AAV, les lipoplexes et les polyplexes. Or il existe d'autres vecteurs, encore au stade de développement qui pourraient être employés dans le cadre de cette thérapie génique (tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques des vecteurs viraux développés pour la thérapie génique contre la mucoviscidose (d'après Conese *et al.*, 2011)

Vecteur	Intégration	Persistance de l'expression <i>in vivo</i>	Immunogénicité	Efficacité et sécurité des modèles animaux	Efficacité en modèles cellulaires (<i>cftr</i>)	Efficacité en modèles animaux (<i>tcfr</i>)	Essais cliniques (transgène <i>cftr</i>)
Adénovirus	non	Non	Elevée	Oui	Oui	Oui	Oui
Adéno-associé virus	Oui, épisomale et gènes intégré	Oui	Faible	Oui	Oui	Oui	Oui
Sendai virus	Non, cytoplasmique	Non	Elevée	Oui	Oui	Oui	Non
Parainfluenza virus	Non, cytoplasmique	Non connu	Pathogène humain	Non	Oui	Non	Non
virus respiratoire syncytial	Non, cytoplasmique	Non connu	Pathogène humain	Non	Oui	Non	Non
Lentivirus	Oui	Oui	Faible	Oui	Non	Oui	Non
SV40	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Non

2.4.1 Les rétrovirus

Les lentiviraux (LV) sont des vecteurs essentiellement dérivés du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et du virus de l'immunodéficience féline (VIF) qui, de part leur capacité d'intégration, en font des vecteurs susceptibles de réaliser la transduction efficace des épithéliums pulmonaires (Copreni *et al.*, 2004). En effet, l'intégration d'une seule copie d'un transgène thérapeutique en cellules progénitrices des voies respiratoires ou de cellules souches permettrait d'obtenir une expression persistante sachant que les cellules épithéliales des voies aériennes *cf*- ont un index mitotique faible. Même s'il n'est actuellement pas défini si l'expression prolongée en épithélium pulmonaire est le résultat d'intégration du vecteur dans les cellules progénitrices ou est due à la longue demi-vie des cellules épithéliales des voies aériennes (jusqu'à 17 mois)(Rawlins and Hogan, 2008).

Depuis le développement initial des vecteurs lentiviraux, des efforts considérables ont été consacrés à l'amélioration de l'efficacité de transduction, l'expression du transgène, la sécurité lors de l'intégration, mais surtout la spécificité des voies respiratoires de ces vecteurs. En effet plusieurs stratégies de pseudotypage visent à modifier le tropisme par l'insertion de glycoprotéines d'enveloppe viral hétérologues capable de cibler la membrane apicale des voies respiratoires avec une efficacité importante.

Les essais portant sur les vecteurs dérivant du VIH pseudotypés avec la glycoprotéine G de l'enveloppe du Virus de la Stomatite Vésiculeuse (VSV) ont montré chez la souris invalidée

(*cf-*) que la vectorisation du gène *cftr* via un vecteur a permis une restauration partielle et transitoire du transport des ions Cl^- pendant 110 jours (Limberis *et al.*, 2002). Ce même vecteur a été comparé avec le vecteur AAV dérivé de l'Ad5 sur l'induction d'une réponse immunitaire. Le vecteur HIV/VSV-G n'a induit qu'une transcription d'IFN- γ légère et transitoire dans les cellules épithéliales trachéales, alors que le vecteur AAV a fortement activé le facteur nucléaire NF-kB et ainsi la transcription de différentes cytokines comme ICAM-1, IL-8, RANTES, IP-10, TNF- α , IL-6, IL-1 β (Copreni *et al.*, 2009). En revanche, Limberis *et al.* ont rapporté que le transfert de gène avec un vecteur pseudotypé VIH /VSV-G a conduit à l'activation de cellules T spécifiques chez la souris avec une faible efficacité de transfert de gènes *in vivo* (Limberis *et al.*, 2010). Cependant, la transduction par les vecteurs VIH/VSV-G peut encore être améliorée par des formulations dont la magnetofectine, polyéthylèneimine ou lysophosphatidylcholine (Stocker *et al.*, 2009; Castellani *et al.*, 2010; Orlando *et al.*, 2010). Ces méthodes permettraient d'atteindre l'efficacité de transduction suffisante pour corriger le défaut de transport du chlorure *in vivo*.

D'autres glycoprotéines virales ont également été testés avec succès dans le poumon, comme la glycoprotéine d'enveloppe du baculovirus gp64 (Kremer *et al.*, 2007; Buckley *et al.*, 2008; Sinn *et al.*, 2008), la protéine d'enveloppe d'un rétrovirus de mouton *Jaagsiekte* (JSRV)(Sinn *et al.*, 2005), même la protéine d'enveloppe du tristement célèbre virus Ebola (Medina *et al.*, 2003) et dernièrement l'hémagglutinine-neuraminidase (HN) et la protéine de fusion (F) du Sendai virus (Mitomo *et al.*, 2010).

Sinn *et al.* (2008) ont montré l'expression stable et persistante (> 11 mois) d'un transgène dans l'épithélium nasal murin après une application unique *in vivo* d'un vecteur lentiviral dérivé du virus de l'immunodéficience féline (VIF) pseudotypé avec la GP64 (VIF/gp64). L'étude a aussi montré l'efficacité de l'administration répétée du vecteurs puisqu'avec l'administration de sept doses (une dose par semaine) ils ont observé des augmentations dose-dépendante de l'expression du gène rapporteur qui a persisté la durée de l'expérience (80 semaines) sans le développement de réponse immunitaire systémique ou locale, d'anticorps neutralisants, ni restriction de l'expression du gène rapporteur ou thérapeutique.

Buckley *et al.* (2008) ont comparé la transduction des vecteur VIH/VSV-G et le VIH/gp64 dans les voies respiratoires du fœtus, du nouveau-né ou d'une souris adulte. L'administration fœtale intra-amniotique du VIH/gp64 a entraîné la transduction d'environ 14% des cellules épithéliales des voies aériennes, y compris l'épithélium cilié et non ciliées à

la fois de la partie supérieure, intermédiaire et inférieure du poumon, avec transduction nasale ou alvéolaire négligeable. L'administration néonatale en intranasale du vecteur a entraîné la transduction de l'ensemble de l'épithélium des voies aériennes d'environ 11%, mais avec une transduction préférentielle dans le poumon distal, et substantielle dans les alvéoles. Cette expression était toujours détectable à 1 an après l'application. Chez la souris adulte, la majorité de la transduction a été limitée aux alvéoles. En revanche, le vecteur VIH/VSV-G n'a transduit que les alvéoles néonatales et adultes. Aucune transduction dans le fœtus murin n'a été observée après l'administration intra-amniotique. La répétition de l'administration n'a pas augmenté les niveaux de la transduction de l'épithélium des voies aériennes. Ces données montrent que l'utilisation de vecteurs pseudotypés VIH/gp64, aux premiers stades de développement, est possible et efficace, et permet une expression de haut niveau du transgène dans les poumons de souris.

Mitomo *et al.* (2010) décrit un vecteur dérivé du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) pseudotypé avec l'hémagglutinine-neuraminidase et la protéine de fusion du virus de Sendai (SeV). Ce vecteur a montré qu'il était capable de transduire, *in vivo*, les cellules épithéliales nasales murine pendant toute la durée de l'expérience (8-12 mois), mais aussi un épithélium différencié des voies respiratoires humaines avec une expression du gène rapporteur a pu être détecté pendant au moins 26 jours après la transduction. Mais surtout, le transfert de gènes ne nécessite pas de pré-conditionnement avec des dispositifs d'ouverture des jonctions serrées ou d'agents physiques qui sont souvent nécessaires avec d'autres vecteurs viraux.

4.2.2 les virus para influenza (PIV)

Les membres de la famille des paramyxovirus à tropisme respiratoire connus sont actuellement explorés comme vecteur pour le traitement de la mucoviscidose à l'aide de systèmes de génétique inverse. Kwilas *et al.* a récemment démontré qu'un vecteur basé sur le virus respiratoire syncytial (VRS) pourrait délivrer le *cftr* et corriger les défauts de transport de chlore dans les cultures primaires de l'épithélium des voies aériennes *cf-* (Kwilas *et al.*, 2010). D'un autre côté, l'équipe de Pickels a développé un vecteur dérivé du virus humain parainfluenza de type 3 (PIV3) capable de corriger un nombre suffisant de cellules épithéliales humaines *cf-* afin de restaurer la fonction bioélectrique des cellules à des niveaux

normaux (Zhang et al., 2009). De plus, le transfert de gènes a été efficace *in vivo* sur modèle macaque rhésus puisque la traduction du transgene était détectée à la fois dans des compartiments de la muqueuse et de la séreuse nasale. Bien que l'expression fût transitoire, d'une durée maximale de 10 jours, aucunes réactions indésirables ou des signes de malaise ont été notés, et seulement une légère augmentation transitoire de cytokines inflammatoires ont été mesurées au pic de réplication virale (Zhang et al., 2010).

Le virus de Sendai est un virus à ARN simple brin, qui transduit très efficacement les cellules épithéliales respiratoires *in situ* chez la souris et le furet (Rakonczay et al., 2008). Néanmoins, le virus Sendai induit une forte réponse immunitaire après sa première administration, qui atténue notablement la seconde transduction de l'épithélium respiratoire (Ferrari et al., 2007). Jusqu'à présent, toutes les tentatives pour rendre les modèles animaux tolérants vis-à-vis des antigènes du virus recombinant ont échoué. L'administration du vecteur SeV-*cftr* dans l'épithélium nasal des souris *cf-* a partiellement corrigé le transport chlore, mais avec un haut degré de l'inflammation (Ferrari et al., 2007). Cependant l'expression des gènes, médiée par le SeV recombinant basé sur les vecteurs est transitoire et l'administration répétée ne semble pas réalisable en raison du développement d'anticorps neutralisants contre les vecteurs (Ferrari et al., 2004; Griesenbach et al., 2006).

4.2.3 Les polyomavirus, exemple du SV40.

Comme alternative aux vecteurs de thérapie génique en développement à ce jour, Mueller et al. ont examiné la faisabilité de l'utilisation d'un vecteur recombinant dérivé du SV40 (rSV40s), qui peuvent contourner certains des obstacles rencontrés pour accueillir le long ADNc du *cftr*. Le rSV40s ont montré qu'ils étaient capable d'encapsider cet ADNc mais aussi d'exprimer une protéine CFTR fonctionnelle. En effet, ces résultats *in vitro* montre que rSV40-*cftr* a été capable d'induire l'expression de la protéine CFTR en cellules pancréatiques humaines ($\Delta 508$ -*cftr*), avec une localisation à la membrane plasmique, et associé à une restauration de la fonction du canal dans les cellules. De même, *in vivo*, l'instillation du vecteur rSV40-*cftr* dans les poumons de souris KO pour la protéine CFTR, a entraîné une réduction de la pathologie intra-trachéale associée à *P. aeruginosa*. En effet, les souris traitées avec le rSV40-*cftr* avaient moins de perte de poids par rapport aux souris témoins ainsi qu'une inflammation pulmonaire réduite visualisée par histologie et la réduction des cytokines inflammatoires dans le lavage broncho-alvéolaire, conduisant à une diminution évidente dans

l'afflux de neutrophiles dans les voies aériennes. Ces résultats indiquent que l'application de rSV40-*cftr* peut faire l'objet d'une étude plus approfondie dans le cadre d'une thérapie génique contre la mucoviscidose (Mueller *et al.*, 2010).

En effet, les Polymavirus et Papillomavirus ont montré une capacité à transduire différents types de lignées cellulaires. Ces vecteurs sont des virus artificiels, des pseudo-particules virales (VLPs), dépourvus de gènes viraux, mais capables de véhiculer dans la cellule le gène d'intérêt. Les travaux développés ont pour but d'améliorer ces vecteurs en les rendant plus efficaces dans les différents domaines comme la vaccination, la thérapie génique ou encore thérapie anticancéreuse.

L'amélioration du ciblage des vecteurs de gènes pour les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines peut aider à surmonter le manque de spécificité actuel des vecteurs qui est l'un des problèmes majeurs des nouvelles thérapies géniques.

Partie 3 : Modification du tropisme des vecteurs de transfert de gène

Plusieurs axes de recherche ont été explorés afin d'augmenter ou modifier le tropisme des vecteurs pour les voies aériennes. Différents vecteurs chimères ont ainsi été suggérés : par l'incorporation de séquences virales connues pour conférer une spécificité du ciblage, l'insertion d'un motif connu ou d'une séquence aléatoire choisie pour conférer un ciblage pulmonaire (natural small molécule ligands).

1. Incorporation de motifs de ciblage

La fusion de différents sérotypes d'un même virus (ex : AAV2/9, AAV2/5) ou l'incorporation de glycoprotéines d'autres types viraux (ex :HIV-SVS-G, SIV-SeV, SIV-gp64) a permis une augmentation du ciblage et/ou une diminution de la réponse immunitaire liée au vecteur (cf partie 2 : Thérapie génique).

1.1 Insertion d'un motif connu

Le couplage de vecteur à de petites molécules ligands peut aussi optimiser le ciblage des vecteurs. Pour exemple, l'UTP a été couplé par liaison biotine-streptactine à l'adénovirus 5. Celui-ci étant un agoniste du récepteur purinergique P2Y₂ abondamment exprimé sur l'épithélium pulmonaire, il a permis l'attachement, l'internalisation du vecteur et le transfert de gène en lignées résistantes à l'infection par Adénovirus (A9 et MDCK) ainsi qu'en cellules différenciées d'épithélium pulmonaire humain (Kreda *et al.*, 2000). Par une autre technique, le motif RGD, reconnu par l'alpha 5 intégrine et présent sur le coxsackie A9 ou la VP1 du paréchovirus humain 1, a été fusionné en N-terminale à la gp64 du baculovirus. Ce baculovirus muté a montré une efficacité de transduction 3 fois plus importante en cellules de carcinome pulmonaire humain A549 (Matilainen *et al.*, 2006).

1.2 Insertion d'une séquence aléatoire

D'autres études ont montré que la mutation de quelques acides aminés pouvait améliorer ou changer le tropisme de certains vecteurs. Ainsi dans une autre problématique, Müller *et al.*, ont conçu une bibliothèque de AAV-2 mutants affichant un peptide aléatoire de 7 acides aminés dans le domaine de la protéine de capsid VP requis pour la liaison de l'AAV-2 sur son récepteur naturel, l'héparane sulfate. Certains de ces motifs peptidiques ont permis le reciblage spécifique de ces AAV-2 mutants pour les cellules endothéliales de coronaire (Müller *et al.*, 2003).

De la même façon, White *et al.*, ont développé et caractérisé des mutants du vecteur AAV-2 par modification génétique de la capsid. En effet, des ligands peptidiques putatifs de haute affinité pour l'épithélium des voies respiratoires humaines ont été génétiquement incorporés dans la région de la boucle GH de la protéine de capsid de l'AAV-2. Les vecteurs ont été testés sur des cellules non pulmonaires ainsi que sur des cellules épithéliales polarisées et non polarisées des voies respiratoires humaines. L'un des vecteurs mutants, avec la séquence peptidique THALWHT, a montré, non seulement, la transduction la plus élevée dans les cellules indifférenciées des voies respiratoires épithéliales humaines, mais a également indiqué une transduction significative des cellules polarisées. Ce vecteur mutant a également été en mesure d'infecter les cellules indépendamment de son récepteur originel, le protéoglycane à héparane sulfate. L'incorporation de ce ligand sur les sérotypes d'autres AAV, qui ont montré une meilleure efficacité de transfert de gène dans l'épithélium des voies respiratoires humaines, peut améliorer l'application de vecteurs AAV dans les thérapie génique pulmonaire (White *et al.*, 2008).

L'enjeu de ces dernières années est d'identifier de nouvelles séquences de ciblage afin d'augmenter ou modifier le tropisme des vecteurs préexistants les rendant ainsi plus spécifiques de leurs cellules cibles.

2. Identification de motifs de ciblage pulmonaire

Pour identifier de nouveaux motifs de ciblage, que ce soit un récepteur cellulaire ou l'épitope d'un anticorps, plusieurs techniques permettant de mettre en évidence de nouvelles

interactions protéine-protéine ont été élaborées, comme le « bactériel display », le « yeast display » ou le « phage display ». La stratégie de ces 3 techniques de biotechnologie dites « de présentation » (display) est de présenter une banque de peptides aléatoires à la surface de levure (yeast display), de bactérie (bactériel display) ou de bactériophage (phage display).

Afin d'identifier un nouveau ligand cellulaire pour le ciblage pulmonaire, la technique du phage display a été la plus largement utilisée.

2.1 Principe du phage display

Le principe de la méthode repose sur la présentation de peptides à la surface de phages filamenteux, permettent de sélectionner *in vitro* des séquences nucléotidiques parmi une banque de grande taille (10^6 à 10^{12} clones distincts). Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface des molécules telles que des peptides aléatoires, des fragments d'anticorps (Fab, Fv, ou scFv single chain Fv) ou d'autres protéines. Lors d'un crible, chaque clone de cette banque de séquences nucléotidiques est traduit en polypeptide et présenté à la surface d'un vecteur qui contient la séquence nucléotidique correspondante. Les phages recombinants sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible. Ainsi, le polypeptide présenté peut être sélectionné ou éliminé lors du crible (par exemple en fonction de son affinité de liaison pour une cible d'intérêt), et la séquence nucléotidique correspondante est co-sélectionnée (ou co-éliminée).

Les banques de peptides exposés sur phage peuvent être sélectionnées sur différentes cibles pour caractériser rapidement de nouveaux épitopes, récepteurs pour identifier de nouveaux ligands, ou enzymes pour caractériser de nouveaux substrats.

2.1.1 Morphologie du Bactériophage

Le phage M13 est un bactériophage filamenteux de bactérie *E. coli* très bien connu. Son génome consiste en un simple brin d'ADN circulaire de 6,4 kilobases compacté dans un cylindre flexible. Ce cylindre est constitué de 2700 copies de la protéine majeure de capsid qu'est pVIII. La taille du cylindre est proportionnelle à la taille de l'ADN. Par ailleurs, une des extrémités de la particule phagique se compose de 5 copies de la protéine pVII et 5 copies de la protéine pIX. Elles constituent, associées au signal d'encapsulation (*Packaging signal*),

la première partie du virion à assembler. La deuxième extrémité est composée de 5 copies de la protéine pVI et de 5 copies de la protéine pIII (Figure : Structure du phage M13).

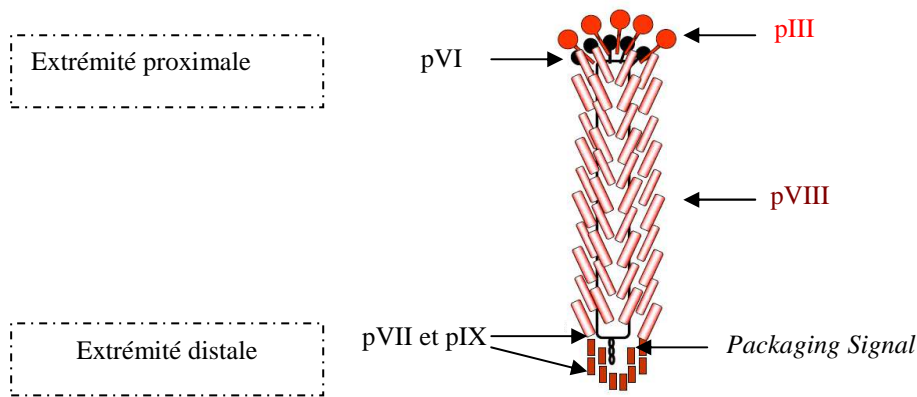


Figure 8 : Structure du phage M13.

La protéine la plus utilisée pour le *Phage Display* est pIII. Elle est présente en 5 copies à l'une des extrémités du phage. Elle est nécessaire à la pénétration du virus ainsi que pour la formation des virions. La protéine pIII est composée de trois domaines : N1, N2 et CT (C-terminal), séparés par des régions riches en glycine. Les domaines N1 et N2 sont impliqués dans l'adsorption/pénétration du phage dans la bactérie. La délétion d'un des domaines aboutit à des particules non infectieuses. Le domaine CT est nécessaire à la formation de particules virales stables. Par conséquent, son utilisation dans la protéine de fusion est complétée par la protéine sauvage. Cette dernière permet aussi le repliement correct des protéines recombinantes. La protéine majeure de capsid pVIII peut également être utilisée.

2.1.2 Présentation et sélection des motifs

Les banques de peptides sont engendrées par clonage d'oligonucléotides aléatoires en 5' des gènes des protéines pIII ou pVIII d'un phage filamenteux. La longueur des peptides fusionnés avec pIII ne semble pas perturber la morphologie du phage. En revanche, la longueur des peptides fusionnés avec les protéines pVIII doit être limitée à environ 8 acides aminés afin d'éviter les phénomènes d'encombrement stérique dû au nombre important de protéines pVIII en surface. Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés

et amplifiés par infection de bactéries. Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après 3 ou 4 tours de sélection-amplification, les phages sélectionnés sont analysés et testés pour l'activité recherchée.

Les banques dites contraintes présentent les peptides aléatoires dans une conformation qui accepte peu de degrés de liberté. Les peptides peuvent être cycliques (leur séquence est flanquée de deux cystéines formant un pont disulfure), ou abrités dans des structures fixes d'autres protéines. Une étude systématique du mode de présentation semble indiquer que les peptides contraints présentent souvent des affinités et des spécificités de liaison supérieures aux peptides linéaires et sont plus informatifs sur les sites de liaison.

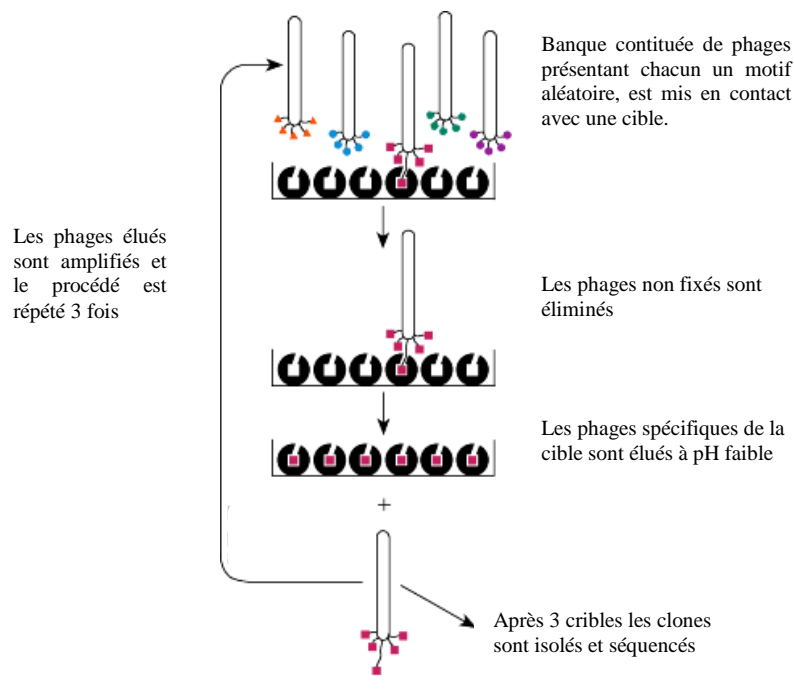


Figure 9 : Technique de sélection du *Phage Display*. L'obtention de ligands spécifiques à partir de larges répertoires exprimés à la surface de phages, nécessite plusieurs tours de sélection et d'amplification. Les sélections s'effectuent souvent à l'aide d'une molécule d'intérêt purifiée, ou à partir de lignées cellulaires choisies, et sont typiquement composées des étapes suivantes :

- L'adsorption représente l'étape de fixation des phages sur la cible ;
- Les lavages permettent d'éliminer les phages non spécifiques ;
- L'éluion au cours de laquelle les phages fixés sont récupérés, et enfin ;

L'infection d'*Escherichia coli* par les phages élués qui permet ensuite d'amplifier la population de phages sélectionnés

2.2 Nouveaux motifs de ciblage pulmonaire identifiés

Plusieurs auteurs ont décrit des motifs spécifiques des cellules des voies aériennes qui ont permis une augmentation de leur transduction. Parmi ces différents ligands, trois ont retenu notre attention : RFDSLKV, THALWHT et GHPRQMSHVY (tableau 3).

Tableau 3 : Motifs décrits dans la littérature pour conférer un ciblage pulmonaire.

Séquence protéique identifiée	Fréquence du motif	Technique de phage utilisée	Cellules	Auteurs
RFDSLKV	6/24	Phage construit par le laboratoire	CFT-2	(Vaysse <i>et al.</i> , 2000)
THALWHT	3/20	Ph-7	16HBe14o- /HTEo-	(Jost <i>et al.</i> , 2001)
GHPRQMSHVY	Séquence consensus	Ph-10	CFKM4	(Gaden <i>et al.</i> , 2004)

Les vecteurs synthétiques de transfert de gènes peuvent être optimisés en combinant liaison à l'ADN des peptides, des ligands de récepteurs de surface des cellules, et les peptides de localisation nucléaire et fusogènes. Dans cette démarche, Vaysse *et al.* ont sélectionné des ligands de la lignée de cellules épithéliales trachéales CFT-2 par la technique de phage display. Les peptides hébergés par deux phages ont été sélectionnés pour des études de transfection: peptide 7 (GRGDGDV) qui contenait le RGD motif intégrine de liaison, et le peptide 9 (RFDSLKV) qui a été trouvé dans six des 24 phages analysés. Deux peptides, fusionnés avec la liaison à l'ADN peptide P2 (SPKRSPKRSPKR), renforcée efficacité de la transfection dans des lignées cellulaires FT-2, NT-1, NIH-3T3 et ECV-304. Cependant seul le peptide 9 est le plus spécifique car aucune augmentation de transfection n'a été en ECV-304 qui sont des cellules endothéliale de veine ombilicale humaine (Vaysse *et al.*, 2000).

En effet, le motif THALWHT a été découvert par criblage d'une banque de phage display sur une lignée de cellules épithéliales de trachée (HTEo-) et une lignée de cellules épithéliales pulmonaires (16HBe14o-). L'étude de Jost *et al.* a confirmé que les phages présentant le motif THALWHT se lient beaucoup plus fortement sur les cellules des voies respiratoires épithéliales humaines que les phages présentant un peptide contrôle. De plus, aucune liaison aussi importante n'a été observée sur des lignées d'origine cervicale ou reinale suggérant une liaison sélective du motif THALWHT pour les épithéliums des voies aériennes.

Visualisé par microscopie confocale, la transfection d'agent contenant le peptide THALWHT a indiqué que sa fixation aux cellules est suivie d'internalisation par endocytose spécifique. Un peptide de synthèse comprenant un domaine cyclique CTHALWHTC et une liaison à l'ADN groupement a permis une transfection efficace dans des cellules épithéliales des voies aériennes humaines. Des essais de compétition avec le peptide THALWHT libre a confirmé la spécificité de la transduction. Ainsi, le motif THALWHT peut s'avérer une fraction utile de ciblage pour à la fois non-virale et vecteurs viraux de thérapie génique (Jost *et al.*, 2001).

La sélection d'un nouveau ligand par phage display sur les cellules glandulaires trachéale *cf-* (CF-KM4) ont permis d'identifier un seul vecteur, portant le décapeptide GHPRQMSHVY. Ce vecteur a montré une transduction plus importantes des cellules CF-KM4 par rapport au vecteur témoin de même longueur. L'amélioration de l'efficacité de transfert de gène n'est pas spécifique à CF-KM4 cellules, mais a été observé dans d'autres lignées cellulaires de mammifères testés. Ce ligand identifié sur les cellules CF-KM4 confère, tout de même, au vecteur adénoviral de type 5 (Ad5) une efficacité de tranfert dans les cellules des voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose (Gaden *et al.*, 2004).

Partie 3 : les papillomavirus

Autrefois, les Polyomavirus et les Papillomavirus étaient regroupés en une famille unique nommée *Papovaviridae*. Papova a été un sigle construit avec la première syllabe du nom des premiers membres de cet ensemble : virus des papillomes (verrues), virus du polyome de la souris (dû au polymorphisme extrême de la maladie justifiant la dénomination de polyomavirus) et agent vacuolant (ancienne dénomination du virus simien 40 ou SV 40).

Ils ont été séparés depuis une dizaine d'années en deux familles distinctes, les Polyomaviridae et Papillomaviridae. Ce sont de petits virus nus, à ADN, possédant une capsidie icosaédrique de symétrie T=7, formée de 72 capsomères. L'ADN viral des polyomavirus et des papillomavirus est bicaténaire, circulaire, super-enroulé, combiné à des histones cellulaires, et est souvent comparé à un minichromosome. Leur structure diffère de par le diamètre de la particule virale et la taille du génome : 45 nm et $3,5 \times 10^6$ daltons pour les polyomavirus, 55 nm et 5×10^6 daltons pour les papillomavirus.

1. La famille des Papillomaviridae

Chez l'Homme ou l'animal, les papillomavirus peuvent causer des lésions liées à la prolifération cellulaire, qui vont de la verrue commune au cancer du col de l'utérus. Actuellement, environ 200 types de papillomavirus répartis en 29 genres sur la base de l'analyse de leur génome. Ils sont classés en genres, espèces et génotypes, en fonction du degré d'homologie du génome entre ces types : un virus constitue un nouveau génotype lorsque la séquence de la protéine majeure de capsidie L1 présente une identité inférieure à 90% avec l'ADN des autres papillomavirus. 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 *et al.*, 2004) 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 10).

Les différents génotypes humains (HPV pour papillomavirus humain) sont partagés entre ceux affectant les muqueuses et ceux touchant la peau (Van Ranst *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1994; Birley *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1995). Les papillomavirus responsables de lésions muqueuses chez l'Homme sont regroupés dans le genre des alpha-papillomavirus, puis classés selon le type de pathologie associée. Les lésions bénignes régressant spontanément, tels que les condylomes, sont dûes aux papillomavirus dits de « bas risque » (BR), comme les types 6 et 11, regroupés dans l'espèce des alpha-10. Les papillomavirus dit à « haut risque » (HR) rassemblent les génotypes pouvant être associés à des cancers. L'HPV-16 et HPV-18 sont responsables à eux seuls plus de 70% des cancers du col de l'utérus, et appartiennent, respectivement, aux espèces alpha-9 et alpha-7.

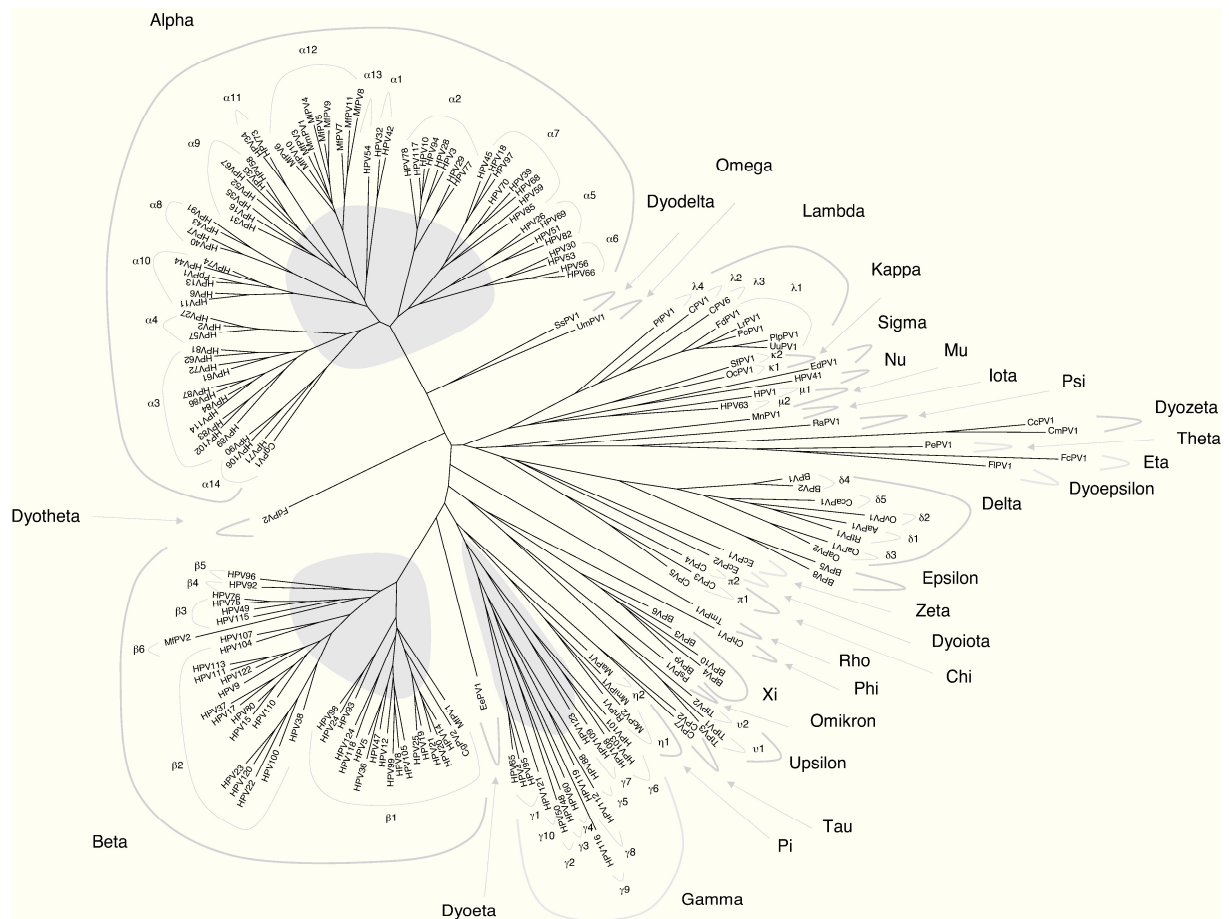


Figure 10 : Arbre phylogénétique de 118 types de papillomavirus construit par l'analyse de séquences partielles du gène L1 (Bernard *et al.*, 2010).

Les 15 génotypes HR les plus fréquemment retrouvés lors du développement des cancers du col de l'utérus sont par ordre d'importance au niveau mondial : les types 16, 18, 45, 31,33, 52, 58, 35, 59, 39, 56, 51, 73, 66 et 68 (Muñoz *et al.*, 1994).

La découverte du lien de causalité entre papillomavirus et cancer du col de l'utérus a valu au Pr. H. zur Hausen le prix Nobel de Physiologie et Médecine 2008. L'ADN d'HPV est retrouvé dans 100% des cancers du col de l'utérus, 90% des cancers de l'anus, 40% des cancers du pénis et de la vulve, mais aussi 12% de cancer de l'oropharynx et 3% des cancers de la bouche (Parkin and Bray, 2006).

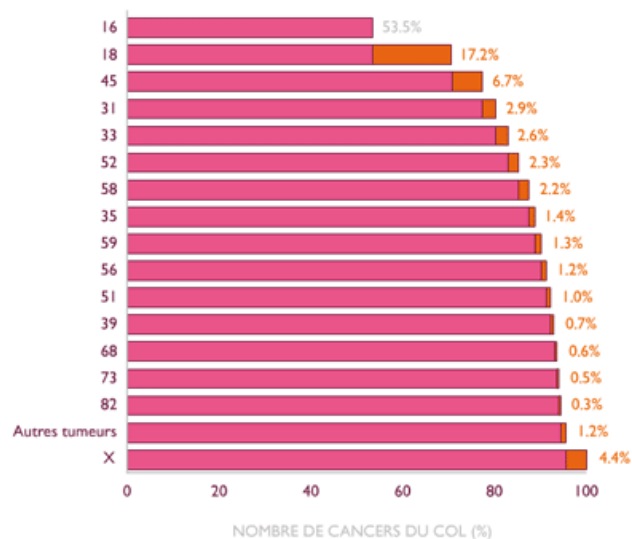


Figure 11 : Proportion de cas de cancer du col de l'utérus attribués aux types d'HPV les plus fréquents (d'après Munoz *et al.*, 2004)

Chaque génotype paraît donc associé préférentiellement à une certaine catégorie de tumeur : ainsi le l'HPV-1 et les verrues plantaires ; l'HPV-2 et les verrues vulgaires ; l'HPV-3 et les verrues planes ; l'HPV-4 et les verrues palmaires ; les HPV-6 et 11 et les condylomes ano-génitaux sans potentiel cancéreux ou les condylomes laryngés ; les HPV-16, 18, 31 et les lésions dysplasiques précancéreuses du col utérin.

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. 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 11) :

(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.

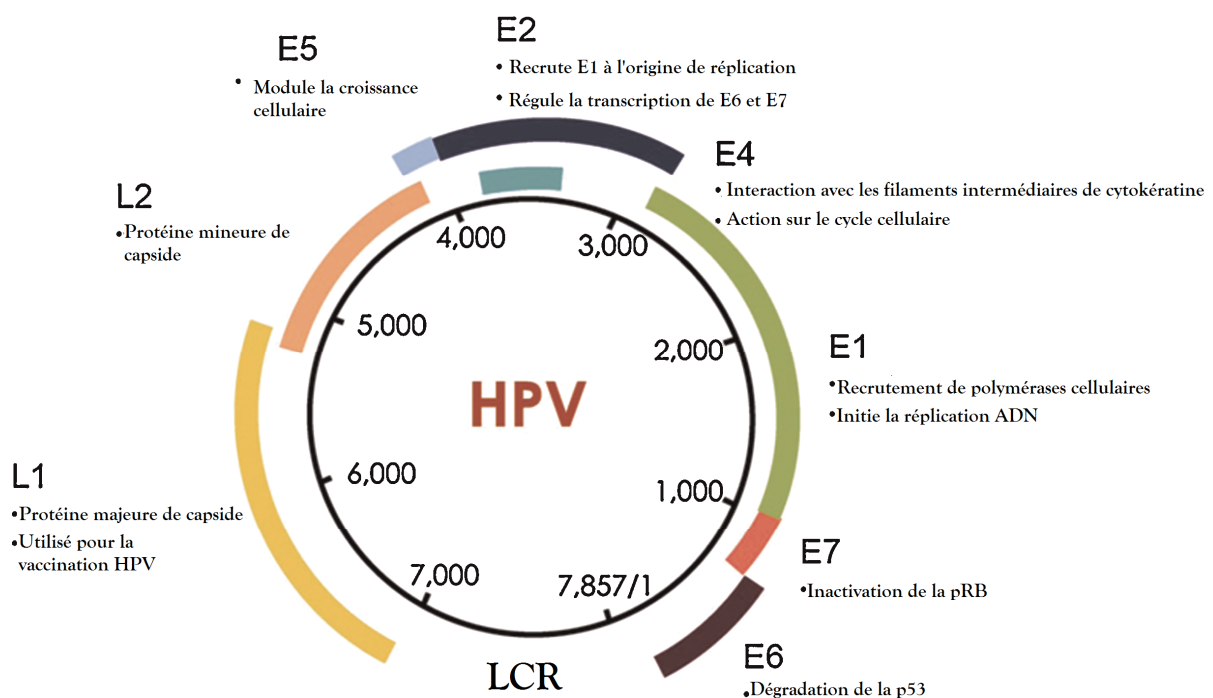


Figure 12 : Représentation schématique du génome des HPV. Organisation du génome de l'HPV 16 et fonctions des protéines codées par les différents ORFs. E1 : Liaison à l'origine de réplication et activité hélicase. E2 : Régulateur transcriptionnel négatif de l'expression de protéines. E4 : Rôle dans la 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

3. Cycle viral

La réplication de ces virus, non cultivable *in vitro*, ne prend place que dans les cellules épithéliales (figure 13) et sont dits épithéliotropes. Initialement, par une brèche dans le revêtement cutané ou muqueux, le virus infecte les kératinocytes basaux qui vont proliférer sous l'action des protéines précoces 6 et 7 (E6 et E7, E pour « early »), en se multipliant. Ces protéines oncogènes se lient et inhibent les activités anti-oncogènes et pro-apoptotiques de la protéine p53 pour E6 et de la protéine Rb pour E7. Le génome va alors se multiplier dans ces cellules qui vont poursuivre leur différenciation. Celle-ci permettra l'expression des protéines tardive de structure et ainsi la production de particules virales intra nucléaires. La desquamation de ces kératinocytes infectés assure la dissémination du virus dans l'environnement. Lors d'infection par des papillomavirus de type HR, une forte production d'E6 et E7 vont conduire à la dégradation des anti-oncogène, induire une forte prolifération cellulaire, à laquelle peut avoir lieu l'intégration du génome viral : cette intégration conduit à une expression exacerbée des oncoprotéines E6 et E7 et donc à l'induction d'une dysplasie. Ces lésions sont représentées par un *continuum* d'anomalies morphologiques de gravité croissante (bas grade à haut grade) qui peuvent de régresser spontanément ou d'évoluer vers un carcinome invasif.

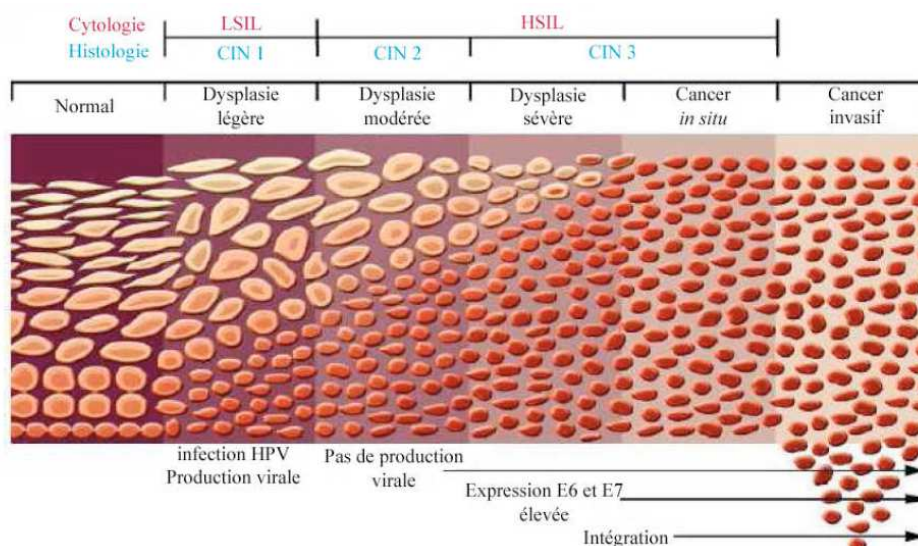


Figure 13 : Représentation schématique des différents grades de lésions histologiques du col de l'utérus (d'après Lowy and Schiller, 2006). Principales étapes du cycle de l'HPV dans l'épithélium pavimenteux. L'architecture de l'épithélium stratifié malpighien du col de l'utérus et l'expression de des différentes protéines virales durant l'infection. Les protéines virales sont exprimés de manière séquentielle et avec la différenciation. Les virions matures ne sont produits que dans la plus superficielle des couches de l'épithélium.

Les modifications de l'épithélium malpighien sont classées en trois grades selon l'importance des modifications histologiques et de l'extension des lésions. La dénomination actuelle : CIN (cervical intraépithélial neoplasia) comporte les parallélismes suivants avec les dysplasies et carcinomes in-situ : Le CIN I correspond à l'ancienne dénomination de dysplasie légère (de bas grade) où la hauteur de prolifération ne dépasse pas le tiers inférieur de l'épithélium. Le CIN II correspond à la dysplasie moyenne (de grade moyen), cette hauteur est comprise entre le tiers inférieur et les deux tiers inférieurs de l'épithélium. Puis le CIN III correspond à la dysplasie sévère ou au carcinome *in situ* (de haut grade) où cette hauteur dépasse les deux tiers de l'épithélium (figure 13).

4. Mécanisme d'entrée des papillomavirus

4.1 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 (Joyce *et al.*, 1999; Giroglou *et al.*, 2001). 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 capsid 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. 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, Budgeon, and Christensen, 2006; Culp, Budgeon, Marinkovich, *et al.*, 2006; Selinka *et al.*, 2007; Sapp and Day, 2009).

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un second récepteur ou d'un corécepteur lors de l'attachement de la capsid 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' $\alpha 6$ 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).

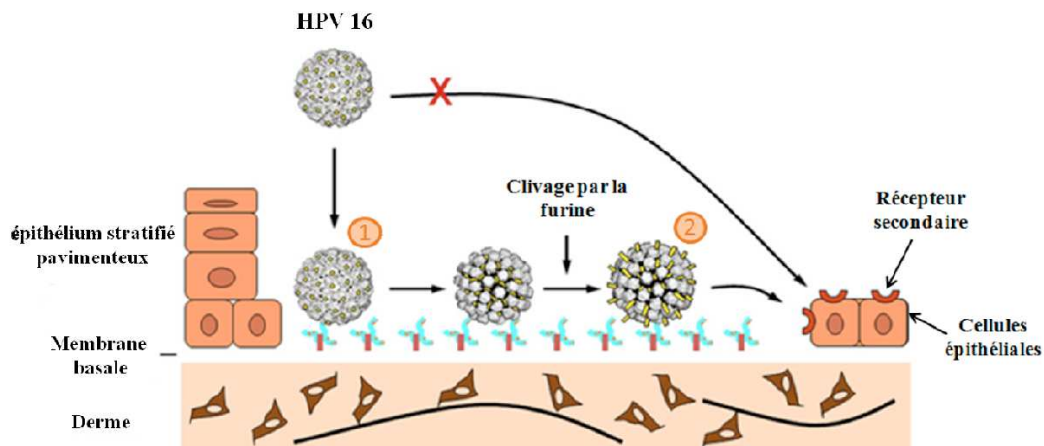


Figure 14 : Modèle d'attachement des HPV à la cellule. Les capsides interagissent avec les héparanes sulfates au niveau de la membrane basale. Cette interaction avec le récepteur primaire induit un changement de conformation de la capsidule qui permet de rendre accessible le site de clivage par la furine 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 capsidule peut se lier à un récepteur secondaire au niveau des cellules épithéliales. Ce transfert d'affinité s'opère par roulement de la capsidule vers les cellules de la membrane pendant le processus de cicatrisation (d'après Kines *et al.*, 2009).

De nombreuses études suggèrent que la protéine mineure de capsidule L2 facilite l'infection en interagissant avec un récepteur secondaire (Kawana *et al.*, 2001; Roden *et al.*, 2001; Yang, Day, *et al.*, 2003; Yang, Yutzy, *et al.*, 2003). L'attachement de la protéine de capsidule L1 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 conservé 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 capsidule 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 14).

4.2 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 riches 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 and Christensen, 2004). La raison reste inconnue, cependant l'induction d'une cinétique lente après l'interaction de virus avec les syndécans a été reportée pour d'autres virus (Williams and Fuki, 1997). De plus, le changement de conformation de la capsidie 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 (Selinka *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2003). 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.*, 2008). Le traitement des cellules avec la chlorpromazine, inhibiteur chimique des voies clathrine-dépendantes, préviendrait l'infection par des PsV de l'HPV-31 (Hindmarsh and 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 kératinocytes 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.*, 2007).

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.*, 2007; 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 (Kämper *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 réticulum endoplasmique (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 connaître la position exacte de la syntaxine-18 au sein du RE et de connaître 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 (Laniosz *et al.*, 2008).

4.3 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 HPV-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 (Görlich, 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).

Comme pour toute infection sexuellement transmissible (IST), la prévalence des infections aux HPV augmente avec l'âge mais surtout le nombre de partenaires sexuels.

Ces HPV sont considérés comme des oncogènes nécessaires mais non suffisants pour le cancer du col utérin. Ce cancer pose un problème important de santé publique : 500 000 nouveaux cas par an dans le monde et est la 2ème cause de mortalité par cancer chez la femme après le cancer du sein.

Le diagnostic des infections à HPV est avant tout clinique, cytologique (frottis cervical) ou histologique (sur biopsie d'exérèse). Ainsi, on fait le diagnostic de condylome plan avec présence de koïlocytes, et l'on classe les dysplasies du col utérin en CIN I à III, recherchant des foyers de micro-invasion. Le dépistage et le traitement des lésions précancéreuses identifiées constituent une prévention secondaire. La prévention primaire étant la vaccination prophylactique utilisant des pseudocapsides virales (VLP pour Virus-like Particles), composé de la protéine majeure de capsid L1. Ainsi, 2 vaccins ont été développés :

- le Gardasil® (Sanofi Pasteur MSD, West Point PA, USA) : vaccin tétravalent dirigé contre les types 16, 18, 6 et 11 (ces deux derniers étant responsables de 90 % des condylomes acuminés, et d'environ 20 % des CIN1) ;
- le Cervarix® (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgique) : vaccin bivalent contre les types 16 et 18 utilisant un adjuvant (ASO4) susceptible de stabiliser les VLP et d'induire un taux d'anticorps avec de plus faibles quantités d'antigènes.

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).

5. Capsides et pseudoparticules virales de papillomavirus

Seules 2 protéines composent la capsid des HPV, les protéines structurales L1 et L2, qui sont respectivement la protéine majeure et mineure de capsid. Exprimée en systèmes eucaryotes, la protéine L1 a la capacité, en présence ou en absence de protéine L2, de s'auto assembler en pseudoparticules virales ou VLP (« virus like particle »). Ces VLPs, identiques d'un point de vue structural et antigénique aux virions, ont permis une étude plus approfondie

de la structure de la capside et de la fonction des protéines qui la composent. Dépourvues d'ADN viral, elles sont fortement immunogènes (Kirnbauer *et al.*, 1992, 1994), et conservent la capacité de lier et de transférer de l'ADN vers les cellules cibles (Sandalon and Oppenheim, 1997; Kawana *et al.*, 1998a; Touze and Coursaget, 1998; Goldmann *et al.*, 1999; Combita *et al.*, 2001). Cependant, 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). Divers systèmes d'expression eucaryotes ont été étudiés afin de produire des VLPs comme le virus de la vaccine (Zhou *et al.*, 1991), le système baculovirus/cellules d'insecte (Kirnbauer *et al.*, 1992; Le Cann *et al.*, 1994), le système levure (Hofmann *et al.*, 1995; Sasagawa *et al.*, 1995) et le virus de la forêt de Semliki (Heino *et al.*, 1995; Roden *et al.*, 1996). La production de VLP a également été réalisée *in vitro* par assemblage de capsomères de protéines L1 exprimées en *E. coli* (Li *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000).

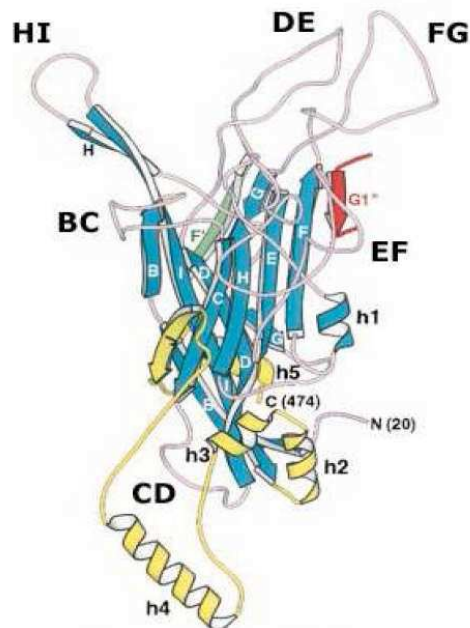


Figure 15 : Représentation schématique de la structure tertiaire de la protéine L1 de l'HPV 16 (d'après Chen *et al.*, 2000). La protéine L1 possède 6 boucles antgéniques. Les boucles BC, DE, EF, FG et HI sont orientées vers l'extérieur de la capside, la boucle CD est orientée vers l'intérieur.

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

(Figure 15). La région centrale, comprise entre les aa 20 à 382, est formée de feuillets β antiparallèles conservés, induisant la formation de six boucles antigéniques, variables entre les différents génotypes. Les boucles BC, DE, EF, FG et HI sont orientées vers l'extérieur de la capsid, contrairement à la boucle CD 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 l'assemblage des capsides en permettant le contact entre les pentamères (Chen *et al.*, 2000). Ces pentamères s'assemblent grâce à des 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 pas pu, à ce jour, être cristallisées.

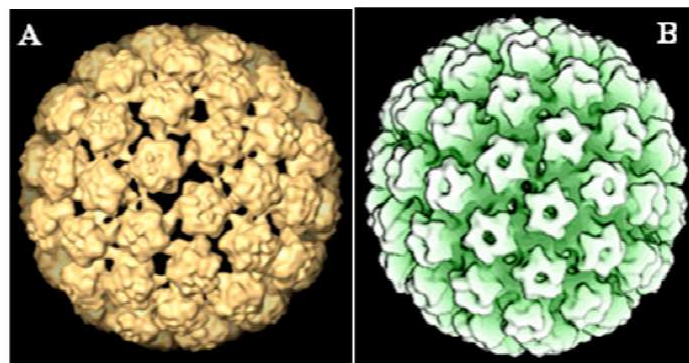


Figure 16 : Reconstruction d'image après cryomicroscopie électronique des structures tridimensionnelles des pseudoparticules virales d'HPV. A. Capside de l'HPV 31 composée de protéines L1 (d'après James Conway, travaux non publiés). B. Capside l'HPV 1 composée de protéines L1 (d'après Hagensee *et al.*, 1994).

La capsid des papillomavirus est icosaédrique et mesure de 50 à 55 nm de diamètre. Elle est composée de 360 protéines L1 assemblées en 72 pentamères appelés capsomères, et 12 à 72 protéines L2 (Buck *et al.*, 2008). Les capsomères pentamériques s'assemblent selon une symétrie icosaédrique T=7 (Hagensee *et al.*, 1994) (Figure 16).

Contrairement à la majorité des virus qui possèdent une capsid formée de capsomères penta ou hexamériques, l'assemblage des capsomères des papillomavirus aboutit à la formation d'une capsid ne présentant que des capsomères métamériques, pentavalents sur les faces et hexavalents aux sommets. 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 (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 capsid 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 11 aa C-terminaux n'affecte pas l'assemblage pour l'HPV-11 (Li *et al.*, 1997). Les 31 aa C-terminaux de la protéine L1 de l'HPV-16 ne semblent pas nécessaires à l'auto-assemblage en VLP (Touzé *et al.*, 2000). Des délétions situées au-delà de ces régions abolissent la formation de capsid 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 capsid 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-disulfure inter-capsomères entre deux protéines L1 de l'HPV-16 (Ishii *et al.*, 2003). Les C-424 et C-429 sur la protéine L1 sont également indispensables à la formation et à la stabilité des capsides (Sapp *et al.*, 1998).

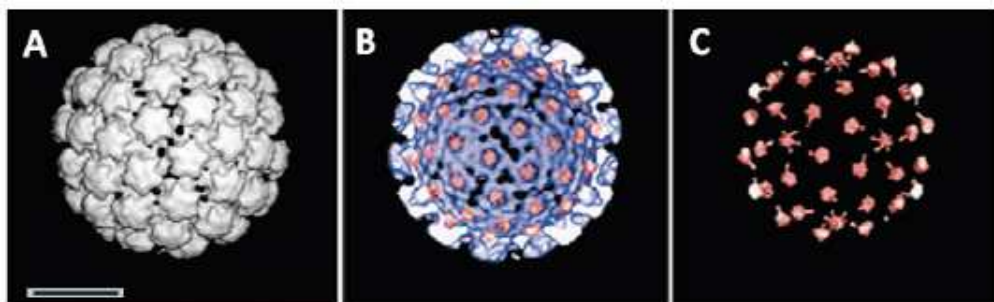


Figure 17 : Reconstitution 3D de pseudoparticules virales d'HPV-16 obtenue par expression des protéines L1 et L2 par cryomicroscopie électronique (d'après Buck *et al.*, 2008). A. Représentation de la capsid constituée des protéines L1 et L2 de l'HPV 16. B. Représentation en coupe de l'intérieur de la capsid virale avec la protéine L1 en bleu et la protéine L2 en rouge. C. la protéine L2 seule en rouge. Barre = 200 Å

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 5 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 capsid 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 ou 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 au centre des capsomères, ne laissant apparaître qu'une faible partie centrale à la surface de la capsid. Les analyses en SDS-PAGE de capsides d'HPV composées des protéines L1 et L2 montrent un ratio de 1 protéine L2 pour 30 protéines L1, confirmant ainsi le nombre de 12 protéines L2 dans la capsid (Hagensee *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994; Bossis *et al.*, 2005). Cependant, l'étude par SDS-PAGE de virions de l'HPV 16, 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 capsid (Doorbar and Gallimore, 1987; Finnen *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2008). L'analyse en cryoélectromicroscopie des capsides constituées de la protéine L1 seule, ou des protéines L1 et L2, ne révèle pas de différence au niveau de la structure externe de la capsid. Cependant, la reconstitution 3D des pseudoparticules virales de l'HPV-16 révèle l'existence de 72 sites d'interaction possibles entre les protéines L1 et L2, indiquant ainsi l'interaction possible d'une protéine L2 au centre de chaque capsomère pentamérique. La protéine L2 peut donc être présente à raison de 72 copies par capsid avec un rapport de L2/L1 de 1/5 (Figure 17).

6. Les pseudoparticules virales comme vecteur de gène

6.1 Les systèmes de formation cellulaire des PsV

- **Formation de PsV en utilisant le virus de la vaccine recombinant**

Les premières études en système cellulaire ont été réalisées en utilisant un virus de la vaccine recombinant (VVr) codant les gènes L1 ou L1 et L2 du BPV-1 (VVr-L1 ou VVr-L1/L2). Après infection de cellules CON/BPV.B2 contenant 50 copies du génome viral du BPV-1 sous forme épisomale, des particules de BPV-1 infectieuses ont pu être obtenues uniquement après infection par le vecteur VVr-L1/L2. En effet, les particules obtenues avec le vecteur VVr-L1 ne contenaient pas d'ADN, suggérant que la co-expression de la protéine L2 est donc nécessaire à l'encapsulation du génome du BPV-1 (Zhou *et al.*, 1993).

Des PsV de BPV-1 ont également été obtenus par transfection de cellules COS-1 avec un plasmide rapporteur suivi d'une infection par le virus de la vaccine recombinant codant soit la protéines L1 seule soit les protéines L1 et L2 du BPV-1 (Zhao *et al.*, 1998). Contrairement à l'étude de Zhou *et al.*, les PsV constitués uniquement de la protéine L1 ont montré qu'ils étaient capables d'encapsider le plasmide rapporteur. Cependant, les PsV BPV-1 composés des protéines L1 et L2 ont vu leur capacité d'encapsulation augmentée d'un facteur 50. De plus, 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.

Des PsV de l'HPV-33 ont aussi été obtenus en utilisant des virus de la vaccine recombinants (VVr-L1 ou VVr-L1/L2) pour infecter des cellules COS-7 contenant de nombreuses copies d'un plasmide rapporteur (Unckell *et al.*, 1997; Sapp and Selinka, 2005). Cette études confirment les résultats précédents, la protéine L2 est nécessaire afin d'optimiser l'encapsulation de l'ADN, la production ainsi que leur infectiosité des PsV.

- **Formation de PsV par transfection de gènes optimisés des protéines de capsid**

Les systèmes décrits précédemment ne permettent d'obtenir que de faibles quantités de PsV. Un autre système, décrit plus récemment, repose sur la simple co-transfection d'un plasmide contenant les gènes adaptés des protéines de capsid L1 et L2 et d'un plasmide rapporteur dans cellules d'origine humaine 293TT. Ces cellules ont été modifiées de façon à surexprimer l'antigène T du SV40 de façon constitutive (Buck *et al.*, 2004, 2005)(figure 18). L'adaptation des gènes consiste à remplacer tous les codons des gènes viraux par les codons les plus différents possibles (ADAP : As Different As Possible). Afin d'optimiser au

maximum la production de PsV, les plasmides, codant les protéines de capsid L1 et L2 d'un type d'HPV ainsi que le plasmide codant le gène rapporteur, portent l'origine de réplication du SV40. Avec l'utilisation des cellules 293TT, exprimant fortement l'AgT du SV40, ce système de production de PsV devient 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. Ce système permet d'encapsider des plasmides d'une taille inférieure ou égale à celle du génome des papillomavirus (8 kpb) et la capacité à transférer l'ADN encapsidé est inversement proportionnelle à la taille du plasmide codant le gène rapporteur (Buck *et al.*, 2004).

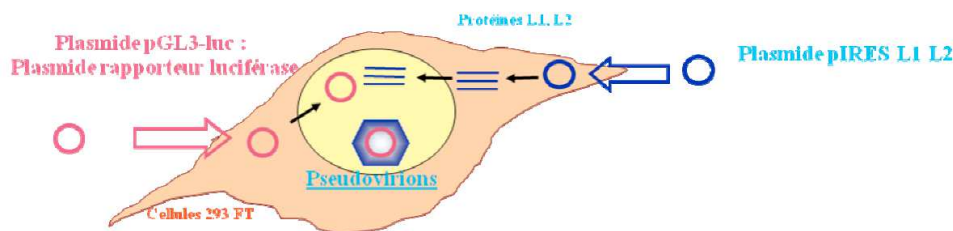


Figure 18 : Représentation schématique de la production de pseudovirus en système cellulaire 293FT. Les cellules 293FT sont co-transfectées à l'aide de 2 plasmides : en bleu le plasmide pIRES codant les protéines L1 et L2 d'un type d'HPV, et en rose le plasmide rapporteur pGL3-luc codant le gène de la luciférase. Les protéines L1 et L2 vont s'autoassembler autour du plasmide rapporteur formant ainsi des pseudovirus.

6.2 Les systèmes acellulaires de formation des PsV

- **Obtention de PsV de papillomavirus par dissociation-réassociation**

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. En effet, la détermination du rôle des ions calcium et des ponts disulfures dans la formation des capsides a permis d'optimiser la réassociation des particules (McCarthy *et al.*, 1998; Touze and Coursaget, 1998). 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 VLP sont dissociées, permettant ainsi de déstructurer la capsid sous forme de capsomères, puis réassocié en présence d'un plasmide rapporteur (Figure 19). 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) sans présence de L2 (Touze and Coursaget, 1998).

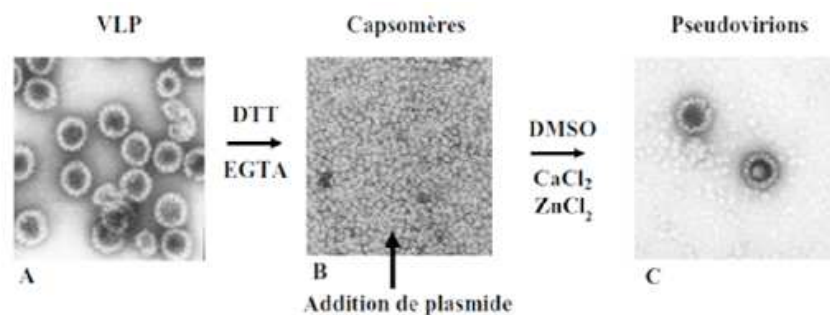


Figure 18 : Observation en microscopie électronique de la formation de pseudovirions par la méthode de dissociation-association. Les VLP L1 d'HPV 16 (A) sont dissociées en capsomères (B), le plasmide contenant le gène rapporteur est mis en présence des capsomères (B). Des complexes ADN/VLP se forment (C) en présence de CaCl_2 (D'après Touzé *et Coursaget*, 1998).

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 (Kawana *et al.*, 1998a; El Mehdaoui *et al.*, 2000).

Plus récemment, la méthode de dissociation-réassociation a été optimisée par addition de chlorure de zinc afin d'augmenter l'efficacité du réassemblage. Cette optimisation repose sur une étude de Hanslip *et al.* 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 (Hanslip *et al.*, 2006). Ce principe a donc été repris et adapté à la méthode de dissociation-réassociation. Ces capsomères, en présence du plasmide d'intérêt, de CaCl_2 et de 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.*, 2009).

Matériels et méthodes

1. Identification d'un nouveau ligand spécifique des cellules pulmonaires par la technique « phage display »

Les cellules des lignées pulmonaires (IB3-1 et S9), ainsi que les cellules des lignées cervicales (HeLa, SiHa et CaSki) et les cellules des lignées rénales (COS-7 et 293FT) sont ensemencées en plaque 6 puits afin d'être à 80% de confluence. Le tapis cellulaire est préalablement lavé 3 fois avec du milieu de culture DMEM non complété avec du sérum de veau fœtal, avant d'y déposer un volume de 2 mL de DMEM contenant 10 μ L de la banque de phages, soit environ 2.10¹¹ phages (Ph.D.-C7C library, Ph.D.TM Phage Display Libraries, Biolabs). Les phages sont incubés avec les cellules, 30 min sous agitation lente, 60rpm, à 37°C. La banque est épuisée par passages successifs sur 3 puits ensemencés d'une même lignée non pulmonaire, afin de discriminer les phages non spécifiques. Les puits sont alors lavés 3 fois avec 2 mL du milieu DMEM. Les éluats contenant les phages ne se fixant pas sont récoltés, puis mis en contact avec les lignées pulmonaires, 30 min sous agitation lente, 60rpm, à 37°C. Ici, les phages capables de se fixer sont retenus. Après 3 lavages avec 2mL de milieu DMEM, les phages sont décrochés par l'addition d'une solution de 0.2 M de Glycine-HCl (pH 2.2) à 1 mg/ml de BSA. Les phages spécifiques des cellules pulmonaires sont amplifiés par infection de *E.coli* ER2738 (selon le protocole du fournisseur). Cette sélection est répétée successivement 3 fois sur chacune des lignées disponibles (figure 19). Les phages ainsi sélectionnés sont ensuite séquencés par la société MWG operon (Allemagne).

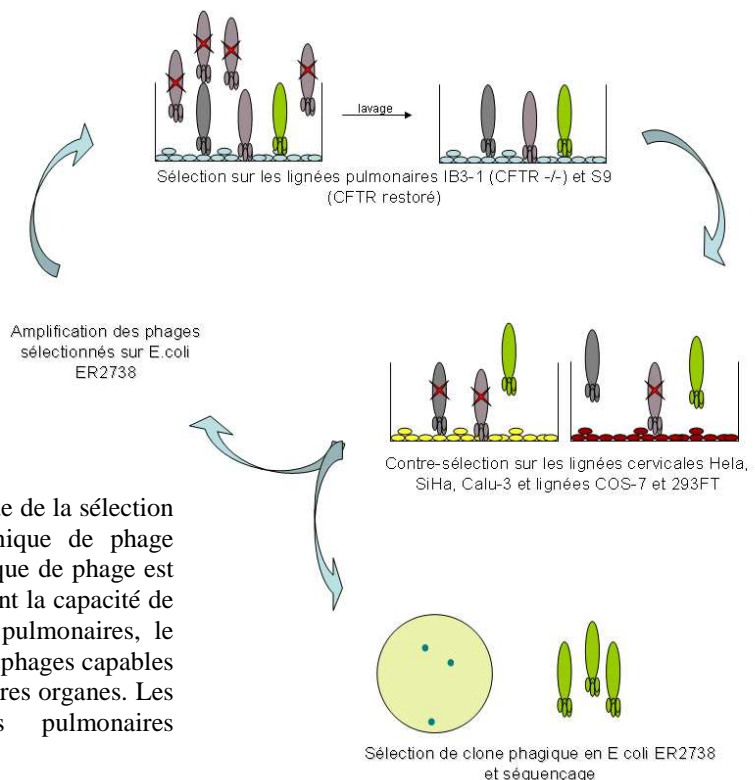


Figure 19 : Représentation schématique de la sélection de ligands pulmonaire par la technique de phage display. Un premier crible de la banque de phage est effectué afin de retenir les phages ayant la capacité de se fixer sur les lignées de cellules pulmonaires, le deuxième crible permet d'éliminer les phages capables de se fixer sur des lignées issues d'autres organes. Les phages spécifiques des lignées pulmonaires uniquement sont séquencés.

2. Insertion des motifs dans la séquence de la protéine L1 de l'HPV-16

2.1. Mutagenèse dirigée

L'insertion de différents motifs décrits comme des ligands ou des motifs de ciblage pulmonaire dans les différentes boucles antigéniques de la protéine L1 de HPV16 s'est faite par PCR recombinante en 2 temps. En effet des amorces ont été designées pour être chevauchante, ainsi une première PCR, interne, va insérer le motif dans la boucle et une seconde, externe, va amplifier l'ensemble du gène L1 mutant afin de le cloner et de le séquencer (Annexe 1 : Tableau des amorces).

La première PCR est réalisée avec la matrice pGA4 16L1 (plasmide commercial contenant le gène de synthèse optimisé de la protéine L1 de l'HPV16) à l'aide des couples d'amorces HPV16 L1 rev et P4 140/141 rev (pour le fragment amont) puis P4 140/141 for et HPV16 L1 for (pour le fragment aval) afin de produire le mutant insérant le motif P4 dans la boucle DE et les couples HPV16 L1 rev et P5 140/141 rev et P5 140/141 for et HPV16 L1 for de la même manière pour le mutant insérant le motif P5 dans la boucle DE. L'insertion du motif se fait dans un volume final de 50 µL en mélangeant 100 ng de matrice pGA4 HPV16 L1, 0,6 µM d'amorce Rev ou For, 0,3 mM de désoxy-ribonucléotide triphosphate (dNTP, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂) et 1,5 UI de polymérase Platinum High Concentrated (Invitrogen) dans le tampon d'amplification adapté 10X (Invitrogen) par un programme de PCR de dénaturation à 94°C pendant 5min, 18 cycles d'amplification en dénaturation de 45 sec à 94°C, hybridation des amorces pendant 30sec à 52°C et une élongation de 2min à 72°C, en finissant par 7min d'élongation à 72°C.

La deuxième étape de PCR consiste à amplifier l'intégralité du gène L1 de l'HPV16 muté à partir des 2 fragments amont et aval générés. Celle-ci est faite avec le même programme de PCR en utilisant le produit de la première PCR comme matrice avec les amorces HPV16 L1 rev et HPV16 L1 for qui s'hybrident de part et d'autre du gène.

Après migration sur gel d'agarose 0,8%, les produit de PCR sont extraits du gel et purifiés grâce au kit de purification d'ADN gel extraction « NucleoTrap » (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Les fragments sont ensuite insérés dans le plasmide pCR2.1 TOPO TA cloning (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon le protocole du fournisseur afin d'être séquencé (MWG, Germany).

2.2. 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 ultraviolets. Le marqueur de taille (MT) utilisé est de l'ADN du phage λ, digéré par l'enzyme HindIII (Invitrogen).

2.3. 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, Hoerd, 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.

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

La ligation (5 min à 20°C) des produits de PCR est réalisée 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". Le vecteur pCR2.1-TOPO (Invitrogen) intègre les produits de PCR par "TA cloning" et contient des séquences d'amorces consensus pour le séquençage (Figure 20). Cette insertion ne fait pas intervenir de DNA ligase, une topo-isomérase fixée sur les extrémités du plasmide réalise la ligation. Dans ce vecteur, le site d'insertion est situé dans le gène *lacZ*. Ainsi,

l'insertion d'un gène à ce niveau rompt le cadre de lecture du gène *lacZ* ce qui permet la sélection "blanc/bleu" des clones bactériens recombinants.

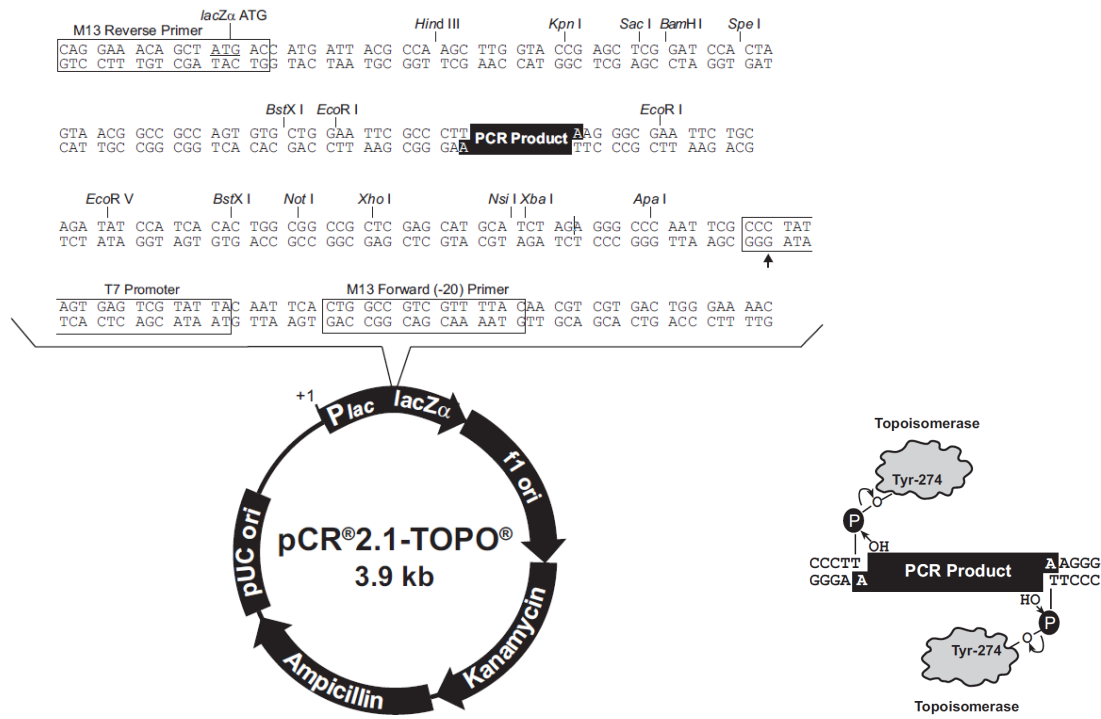


Figure 20 : Carte du plasmide PCR2.1-TOPO (Invitrogen). Le produit de PCR est intégré dans le plasmide par l'action de topoisomérase.

2.5. 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 ($\text{Abs}_{600\text{nm}} = 0,4$) 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).

2.6. Mini-préparation d'ADN plasmidique

La purification des plasmides est effectuée par lyse alcaline (Birnboim and 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).

2.7. 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.

Les clones ayant parfaitement intégrés le motif et n'ayant aucune mutation dans la séquence sont sélectionnés afin de produire des baculovirus recombinants permettant l'obtention de VLPs chimériques en système baculovirus/cellules d'insecte.

3. Production des pseudovirions chimériques

3.1. 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 fonctionnels 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 21). 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-attTn7, 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.

3.2 Clonage des gènes d'intérêt dans le plasmide pFastBacDual

Les plasmides pCR2.1 TOPO contenant les gènes des protéines L1 HPV16 recombinantes ainsi que le plasmide FastBacDual ont été digérés avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (2h à 37°C) puis les fragments d'intérêt ont été ligaturés. Le produit de ligature a ensuite été utilisé pour transformer des bactéries DH5 α . La présence de l'insert a été vérifiée par minipréparation d'ADN plasmidique et digestion enzymatique par *Bam*HI et *Hind*III.

L'ADN est digéré par des endonucléases de restriction *Bam*HI et *Hind*III (Invitrogen) dans un volume final de 20 μ L. Les doubles digestions sont réalisées en utilisant 2 à 10 unités de chacune des deux enzymes par μ g d'ADN et en présence du tampon de réaction permettant l'activité optimale de senszymes. La digestion est réalisée 2h à 37°C afin d'obtenir une activité enzymatique maximale. Les échantillons d'ADN restreints sont mélangés à un tampon de charge au 1/10 (0,3% bleu de bromophénol, 50% glycérol) et déposés dans les puits d'un gel d'agarose préparé à 0,8% dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) additionné de bromure d'éthidium (0,5 μ g/mL). La migration s'effectue sous un courant constant de 100 mA puis les fragments d'ADN sont visualisés sous UV. Le marqueur de taille (Smart Ladder) permet aussi bien d'estimer la quantité d'ADN que de déterminer la taille du fragment d'intérêt par comparaison avec les 14 fragments de tailles et quantités définies (10000 pb à 200 pb et de 100 ng à 15 ng).

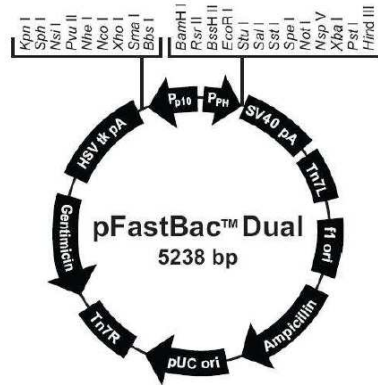
La ligature des fragments d'ADN est réalisée suivant un rapport molaire vecteur/ insert de 1/3 en utilisant 100 ng de vecteur. Les réactions sont effectuées dans un volume final de 30 μ L contenant du tampon de ligature 1X (tris-HCl 30 mM pH 7,8 ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 10 mM ; ATP 1 mM) et 2 unités d'ADN ligase T4 (Invitrogen). La réaction de ligature est effectuée pendant 16 h à 16°C.

3.3 Transformation des bactéries DH10Bac

Les bactéries DH10BacTM sont transformées avec 50 ng de plasmide pFastBacDualTM 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 μ L 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 μ L de dilutions (10-1, 10-2, 10-3) de cette culture sont étalés sur du milieu LB/agar additionné de kanamycine à 50 μ g/mL (Interchim, Montluçon, France), de gentamicine à 7 μ g/mL (Invitrogen), de tétracycline à 10

$\mu\text{g/mL}$ (Sigma Aldrich, France), de X-Gal à $100 \mu\text{g/mL}$ et d'IPTG (Sigma Aldrich, France) à $40 \mu\text{g/mL}$ et incubées 48 h à 37°C sous agitation.

A.



B.

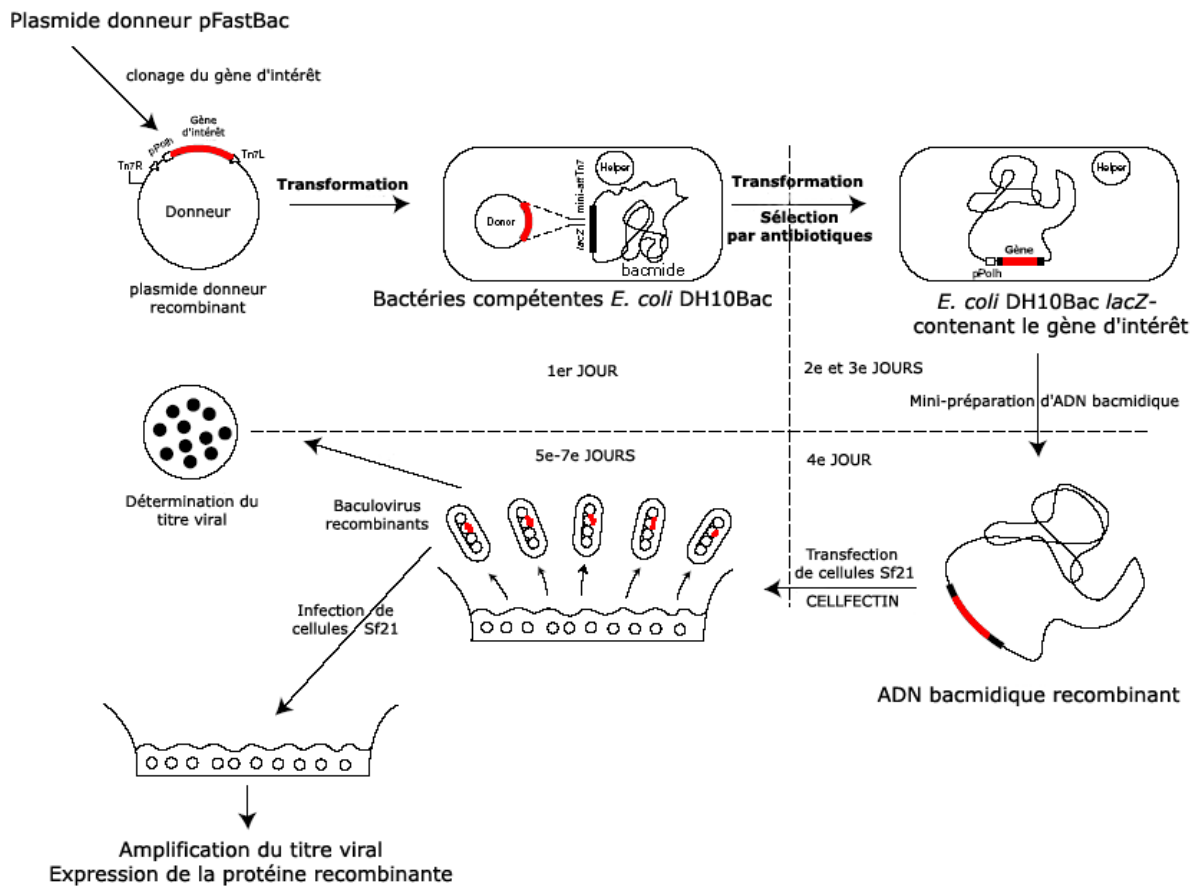


Figure 21 : Génération de baculovirus recombinants et l'expression des gènes avec le système d'expression Bac to Bac®. A : Carte de restriction du plasmide pFast BacDual, B : Schéma de la génération de baculovirus recombinants et de l'expression de gène d'intérêt dans le système Bac-to-Bac.

3.4 Mini-préparation d'ADN bacmidique

Les colonies blanches obtenues, c'est-à-dire les DH10Bac™ ayant transposé le gène d'intérêt dans le bacmide, 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.

3.5 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 MgCl₂ 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.

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

3.6.1 Les cellules d'insecte

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 » 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.

3.6.2 Transfection des cellules d'insecte 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.

3.6.3 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 boîte 150 cm² (TPP, ATGC), sont infectées avec 3 mL de baculovirus recombinants dans 10 mL de milieu SF 900 II complet. 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.

4. Purification des pseudo-particules virales de papillomavirus

4.1 Extraction des protéines nucléaires

Le culot de cellules d'insecte Sf21 infectées par les baculovirus recombinants sont mises en suspension dans du PBS contenant 0,5% de NP40 et 4% inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free, Roche diagnostics, Meylan, France) afin de casser la membrane cytoplasmique et de libérer les noyaux contenant les VLPs. La suspension est incubée 30 min dans la glace puis centrifugée à 12000 g pendant 20 min à 4°C. Les noyaux présents dans le culot sont repris dans 2 mL de PBS 1X contenant 4% d'inhibiteurs de protéases puis lysés par sonication (3 cycles de 15 sec à la puissance maximale) (Vibracell, Bioblock).

4.2 Purification de protéines par gradient de densité

L'extrait nucléaire est déposé sur un gradient discontinu de CsCl (8,5 mL de CsCl de densité 1,164, 1,272, 1,338 et 1,380). Après une ultracentrifugation à 27000 rpm pendant 22h à 4°C dans un rotor Beckman SW28, la partie centrale du gradient est récoltée en 12 fractions de 1 mL. La densité de chaque fraction est déterminée à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé.

Les fractions dont la densité est comprise entre 1,26 et 1,28 sont analysées par SDS-PAGE pour détecter la protéine L1. Les fractions contenant les protéines d'intérêts sont regroupées, diluées dans du PBS 1X et centrifugées 3h à 28000 rpm dans un rotor Beckman SW28 afin d'éliminer le césium. Les culots sont repris dans 500 µL de PBS 1X puis soniqués 3 fois 5 secondes à la puissance maximale.

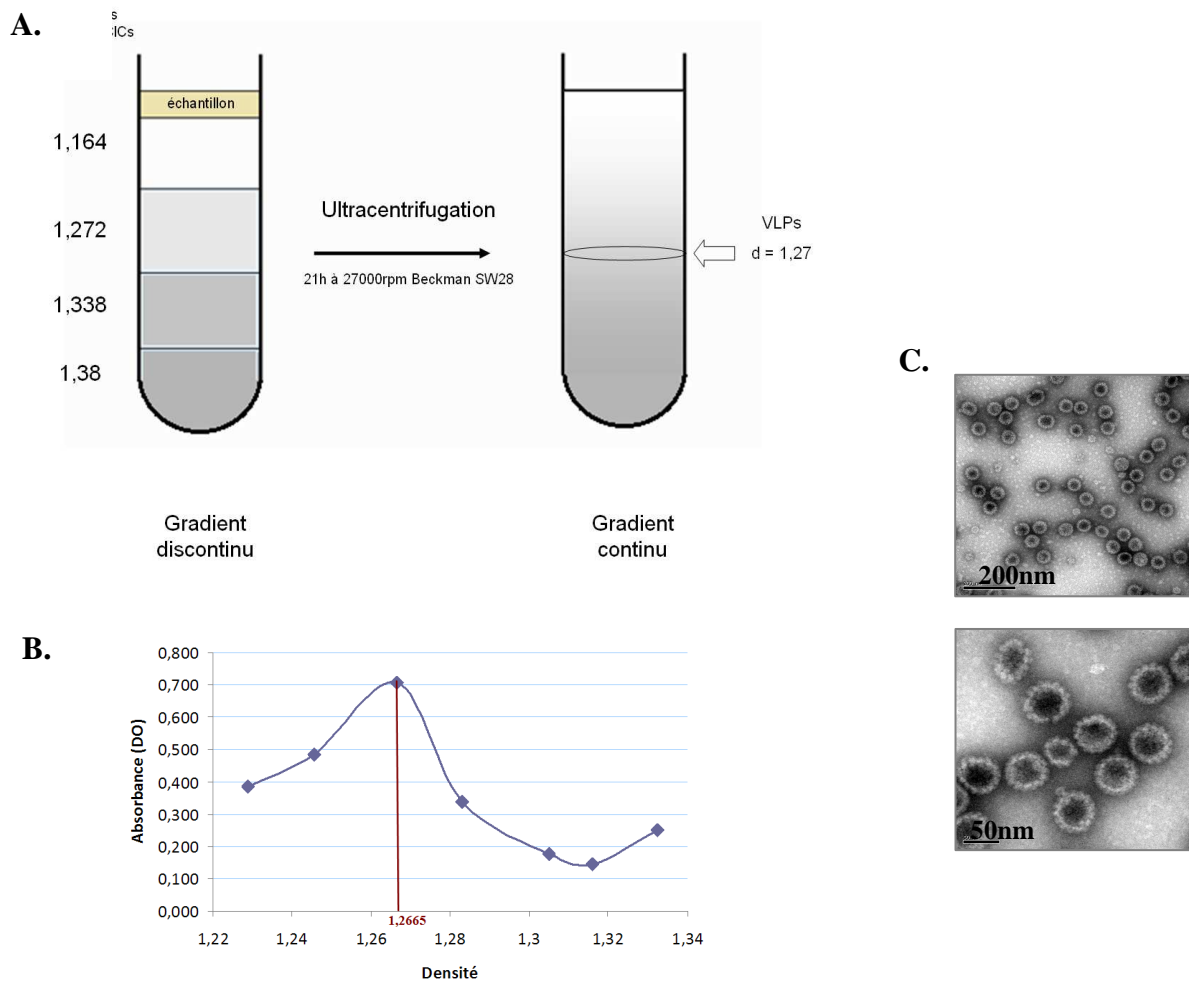


Figure 22 : Purification de VLPs par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium. A.representation schématique de la formation du gradient continu de CICs B. Evaluation des concentrations de protéines L1 dans les différentes fractions du gradient de chlorure de césium par ELISA. Représentation Absorbance (DO) / densité de la fraction. Les losanges sont les données exactes, la courbe symbolise la tendance. C.Observation par Microscopie électronique à transmission (MET) des VLPs purifiées après coloration négative à l'acétate d'uranyl 1,5%

4.3 Observation des VLP en microscopie électronique

Les échantillons sont déposés sur des grilles de cuivre de 400 meshes 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 50.000.

4.4 Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées à l'aide d'un fluoromètre 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 amines N-terminales. 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.

4.5 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 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, 14, 19, 25, 37, 48, 64, 82, 115 et 181 kDa est utilisé (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder Invitrogen).

4.6 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. La membrane est ensuite incubée 1h avec l'anticorps primaire (Camvir-1, monoclonaux 1D24 et F7 produits au laboratoire), dilué dans du tampon TNT-5% lait écrémé. La membrane est lavée 3 fois avec du TNT-5% lait écrémé puis incubée 1h avec l'anticorps secondaire 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 écrémé et deux lavages dans du TNT, la révélation s'effectue avec 10 mL de NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, Promega). La réaction de coloration est arrêtée par un lavage à l'eau distillée.

5. Production des PsV par la technique de dissociation-réassociation et vérification de l'encapsidation.

5.1 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 (Touze and Coursaget, 1998) en y incorporant les modifications décrites par Bousarghin *et al.* (Bousarghin *et al.*, 2009). Les VLP composées des protéines L1 ou L1/L2 des HPV 16 ou 31 sont incubées dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contenant 20 mM de DTT et 1 mM d'EGTA, pendant 30 minutes à température ambiante. A cette étape, 10 µg du plasmide pGL4.13 (SV40/*luc2*) ou le plasmide pCDNA3 HEV (ayant intégré l'ORF2 (112-660) du gène codant la protéine de capsid du virus HEV (Renoux *et al.*, 2008)). sont ajoutés aux VLP dénaturées. La préparation est ensuite diluée par ajout de concentration croissante de CaCl₂ (pour obtenir une concentration finale de 5mM) en présence de 10nM de ZnCl₂. Les PsV sont ensuite dialysés contre du PBS 1 X durant toute la nuit et stockés à 4°C avant utilisation.

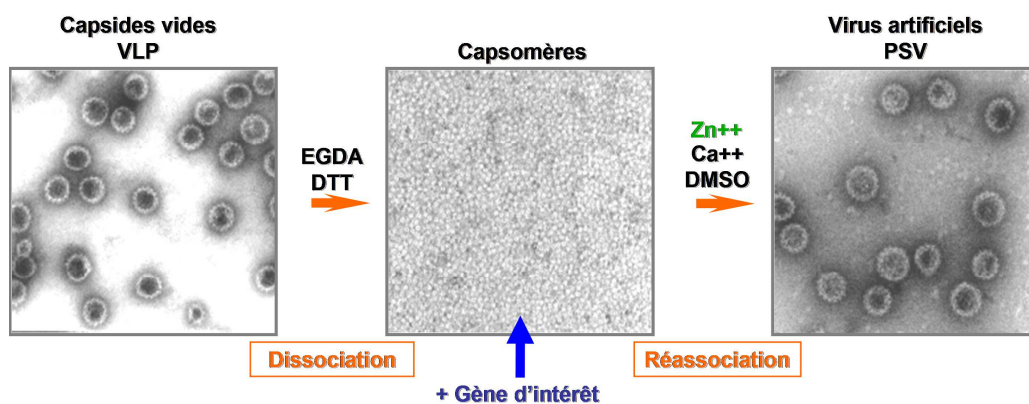


Figure 23 : Représentation schématique de la technique de dissociation-réassociation. Les VLP sont dissociées et sont réassociées en présence du plasmide d'intérêt pour former des PsV.

5.2 Vérification de l'encapsidation du plasmide pGL4.13 par les pseudovirions

Afin d'évaluer le taux d'encapsidation des différents pseudovirions, 10 µg de PsV sont traités pendant 1 h à 37°C avec 10UI de Benzonase (Benzonase®Nuclease, Novagen) dans un tampon de réactionnel (50mM TrisHCl pH8, 10mM MgCl₂ contenant 1mg/mL de BSA). La Benzonase est ensuite inactivé par la chaleur pendant 10 min à 65 ° C en présence de 25 mM d'EDTA. L'ADN plasmidique est desencapsidé en présence de 3% de SDS et 1µg/µL de protéinase K (Invitrogen) pendant 1 h à 56 ° C. L'ADN plasmidique est purifié par traitement volume à volume au phénol/chloroforme (UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1), Invitrogen) et précipité à l'éthanol. L'ADN récupéré est linéarisé en utilisant des enzymes de restriction HindIII. Comme le contrôle, la même quantité d'ADN plasmidique a été traitée de la même manière avec ou sans traitement Benzonase. Les résultats ont été évalués à l'aide d'analyste moléculaire logiciel (Bio-Rad, Ivry / Seine, France) après migration sur gel d'agarose 0,8%. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN protégé.

6. Tests de transfert de gène pour les HPV16 mutants

6.1 Culture Cellulaire

Les cellules sont cultivées en flasques de 75 cm² (TPP, ATGC, Marne la Vallée, France) à 37°C en présence de 5 % de CO₂ dans leur milieu de culture respectifs. Les cellules à 90% de confluence sont mises en suspension 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 7.10⁵ cellules sont ajoutées à 10 mL de milieu complet dans une flasque de 75 cm².

6.2 Transduction des cellules à l'aide des pseudovirions sauvages et chimériques

Les différentes lignées pulmonaires humaines : IB3-1 et S9, lignées cellulaires issues d'épithélium bronchique, respectivement de phénotype CFTR^{-/-} et CFTR restauré, la lignée potentiellement ciliée 16HBe14o-, issue aussi d'épithélium pulmonaire, ainsi que les A549, lignée issue d'un carcinome alvéolaire sont mises en culture afin d'être utilisées pour les expériences de transfert de gène. Les lignées cervicales SiHa, contenant de 100 à 500 copies du génome de l'HPV-16 et HeLa, contenant de 1 à 5 copies du génome de l'HPV-18, sont quant à elles à utilisées comme modèle pour définir le tropisme naturel des PsV.

Chaque PsV est évalué par leur capacité de transduction des différentes lignées cellulaires. Pour ce faire, 10µg de PsV, soit environ 0,3. 10¹² PsV théorique, sont mis en contact avec les cellules contenu dans un puits de P96, soit environ 50 000 cellules, pendant 72h. L'efficacité de transduction des PsV est évaluée par la détection de l'activité luciférase, relative reflétant dépendante de l'expression du gène rapporteur.

6.2.1 Infection des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sontensemencées la veille, en P96, en fonction de leur croissance ; les cellules COS-7, 293FT, HeLa et SiHa sontensemencées à raison de 10 000 cellules par puits, tandis que les cellules IB3-1, S9, A549 le sont à 20 000 cellules par puits et les cellules 16HBe14o-, 293TT, Calu-3 et CaSki à 40 000 cellules par puits dans leur milieu de culture respectif, pour être à 70-80% le jour de l'infection. Le lendemain, l'infection commence lorsque le milieu de culture est remplacé par 100µL de milieu DMEM non supplémenté en SVF contenant 10µg de pseudovirions luciférase. Après 3h d'infection, 100µL de milieu de culture sont ajoutés dans chaque puits pour maintenir l'infection pendant 48h.

6.2.2 Révélation de l'expression luciférase

La capacité de transfert de gène des pseudovirions est évaluée par l'activité luciférase détectée, résultant directement de l'expression du gène rapporteur encapsidé. Après 48h, le milieu est éliminé des puits et 100 µL de solution de révélation (Firefly Luciferase 1 Step Assay Kit, Interchim, France) 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). L'activité de la luciférase firefly, comme pour la plupart des enzymes, suit les cinétiques de Michaelis-Menten. Dans ces conditions (où le substrat D-luciférine et les co-facteurs (ATP, Mg²⁺) présents dans la solution du kit sont en excès), l'émission de lumière liée à la réaction est directement proportionnelle au nombre de molécules d'enzymes de luciferases Firefly exprimées dans les cultures de cellules et l'intensité de lumière émise mesurée par luminomètre (luminoskan acsent, Thermo) est exprimée en rlu (figure 24).



Figure 24 : réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase Firefly.

7. Vaccination par aérosol à l'aide des pseudovirus sauvage et chimériques en modèle rat

7.1 Les dispositifs d'aérosols

Les préparations vaccinales ont été nébulisées avec trois dispositifs différents couramment utilisés en aérosolthérapie humaine : (1) un nébuliseur à jet, LSTAR PARI \ (Pari, Allemagne) en utilisant un compresseur d'air Turboboy Pari (Pari, Allemagne) pour atomiser la solution vaccinale, (2) un nébuliseur ultrasonique LS290 (Systam, France) appliquer des vibrations haute fréquence à travers le vaccin pour produire des gouttelettes et (3) d'un nébuliseur maillage, AeronebSolo \ (Aerogen, Etats-Unis) à l'aide d'un élément de maille avec une action de micro-pompage pour créer des particules d'aérosol (figure 25). Conformément aux recommandations du fabricant en raison du volume résiduel dans les nébuliseurs, 1 ml de vaccin a été chargé dans Aeroneb solo nébuliseur maille, 3 ml a été chargé dans Pari LC Star nébuliseur à jet et 3 ml a été chargé dans LS290 nébuliseur ultrasonique. Aérosol ont été recueillies en phase liquide avec un impacteur (Ace Glass Inc, Vineland, États-Unis) fonctionnant à un débit d'air de 12,6 l / min. La durée totale de fonctionnement n'était pas plus de 20 minutes. Chaque nébuliseur à chaque type de vaccin ont été testés en triple exemplaire.



Figure 25 : Nébuliseurs utilisés lors de l'évaluation de la résistance des PsV d'HPV-31 à l'aérosolisation.

7.2 La mesure du dépôt de l'aérosol dans les poumons de rats

Le microsprayer IA-1B ® est un système de nébulisation composé d'un tube en acier inoxydable est inclinée et qui peut être monté sur une seringue, avec un atomiseur à l'extrémité. Le liquide est poussé à travers la seringue, ce qui entraîne la formation d'un aérosol de gouttelettes 20-30 µm qui permet une biodistribution dans l'ensemble des compartiments pulmonaires. La distribution de l'aérosol dans les poumons de rat a été vérifiée par aérosolisation d'un radio-isotope, le Tc99, montre par visualisation sur γ-caméra une bio distribution de 70 à 80% de l'échantillon dans les poumons de rats (Dr Le Pape) (figure 25).



Figure 26 : Visualisation d'un radio-isotope Tc 99 après aérosol dans les poumons de rat sur gamma camera. Bio distribution de 70% à 80% de l'aérosol dans les poumons.

7.3 Immunisation des rats

Des pseudovirions encapsidant un plasmide codant l'ORF2 (112-660) du gène de la capsid de l'hépatite E (HEV) ont été générés comme décrit ci-dessus (Renoux *et al.*, 2008). Des rattes Sprague-Dawley, âgées de 11 semaines (8 rats par groupe), ont reçu 20 pg de pseudovirions P1DE, P3EF ou WT par aérosolisation intratrachéale l'aide d'un microsprayer IA-1B-2inchs ® (Penn siècle, Philadelphie, PA, Etats-Unis). Le microsprayer IA-1B ® est un système de nébulisation composé d'un tube en acier inoxydable est inclinée et qui peut être monté sur une seringue, avec un atomiseur à l'extrémité. Le liquide est poussé à travers la seringue, ce qui entraîne la formation d'un aérosol de gouttelettes 20-30 µm. L'intubation intra trachéale à l'aide du microsprayer® permet d'administrer 50µL des différents pseudovirions en intra pulmonaire dans les poumons.

Les rats sont anesthésiés par inhalation d'oxygène contenant 5% d'isoflurane (Aerrane ®, Baxter, pharmacie centrale du CHRU bretonneau, Tours). Les rats sous anesthésie générale sont placés sur une table de contention inclinée à 45°C (Workstand rongeurs (Hallowell EMC PN 000A3467 ®; TEM, Bordeaux, France)), et intubés afin d'insérer le microsprayer entre les cordes vocales (figure 27).

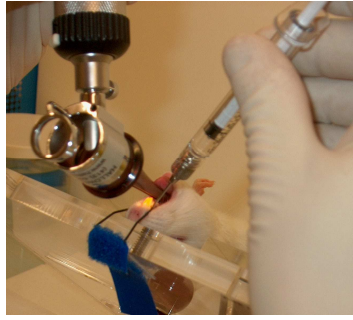


Figure 27 : Contention d'un rat lors d'une aérosolisation intra-trachéale à l'aide du microsprinter®.

Les rates ont été vaccinées par administration pulmonaire aux jours 0, 14 et 28. Deux semaines après la dernière nébulisation, les rattes ont été sacrifiées par une injection intra péritonéale de 0,5 ml de sodium thiopental (Pentotal ®, Abbott, Rungis, France). Après l'ouverture de la cavité abdominale, l'incision de l'aorte abdominale permet le prélèvement de 1,5mL de sang. Le sérum est récupéré après centrifugation à 1000 g pendant 10 min à 25°C. Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) a été réalisé par l'injection de 10 ml de DMEM à travers une canule intra trachéale (1,2 mm de diamètre interne) puis ré-aspiration du liquide de lavage broncho-alvéolaire. Les échantillons (sérum et LBA) ont ensuite été conservés à -20 ° C. La réactivité des sérums et de LBA est ensuite analysée par ELISA (cf. paragraphe 7.2). Toutes les procédures animales ont été réalisées selon des protocoles approuvés et en conformité avec les recommandations pour l'utilisation et le soin des animaux de laboratoire, des expériences ont été approuvées par le comité d'éthique animale régionale (Centre-CREEA Limousin, France).

7.4 Evaluation du transfert de gène par mesure des Ac anti-HEV par ELISA

Les échantillons ont été analysés par ELISA pour les anticorps spécifiques dirigés contre la protéine de capsid de l'HEV, mais aussi contre les protéines L1 sauvage et mutées des vecteurs. Des pseudo particules virales d'HEV ont été produites selon le même protocole que les pseudo particules virales d'HPV-16 sauvage et chimériques.

Une solution de PBS 1X contenant 100ng de VLPs est déposée dans les puits d'une plaque à 96 puits et incubés pendant 18 h à 4°C. Les puits sont ensuite saturés avec 200 µl de PBS 1X contenant 1% de sérum de veau foetal (SVF) pendant 1h à 37°C. Après élimination de la solution de saturation, 100 µL de sérum dilués dans du tampon de dilution du 1/200 au 1/256000 (PBS 10X, SVF 10%, Tween 20 2%) sont ajoutés. Après 1h d'incubation à 37°C et 4 lavages avec du PBS contenant 0,1% de Tween 20, les anticorps fixés spécifiquement sont

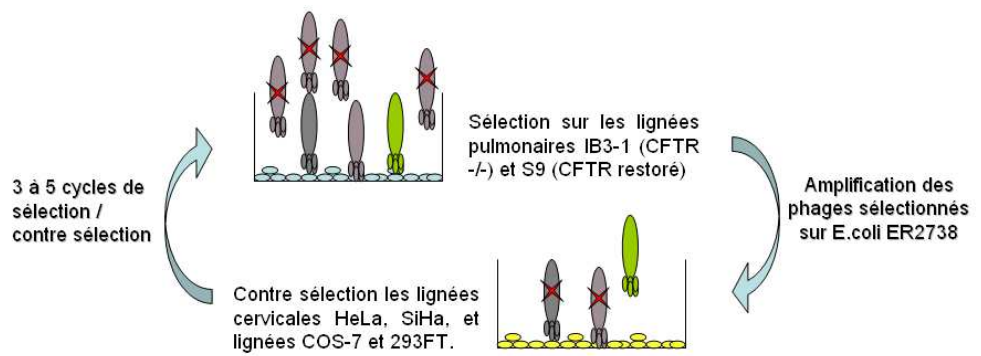
déTECTÉS par l'addition de 100 μ L d'anticorps de mouton anti-IgG de rat couplés à la peroxydase (AAR10P, AbD Serotec) dilués dans le tampon de dilution. Après 1h d'incubation à 37°C et 4 lavages, la réactivité des anticorps est révélée par l'addition de 100 μ L de solution de substrat contenant 1 mg/mL d'o-phénylène diamine et 0,03% d'H₂O₂ dans du tampon citrate (acide citrique 25 mM, Na₂HPO₄ 50 mM). Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, la réaction est arrêtée par addition de 100 μ L d'acide sulfurique 4N. L'absorbance est mesurée à 492 nm (Microplate Reader Model 550, Biorad). Le titre est l'inverse de la dernière dilution donnant une absorbance supérieure à 0,2 (seuil de positivité).

7. 5 L'analyse statistique

Les valeurs sont exprimées comme la moyenne \pm écart-type. L'importance de la différence des contrôles pour chaque condition de test a été dosée par des non-paramétrique de Mann Whitney de chacun des essais jumelés. Une valeur *p* de 0,05 ou moins est considérée comme statistiquement significative.

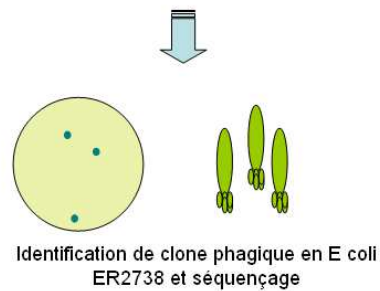
Résultats

A.



B.

1	9
T	P
H	P
N	R
R	A
A	Q
Q	A
A	A
T	G
G	A
A	Q
Q	L
L	L
L	H
T	H
H	S
S	Q
Q	P
P	S
S	H
T	T
T	R
R	P
P	R
R	P
P	P
T	N
N	P
P	P
P	E
E	P
P	E
E	P
Q	G
G	T
T	H
H	H
H	L
L	K
G	T
T	W
W	P
P	L
L	A
A	A
N	T
T	G
G	Q
Q	A
A	T
F	P
P	A
A	T
T	A
A	A
P	H
H	P
P	N
N	R
R	A
A	Q
P	H
H	P
P	N
N	R
R	A
A	Q
P	H
H	P
P	N
N	R
R	A
A	Q
P	H
H	P
P	N
N	R
R	A
A	Q
V	D
D	R
R	L
L	Q
Q	Q
Q	K
V	D
D	R
R	L
L	Q
Q	Q
Q	K
I	S
S	N
N	K
K	D
D	M
M	L
I	S
S	N
N	K
K	D
D	I
I	L
F	S
S	G
G	P
P	S
S	A
A	H
Y	S
S	F
F	S
S	S
S	S
S	S
N	S
S	P
P	S
S	Q
Q	T
T	M
K	W
W	C
C	S
S	A
A	G
A	A
A	I
I	P
P	S
S	A
A	G
G	L
L	T
T	Q
Q	H
H	R
R	Y
G	L
L	T
T	Q
Q	H
H	R
R	Y
S	L
L	P
P	L
L	L
L	P
P	G
L	G
G	A
A	L
L	S
S	H
A	G
G	P
P	L
L	V
V	Q
Q	P



55 clones phagiques identifiés

39 clones efficacement séquencés

31 motifs

C.

	pHi	GRAVY
PHPNRAQ	10.18	-2.300
TGAQLLH	6.40	0.229
VDRLQQK	8.72	-1.557
GLTQHRY	8.75	-1.400
ISNKDIL	5.84	0.157

Figure 28 : A. Représentation schématique de l'identification de motifs spécifiques des cellules pulmonaires B. Alignement des séquences protéiques identifiées par phage display sur les lignées pulmonaires (IB3-1 et S9) et génération du sequence consensus. C. Tableau des propriétés physico-chimique des séquences protéiques identifiées (pHi = potentiel hydrogène isoélectrique) (indice d'hydrophobicité, GRAVY (Kyte and Doolittle, 1982))

1. Identification de nouveaux ligands spécifiques des cellules pulmonaires par la technique de « phage display ».

Les techniques dites « de présentation » (display), comme le Phage Display, permettent de sélectionner *in vitro* des séquences (nucléotidiques ou protéiques) parmi une banque de grande taille (10^6 à 10^{12} clones distincts) en fonction des propriétés d'interaction protéine-protéine, protéine-peptide ou protéine-ADN. Le kit Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library de chez New England Biolabs, utilise une banque de $1,2 \cdot 10^9$ motifs aléatoires de 7 aa contraints par 2 cystéines. Ce motif est fusionné en N-terminale à la protéine mineure de manteau PIII du bactériophage filamenteux M13. Cinq peptides sont présentés par phage.

Ce kit nous a permis de sélectionner des ligands conformationnels potentiellement spécifiques des cellules pulmonaires par sélection des bactériophages sur cellules humaines de lignées pulmonaires (S9, IB3-1) avec contre-sélection sur des cellules de carcinome du col de l'utérus (CasKi, SiHa et HeLa), mais aussi sur d'autres lignées de cellules tumorales (COS-7 et 293FT). Après 3 cycles de sélections et contre-sélections, les phages ont été séquencés. Sur 55 clones étudiés, 39 séquences ont été obtenues dont 31 étaient exploitables avec 21 séquences différentes (figure 28). Aucune ne présente d'homologie avec un ligand connu après alignement sur les bases de données.

La séquence protéique PHPNRAQ a été retrouvée 8 fois, les séquences TGAQLLH, GLTQHRY et VDRLQQK 2 fois. Pour la suite des travaux, seules les séquences PHPNRAQ et VDRLQQK ont été retenues : PHPNRAQ pour sa fréquence de détection (8 fois) et VDRLQQK pour son faible degré d'hydrophobicité avec des charges positives à PH neutre, les membranes cellulaires étant chargées négativement.

2. Modification de la protéine de capsid L1 de l'HPV-16 par insertion d'un motif de ciblage dans les boucles antigéniques DE, EF ou FG.

Afin de modifier le tropisme de l'HPV-16 en les redirigeant vers les cellules épithéliales pulmonaires, la stratégie adoptée a consisté à insérer dans les boucles antigéniques de la L1 des motifs de ciblage pulmonaire : trois motifs décrits dans la littérature, ainsi que les deux motifs identifiés précédemment. Les trois ligands décrits dans la

littérature avaient été également identifiés par la technologie de phage display. Deux de ces ligands, désignés P1 (THALWHT) et P2 (RFDSLKV), ont été sélectionnés sur la base de phages se liant respectivement aux cellules 16HBe14o- et CFT-2, et le troisième, P3 (GHPRQMSHVY), a été sélectionné pour une plus grande efficacité d'internalisation dans les cellules CF-KM4. Les ligands P4 et P5, PHPNRAQ et VDRLQQK, ont été sélectionnés pour leur capacité de liaison aux cellules IB3-1 et S9.

Chaque motif a été inséré dans la boucle antigénique DE (en position 140/141). En plus, les motifs P1 P2 et P3 ont été insérés dans la boucle EF (en position 179/180). Le motif P1 a aussi été inséré dans la boucle FG (en position 283/284) de la protéine L1 de l'HPV-16 (figure 29). Les constructions avec les peptides P1, P2 et P3 étant déjà présentes au laboratoire, seules les constructions insérant les nouveaux peptides P4 et P5 ont été générés.

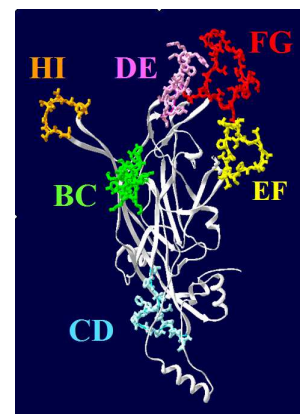
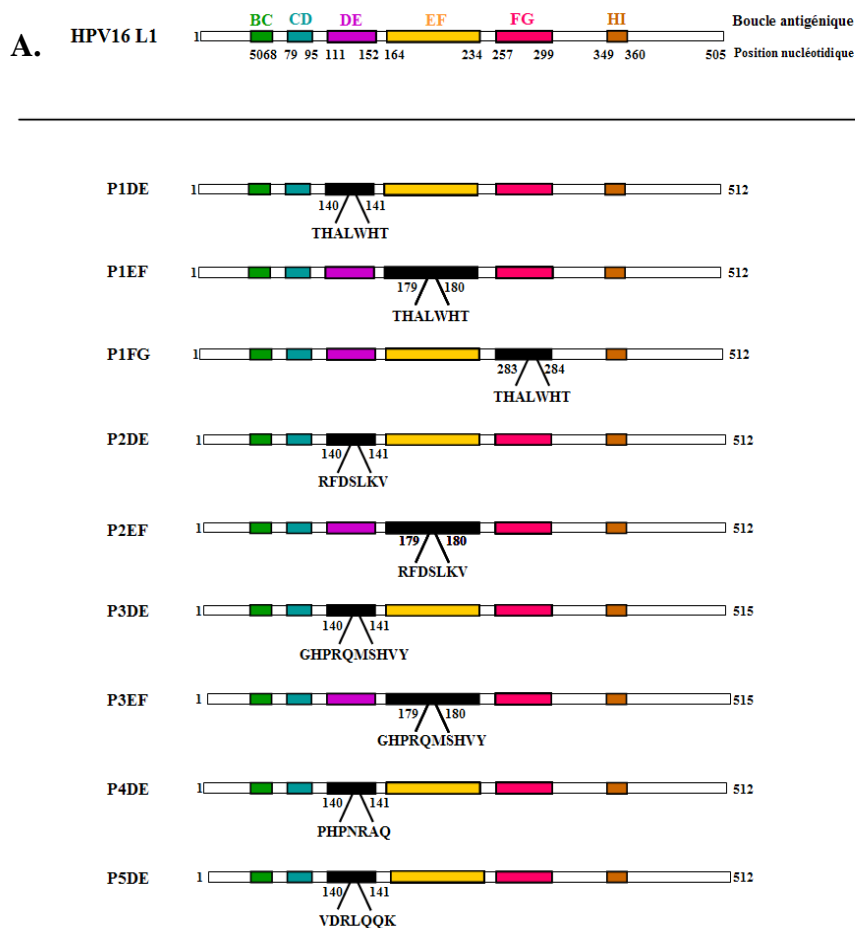


Figure 29 : A. Représentation schématique des différentes constructions des mutants de L1 de l'HPV16. Les peptides P1 (THALWHT), P2 (RFDSLKV), P3 (GHPRQMSHVY), P4 (PHPNRAQ) et P5 (VDRLQQK) ont été insérés dans les boucles DE, EF et EF de la L1 de l'HPV16.B. Représentation schématique de la structure 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 (vert), DE (violet), EF (jaune), FG (rouge) et HI (orange) sont orientées vers l'extérieur de la capside, la boucle CD (bleue) est orientée vers l'intérieur.

2.1. Insertion des nouveaux ligands P4 et P5 dans la boucle DE de l'HPV16 L1

Les séquences des motifs P4 et P5 dans la boucle DE, sont insérées en position 140/141 par mutagenèse dirigée (figure 30).

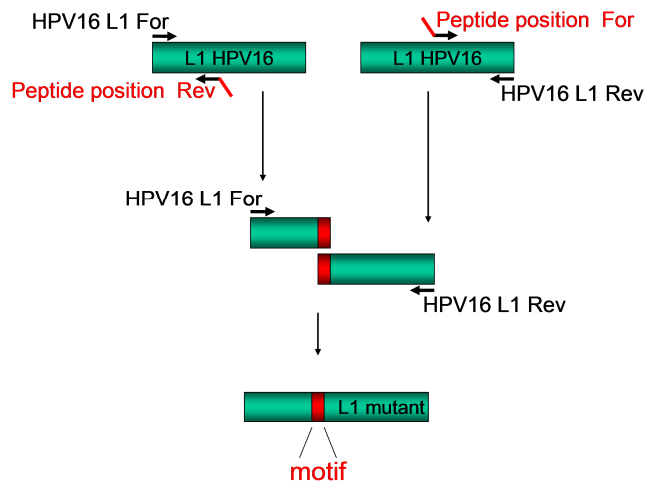


Figure 30 : Principe de la mutagenèse dirigée par PCR Dans la première étape, les amorces vont apporter et insérer le motif à la position voulue et générer des fragments chevauchants amont et aval qui seront assemblés lors de la seconde étape. Les 2 premières réactions concomitantes vont amplifier l'amont et l'aval du gène L1 optimisé de référence à partir de la matrice, le plasmide pGA4 16L1, en ajoutant en 3' et 5', respectivement, la séquence du motif à l'extrémité du fragment généré. Les 2 fragments ont alors leur extrémité chevauchante, le gène chimérique est obtenu lors d'une 3ème réaction de PCR qui va amplifier la totalité de la construction grâce à des amorces extérieures.

La première PCR a généré 2 fragments chevauchants, amont et aval, intégrant le motif en utilisant comme matrice le plasmide pGA4 16L1 ainsi que les couples d'amorces HPV16 L1 For avec P4 140/141 Rev ou P5 140/141 Rev et d'autre part P4 140/141 For ou P5 140/141 For avec HPV16 L1 Rev. Le fragment amont est visualisé pour les mutant HPV16 L1P4DE et HPV16 L1P5DE à environ 400pb (441pb théorique), il code les 140 premiers aa de la protéine ainsi que le motif (figure 31). Le fragment aval est visualisé pour les mutant HPV16 L1P4DE et HPV16 L1P5DE à environ 1000pb (1110pb théorique), il code les 363 derniers aa la protéine ainsi que le motif (figure 31).

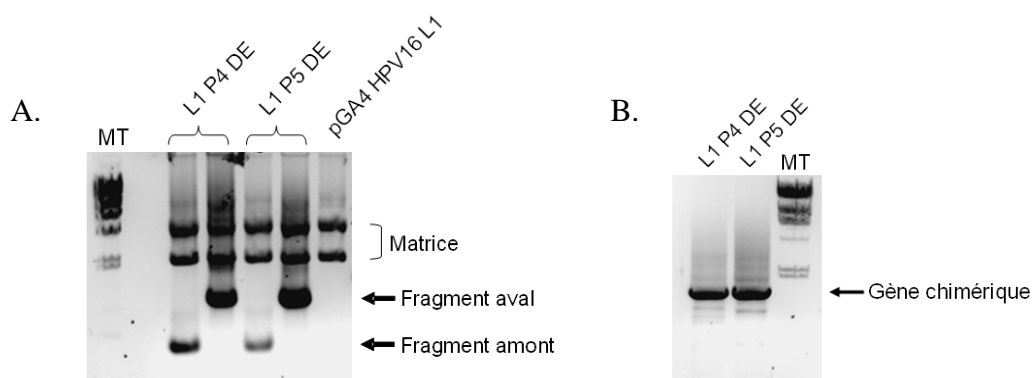


Figure 31 : A. Insertion du motif. B. Génération du gène chimérique (A) et (B) Séparation électrophorétique des produits de PCR sur gel d'agarose 0,8%. MT : marqueur de poids moléculaire λ HindIII DNA.

La seconde étape a permis d'obtenir la séquence L1 mutant en utilisant comme matrice les fragments amont et aval obtenus lors de la première étape de PCR et les amorces HPV16 L1 For/HPV16 L1 Rev. Après 10 cycles de PCR, une bande à environ 1500pb (1656pb théorique) est visualisée, correspondant à la taille attendue des deux séquences L1 chimériques, ayant inséré soit le motif P4 soit le motif P5 en position 140/141, chimérique (figure 31.B.).

Après purification des produits de PCR, les séquences L1 chimériques ont été clonées dans le plasmide pCR®2.1-TOPO afin d'être contrôlées par séquençage (figure 32). La ligation des produits de PCR est faite par TA-cloning. Des bactéries DH5α ont ensuite été transformées avec les différentes ligations L1 P4DE et L1 P5DE et la présence de l'insert a été vérifiée après minipréparation d'ADN plasmidique et digestion par les enzymes BamHI et HindIII (Figure). La présence d'un insert d'une taille de 1500 pb indique l'insertion des séquences de L1 mutant dans le pCR®2.1-TOPO pour les clones pCR2.1/L1P4DE 2 et 3 ainsi que pCR2.1/L1P5DE 1, 2 et 3. Le séquençage n'a pas révélé de mutations non silencieuses non désirées. Les séquences des clones pCR2.1/L1P4DE 2 et pCR2.1/L1P5DE 3 ont été validées et sont retenus pour la suite des expérimentations (résultats non montrés).

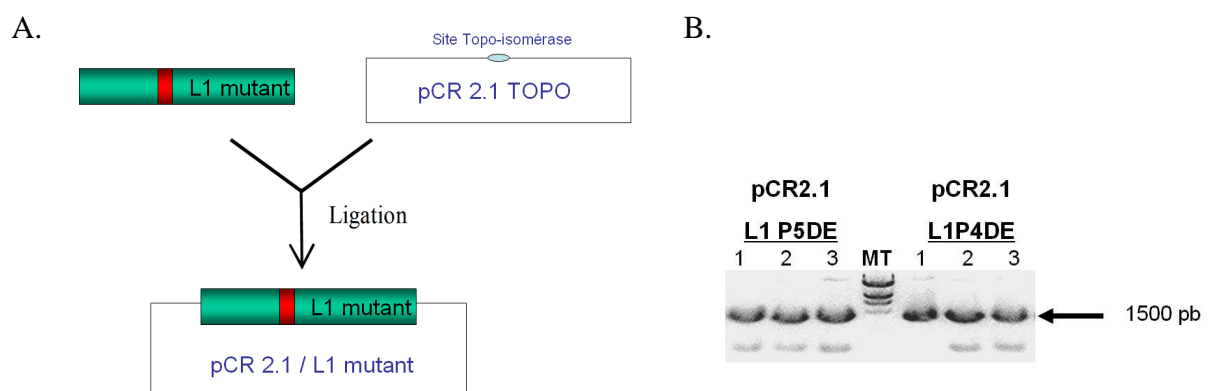


Figure 32 : Construction des plasmides pCR2.1 /L1 P4DE et pCR 2.1 /L1 P5DE.

A. Représentation schématique de la construction des pCR 2.1 /L1 P4DE et pCR 2.1 /L1 P5DE par ligation des produits de PCR des L1 mutants et du plasmide pCR2.1 TOPO par TA cloning. B. Analyse par migration électrophorétique 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 1400 pb. MT : λ *Hind*III

2.2. Production des baculovirus codant les HPV16 L1 P4DE et HPV16 L1 P5DE

Les différentes séquences L1 P4DE et L1 P5DE ont été excisées des plasmides pCR2.1-TOPO afin d'être sous-clonées dans le plasmide pFastBac™ Dual sous le promoteur de la polyhédrine. Les plasmides recombinants ont été utilisés pour générer des baculovirus recombinants selon la procédure de Bac-to-Bac (figure 33. A.).

Dans ce but, les plasmides pCR2.1 /L1 mutant ainsi que le pFastBac™ Dual ont été digérés par les enzymes de restriction BamHI HindIII afin de sortir l'insert (les séquences L1 mutant) et d'ouvrir le vecteur pFastBac™ Dual. Après ligation et transformation, les pFBD recombinants ont été vérifiés par restriction enzymatique (BamHI/HindIII). La présence d'une bande à environ 1500pb, correspondant à la taille de la séquence des L1 chimérique théorique, valide l'insertion des L1 P4DE et L1P5DE dans le pFBD (figure 33 B.).

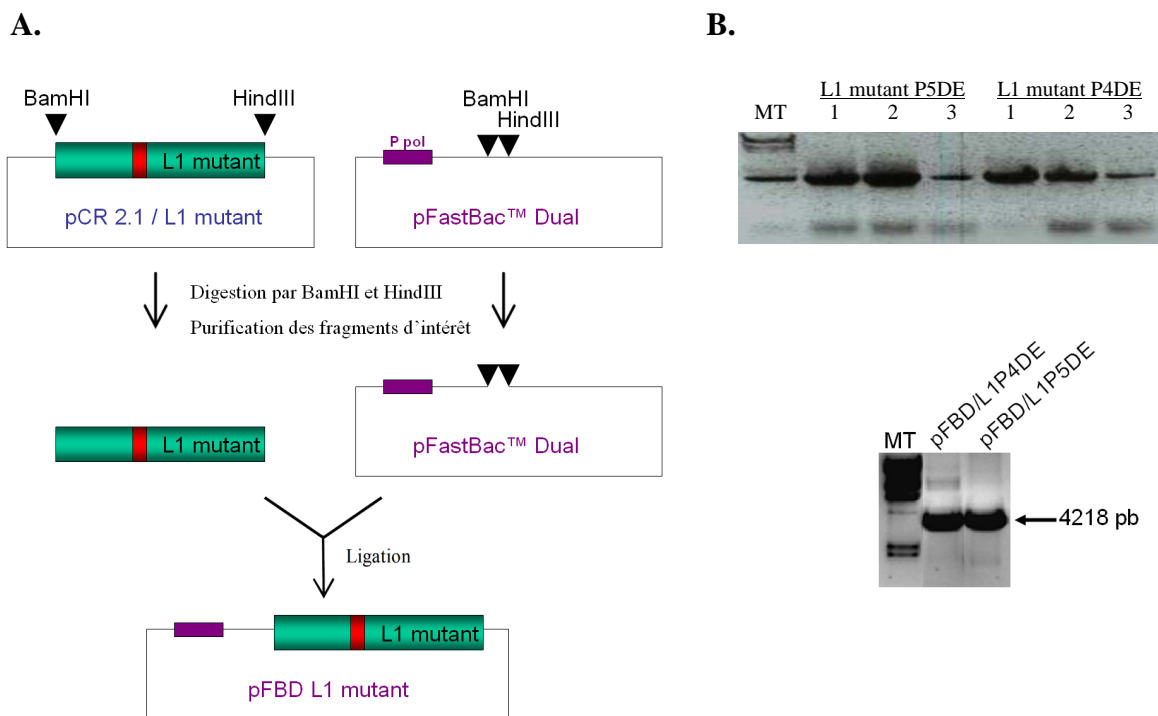


Figure 33: Construction des plasmides pFBD/L1-mutant et transposition dans le Bacmide. A. Représentation schématique du clonage des L1 mutant dans le pFastBac™ Dual aux sites de restriction *BamHI* *HindIII*. B. Vérification de l'insertion des séquences L1 mutant P5DE et P4DE dans le pFastBacDual par séparation électrophorétique sur gel d'agarose après digestion enzymatique (*BamHI/HindIII*) du plasmide recombinant. La bande observée à environ 1500pb étant la séquence L1-P5DE et L1-P4DE. C. Vérification de la transposition des pFBD L1P4DE et pFBD L1P5DE dans le bacmides des DH10Bac™ par PCR et séparation électrophorétique sur gel d'agarose. Les bandes observées à environ 4000pb vérifient la transposition des séquences L1-P5DE et L1-P4DE dans le bacmide. MT : λ *HindIII*.

Des bactéries DH10Bac™ ont été transformées avec les plasmides pFBD/L1P4DE, pFBD/L1P5DE. La transposition des gènes chimères dans les bacmides a été vérifiée par PCR en utilisant les amorces M13/pUC Forward et M13/pUC Reverse. La visualisation d'un fragment d'environ 4000 pb soit 4218pb théorique (2562pb correspondant au pfastBacDual + 1656pb correspondant aux L1 chimériques) confirme cette transposition (figure 33. B.). 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 HPV16 L1 P4DE et HPV16 L1 P5DE en système baculovirus/cellules d'insecte.

3. Production des pseudo-particules virales chimériques.

Les baculovirus des différents mutants insérant les peptides P1, P2 et P3 dans les boucles DE, EF et FG de la protéine L1 de l'HPV16 ont été produits précédemment à mes travaux de thèse. L'efficacité du ciblage vers les cellules pulmonaires 16HBe14O- des VLP chimériques marquées au CFDA-SE a été déterminée par comparaison du pourcentage de cellules fluorescentes avec le pourcentage de cellules HeLa fluorescentes. Seules les VLPs chimériques montrant une efficacité de ciblage supérieure à 2 par rapport aux VLP wt (3,3 à 7,7 fois) ont été choisies pour la suite des études de transduction; c'est-à-dire les mutants HPV16 P1 (DE, EF et FG), P2DE et P3EF.

Les différents baculovirus P1DE, P1EF, P1FG, P2DE, P3EF et L1WT déjà présents au laboratoire et les nouveaux baculovirus P4DE et P5DE ont été amplifiés pour infecter des cellules d'insecte Sf21. Les protéines recombinantes présentes dans la fraction nucléaire des cellules ont été purifiées sur gradient de CICs. Après analyse des fractions du gradient par ELISA, les plus fortes absorbances sont observées dans les fractions entourant de densité 1,27. Les fractions contenant le plus de protéines L1 sont récoltées puis les VLPs recombinantes purifiées par ultracentrifugation.

En microscopie électronique, toutes les protéines L1 chimériques sont capables de s'auto-assembler en VLPs avec un diamètre est d'environ 45 à 50nm (la taille attendue), correspondant à celle des VLPs de L1 sauvages (figure 34). Cependant la quantité de VLPs varie sensiblement d'une production à l'autre et d'un mutant à l'autre. De plus, les VLPs de certains mutants sont de plus ou moins bonne conformation.

Sur cet exemple de production, tous les échantillons montrent un assemblage de L1 en VLP d'environ 45 à 50nm de diamètre, mais aussi la présence de VLPs moins bien formées et de plus petites tailles. Toutefois, la présence de capsomères et de petites VLPs sont aussi observées dans les préparations de VLP wt.

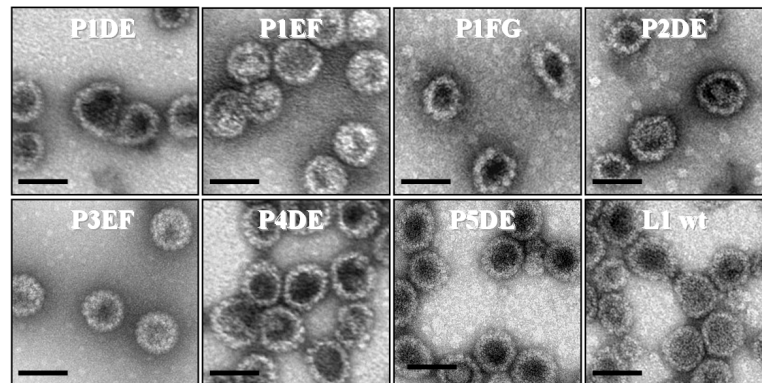


Figure 34 : Observation de VLPs composées des L1 de l'HPV16 sauvage (L1 wt) et chimériques (P1DE, P1EF, P1FG, P2DE et P3EF) en microscopie électronique à transmission après coloration à l'acétate d'uranyle 1,5%.

L'expression des protéines L1 recombinantes a été vérifiée par immuno-empreinte, avec un cocktail d'anticorps primaire composé de l'anticorps monoclonal CAMVIR-1, qui reconnaît un épitope présent sur la boucle EF de la L1 de l'HPV-16 et des l'anticorps monoclonaux H31.1D24 et F7 qui reconnaît un épitope présent sur la boucle FG, cela afin de s'affranchir des modifications antigéniques potentiellement induites par insertions. Après révélation, les bandes correspondant aux différentes L1 sont observées à 60KDa (figure 35).

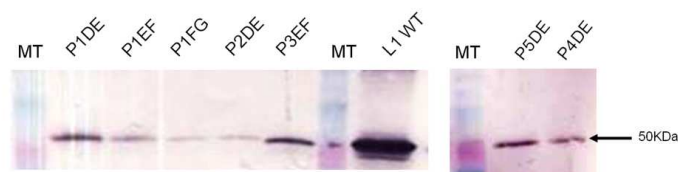










Figure 35: Analyse des productions après purification sur gradient de chlorure de césium des VLPs L1 de l'HPV16 sauvage et chimériques par immuno-empreinte. MT : BenchMark™ Protein Ladder

L'intensité des bandes reflétant la quantité de L1 dans l'échantillon montre une bonne production des protéines sauvages. Dans cette expérience, les bandes correspondant aux L1 chimériques P1DE P3EF et P5DE sont les plus intenses tandis que les L1 chimériques P1EF et P2DE sont les plus faibles. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Afin d'homogénéiser

les quantités de VLPs pour la suite de l'expérimentation, un dosage des protéines totales de chaque échantillon est effectué avec le test Qbit® (µg/mL). La même quantité des protéines est ensuite analysée par immuno-empreinte afin de définir la proportion de protéines L1 dans les différentes productions et ainsi normaliser les quantités de VLPs utilisées par la suite (tableau 4).

Tableau 4 : Normalisation entre immuno-empreinte et dosage protéique au Qbit®. Exemple de production montrant une cohérence entre les bandes visualisées en Immuno-empreinte et le dosage protéique effectué par le Qbit®. Les valeurs numériques obtenues avec le Qbit® sont retenus pour quantifier les L1.

Construction HPV16	Immuno-empreinte	Dosage test Qbit®
HPV16 L1 P1DE		1580 µg/mL
HPV16 L1 P1EF		497 µg/mL
HPV16 L1 P1FG		430 µg/mL
HPV16 L1 P2DE		1058 µg/mL
HPV16 L1 P3EF		1182 µg/mL
HPV16 L1 P4DE		1142 µg/mL
HPV16 L1 P5DE		1200 µg/mL
HPV16 L1 wt		3120 µg/mL

4. Optimisation du transfert de gène

Les premiers essais de pseudo virions avec les VLP chimériques n'avaient pas permis de détecter un transfert de gène dans les lignées pulmonaires. Plusieurs essais visant à améliorer la détection ainsi que d'optimiser le structure du PsV et le transfert de gène ont été comparés.

4.1. Utilisation du plasmide pGL4.13 *luc*

Ainsi, afin d'optimiser de la détection transfert de gène, le plasmide pGL4.13 (SV40/*luc2*), et le plasmide pGL3 (utilisé habituellement au laboratoire), ont été utilisé pour la production de pseudovirions par dissociation-réassociation. Après 48h d'infection de cellules COS-7 par les PsV d'HPV16, l'évaluation de l'expression luciférase a montré une détection du transfert de gène de 3,6 fois supérieure avec l'utilisation du pGL4.13 *luc* par rapport à l'utilisation du pGL3 control (figure 36). Pour la suite des expérimentations, l'évaluation du transfert de gène a été réalisée en utilisant le plasmide pGL4.13 *luc*.

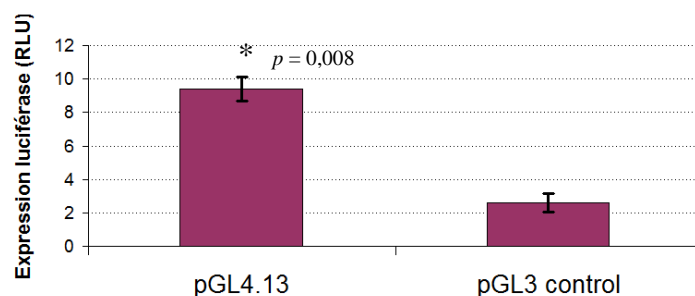


Figure 36 : Comparaison du transfert de gène en cellule COS-7 des PsV d'HPV16 en utilisant les plasmides pGL3 et pGL4.13. L'expression luciférase est exprimée en RLU.

4.2. Incorporation de la L2 dans les pseudovirions

4.2.1. Production des VLP L1/L2

Il avait été montré que des PsVs constitués des L1 et L2 sauvage d'HPV16 ont une meilleure capacité de transfert de gène que les PsVs constitués de L1 seule. Ainsi, afin d'augmenter l'efficacité de transfert des PsVs chimériques, la production des VLPs s'est fait par la co-infection des sf21 par le baculovirus codant la protéine L1 mutée et le baculovirus codant la L2 de l'HPV-16 couplé à la streptactine (L2SA) pour faciliter sa purification.

Après purification sur gradient de chlorure de césium, les différentes productions ont été analysées en microscopie électronique à transmission (figure 37). L'insertion de la L2 conduit à une meilleure conformation des VLPs en comparaison aux VLPs composés seulement des L1, notamment pour les VLPs chimériques P1DE, P1FG et P2DE. Cependant des VLPs de grande taille (P2DE et P5DE) mais aussi de petite taille (P2DE, P3EF, P4DE, P5DE et wt) sont aussi visualisées.

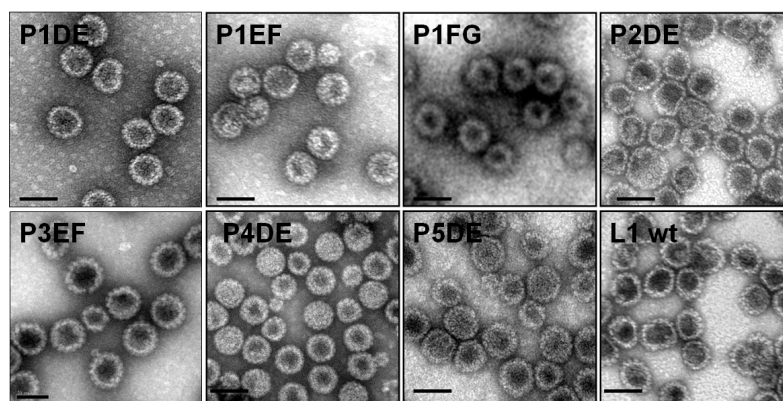


Figure 37 : Observation de VLPs L1/L2 de l'HPV16 composées des L1 sauvage (L1 wt) et chimériques (P1DE, P1EF, P1FG, P2DE et P3EF) en microscopie électronique à transmission après coloration à l'acétate d'uranyle 1,5%. La barre d'échelle représente 50nm.

Afin de vérifier si la protéine L2 est incorporée aux VLPs, des billes de sépharose protéine A préalablement incubées avec des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine L1 de l'HPV16, ont été mis en contact avec 10µg de chaque production. Après immunoprécipitation, la présence de la L2 est analysée par immuno-empreinte (Figure 38). Avec un anticorps polyclonal anti-L2, une bande observée à environ 90KDa concordant avec la taille théorique de la protéine L2SA (la protéine L2 : environ 70 kDa, additionnée de la masse de la streptactine : environ 17,6 kDa). Cependant, en comparant le signal anti-L1 de ces mêmes productions, les différences de concentration de L2 observées par immuno-empreinte coïncident avec les variations de quantités de L1 des différentes préparations (figure 38).

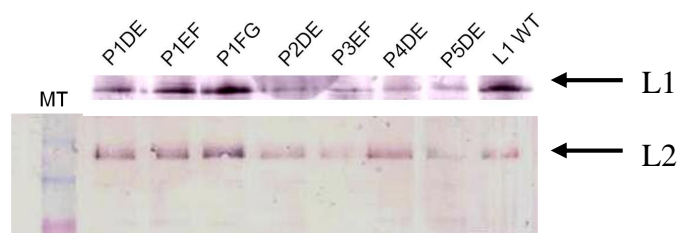


Figure 38 : Analyse des quantités de L2SA dans les productions de VLPs L1/L2 après purification sur gradient de chlorure de césium des VLPs L1 de l'HPV16 sauvage et chimériques par immuno-empreinte. MT : BenchMark™ Protein Ladder

4.2.2 Efficacité de transfert de gène des pseudovirions L1/L2

Après dissociation-réassociation, les PsV HPV16 L1P1DE/L2 ont été évalué pour le transfert de gène sur des cellules COS-7 en comparaison de PsVs L1 mutant seul. Après 48h, l'expression luciférase induite par l'infection de 10µg, 5µg, 2,5µg et 1,25µg de PsVs a montré une augmentation du transfert de gène, d'un facteur 10, 10,2, 12,3 et 60,4 respectivement, pour les PsV intégrant la protéine L2, (figure 39).

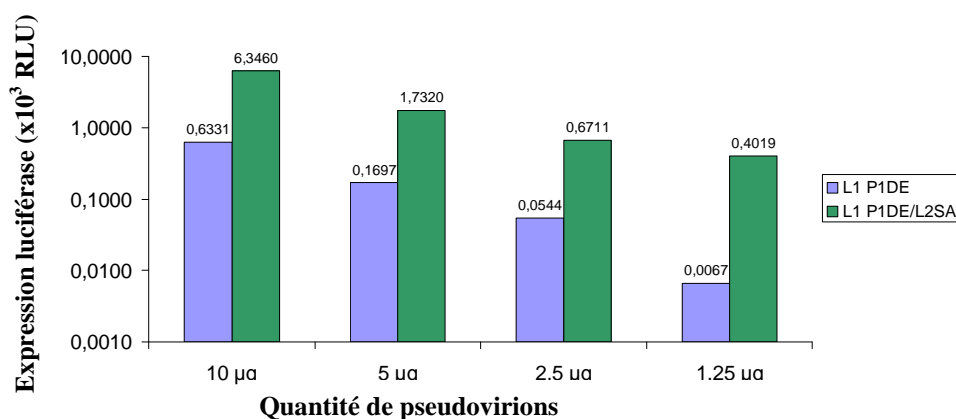


Figure 39 : Evaluation du transfert de gène par les PsV HPV16 L1P1DE et HPV16 L1P1DE/L2 par expression luciférase en cellules COS-7. L'expression luciférase est exprimée en x10³ RLU.

Une augmentation du transfert de gène est aussi observée pour les PsVs L1 P1EF, L1 P1FG, L1 P2DE et L1 P3EF co-exprimant la L2 par rapport au PsVs L1 seule. L'infection de cellules COS-7 par 10µg de PsVs indique, 48h post-infection, une augmentation de l'expression luciférase d'un facteur de 2,2 à 10 pour les PsVs co-exprimant la L2 (tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison du transfert de gène par les PsVs L1 seules et les PsVs L1/L2 chimériques sur cellules COS-7. L'efficacité de transfert gène est évaluée par l'expression de la luciférase (exprimé en 10³RLU) après 48h d'infection par 10µg de PsVs encapsidant le plasmide pGL4.13. NT : non testé. Efficacité : Rapport de l'expression luciférase des PsVs L1/L2 et l'expression luciférase de PsVs L1. Données pour une expérience.

Séquence	Transfert de gène		Augmentation de l'expression luciférase
	PsVs L1	PsVs L1/L2	
P1DE	633	6346	10,0
P1EF	228	2192	9,6
P1FG	438	1987	4,5
P2DE	621	1341	2,2
P3EF	582	2198	3,8
L1 wt	894	7481	8,4

La capacité de transfert de gène des PsVs d'HPV16 sauvage L1/L2 a aussi été évaluée sur différentes lignées : 3 lignées d'origine pulmonaires (IB3-1 (Δ 508-CFTR), S9 (CFTR restauré) et 16HBe14o-), 2 lignées issues d'un cancer du col de l'utérus (HeLa et SiHa) ainsi que 2 lignées rénales (COS-7, 293FT) (figure 40).

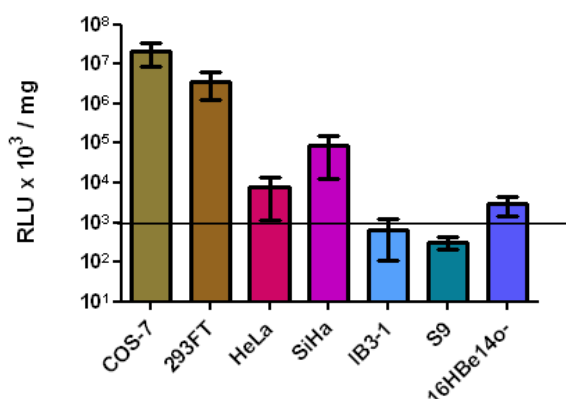


Figure 40 : Evaluation du transfert de gène par expression de la luciférase (RLU x10³ /mg) après infection de PsVs d'HPV16 L1/L2 wt sur les différentes lignées rénales (COS-7, 293FT), cervicales (HeLa, SiHa) et pulmonaires (IB3-1, S9 et 16HBe14o-).

Les lignées pulmonaires sont difficilement transfectable par les PsVs d'HPV16 avec des expressions en luciférase de 0,3 et 0,6 RLU/mg pour les lignées S9 et IB3-1 respectivement, et de 2,8 RLU/mg pour les cellules 16HBe14o-. Pour les cellules dérivées de cancer du col de l'utérus, l'infection avec des PsVs HPV16 L1wt/L2 induit une expression de la luciférase de 8,7 RLU/mg pour la lignée HeLa et 84 RLU/mg, soit 10 fois plus pour la lignée SiHa. Les lignées rénales, qui surexprime fortement l'AgT du SV40 et donc amplifient l'expression des plasmides codant pour la luciférase, montrent des taux d'expression très élevés, allant de 3300 et 21000 RLU/mg respectivement pour les lignées 293FT et COS-7. Pour la suite des expériences, nous avons sélectionné les 3 lignées pulmonaires IB3-1, S9 et 16HBe14o-, ainsi que la lignée cervicale SiHa pour comparaison des efficacité de transfert.

5. Evaluation de l'efficacité du transfert de gène des PsVs chimériques L1/L2 *in vitro* sur les lignées de cellules pulmonaires

Les sept pseudovirions L1 mutant/L2, codant pour la luciférase, ont été produits selon un procédé de dissociation-réassociation. Ces PsVs ont montré qu'ils étaient capables de transfert de gène ; avec des expressions luciférase moyennes de $3,4 \cdot 10^5$ et $2,6 \cdot 10^5$ en cellules rénales 293FT et COS-7 respectivement (résultats non montrés).

Afin d'évaluer si l'insertion de peptides de ciblage augmente les capacités de transfert de gène des PsV dans les cellules de lignées pulmonaires, les pseudovirions ainsi générés ont été étudiés pour leur capacité de transfert de gène sur 3 lignées de cellules des voies aériennes : IB3-1 (Δ 508-CFTR), S9 (CFTR restauré), et 16HBe14o- ; et dans une lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus : SiHa.

Le PsV chimérique L1 P1DE/L2 montre une augmentation du transfert de gène par rapport au PsV wt dans les cellules pulmonaires et cervicales. Cette augmentation est significative dans les lignées IB3-1, S9 et 16HBe14o- avec une expression luciférase de 3522, 1649 et 19660 RLU/mg respectivement par rapport au PsV sauvage (519, 285 et 2870 RLU/mg). Les PsV L1mutant/L2 P1EF, P1FG et P2DE, montre une augmentation non significative dans les 4 lignées sauf pour le mutant P2DE dans la lignée 16HBe14o- qui montre une diminution de l'expression luciférase. Le PsV chimérique L1 P3EF/L2, montre,

comme le mutant P1DE, une augmentation significative du transfert de gène, dans les lignées IB3-1 et S9 avec une expression luciférase respective de 2987 et 1041 RLU/mg par rapport au wt (519 et 285 RLU/mg). Cette augmentation n'est pas retrouvée avec la lignée 16HBe14o-. Le PsV chimérique L1 P4DE/L2 montre une diminution du transfert de gène et ce dans les 4 lignées, cervicale et pulmonaire. Le PsV chimérique L1 P5DE/L2 ne montre pas d'augmentation particulière du transfert de gène dans les IB3-1 et S9. Cependant, une augmentation significative de l'expression luciférase est retrouvée en cellules 16HBe14o- (19460 RLU/mg) par rapport au PsV sauvage (2870 RLU/mg). De plus, une diminution significative de l'expression luciférase est visualisée pour les cellules de tropisme naturel SiHa (1592 RLU/mg) par rapport au PsV sauvage (84685 RLU/mg) (figure 41).

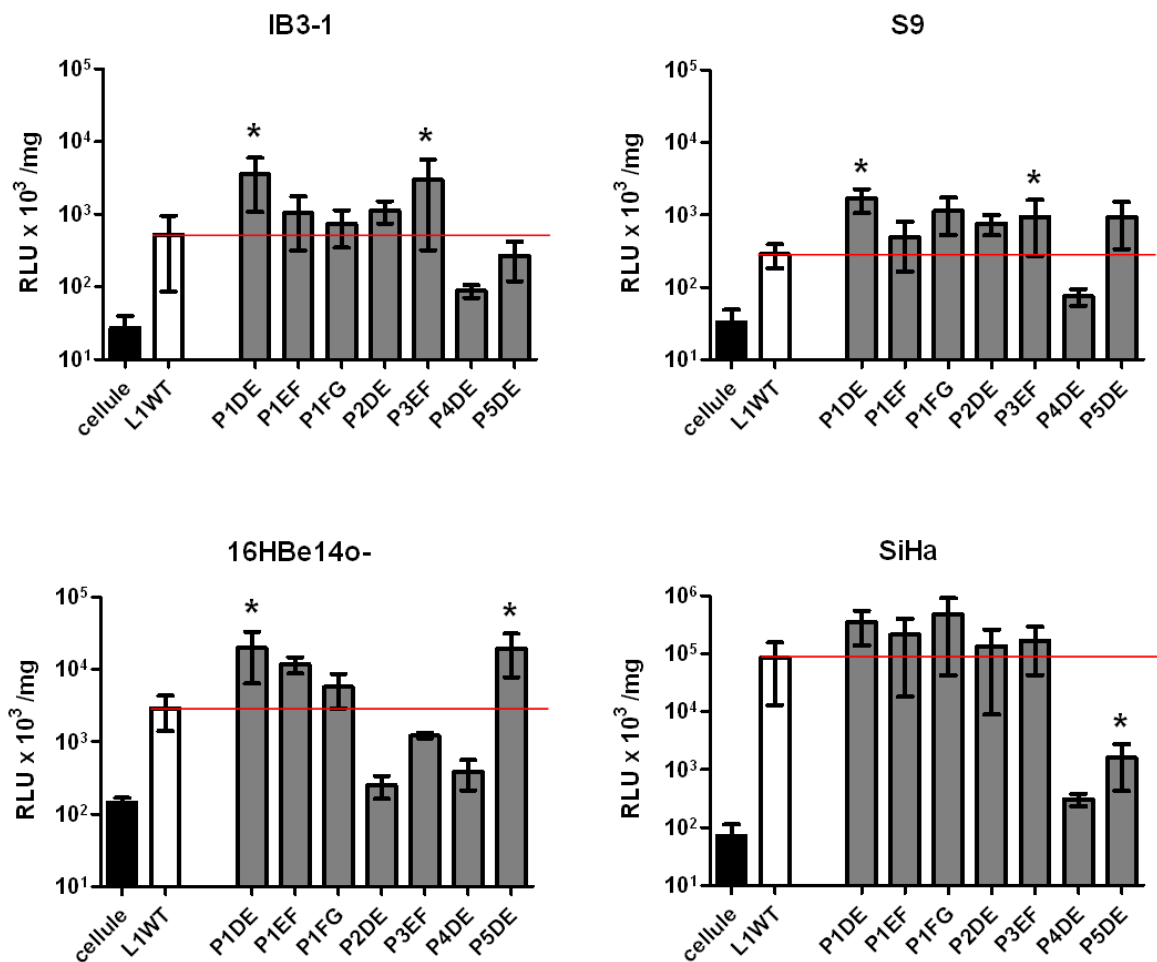


Figure 41 : Evaluation du transfert de gène des différents PsVs chimériques observé dans 3 lignées cellulaires d'origine pulmonaire (IB3-1, S9 and 16HBe14o-) et une lignée cellulaire d'origine cervicale (SiHa) comparé au PsV sauvage. Le transfert de gène est évalué par expression luciférase et exprimé en RLU /mg de protéines.

L'augmentation du transfert de gène a été évaluée en comparant l'expression luciférase calculée entre les pseudovirions mutants et les pseudovirions sauvages pour les 3 lignées pulmonaires. En cellules IB3-1, les ratios d'expression luciférase les plus importants sont calculés avec les PsV L1 P1DE/L2 et L1 P3DE/L2 qui comparé aux PsV wt montrent une augmentation du transfert de gène, respectivement 6,8 et 5,7 fois supérieure. Lorsque la fonction CFTR est restauré, c'est-à-dire en cellules S9, seul le mutant L1 P1DE/L2 montre une augmentation du transfert de gène supérieure à 5 fois (5,8) supérieure aux PsV wt ; les PsV mutants P1FG P3EF et P5DE augmentant le transfert de gène respectivement de 4,9, 3,6 et 3,2 comparé au PsV sauvage. Dans la lignée 16HBe14o-, les PsV L1 P1DE/L2 et L1 P5DE/L2 augmente, respectivement, de 6,9 et 6,8 fois l'expression luciférase évaluée avec les PsV L1wt/L2 (tableau 6).

Tableau 6 : Augmentation du transfert de gène des différents PsV chimériques en cellules pulmonaires IB3-1, S9 et 16HBe (ratio de l'expression luciférase observé avec les PsV mutant comparé aux PsV sauvages) et indice de ciblage pulmonaire. Le ciblage est le ratio entre l'augmentation du transfert de gène observée en cellules pulmonaire et l'augmentation observée en cellules cervicales SiHa. Les valeurs en gras sont les ratios >5.

L1 mutant	Augmentation du transfert de gène en cellules pulmonaires			Ciblage pulmonaire		
	IB3-1	S9	16HBe	IB3-1	S9	16HBe
Wt	1	1	1	1	1	1
P1DE	6.8	5.8	6.9	1.7	1.4	1.7
P1EF	2.0	2.0	4.1	0.8	0.8	1.6
P1FG	1.4	4.9	2.0	0.3	0.9	0.4
P2DE	2.2	2.5	0.1	1.4	1.6	0.1
P3EF	5.7	3.6	0.4	2.9	1.8	0.2
P4DE	0.2	0.3	0.1	46.14	71.7	36.9
P5DE	0.5	3.2	6.8	27.5	172.1	360.6

6. Evaluation *in vitro* du ciblage sur lignée de cellules pulmonaires des PsV chimériques L1/L2

La spécificité cellulaire, ici le ciblage pulmonaire, des différents pseudovirions chimériques a ensuite été évaluée en comparant l'expression de la luciférase entre les lignées

de cellules des voies respiratoires et la lignée SiHa. Le coefficient de ciblage a été calculé pour chaque mutant (le ratio d'expression de la luciférase des pseudovirions mutants à l'expression de luciférase observée avec les pseudovirions sauvage dans les cellules pulmonaires, divisé par le ratio d'expression luciférase pour pseudovirions mutants à l'expression de la luciférase avec les pseudovirions sauvage dans les cellules du col utérin). Le ciblage est faible pour la plupart des mutants (de 0,2 à 2,9), car l'augmentation de l'expression du gène luciférase a été observée à la fois dans les cellules cervicales et les cellules des voies respiratoires. Toutefois, pour les mutants et P4DE P5DE, ciblant les cellules des voies respiratoires humaines a été très fortement augmenté, soit jusqu'à un facteur de 360 observé avec P5DE pseudovirions mutantes dans les cellules 16HBe14o- (tableau 6). Cependant, le mutant P4DE ne montrait pas d'augmentation du transfert de gène. Il convient de noter que cette sélectivité pour les cellules des voies respiratoires est due à la fois à une augmentation de l'expression de la luciférase dans des cellules des voies respiratoires et à une diminution de l'expression de la luciférase dans des cellules SiHa : ce qui est le cas seulement pour le mutant L1 P5DE/L2 en cellules 16HBe14o-.

7. Evaluation de l'efficacité du transfert de gène *in vivo* à l'aide de PsV

Ces études ont été réalisées chez des rates par injection pulmonaire par l'intermédiaire d'aérosol de pseudovirions codant pour la protéine de capsid du virus de l'hépatite E. L'efficacité du transfert de gène est mesurée par la production d'anticorps anti-HEV chez les rates. Si les pseudovirions sont capables de transfecter les cellules cibles de l'animal, la protéine de capsid de l'HEV sera exprimée dans les cellules de l'organe ciblé. La réponse immunitaire systémique en découlant pourra être évaluée. De cette façon, la réponse anti-ORF2 de l'HEV déterminé par ELISA sera le reflet de taux de transfert de gène des PsVs *in vivo*.

7.1. Résistance des PsV de papillomavirus aux procédés de génération d'aérosols

Des études précédentes au laboratoire avaient utilisés les PsV de papillomavirus pour des essais de vaccination en délivrant *in vivo* le gène de l'HEV. Ces études montraient que les PsV d'HPV31 transfectent efficacement les cellules de souris et leur injection conduit à une forte réponse anti-HEV. Notre cible étant une thérapie génique pulmonaire, nous avons

en premier voulu tester ces même PsV afin d'évaluer leur résistance avec différents dispositifs d'aérosolisation utilisée en thérapie pulmonaire humaine.

Pour cela, des VLPs de L1 d'HPV31 ont été utilisées. La production, analysée en microscopie électronique à transmission, montre la production de VLP de bonne conformation et de diamètre attendu (figure 42). Des pseudovirions ont été générés par la technique de dissociation-réassociation, en utilisant le plasmide pGL3 codant la luciférase

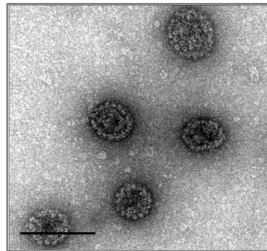


Figure 42 : Observation de VLPs d'HPV31 composées des protéines majeures de capsid L1 en microscopie électronique à transmission après coloration à l'acétate d'uranyle 1,5%. La barre d'échelle représente 50nm.

Les préparations de pseudovirions HPV31 L1/*luc* ont été nébulisées avec trois dispositifs différents couramment utilisés en aérosolthérapie humaine : (1) un nébuliseur à jet, LSTAR PARI couplé à un compresseur d'air Turboboy, (2) un nébuliseur ultrasonique LS290® dont les vibrations haute fréquence produisent des microgouttelettes, (3) un nébuliseur à tamis, l'AeronebSolo® qui génère des particules d'aérosol par action de micro-pompage au niveau d'une membrane perforée. De plus, (4) le microsyringer IA-1B ® utilisé chez le rat et qui génère des microgouttelettes par décompression en bout de seringue, a été testé.

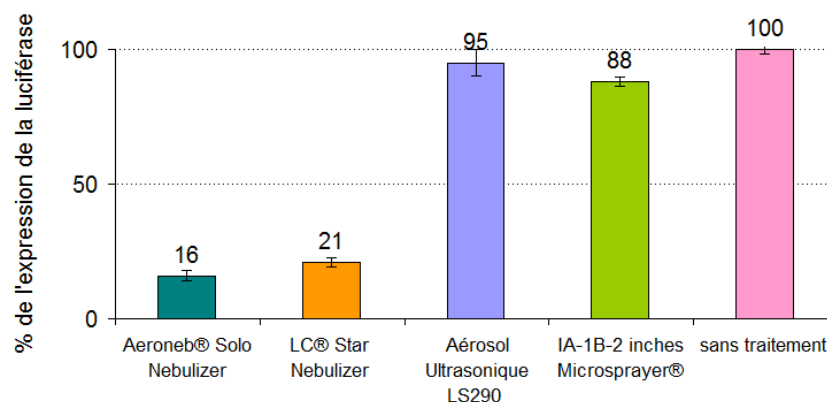


Figure 43: Evaluation de l'effet délétère de différents procédés d'aérosolisation sur la capacité de transfert de gène des pseudovirions HPV31 L1/*luc*. Les valeurs sont exprimés en % de transfert observé avec les pseudovirions sans traitement.

Après nébulisation de 100ng de PsV HPV31/*luc* avec les différents appareils, les aérosols ont été récoltés et déposés sur des cellules 293FT afin de vérifier l'intégrité de leur capacité de transfert de gène après traitement. Les résultats sont rapportés au taux de transfert des PsV sans traitement (figure). Un taux faible de transfert est observé avec l'aeroneb® Solo et le LC® Star Nebulizer (16% et 21% respectivement), tandis que les capacités de transfert de gène des PsV HPV31 L1/*luc* sont conservées (95% et 88%) avec les appareils Aérosol Ultrasonique LS290® et le microsprayer®.

Le microsprayer® pour lequel une faible inactivation des pseudovirions est observée a été choisi pour les expérimentations *in vivo*, celui-ci permettant une manipulation plus aisés sur les rongeurs.

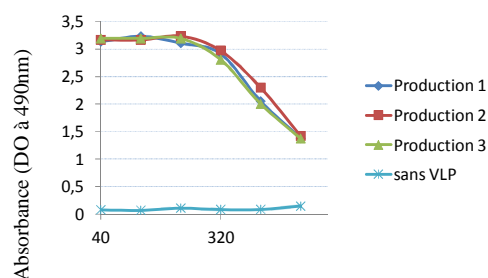
7.2. Efficacité de transfert de gène pulmonaire par vaccination aérosol en modèle rat

Les pseudovirions chimériques choisi pour les expérimentations *in vivo* sont ceux ayant la plus grandes capacité de transfert de gène dans les cellules IB3-1 (CFTR^{-/-}). Ainsi les pseudovirions HPV16 L1mutant/L2 (HPV16 L1 P1DE/P2 et HVP16 L1 P3EF/L2) ainsi que les pseudovirions HPV16 L1wt/L2 ont été générés par dissociation-réassociation encapsidant le plasmide d'expression codant l'ORF2 (112-660) du gène de la capsid de l'hépatite E (HEV). La réponse anticorps dirigée contre HEV témoigne du transfert de gène.

Le protocole expérimental d'immunisation par voie aérosol consiste à immuniser 48 rates avec 20µg de PsV, à l'aide du IA-1B-2inchs-microsprayer®.

7.2.1 Production de VLP d'HEV

Des VLP d'HEV ont été produite en système baculovirus/cellules d'insecte. Apres purification sur gradient de chlorure de césium, la production est analysée par immuno-empainte puis la réactivité des productions de VLP d'HEV ont été testé en dilution de 2 en 2 (du 1/40 au 1/1280^{ème}) par ELISA (figure). L'allure des courbes des différentes productions est identique et les quantités de protéines sont homogènes avec une absorbance à 490nm à 3 de DO. Un décrochage de la courbe est observé aux dilutions 1/320^{ème} : les 3 productions seront utilisées au 1/200^{ème} pour coater nos plaques lors des tests de réactivité anti-HEV par ELISA.



Dilution inverse des productions de VLP

Figure 44 : Observation de VLP d'HEV en microscopie électronique après coloration négative à l'acétate d'uranyl. B. Réactivité des productions de VLP HEV par ELISA en dilution inverse.

7.2.2 Evaluation du transfert de gène par ELISA

Afin d'évaluer la capacité de vectorisation *in vivo*, les différents PsV L1wt/L2, L1 P1DE/L2 et L1 P3EF/L2 ont été aérosolisés dans les poumons de rats. Après 3 instillations, la réponse immunitaire contre le transgène est déterminée afin d'évaluer la capacité de transfert de gène par voie pulmonaire. La réactivité des prélèvements, sérum et lavages broncho-alvéolaires (LBA), ont été analysées par ELISA, vis à vis de VLP d'HEV mais aussi des vecteurs homologues à la préparation vaccinale.

Comme il était difficile de quantifier les pseudovirions, l'augmentation de la réactivité des anticorps anti-HEV a été ajustée à la réponse immunitaire au vecteur (anti-L1) et les titres observés moyens sont la moyenne géométrique des titres de chaque lot de rats. L'analyse des anticorps sériques permet d'observer un titre moyen en anticorps anti-HEV de 21 000 sur les rats immunisés avec les pseudovirions sauvage, HPV16 L1wt/L2/*hev*. Chez les rats immunisés avec les PsV/*hev*, HPV16 L1 P1DE/L2 et P3EF/L2, le titre en anticorps anti-HEV est respectivement de 48 271 et 66 964. L'analyse des lavages broncho-alvéolaires met en évidence des titres plus faibles. En effet, les rats aérosolisés avec les PsV L1 P1DE/L2 et L1 P3EF/L2, ont un titre d'anticorps anti-HEV de 15,2 et 32,5 respectifs, tandis qu'avec les PsV L1wt/L2 le titre moyen est 7,6.

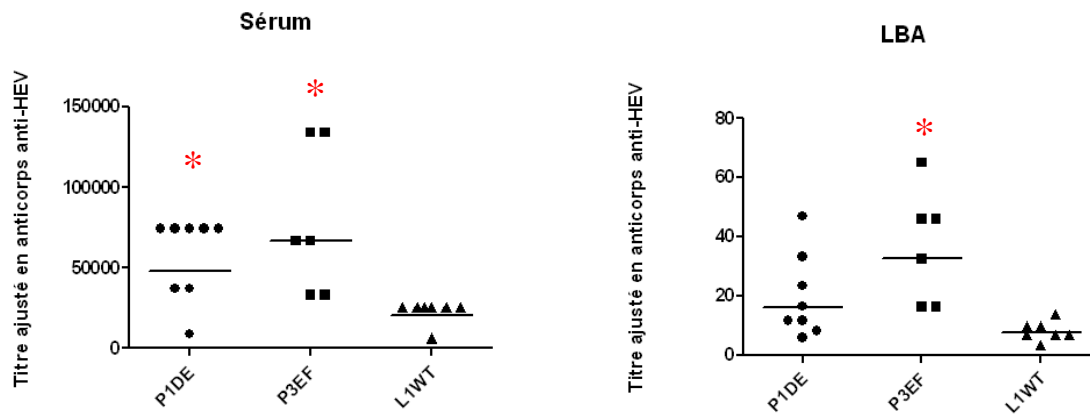


Figure 44 : Titre ajusté d'anticorps IgG anti-HEV observé dans le sérum et les lavages broncho-alvéolaires en fonction des PsV/hev (●P1DE, ■P3EF ou ▲L1wt) instillés par aérosol dans les poumons de rats. Le titre moyen de chaque groupe est représenté par une barre. * représente la significativité à $p=0,05$ par rapport au groupe témoin L1WT.

Les résultats obtenus (tableau 7) indiquent que 2 à 3 fois plus important dans le sérum anticorps anti-HEV s'est produite avec le P1DE et pseudovirions P3EF mutantes, respectivement ($p < 0,0001$ et $p = 0,002$). Les titres d'anticorps IgG anti-HEV étaient beaucoup plus faibles dans les LBA que dans le sérum. Toutefois, une augmentation de 2 à 4 fois a également été observée avec les deux mutants ($p = 0,03$ et $p = 0,003$, respectivement).

Tableau 7 : Réponses anticorps IgG anti-HEV observées dans le sérum et les LBA de rats immunisés par aérosol de PsV d'HPV16 encapsidant le plasmide codant l'ORF2 de l'HEV. (*Les titres en anticorps anti-HEV sont ajustés aux titres en anticorps anti-HPV L1). TGM = titre moyennégométrique

	Pseudovirions	Nb rats	Titre en anticorps anti-HEV*		
			Min - Max	TMG	<i>p</i> value
Sérum IgG	WT	7	$6.4 \cdot 10^3 - 2.5 \cdot 10^4$	$2.1 \cdot 10^4$	-
	P1DE	8	$9.3 \cdot 10^3 - 7.4 \cdot 10^4$	$4.8 \cdot 10^4$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	P3EF	6	$3.3 \cdot 10^4 - 1.3 \cdot 10^5$	$6.7 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^{-3}$
LBA IgG	WT	7	3.5 - 13.9	7.6	-
	P1DE	8	5.9 - 46.9	15.9	0.029
	P3EF	6	16.3 - 65.0	32.5	$3 \cdot 10^{-3}$

Conclusion –Discussion

Conclusion – Discussion

La mucoviscidose est une maladie génétique dont la morbidité est due à 90% aux atteintes pulmonaires. Les traitements développés visent principalement à traiter les symptômes, contribuant ainsi à l'amélioration des conditions de vie des patients, mais ils ne sont pas curatifs. La greffe pulmonaire semble être la seule thérapie curative efficace. Cependant, la faible disponibilité des greffons compatibles conduit à développer d'autres stratégies. La thérapie génique est l'une des solutions envisageables, cependant elle reste dans le domaine de la recherche et son application aux patients n'est pas encore envisagée.

Les pseudovirions de papillomavirus sont capables de transférer des gènes dans de nombreuses lignées cellulaires, en particulier les cellules tumorales. Cependant, le tropisme naturel des papillomavirus est l'épithélium malpighien et ces pseudovirions sont peu efficaces pour les cellules de l'épithélium pulmonaire. L'objectif de ma thèse a été de développer de nouveaux vecteurs de gène dérivés des papillomavirus et avec un tropisme amélioré pour les cellules pulmonaires.

Afin de modifier le tropisme de nos pseudocapsides de papillomavirus, la première étape de mon travail a été d'identifier de nouveaux motifs de ciblage pulmonaire. En utilisant la technique de phage display, 21 motifs peptidiques originaux, non décrits dans la littérature, ont été identifiés par sélection sur les cellules épithéliales bronchique IB3-1 ($\Delta 508CFTR^{-/-}$) et S9 (CFTR restauré). La séquence protéique PHPNRAQ a été identifiée 8 fois, et les séquences TGAQLLH, GLTQHRY et VDRLQQK 2 fois. Parmi ceux-ci, seules les séquences PHPNRAQ et VDRLQQK ont été retenues pour la construction de capsides hybrides du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques. La faible représentativité de chaque séquence que nous avons identifiée est en cohérence avec les résultats d'autres études par phage display. Ainsi, les motifs de ciblage pulmonaire identifiés ; THALWHT (Jost *et al.*, 2001) et RFDSLKV (Vaysse *et al.*, 2000) ont été retrouvés respectivement à une fréquence de 3/20 et 6/24. Le motif GHPRQMSHVY identifié sur les cellules glandulaires de trachée humaine (CFTR $^{-/-}$) CF-KM4 est une séquence consensus (Gaden *et al.*, 2004)(tableau 8).

Tableau 8 : Motifs de ciblage pulmonaire identifiés. Ces motifs ont été indentifiés par phages display par sélection sur cellules d'origine pulmonaire ou trachéale.

Motifs	Fréquence de détection du motif	Technique utilisée	Cellules	références
THALWHT	3/20	Ph.D. TM -7 Phage Display	16HBe14o-HTEo-	Jost <i>et al.</i> , 2001
RFDSLKV	6/24	Phage construit par le laboratoire	CFT-2	Vaysse <i>et al.</i> , 2000
GHPRQMSHVY	Séquence consensus	phage-displayed hexapeptide library	CF-KM4	Gaden <i>et al.</i> , 2004
PHPNRAQ	8/31	Ph.D. TM -C7C	IB3-1	Cette étude
VDRLQOK	2/31	Phage Display	S9	

L'avantage théorique du kit de phage display utilisé dans notre étude est l'utilisation de phages présentant un peptide contraint. La reconnaissance avec les cibles (récepteur) correspondent à une reconnaissance spatiale et non plus à une reconnaissance de séquence et les peptides sélectionnés sont de plus dans une conformation relativement proche de celle qu'ils auront une fois inséré dans une boucle antigénique de l'HPV16.

Afin de modifier le tropisme de nos pseudocapsides, chacun de ces motif, P1 à P3 identifiés dans la littérature et les deux motifs identifiés dans notre étude, P4 et P5, ont été insérés par mutagènes dirigée dans les boucles hypervariables de la protéine majeure de capsid L1 de l'HPV16 (boucles DE, EF et FG) : boucles qui sont connues pour accepter une insertion de courts peptides (Sadeyen *et al.*, 2003; Carpentier *et al.*, 2005; Fleury *et al.*, 2006)

Les différents baculovirus recombinants obtenus ont permis la production des protéines de HPV16 L1 P1DE, P1EF, P1FG, P2DE, P3EF et P4DE P5DE et L1 L1WT, en système baculovirus/cellules d'insecte. Toutes les protéines L1 chimériques sont capables de s'auto-assembler en VLPs avec un diamètre est d'environ 45 à 50nm, correspondant à celui des VLPs de type sauvage. Cependant, les premiers essais de production de pseudovirions avec ces VLP chimériques n'avaient pas permis de détecter un transfert de gène significatif dans différentes lignées pulmonaires.

Afin d'optimiser la détection du transfert de gène, le plasmide pGL4.13 (SV40/luc2), et le plasmide pGL3 (utilisé habituellement au laboratoire) ont été comparés pour la production de pseudovirions par la méthode de dissociation-réassociation (Hanslip *et al.*, 2006; Bousarghin *et al.*, 2009). Une augmentation significative du transfert de gène (3,6 fois) a été observée avec l'utilisation du plasmide pGL4.13 *luc* par rapport au plasmide pGL3. De plus, il avait été montré que des PsVs constitués des protéines L1 et L2 ont une meilleure capacité de transfert de gène que les PsVs constitués de L1 seule (Kawana *et al.*, 1998b; El Mehdaoui *et al.*, 2000). Afin d'augmenter l'efficacité de transfert des PsVs chimériques, la production des VLPs d'HPV16 L1+L2 s'est faite par co-infection des cellules d'insecte par le baculovirus codant la protéine L1 mutée et un baculovirus codant la protéine L2 de type sauvage. Les VLPs chimériques L1+L2 ont une meilleure conformation que les VLPs constituées des L1 seules et leur efficacité de transduction est augmentée. Au total les pseudovirions L1+L2 encapsidant le plasmid pGL4.13 *luc* conduisent à une expression du transgène 3,6 fois supérieur à celle que nous avons avec des pseudovirions L1 encapsidant le plasmid pGL3.

L'efficacité de transduction des pseudovirions chimériques a été étudiée avec 3 lignées de cellules pulmonaires (IB3-1, S9, et 16HBe14o-) en comparaison avec une lignée de cancer du col de l'utérus (SiHa). Une augmentation du transfert de gène dans au moins une des lignées d'origine pulmonaire a été observée à l'exception des PsV intégrant le motif P4. En effet, l'insertion de ce motif conduit à une diminution systématique du transfert dans les cellules pulmonaire mais aussi dans les cellules cervicale. La diminution n'est pas explicable par une diminution de la production des pseudovirions. Le peptide de ciblage pulmonaire P4, avait pourtant été identifié 8 fois sur 31 clones de phages. Il est possible que ce peptide modifie la structure de la VLP, modifiant ainsi ses capacités de fixation aux cellules cibles par d'autres récepteurs, il est également possible que ce peptide modifie le trafic cellulaire des VLPs avec comme résultante une inefficacité du transfert.

L'insertion du motif P1 révèle une augmentation du transfert de gène par rapport au PsV sauvage et ce quelque soit la position de l'insertion. Néanmoins la position dans la boucle DE semble être la position optimale pour un ciblage pulmonaire (augmentation significative de l'expression luciférase dans les 3 lignées pulmonaires de 6 à 7 fois supérieure aux PsV sauvages). Ce motif P1 = THALWHT, pourrait être un ligand permettant de cibler l'ensemble des lignées pulmonaires. En effet il montre une grande affinité pour les cellules

16HBe14o- et HTEo- (Jost *et al.*, 2001) mais aussi IB3-1 et S9 (cette étude). Cependant la spécificité pulmonaire reste à démontrer puisqu'une augmentation du transfert de gène est observée dans l'ensemble des lignées testées, conduisant à un indice de ciblage pulmonaire faible, d'un facteur 1,4 à 1,7.

Le peptide P2 inséré dans la boucle DE ne montre qu'un léger avantage avec une augmentation du transfert de gène jusqu'à 2 fois l'expression luciférase obtenue avec les PsV sauvage. Les PsV chimériques L1 P3EF/L3 conduisent à une augmentation significative du transfert de gène dans les lignées IB3-1 et S9 (5,7 et 3,6 fois) avec un indice de ciblage pulmonaire faible (2,9 et 1,8). L'insertion du motif P5 dans la boucle DE semble conférer un avantage pour le ciblage des cellules bronchiques 16HBe14o-. De façon surprenante, ce peptide sélectionné en cellules IB3-1 et S9 montre une plus forte affinité avec les cellules 16HBe14o- que les cellules IB3-1 et S9. Cette augmentation du taux de transfert en cellules pulmonaires combinée à une diminution du taux de transfert en cellules SiHa est responsable de l'indice de ciblage élevé (27 à 360 suivant les cellules pulmonaires).

Afin d'évaluer les capacités de transfert de gène *in vivo* de nos pseudovirions, nous avons opté pour une stratégie vaccinale, déjà utilisée antérieurement au laboratoire (Renoux *et al.*, 2008). Cette stratégie consiste en une vaccination ADN par des pseudovirions, où la qualité du transfert de gène de nos pseudovirions se mesure par la réponse immunitaire induite contre le transgène (l'ORF2 codant la protéine de capsid du virus HEV). Des études précédentes au laboratoire avaient utilisés les PsV d'HPV31 pour des essais de vaccination en délivrant *in vivo* le gène de capsides de l'HEV. Ces études montraient que les PsV d'HPV31 transduisent efficacement les cellules de souris et leur injection conduit à une forte réponse anti-HEV. Dans le cadre d'une thérapie pulmonaire, la voie d'administration aérosol constitue une alternative prometteuse à la voie systémique. L'administration locale du vecteur permet d'augmenter sa concentration dans l'organe cible : le tractus pulmonaire. Nous avons en premier évalué la résistance des PsV à la nébulisation avec trois dispositifs couramment utilisés en aérosolthérapie humaine : (1) un nébuliseur à jet, LCSTAR PARI, (2) un nébuliseur ultrasonique LS290®, (3) un nébuliseur à tamis, l'AeronebSolo®, et avec un dispositif utilisé chez le rat le microsprayer IA-1B ® (4), appareil qui génère des microgouttelettes par décompression en bout de seringue. Les capacités de transfert de gène des PsV HPV31 L1/*luc* sont conservées (95% et 88%) avec le nébuliseur ultrasonique LS290® et le microsprayer®. Par contre l'aeroneb® Solo et le LC® Star Nebulizer

conduisent une perte importante de l'activité des pseudovirions puisque leur efficacité n'est que respectivement de 16% et 21% de celle observée avec les pseudovirions avant traitement. L'inactivation des vecteurs que nous avons observé avec l'aeroneb® Solo est à rapprocher de la diminution de 60% observée par Roy *et al.* en utilisant un vecteur adénoviral (Roy *et al.*, 2011). De même, Lerondel *et al.* avait observé une chute de 45% de la bioréactivité initiale d'un vecteur adénoviral en utilisant un nébuliseur à jet comme le LC Star (Lerondel *et al.*, 2001). A l'inverse, aucune chute importante de l'efficacité de transfert d'un vecteur AAV n'avait été observée avec le microsprayer® (Beck *et al.*, 2002). Aucune étude n'est connue avec le système de nébulisation ultrasonique LS290. Toutefois, la bonne résistance de nos vecteurs avec ce système est sans doute liée à la réduction du réchauffement pour cet appareil, réchauffement de l'échantillon généralement observé avec les nébulisateurs à ultrasons.

Les capacités de transfert de gène *in vivo* au niveau pulmonaire ont été évaluées avec le type sauvage (HPV-16 L1wt/L2) contenant l'ORF-2 du gène de capsid du virus HEV et les 2 types mutants permettant un meilleur transfert dans les cellules IB3-1 (CFTR^{-/-}) (HPV-16 L1 P1DE/L2 et HPV-16 L1 P3EF/L2). Le microsprayer®, pour lequel aucune inactivation ou destruction notable des pseudovirions avait été observée, a été choisi pour les vaccinations par aérosol. Après 3 injections à 15 jours d'intervalle, les anticorps dirigés contre la capsid de l'HEV (le transgène exprimé dans les cellules pulmonaires), mais aussi les anticorps anti-L1 (la réponse contre le vecteur), ont été analysés par ELISA. La quantification précise des pseudovirions utilisés étant difficile, ainsi que de ceux réellement administrés aux animaux, les réponses contre la protéine exprimée par le transgène (anti-HEV) ont été rapportées aux réponses contre le vecteur (anti-L1). L'analyse des résultats montre que l'insertion des motifs de ciblage conduit à une augmentation de l'efficacité de transfert *in vivo*, s'exprimant par une augmentation significative du titre moyen en anticorps IgG anti-HEV sériques, mais aussi au niveau local dans les lavages broncho-alvéolaire. En effet, une augmentation d'un facteur 2 est observée pour le titre en IgG anti-HEV dans le sérum et dans les lavages broncho-alvéolaires avec les PsV L1 P1DE/L2 par rapport aux PsV sauvage.

De manière inattendue, les PsV L1 P3EF moins performant que les PsV P1DE dans les études *in vitro*, ont une capacité de transduction plus importante que le mutant P1DE *in vivo* avec une augmentation significative du titre d'anticorps anti-HEV sérique et local (de 3 et 4 fois). Les efficacités différentes *in vitro* et *in vivo* ne sont pas surprenantes. Les modèles *in vitro* ne reproduisent pas l'environnement naturel, et les types cellulaires transduites

efficacement qui permettent une réponse immune chez la souris n'ont pas été identifiés, et ne sont peut-être pas de type pulmonaire.

Les augmentations de transfert de gène observées avec les mutants réalisés peuvent être considérées comme insuffisantes compte tenu des taux de transfert observé avec d'autres vecteurs (type adénovirus, AAV, et rétrovirus). Néanmoins ces capacités de transfert sont plus importantes que celles décrites dans d'autres études. En effet, Jost *et al.* ont observé une augmentation de 6 fois du transfert dans les cellules 16HBe14o- avec un vecteur lipidique intégrant le motif P1 (THALWHT) (Jost *et al.*, 2001). Dans notre étude les capacités de transfert de gène sont augmentées par un facteur de 6,9 fois par rapport au wt dans les mêmes cellules. De même, l'absence d'augmentation de l'efficacité de transfert observé avec le motif P2 = RFDSLKV dans la lignée 16HBe14o- et la faible augmentation (2,2 à 2,5 fois) dans les lignées IB3-1 et S9, est similaire aux résultats obtenus par Vaysse *et al.* (2000) avec ce motif dans les cellules CFT-2, NT-1, NIH-3T3, ECV-304 (augmentation de 1,1 à 1,25 fois).

Les études portant sur le motif P3 (GHPRQMSHVY) montrent une augmentation de la transduction jusqu'à 3 fois avec un Adénovirus 5 modifié par ce ligand sur les cellules CF KM4, sans spécificité de ciblage mais avec une chute de la productivité des pseudovirions de 10 fois (Gaden *et al.*, 2004). Les pseudovirions HPV16 P3EF que nous avons obtenus permettent d'une part une augmentation de 5,7 fois et 3,6 fois du transfert de gène en cellules IB3-1 et S9 respectivement par rapport aux pseudovirions wt et d'autre part d'obtenir un ciblage important vers les cellules pulmonaires utilisées.

En conclusion, nous avons réalisé des pseudovirions chimériques de papillomavirus qui possèdent une efficacité de transduction plus grande dans les cellules pulmonaires. Toutefois, l'augmentation de transfert est limitée (2 à 6 fois) aussi bien *in vitro* sur des cellules pulmonaires humaine, que dans un modèle *in vivo* chez le rat. Pour une application en thérapie génique humaine il est nécessaire d'augmenter ce transfert par 100 ou 1000. Cette augmentation faible de l'efficacité est toutefois du même ordre que celle obtenue avec d'autres vecteurs viraux et d'autres systèmes de ciblage. Cependant, si une application en thérapie génique de la mucoviscidose n'est pas envisageable avec les vecteurs HPV actuels, les résultats obtenus *in vivo* chez le rat montrent qu'une application en vaccination pulmonaire est possible. L'augmentation du transfert à l'aide avec les mutants d'HPV doit permettre une réponse immune plus forte, ou doit permettre d'utiliser des doses plus faibles

de vecteur. En particulier, il serait intéressant d'évaluer le mutant P5DE qui est le plus performant in vitro pour transduire les cellules pulmonaires pour ses capacités en vaccination par aérosol par rapport au type sauvage.

Références bibliographiques

- Aitken, M.L., Moss, R.B., Waltz, D.A., Dovey, M.E., Tonelli, M.R., McNamara, S.C., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., Carter, B.J., Reynolds, T.C., 2001. A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum. Gene Ther.* 12, 1907–1916.
- Alton, E.W., Middleton, P.G., Caplen, N.J., Smith, S.N., Steel, D.M., Munkonge, F.M., Jeffery, P.K., Geddes, D.M., Hart, S.L., Williamson, R., 1993. Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nat. Genet.* 5, 135–142.
- Alton, E.W., Stern, M., Farley, R., Jaffe, A., Chadwick, S.L., Phillips, J., Davies, J., Smith, S.N., Browning, J., Davies, M.G., Hodson, M.E., Durham, S.R., Li, D., Jeffery, P.K., Scallan, M., Balfour, R., Eastman, S.J., Cheng, S.H., Smith, A.E., Meeker, D., Geddes, D.M., 1999. Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* 353, 947–954.
- Amaral, M.D., Kunzelmann, K., 2007. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 334–341.
- ANDERSEN, D.H., HODGES, R.G., 1946. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72, 62–80.
- Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E., Welsh, M.J., 1991a. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science (New York, N.Y.)* 253, 202–5.
- Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E., Welsh, M.J., 1991b. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253, 202–205.
- Bangari, D.S., Mittal, S.K., 2006. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther* 6, 215–226.
- Bastos, R., Panté, N., Burke, B., 1995. Nuclear pore complex proteins. *Int. Rev. Cytol.* 162B, 257–302.
- Beck, S.E., Laube, B.L., Barberena, C.I., Fischer, A.C., Adams, R.J., Chesnut, K., Flotte, T.R., Guggino, W.B., 2002. Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of Rhesus macaques. *Mol. Ther.* 6, 546–554.
- 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.
- Becq, F., 2003. [CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 10 Suppl 2, 325s–332s.
- Bellon, G., Michel-Calemard, L., Thouvenot, D., Jagneaux, V., Poitevin, F., Malcus, C., Accart, N., Layani, M.P., Aymard, M., Bernon, H., Bienvenu, J., Courtney, M., Döring, G., Gilly, B., Gilly, R., Lamy, D., Levrey, H., Morel, Y., Paulin, C., Perraud, F., Rodillon, L., Sené, C., So, S., Touraine-Moulin, F., Pavirani, A., 1997. Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 8, 15–25.
- 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.
- Ben-Gary, H., McKinney, R.L., Rosengart, T., Lesser, M.L., Crystal, R.G., 2002. Systemic interleukin-6 responses following administration of adenovirus gene transfer vectors to humans by different routes. *Mol. Ther.* 6, 287–297.

- Bernard, C., Mougin, C., Bettinger, D., Didier, J.M., Lab, M., 1994. Detection of human papillomavirus by in situ polymerase chain reaction in paraffin-embedded cervical biopsies. *Mol. Cell. Probes* 8, 337–343.
- Bernard, H.-U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. zur, 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., Götte, 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.
- Bossis, I., Roden, R.B.S., 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., Touze, A., Gaud, G., Iochmann, S., Alvarez, E., Reverdiau, P., Gaitan, J., Jourdan, M.-L., Sizaret, P.-Y., Coursaget, P.L., 2009. 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.
- 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., 2005. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol. Med.* 119, 445–462.
- Buckley, S.M.K., Howe, S.J., Sheard, V., Ward, N.J., Coutelle, C., Thrasher, A.J., Waddington, S.N., McKay, T.R., 2008. Lentiviral transduction of the murine lung provides efficient pseudotype and developmental stage-dependent cell-specific transgene expression. *Gene Ther.* 15, 1167–1175.
- Cao, H., Yang, T., Li, X.-F., Wu, J., Duan, C., Coates, A.L., Hu, J., 2011. Readministration of helper-dependent adenoviral vectors to mouse airway mediated via transient immunosuppression. *Gene Ther.* 18, 173–181.
- Caplen, N.J., Kinrade, E., Sorgi, F., Gao, X., Gruenert, D., Geddes, D., Coutelle, C., Huang, L., Alton, E.W., Williamson, R., 1995. In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using the cationic liposome DC-Chol/DOPE. *Gene Ther.* 2, 603–613.
- Carlou, M., Toelen, J., Van der Perren, A., Vandenberghe, L.H., Reumers, V., Sbragia, L., Gijssbers, R., Baekelandt, V., Himmelreich, U., Wilson, J.M., Deprest, J., Debyser, Z., 2010. Efficient gene transfer into the mouse lung by fetal intratracheal injection of rAAV2/6.2. *Mol. Ther.* 18, 2130–2138.
- Carpentier, G.S., Fleury, M.J.J., Touzé, 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.

- Carroll, T.P., Morales, M.M., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Flotte, T.R., Cutting, G.R., Guggino, W.B., 1995. Alternate translation initiation codons can create functional forms of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 270, 11941–11946.
- Castellani, S., Di Gioia, S., Trotta, T., Maffione, A.B., Conese, M., 2010. Impact of lentiviral vector-mediated transduction on the tightness of a polarized model of airway epithelium and effect of cationic polymer polyethylenimine. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 103976.
- 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.
- 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, 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.
- Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O’Riordan, C.R., Smith, A.E., 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827–34.
- Childers, M., Eckel, G., Himmel, A., Caldwell, J., 2007. A new model of cystic fibrosis pathology: lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. *Med. Hypotheses* 68, 101–112.
- 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.
- Combata, A.L., Touzé, A., Bousarghin, L., Sizaret, P.Y., Muñoz, 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.
- Conese, M., Ascenzioni, F., Boyd, A.C., Coutelle, C., De Fino, I., De Smedt, S., Rejman, J., Rosenecker, J., Schindelbauer, D., Scholte, B.J., 2011. Gene and cell therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside. *J. Cyst. Fibros.* 10 Suppl 2, S114–128.
- Copreni, E., Nicolis, E., Tamanini, A., Bezzetti, V., Castellani, S., Palmieri, L., Giri, M.G., Vella, A., Colombatti, M., Rizzotti, P., Conese, M., Cabrini, G., 2009. Late generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human airway epithelial cells. *Virus Res.* 144, 8–17.
- Copreni, E., Penzo, M., Carrabino, S., Conese, M., 2004. Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. *Gene Ther.* 11 Suppl 1, S67–75.
- Cornet-Boyaka, E., Hong, J.S., Berdiev, B.K., Fortenberry, J.A., Rennolds, J., Clancy, J.P., Benos, D.J., Boyaka, P.N., Sorscher, E.J., 2009. A truncated CFTR protein rescues endogenous DeltaF508-CFTR and corrects chloride transport in mice. *FASEB J.* 23, 3743–3751.
- Crystal, R.G., Jaffe, A., Brody, S., Mastrangeli, A., McElvaney, N.G., Rosenfeld, M., Chu, C.S., Danel, C., Hay, J., Eissa, T., 1995. A phase 1 study, in cystic fibrosis patients, of the safety, toxicity, and biological efficacy of a single administration of a replication deficient, recombinant adenovirus carrying the cDNA of the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the lung. *Hum. Gene Ther.* 6, 643–666.
- Crystal, R.G., McElvaney, N.G., Rosenfeld, M.A., Chu, C.S., Mastrangeli, A., Hay, J.G., Brody, S.L., Jaffe, H.A., Eissa, N.T., Danel, C., 1994. Administration of an adenovirus

- containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 8, 42–51.
- Culp, T.D., Budgeon, L.R., Christensen, N.D., 2006. 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., 2006. 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.
- Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics [WWW Document], 2012. . URL <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>
- Darshan, M.S., Lucchi, J., Harding, E., Moroianu, J., 2004. The 12 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J. Virol.* 78, 12179–12188.
- Davis, P.B., 2006. Cystic fibrosis since 1938. *American journal of respiratory and critical care medicine* 173, 475–82.
- 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., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27.
- Deterding, R.R., Lavange, L.M., Engels, J.M., Mathews, D.W., Coquillette, S.J., Brody, A.S., Millard, S.P., Ramsey, B.W., 2007. Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosol tetrasodium in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 362–369.
- DI SANT'AGNESE, P.A., DARLING, R.C., PERERA, G.A., SHEA, E., 1953. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12, 549–563.
- Dickey, D.D., Excoffon, K.J.D.A., Koerber, J.T., Bergen, J., Steines, B., Klesney-Tait, J., Schaffer, D.V., Zabner, J., 2011. Enhanced sialic acid-dependent endocytosis explains the increased efficiency of infection of airway epithelia by a novel adeno-associated virus. *J. Virol.* 85, 9023–9030.
- 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.
- Dorin, J.R., Farley, R., Webb, S., Smith, S.N., Farini, E., Delaney, S.J., Wainwright, B.J., Alton, E.W., Porteous, D.J., 1996. A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction. *Gene Ther.* 3, 797–801.
- Durieu, I., Jossierand, R.N., 2008. [Cystic fibrosis in 2008]. *La Revue de médecine interne / fondée ... par la Société nationale française de médecine interne* 29, 901–7.
- Edelman, A., 2005. Différents aspects de régulation du transport ionique transépithélial dans le contexte de la mucoviscidose: Mécanismes d'absorption et de sécrétion, protéine CFTR., MTP. *Médecine thérapeutique pédiatrie* 8, 135–149.

- 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.
- 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.
- Farber, S., Shwachman, H., Maddock, C.L., 1943. PANCREATIC FUNCTION AND DISEASE IN EARLY LIFE. I. PANCREATIC ENZYME ACTIVITY AND THE CELIAC SYNDROME. *J. Clin. Invest.* 22, 827–838.
- 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., 4th, Roden, R.B.S., 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.
- Felgner, P.L., 1997. Nonviral strategies for gene therapy. *Sci. Am.* 276, 102–106.
- Ferrari, S., Griesenbach, U., Iida, A., Farley, R., Wright, A.M., Zhu, J., Munkonge, F.M., Smith, S.N., You, J., Ban, H., Inoue, M., Chan, M., Singh, C., Verdon, B., Argent, B.E., Wainwright, B., Jeffery, P.K., Geddes, D.M., Porteous, D.J., Hyde, S.C., Gray, M.A., Hasegawa, M., Alton, E.W.F.W., 2007. Sendai virus-mediated CFTR gene transfer to the airway epithelium. *Gene Ther.* 14, 1371–1379.
- Ferrari, S., Griesenbach, U., Shiraki-Iida, T., Shu, T., Hironaka, T., Hou, X., Williams, J., Zhu, J., Jeffery, P.K., Geddes, D.M., Hasegawa, M., Alton, E.W.F.W., 2004. A defective nontransmissible recombinant Sendai virus mediates efficient gene transfer to airway epithelium in vivo. *Gene Ther.* 11, 1659–1664.
- 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.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.
- 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., Müller, M., Streeck, R.E., Sapp, M., 2004. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J. Virol.* 78, 5546–5553.
- Flotte, T.R., Carter, B.J., 1997. In vivo gene therapy with adeno-associated virus vectors for cystic fibrosis. *Adv. Pharmacol.* 40, 85–101.
- Flotte, T.R., Fischer, A.C., Goetzmann, J., Mueller, C., Cebotaru, L., Yan, Z., Wang, L., Wilson, J.M., Guggino, W.B., Engelhardt, J.F., 2010. Dual reporter comparative indexing of rAAV pseudotyped vectors in chimpanzee airway. *Mol. Ther.* 18, 594–600.
- Gaden, F., Franqueville, L., Magnusson, M.K., Hong, S.S., Merten, M.D., Lindholm, L., Boulanger, P., 2004. Gene transduction and cell entry pathway of fiber-modified adenovirus type 5 vectors carrying novel endocytic peptide ligands selected on human tracheal glandular cells. *J. Virol.* 78, 7227–7247.
- Gadsby, D.C., Vergani, P., Csanády, L., 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440, 477–483.

- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [WWW Document], 2012. . URL <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
- GIBSON, L.E., COOKE, R.E., 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23, 545–549.
- Gill, D.R., Smyth, S.E., Goddard, C.A., Pringle, I.A., Higgins, C.F., Colledge, W.H., Hyde, S.C., 2001. Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther.* 8, 1539–1546.
- Gill, D.R., Southern, K.W., Mofford, K.A., Seddon, T., Huang, L., Sorgi, F., Thomson, A., MacVinish, L.J., Ratcliff, R., Bilton, D., Lane, D.J., Littlewood, J.M., Webb, A.K., Middleton, P.G., Colledge, W.H., Cuthbert, A.W., Evans, M.J., Higgins, C.F., Hyde, S.C., 1997. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 4, 199–209.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R.E., Sapp, M., 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75, 1565–1570.
- 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., Lüke, 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.
- Görlich, D., 1998. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* 17, 2721–2727.
- Goss, C.H., Rosenfeld, M., 2004. Update on cystic fibrosis epidemiology. *Curr Opin Pulm Med* 10, 510–514.
- Granio, O., Ashbourne Excoffon, K.J.D., Henning, P., Melin, P., Norez, C., Gonzalez, G., Karp, P.H., Magnusson, M.K., Habib, N., Lindholm, L., Becq, F., Boulanger, P., Zabner, J., Hong, S.-S., 2010. Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia. *Hum. Gene Ther.* 21, 251–269.
- Grasemann, H., Stehling, F., Brunar, H., Widmann, R., Laliberte, T.W., Molina, L., Döring, G., Ratjen, F., 2007. Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis. *Chest* 131, 1461–1466.
- Griesenbach, U., Alton, E.W.F.W., 2009. Cystic fibrosis gene therapy: successes, failures and hopes for the future. *Expert Rev Respir Med* 3, 363–371.
- Griesenbach, U., Boyton, R.J., Somerton, L., Garcia, S.E., Ferrari, S., Owaki, T., Ya-Fen, Z., Geddes, D.M., Hasegawa, M., Altmann, D.M., Alton, E.W.F.W., 2006. Effect of tolerance induction to immunodominant T-cell epitopes of Sendai virus on gene expression following repeat administration to lung. *Gene Ther.* 13, 449–456.
- Griesenbach, U., Sumner-Jones, S.G., Holder, E., Munkonge, F.M., Wodehouse, T., Smith, S.N., Wasowicz, M.Y., Pringle, I., Casamayor, I., Chan, M., Coles, R., Cornish, N., Dewar, A., Doherty, A., Farley, R., Green, A.-M., Jones, B.L., Larsen, M.D.B., Lawton, A.E., Manvell, M., Painter, H., Singh, C., Somerton, L., Stevenson, B., Varathalingam, A., Siegel, C., Scheule, R.K., Cheng, S.H., Davies, J.C., Porteous, D.J., Gill, D.R., Boyd, A.C., Hyde, S.C., Alton, E.W.F.W., 2010. Limitations of the murine nose in the development of nonviral airway gene transfer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43, 46–54.
- 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.

- Halbert, C.L., Allen, J.M., Miller, A.D., 2001. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. *J. Virol.* 75, 6615–6624.
- Hanslip, S.J., Zaccari, N.R., Middelberg, A.P.J., 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.
- Harvey, B.G., Leopold, P.L., Hackett, N.R., Grasso, T.M., Williams, P.M., Tucker, A.L., Kaner, R.J., Ferris, B., Gonda, I., Sweeney, T.D., Ramalingam, R., Kovesdi, I., Shak, S., Crystal, R.G., 1999. Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J. Clin. Invest.* 104, 1245–1255.
- Haute Autorité de Santé - Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : état des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement [WWW Document], 2012. . URL http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_765713/le-depistage-neonatal-systematique-de-la-mucoviscidose-en-france-etat-des-lieux-et-perspectives-apres-5-ans-de-fonctionnement
- Hay, J.G., McElvaney, N.G., Herena, J., Crystal, R.G., 1995. Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. *Hum. Gene Ther.* 6, 1487–1496.
- 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.
- 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.
- 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.
- Howard, M., Frizzell, R.A., Bedwell, D.M., 1996. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat. Med.* 2, 467–469.
- Hwang, T.C., Nagel, G., Nairn, A.C., Gadsby, D.C., 1994. Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator C1 channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4698–702.
- Hwang, T.-C., Sheppard, D.N., 2009. Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 2151–2161.
- Hyde, S.C., Gill, D.R., Higgins, C.F., Trezise, A.E., MacVinish, L.J., Cuthbert, A.W., Ratcliff, R., Evans, M.J., Colledge, W.H., 1993. Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. *Nature* 362, 250–255.
- Hyde, S.C., Pringle, I.A., Abdullah, S., Lawton, A.E., Davies, L.A., Varathalingam, A., Nunez-Alonso, G., Green, A.-M., Bazzani, R.P., Sumner-Jones, S.G., Chan, M., Li, H., Yew, N.S., Cheng, S.H., Boyd, A.C., Davies, J.C., Griesenbach, U., Porteous, D.J., Sheppard, D.N., Munkonge, F.M., Alton, E.W.F.W., Gill, D.R., 2008. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat. Biotechnol.* 26, 549–551.

- Hyde, S.C., Southern, K.W., Gileadi, U., Fitzjohn, E.M., Mofford, K.A., Waddell, B.E., Gooi, H.C., Goddard, C.A., Hannavy, K., Smyth, S.E., Egan, J.J., Sorgi, F.L., Huang, L., Cuthbert, A.W., Evans, M.J., Colledge, W.H., Higgins, C.F., Webb, A.K., Gill, D.R., 2000. Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 7, 1156–1165.
- 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.
- Jiang, Q., Engelhardt, J.F., 1998. Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 6, 12–31.
- Johns Hopkins CF Center | What is CF? | Basic Science | CFTR | Structure [WWW Document], 2012. URL http://www.hopkinscf.org/main/whatiscf/science_cfrstruc.html
- Johns Hopkins CF Center | What is CF? | Basic Science | Other Ion Channels [WWW Document], 2012. URL http://www.hopkinscf.org/main/whatiscf/science_otherion.html
- Johnson, L.G., Olsen, J.C., Sarkadi, B., Moore, K.L., Swanstrom, R., Boucher, R.C., 1992. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 2, 21–25.
- Joseph, P.M., O’Sullivan, B.P., Lapey, A., Dorkin, H., Oren, J., Balfour, R., Perricone, M.A., Rosenberg, M., Wadsworth, S.C., Smith, A.E., St George, J.A., Meeker, D.P., 2001. Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications. *Hum. Gene Ther.* 12, 1369–1382.
- Jost, P.J., Harbottle, R.P., Knight, A., Miller, A.D., Coutelle, C., Schneider, H., 2001. A novel peptide, THALWHT, for the targeting of human airway epithelia. *FEBS Lett.* 489, 263–269.
- 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.
- Kämper, 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.
- Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., Kanda, T., 1998a. 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., 1998b. 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, 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.
- Kellerman, D., Rossi Mospan, A., Engels, J., Schaberg, A., Gorden, J., Smiley, L., 2008. Denufosal: a review of studies with inhaled P2Y(2) agonists that led to Phase 3. *Pulm Pharmacol Ther* 21, 600–607.

- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)* 245, 1073–80.
- Kerem, E., 2005. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatr. Pulmonol.* 40, 183–196.
- Kerem, E., 2006. Mutation specific therapy in CF. *Paediatr Respir Rev* 7 Suppl 1, S166–169.
- 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., 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., Dürst, 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.
- Knowles, M., Gatzky, J., Boucher, R., 1981. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 305, 1489–1495.
- Knowles, M.R., Hohneker, K.W., Zhou, Z., Olsen, J.C., Noah, T.L., Hu, P.C., Leigh, M.W., Engelhardt, J.F., Edwards, L.J., Jones, K.R., 1995. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 333, 823–831.
- Kreda, S.M., Pickles, R.J., Lazarowski, E.R., Boucher, R.C., 2000. G-protein-coupled receptors as targets for gene transfer vectors using natural small-molecule ligands. *Nat. Biotechnol.* 18, 635–640.
- Kremer, K.L., Dunning, K.R., Parsons, D.W., Anson, D.S., 2007. Gene delivery to airway epithelial cells in vivo: a direct comparison of apical and basolateral transduction strategies using pseudotyped lentivirus vectors. *J Gene Med* 9, 362–368.
- Kwilas, A.R., Yednak, M.A., Zhang, L., Liesman, R., Collins, P.L., Pickles, R.J., Peeples, M.E., 2010. Respiratory syncytial virus engineered to express the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects the bioelectric phenotype of human cystic fibrosis airway epithelium in vitro. *J. Virol.* 84, 7770–7781.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- Laniosz, V., Holthusen, K.A., Meneses, P.I., 2008. Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *J. Virol.* 82, 6288–6298.
- Le Cann, P., Coursaget, P., Iochmann, S., Touze, 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.
- Lee, E.R., Marshall, J., Siegel, C.S., Jiang, C., Yew, N.S., Nichols, M.R., Nietupski, J.B., Ziegler, R.J., Lane, M.B., Wang, K.X., Wan, N.C., Scheule, R.K., Harris, D.J., Smith, A.E., Cheng, S.H., 1996. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther.* 7, 1701–1717.
- Lee, R.J., Foskett, J.K., 2010. cAMP-activated Ca²⁺ signaling is required for CFTR-mediated serous cell fluid secretion in porcine and human airways. *J. Clin. Invest.* 120, 3137–3148.

- LeGrys, V.A., 1996. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J. Pediatr.* 129, 892–897.
- Lerondel, S., Le Pape, A., Sené, C., Faure, L., Bernard, S., Diot, P., Nicolis, E., Mehtali, M., Lusky, M., Cabrini, G., Pavirani, A., 2001. Radioisotopic imaging allows optimization of adenovirus lung deposition for cystic fibrosis gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 12, 1–11.
- 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.
- Li, W., Zhang, L., Johnson, J.S., Zhijian, W., Grieger, J.C., Ping-Jie, X., Drouin, L.M., Agbandje-McKenna, M., Pickles, R.J., Samulski, R.J., 2009. Generation of novel AAV variants by directed evolution for improved CFTR delivery to human ciliated airway epithelium. *Mol. Ther.* 17, 2067–2077.
- Limberis, M., Anson, D.S., Fuller, M., Parsons, D.W., 2002. Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dose lentivirus-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 13, 1961–1970.
- Limberis, M.P., Bell, C.L., Heath, J., Wilson, J.M., 2010. Activation of transgene-specific T cells following lentivirus-mediated gene delivery to mouse lung. *Mol. Ther.* 18, 143–150.
- Limberis, M.P., Vandenberghe, L.H., Zhang, L., Pickles, R.J., Wilson, J.M., 2009. Transduction efficiencies of novel AAV vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Mol. Ther.* 17, 294–301.
- Limberis, M.P., Wilson, J.M., 2006. Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12993–12998.
- Liu, X., Luo, M., Guo, C., Yan, Z., Wang, Y., Lei-Butters, D.C.M., Engelhardt, J.F., 2009. Analysis of adeno-associated virus progenitor cell transduction in mouse lung. *Mol. Ther.* 17, 285–293.
- Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest.* 116, 1167–1173.
- Matilainen, H., Mäkelä, A.R., Riikonen, R., Saloniemi, T., Korhonen, E., Hyypiä, T., Heino, J., Grabherr, R., Oker-Blom, C., 2006. RGD motifs on the surface of baculovirus enhance transduction of human lung carcinoma cells. *J. Biotechnol.* 125, 114–126.
- Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W., Boucher, R.C., 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005–1015.
- 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.
- McLachlan, G., Davidson, H., Holder, E., Davies, L.A., Pringle, I.A., Sumner-Jones, S.G., Baker, A., Tennant, P., Gordon, C., Vrettou, C., Blundell, R., Hyndman, L., Stevenson, B., Wilson, A., Doherty, A., Shaw, D.J., Coles, R.L., Painter, H., Cheng, S.H., Scheule, R.K., Davies, J.C., Innes, J.A., Hyde, S.C., Griesenbach, U., Alton, E.W.F.W., Boyd, A.C., Porteous, D.J., Gill, D.R., Collie, D.D.S., 2011. Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung. *Gene Ther.* 18, 996–1005.
- Medina, M.F., Kobinger, G.P., Rux, J., Gasmi, M., Looney, D.J., Bates, P., Wilson, J.M., 2003. Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung. *Mol. Ther.* 8, 777–789.

- Mehta, A., 2005. CFTR: more than just a chloride channel. *Pediatr. Pulmonol.* 39, 292–298.
- 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.
- Mitomo, K., Griesenbach, U., Inoue, M., Somerton, L., Meng, C., Akiba, E., Tabata, T., Ueda, Y., Frankel, G.M., Farley, R., Singh, C., Chan, M., Munkonge, F., Brum, A., Xenariou, S., Escudero-Garcia, S., Hasegawa, M., Alton, E.W.F.W., 2010. Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Mol. Ther.* 18, 1173–1182.
- Monaghan, K.G., Feldman, G.L., 1999. The risk of cystic fibrosis with prenatally detected echogenic bowel in an ethnically and racially diverse North American population. *Prenat. Diagn.* 19, 604–609.
- Moss, R.B., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P.L., Clancy, J.P., Spencer, L.T., Pilewski, J., Waltz, D.A., Dorkin, H.L., Ferkol, T., Pian, M., Ramsey, B., Carter, B.J., Martin, D.B., Heald, A.E., 2007. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum. Gene Ther.* 18, 726–732.
- Moss, R.B., Rodman, D., Spencer, L.T., Aitken, M.L., Zeitlin, P.L., Waltz, D., Milla, C., Brody, A.S., Clancy, J.P., Ramsey, B., Hamblett, N., Heald, A.E., 2004. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 125, 509–521.
- Mueller, C., Strayer, M.S., Sirninger, J., Braag, S., Branco, F., Louboutin, J.-P., Flotte, T.R., Strayer, D.S., 2010. In vitro and in vivo functional characterization of gutless recombinant SV40-derived CFTR vectors. *Gene Ther.* 17, 227–237.
- Müller, O.J., Kaul, F., Weitzman, M.D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A., Trepel, M., 2003. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat. Biotechnol.* 21, 1040–1046.
- Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., Shah, K.V., 1994. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat. Res.* 305, 293–301.
- 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.
- Noone, P.G., Hohneker, K.W., Zhou, Z., Johnson, L.G., Foy, C., Gipson, C., Jones, K., Noah, T.L., Leigh, M.W., Schwartzbach, C., Efthimiou, J., Pearlman, R., Boucher, R.C., Knowles, M.R., 2000. Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol. Ther.* 1, 105–114.
- Norez, C., Noel, S., Wilke, M., Bijvelds, M., Jorna, H., Melin, P., DeJonge, H., Becq, F., 2006. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* 580, 2081–2086.
- O’Sullivan, B.P., Freedman, S.D., 2009. Cystic fibrosis. *Lancet* 373, 1891–1904.
- Olsen, J.C., Johnson, L.G., Stutts, M.J., Sarkadi, B., Yankaskas, J.R., Swanstrom, R., Boucher, R.C., 1992. Correction of the apical membrane chloride permeability defect in polarized cystic fibrosis airway epithelia following retroviral-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 3, 253–266.
- Orlando, C., Castellani, S., Mykhaylyk, O., Copreni, E., Zelphati, O., Plank, C., Conese, M., 2010. Magnetically guided lentiviral-mediated transduction of airway epithelial cells. *J Gene Med* 12, 747–754.

- Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Karp, P.H., Lashmit, P., Afione, S., Schmidt, M., Zabner, J., Stinski, M.F., Chiorini, J.A., Welsh, M.J., 2005. A shortened adeno-associated virus expression cassette for CFTR gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2952–2957.
- Ostedgaard, L.S., Zabner, J., Vermeer, D.W., Rokhlina, T., Karp, P.H., Stecenko, A.A., Randak, C., Welsh, M.J., 2002. CFTR with a partially deleted R domain corrects the cystic fibrosis chloride transport defect in human airway epithelia in vitro and in mouse nasal mucosa in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3093–3098.
- Painter, R.G., Bonvillain, R.W., Valentine, V.G., Lombard, G.A., LaPlace, S.G., Nauseef, W.M., Wang, G., 2008. The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1345–1353.
- Parkin, D.M., Bray, F., 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/11–25.
- Pedemonte, N., Caci, E., Sondo, E., Caputo, A., Rhoden, K., Pfeffer, U., Di Candia, M., Bandettini, R., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., Galiotta, L.J.V., 2007. Thiocyanate transport in resting and IL-4-stimulated human bronchial epithelial cells: role of pendrin and anion channels. *J. Immunol.* 178, 5144–5153.
- Perricone, M.A., Morris, J.E., Pavelka, K., Plog, M.S., O’Sullivan, B.P., Joseph, P.M., Dorkin, H., Lapey, A., Balfour, R., Meeker, D.P., Smith, A.E., Wadsworth, S.C., St George, J.A., 2001. Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium. *Hum. Gene Ther.* 12, 1383–1394.
- Pilewski, J.M., Frizzell, R.A., 1999. Role of CFTR in Airway Disease. *Physiol Rev* 79, S215–S255.
- Porteous, D.J., Dorin, J.R., McLachlan, G., Davidson-Smith, H., Davidson, H., Stevenson, B.J., Carothers, A.D., Wallace, W.A., Moralee, S., Hoenes, C., Kallmeyer, G., Michaelis, U., Naujoks, K., Ho, L.P., Samways, J.M., Imrie, M., Greening, A.P., Innes, J.A., 1997. Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 4, 210–218.
- Rakonczay, Z., Jr, Hegyi, P., Hasegawa, M., Inoue, M., You, J., Iida, A., Ignáth, I., Alton, E.W.F.W., Griesenbach, U., Ovári, G., Vág, J., Da Paula, A.C., Crawford, R.M., Varga, G., Amaral, M.D., Mehta, A., Lonovics, J., Argent, B.E., Gray, M.A., 2008. CFTR gene transfer to human cystic fibrosis pancreatic duct cells using a Sendai virus vector. *J. Cell. Physiol.* 214, 442–455.
- Rawlins, E.L., Hogan, B.L.M., 2008. Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295, L231–234.
- Registre Français de la Mucoviscidose [WWW Document], 2012. . URL <http://www.centre-reference-muco-nantes.fr/index.php/epidemiologie/registre-francais-de-la-mucoviscidose>
- Renoux, V.M.G., Fleury, M.J.J., Bousarghin, L., Gaitan, J., Sizaret, P.-Y., Touzé, 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.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)* 245, 1066–73.

- Roden, R.B., Day, P.M., Bronzo, B.K., Yutzy, W.H., 4th, 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., 1996. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* 70, 5875–5883.
- Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, N.Y.)* 245, 1059–65.
- Roy, C.J., Ault, A., Sivasubramani, S.K., Gorres, J.P., Wei, C.-J., Andersen, H., Gall, J., Roederer, M., Rao, S.S., 2011. Aerosolized adenovirus-vectored vaccine as an alternative vaccine delivery method. *Respir. Res.* 12, 153.
- Rubenstein, R.C., McVeigh, U., Flotte, T.R., Guggino, W.B., Zeitlin, P.L., 1997. CFTR gene transduction in neonatal rabbits using an adeno-associated virus (AAV) vector. *Gene Ther.* 4, 384–392.
- 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., Oppenheim, A., 1997. Self-assembly and protein-protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology* 237, 414–421.
- 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. Pseudovirions as specific tools for investigation of virus interactions with cells. *Methods Mol. Biol.* 292, 197–212.
- 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.
- Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., Guggino, W.B., 1999a. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiological reviews* 79, S145–66.
- Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., Guggino, W.B., 1999b. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* 79, S145–166.
- 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.
- 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.

- Sinn, P.L., Anthony, R.M., McCray, P.B., Jr, 2011. Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease. *Hum. Mol. Genet.* 20, R79–86.
- Sinn, P.L., Arias, A.C., Brogden, K.A., McCray, P.B., Jr, 2008. Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses. *J. Virol.* 82, 10684–10692.
- Sinn, P.L., Penisten, A.K., Burnight, E.R., Hickey, M.A., Williams, G., McCoy, D.M., Mallampalli, R.K., McCray, P.B., 2005. Gene transfer to respiratory epithelia with lentivirus pseudotyped with Jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 16, 479–488.
- Smith, J.L., Campos, S.K., Wandering-Ness, A., Ozbun, M.A., 2008. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J. Virol.* 82, 9505–9512.
- Song, Y., Lou, H.H., Boyer, J.L., Limberis, M.P., Vandenberghe, L.H., Hackett, N.R., Leopold, P.L., Wilson, J.M., Crystal, R.G., 2009. Functional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in cystic fibrosis airway epithelial cells by AAV6.2-mediated segmental trans-splicing. *Hum. Gene Ther.* 20, 267–281.
- 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.
- Stocker, A.G., Kremer, K.L., Koldej, R., Miller, D.S., Anson, D.S., Parsons, D.W., 2009. Single-dose lentiviral gene transfer for lifetime airway gene expression. *J Gene Med* 11, 861–867.
- Su, X., Looney, M.R., Su, H.E., Lee, J.W., Song, Y., Matthay, M.A., 2011. Role of CFTR expressed by neutrophils in modulating acute lung inflammation and injury in mice. *Inflamm. Res.* 60, 619–632.
- Touze, A., Coursaget, P., 1998. In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res.* 26, 1317–1323.
- Touzé, A., Mahé, 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 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 413–420.
- Tsui, L.C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R., Schumm, J.W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plavsic, N., 1985. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science (New York, N.Y.)* 230, 1054–7.
- Unckell, F., Streeck, R.E., Sapp, M., 1997. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J. Virol.* 71, 2934–2939.
- 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.
- Vaysse, L., Burgelin, I., Merlio, J.P., Arveiler, B., 2000. Improved transfection using epithelial cell line-selected ligands and fusogenic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1475, 369–376.
- Virella-Lowell, I., Zusman, B., Foust, K., Loiler, S., Conlon, T., Song, S., Chesnut, K.A., Ferkol, T., Flotte, T.R., 2005. Enhancing rAAV vector expression in the lung. *J Gene Med* 7, 842–850.

- 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.
- Wagner, J.A., Messner, A.H., Moran, M.L., Daifuku, R., Kouyama, K., Desch, J.K., Manley, S., Norbash, A.M., Conrad, C.K., Friborg, S., Reynolds, T., Guggino, W.B., Moss, R.B., Carter, B.J., Wine, J.J., Flotte, T.R., Gardner, P., 1999. Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. *Laryngoscope* 109, 266–274.
- Wagner, J.A., Nepomuceno, I.B., Messner, A.H., Moran, M.L., Batson, E.P., Dimiceli, S., Brown, B.W., Desch, J.K., Norbash, A.M., Conrad, C.K., Guggino, W.B., Flotte, T.R., Wine, J.J., Carter, B.J., Reynolds, T.C., Moss, R.B., Gardner, P., 2002. A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum. Gene Ther.* 13, 1349–1359.
- Wagner, J.A., Reynolds, T., Moran, M.L., Moss, R.B., Wine, J.J., Flotte, T.R., Gardner, P., 1998. Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* 351, 1702–1703.
- White, A.F., Mazur, M., Sorscher, E.J., Zinn, K.R., Ponnazhagan, S., 2008. Genetic modification of adeno-associated viral vector type 2 capsid enhances gene transfer efficiency in polarized human airway epithelial cells. *Hum. Gene Ther.* 19, 1407–1414.
- Williams, K.J., Fuki, I.V., 1997. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans: dynamic molecules mediating ligand catabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 8, 253–262.
- Wilson, J.M., Engelhardt, J.F., Grossman, M., Simon, R.H., Yang, Y., 1994. Gene therapy of cystic fibrosis lung disease using E1 deleted adenoviruses: a phase I trial. *Hum. Gene Ther.* 5, 501–519.
- Wine, J.J., 1999. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* 103, 309–312.
- Xu, Y., Krause, A., Hamai, H., Harvey, B.-G., Worgall, T.S., Worgall, S., 2010. Proinflammatory phenotype and increased caveolin-1 in alveolar macrophages with silenced CFTR mRNA. *PloS one* 5, e11004.
- Yan, Z., Lei-Butters, D.C.M., Liu, X., Zhang, Y., Zhang, L., Luo, M., Zak, R., Engelhardt, J.F., 2006. Unique biologic properties of recombinant AAV1 transduction in polarized human airway epithelia. *J. Biol. Chem.* 281, 29684–29692.
- Yang, R., Day, P.M., Yutzy, W.H., 4th, Lin, K.-Y., Hung, C.-F., Roden, R.B.S., 2003. Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J. Virol.* 77, 3531–3541.
- Yang, R., Yutzy, W.H., 4th, Viscidi, R.P., Roden, R.B.S., 2003. Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirus and infection. *J. Biol. Chem.* 278, 12546–12553.
- Zabner, J., Cheng, S.H., Meeker, D., Launspach, J., Balfour, R., Perricone, M.A., Morris, J.E., Marshall, J., Fasbender, A., Smith, A.E., Welsh, M.J., 1997. Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia in vivo. *J. Clin. Invest.* 100, 1529–1537.
- Zabner, J., Couture, L.A., Gregory, R.J., Graham, S.M., Smith, A.E., Welsh, M.J., 1993. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75, 207–216.
- Zabner, J., Ramsey, B.W., Meeker, D.P., Aitken, M.L., Balfour, R.P., Gibson, R.L., Launspach, J., Moscicki, R.A., Richards, S.M., Standaert, T.A., 1996. Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane

- conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 97, 1504–1511.
- Zabner, J., Seiler, M., Walters, R., Kotin, R.M., Fulgeras, W., Davidson, B.L., Chiorini, J.A., 2000. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J. Virol.* 74, 3852–3858.
- Zeitlin, P.L., Boyle, M.P., Guggino, W.B., Molina, L., 2004. A phase I trial of intranasal Moli1901 for cystic fibrosis. *Chest* 125, 143–149.
- Zhang, L., Button, B., Gabriel, S.E., Burkett, S., Yan, Y., Skiadopoulos, M.H., Dang, Y.L., Vogel, L.N., McKay, T., Mengos, A., Boucher, R.C., Collins, P.L., Pickles, R.J., 2009. CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol.* 7, e1000155.
- Zhang, L., Limberis, M.P., Thompson, C., Antunes, M.B., Luongo, C., Wilson, J.M., Collins, P.L., Pickles, R.J., 2010. α -Fetoprotein gene delivery to the nasal epithelium of nonhuman primates by human parainfluenza viral vectors. *Hum. Gene Ther.* 21, 1657–1664.
- 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., 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., 1991. 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.
- Ziady, A.G., Davis, P.B., Konstan, M.W., 2003. Non-viral gene transfer therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther* 3, 449–458.
- Zielenski, J., Tsui, L.C., 1995. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu. Rev. Genet.* 29, 777–807.
- Zuckerman, J.B., Robinson, C.B., McCoy, K.S., Shell, R., Sferra, T.J., Chirmule, N., Magosin, S.A., Propert, K.J., Brown-Parr, E.C., Hughes, J.V., Tazelaar, J., Baker, C., Goldman, M.J., Wilson, J.M., 1999. A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* 10, 2973–2985.

Annexes

Annexe 1 : Amorces utilisées pour générer les séquences L1 HPV-16 mutants

Peptide	Nom des amorces	Séquence des amorces
L1	HPV16 L1 For	CCAGATCTATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCCACT
	HPV16 L1 Rev	CCAGATCTTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTTAGCAGTT
P1	P1 140/141 Rev	TGTATGCCATAATGCATGTGTACCTGCATTTGCTGCATAAG
	P1 140/141 For	ACACATGCATTATGGCATAACAGTGGATAATAGAGAATGTAT
	P1 179/180 Rev	TGTATGCCATAATGCATGTGTTGCAACATTGTTACATGGGG
	P1 179/180 For	ACACATGCATTATGGCATAACAGTAAATCCAGGTGATTGTCC
	P1 283/284 Rev	TGTATGCCATAATGCATGTGTAGTAGACCCAGAGCCTTTAA
	P1 283/284 For	ACACATGCATTATGGCATAACAGCAAATTTAGCCAGTTCAAA
P2	P2 140/141 Rev	TACTTTTAAAGAATCAAATCGACCTGCATTTGCTGCATAAG
	P2 140/141 For	CGATTTGATTCTTTAAAAGTAGTGGATAATAGAGAATGTAT
	P2 179/180 Rev	TACTTTTAAAGAATCAAATCGTGCAACATTGTTACATGGGG
	P2 179/180 For	CGATTTGATTCTTTAAAAGTAGTAAATCCAGGTGATTGTCC
P3	P3 140/141 Rev	ATATACATGAGACATTTGTGCGAGGATGACCACCTGCATTTGCTGCATAAG
	P3 140/141 For	GGTCATCCTCGACAAATGTCTCATGTATATGTGGATAATAGAGAATGTAT
	P3 179/180 Rev	ATATACATGAGACATTTGTGCGAGGATGACCTGCAACATTGTTACATGGGG
	P3 179/180 For	GGTCATCCTCGACAAATGTCTCATGTATATGTAAATCCAGGTGATTGTCC
P4	P4 140/141 Rev	CTGGGCTCTGTTAGGGTGAGGGCCGGCGTTGGCGGCGTAGGC GC
	P4 140/141 For	CCTCACCCCTAACAGAGCCCAGGTGGACAACCGGGAGTGCATCAGC
P5	P5 140/141 Rev	CTTCTGCTGCAGCCGGTCCACGCCGGCGTTGGCGGCGTAGGC GC
	P5 140/141 For	GTGGACCGGCTGCAGCAGAAGGGTGACAACCGGGAGTGCATGAGC

Annexes 2

	Cellules d'insecte	Cellules rénales			Cellules cervicales		Cellules pulmonaires			
Nom commun	SF21	COS-7	293FT	293TT	HeLa	SiHa	IB3-1	S9	16HBe14o-	A549
Référence	Invitrogen 11497-013	ATCC CRL-1651	Invitrogen R70007	Don de Dr C. Buck	ATCC CCL2	ATCC HTB-35	ATCC CRL-2777	ATCC CRL-2778	Don de Dr. D. C. Gruenert	ATCC CCL-185
Origine	Cellules dérivées du tissu ovarien de larves du lépidoptère <i>Spodoptera frugiperda</i>	Cellules rénales de singe vert transformées par l'AgT de SV40	Cellules embryonnaires de rein humain transformées pour exprimer l'AgT du SV40	Dérivée des 293FT où l'AgT est plus fortement exprimé Buck et al., 2004)	Adénocarcinome de cellules épithéliales cervicales humaines 10-50 copies HPV18 / cellule Huang et al., 1998	carcinome épidermoïde de grade II de cellules cervicales humaines 1-2 copies HPV16 / cellule Huang et al., 1998	Cellule épithéliale de bronche humaine immortalisée par Ad12/SV40 CFTR-ΔF508	Cellule épithéliale de bronche humaine immortalisée par Ad12/SV40 CFTR restauré	Cellule épithéliale de bronche humaine immortalisée par SV40 Cozen et al., 1994	Carcinome d'alvéole pulmonaire humaine
Milieu de culture	SF900II	DMEM, sodium pyruvate					LHC-8		DMEM-F12	F-12K
Conditions particulières			G418	hygromycine						

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant l'activité du canal CFTR. Le flux de chlorure à travers le pore du canal CFTR est régulé par phosphorylation AMPc-dépendante au niveau du domaine R qui va induire des cycles de liaison à l'ATP et d'hydrolyse en ADP au niveau des NBD permettant l'ouverture du pore et la sortie des ions Chlorure. (Adapté de Hwang and Sheppard, 2009 et "Johns Hopkins CF Center | What is CF? | Basic Science | CFTR | Structure," 2012)

Figure 2 : CFTR, une protéine multifonctionnelle, A. Quand le canal CFTR est fonctionnel, il régule la fonction d'autres canaux ioniques situés au sein de la membrane cellulaire. B. Impact sur l'activation CFTR dépendante des autres canaux quand le CFTR est non fonctionnel. (Adapté de "Johns Hopkins CF Center | What is CF? | Basic Science | Other Ion Channels," 2012)

Figure 3 : Représentation des différentes classes de mutation de la protéine CFTR, le types de mutation dans le gène et l'impact sur les fonctions de la protéine (adapté Zielenski and Tsui, 1995).

Figure 4 : Manifestations cliniques de la Mucoviscidose.

Figure 5 : Rôle du CFTR et du système Duox (Dual Oxydases) dans la formation d'hypothiocyanite (OSCN-) par oxydation du thiocyanate (SCN-) par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) catalysé par la lactoperoxydase (LPO). (Adapté de l'illustration de Pilewski and Frizzell, 1999).

Figure 6 : Récapitulatif des thérapeutiques à l'essai, développées en fonction des anomalies phénotypiques du CFTR (spécifique des mutations de classe I à VI).

Figure 7 : Représentation des caractéristiques des essais cliniques mondiaux (indications, types de gène, vecteurs, types de phase clinique et nombre d'essais cliniques par année) répertoriés par Journal of gene medicine ("Gene Therapy Clinical Trials Worldwide," 2012).

Figure 8 : Structure du phage M13.

Figure 9 : Technique de sélection du Phage Display

Figure 10 : Arbre phylogénétique de 118 types de papillomavirus construit par l'analyse de séquences partielles du gène L1 (Bernard et al., 2010).

Figure 11 : Proportion de cas de cancer du col de l'utérus attribués aux types d'HPV les plus fréquent (d'après Munoz et al., 2004)

Figure 12 : Représentation schématique du génome des HPV

Figure 13 : Représentation schématique des différents grades de lésions histologiques du col de l'utérus (d'après Lowy and Schiller, 2006).

Figure 14 : Modèle d'attachement des HPV à la cellule.

Figure 15 : 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 capsid, la boucle CD est orientée vers l'intérieur.

Figure 16 : 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 17 : Reconstitution 3D de pseudoparticules virales d'HPV-16 obtenue par expression des protéines L1 et L2 par cryomicroscopie électronique (d'après Buck et al., 2008). A. Représentation de la capsidite constituée des protéines L1 et L2 de l'HPV 16. B. Représentation en coupe de l'intérieur de la capsidite virale avec la protéine L1 en bleu et la protéine L2 en rouge. C. la protéine L2 seule en rouge. Barre = 200 Å

Figure 18 : 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 18 : 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 CaCl₂ (D'après Touzé et Coursaget, 1998).

Figure 19 : Représentation schématique de la sélection de ligands pulmonaire par la technique de phage display. Un premier crible de la banque de phage est effectué afin de retenir les phages ayant la capacité de se fixer sur les lignées de cellules pulmonaires, le deuxième crible permet d'éliminer les phages capables de se fixer sur des lignées issues d'autres organes. Les phages spécifiques des lignées pulmonaires uniquement sont séquencés.

Figure 20 : Carte du plasmide PCR2.1-TOPO (Invitrogen). Le produit de PCR est intégré dans le plasmide par l'action de topoisomérase.

Figure 21 : Génération de baculovirus recombinants et l'expression des gènes avec le système d'expression 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 22 : Purification de VLPs par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium. A. représentation schématisation de la formation du gradient continu de CICs B. Evaluation des concentrations de protéines L1 dans les différentes fractions du gradient de chlorure de césium par ELISA. Représentation Absorbance (DO) / densité de la fraction. Les losanges sont les données exactes, la courbe symbolise la tendance. C. Observation par Microscopie électronique à transmission (MET) des VLPs purifiées après coloration négative à l'acétate d'uranyl 1,5%.

Figure 23 : Représentation schématique de la technique de dissociation-réassociation. Les VLP sont dissociées et sont réassociées en présence du plasmide d'intérêt pour former des PsV.

Figure 24 : réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase Firefly.

Figure 25 : Nébuliseurs utilisés lors de l'évaluation de la résistance des PsV d'HPV-31 à l'aérosolisation

Figure 26 : Visualisation d'un radio-isotope Tc 99 après aérosol dans les poumons de rat sur gamma camera. Bio distribution de 70% à 80% de l'aérosol dans les poumons.

Figure 27 : Contention d'un rat lors d'une aérosolisation intra-trachéale à l'aide du microsyringe®.

Figure 28 : A. Représentation schématique de l'identification de motifs spécifiques des cellules pulmonaires B. Alignement des séquences protéiques identifiées par phage display sur les lignées pulmonaires (IB3-1 et S9) et génération du séquence consensus. C. Tableau des propriétés physico-chimique des séquences protéiques identifiées (pHi = potentiel hydrogène isoélectrique) (indice d'hydrophobicité, GRAVY (Kyte and Doolittle, 1982))

Figure 29 : A. Représentation schématique des différentes constructions des mutants de L1 de l'HPV16. Les peptides P1 (THALWHT), P2 (RFDSLKV), P3 (GHPRQMSHVY), P4 (PHPNRAQ) et P5 (VDRLQQK) ont été insérés dans les boucles DE, EF et EF de la L1 de l'HPV16. B. 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 (vert), DE (violet), EF (jaune), FG (rouge) et HI (orange) sont orientées vers l'extérieur de la capsid, la boucle CD (bleue) est orientée vers l'intérieur.

Figure 30 : Principe de la mutagenèse dirigée par PCR

Figure 31 : A. Insertion du motif. B. Génération du gène chimérique (A) et (B) Séparation électrophorétique des produits de PCR sur gel d'agarose 0,8%. MT : marqueur de poids moléculaire λ HindIII DNA.

Figure 32 : Construction des plasmides pCR2.1 /L1 P4DE et pCR 2.1 /L1 P5DE

Figure 33: Construction des plasmides pFBD/L1-mutant et transposition dans le Bacmide.

Figure 34 : Observation de VLPs composées des L1 de l'HPV16 sauvage (L1 wt) et chimériques (P1DE, P1EF, P1FG, P2DE et P3EF) en microscopie électronique à transmission après coloration à l'acétate d'uranyle 1,5%.

Figure 35: Analyse des productions après purification sur gradient de chlorure de césium des VLPs L1 de l'HPV16 sauvage et chimériques par immuno-empreinte. MT : BenchMark™ Protein Ladder

Figure 36 : Comparaison du transfert de gène en cellule COS-7 des PsV d'HPV16 en utilisant les plasmides pGL3 et pGL4.13. L'expression luciférase est exprimée en RLU.

Figure 37 : Observation de VLPs L1/L2 de l'HPV16 composées des L1 sauvage (L1 wt) et chimériques (P1DE, P1EF, P1FG, P2DE et P3EF) en microscopie électronique à transmission après coloration à l'acétate d'uranyle 1,5%. La barre d'échelle représente 50nm.

Figure 38 : Analyse des quantités de L2SA dans les productions de VLPs L1/L2 après purification sur gradient de chlorure de césium des VLPs L1 de l'HPV16 sauvage et chimériques par immuno-empreinte.. MT : BenchMark™ Protein Ladder

Figure 39 : Evaluation du transfert de gène par les PsV HPV16 L1P1DE et HPV16 L1P1DE/L2 par expression luciférase en cellules COS-7. L'expression luciférase est exprimée en $\times 10^3$ RLU.

Figure 40 : Evaluation du transfert de gène par expression de la luciférase (RLU $\times 10^3$ /mg) après infection de PsVs d'HPV16 L1/L2 wt sur les différentes lignées renales (COS-7, 293FT), cervicales (HeLa, SiHa) et pulmonaires (IB3-1, S9 et 16HBe14o-).

Figure 41 : Evaluation du transfert de gène des différents PsVs chimériques observé dans 3 lignées cellulaires d'origine pulmonaire (IB3-1, S9 and 16HBe14o-) et une lignée cellulaire d'origine cervicale (SiHa) comparé au PsV sauvage. Le transfert de gène est évalué par expression luciférase et exprimé en RLU /mg de protéines.

Figure 42 : Observation de VLPs d'HPV31 composées des protéines majeures de capsid L1 en microscopie électronique à transmission après coloration à l'acétate d'uranyle 1,5%. La barre d'échelle représente 50nm.

Figure 43: Evaluation de l'effet délétère de différents procédés d'aérosolisation sur la capacité de transfert de gène des pseudovirus HPV31 L1/luc. Les valeurs sont exprimées en % de transfert observé avec les pseudovirus sans traitement.

Figure 44 : Titre ajusté d'anticorps IgG anti-HEV observé dans le sérum et les lavages broncho-alvéolaires en fonction des PsV/hev (●P1DE, ■P3EF ou ▲L1 wt) instillés par aérosol dans les poumons de rats. Le titre moyen de chaque groupe est représenté par une barre. * représente la significativité à $p=0,05$ par rapport au groupe témoin L1WT.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Données épidémiologiques : incidence de la mucoviscidose et fréquence des porteurs en fonction de l'origine de la population. D'après (Monaghan and Feldman, 1999)

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques des vecteurs viraux développés pour la thérapie génique contre la mucoviscidose (d'après Conese et al., 2011)

Tableau 3 : Motifs décrits dans la littérature pour conférer un ciblage pulmonaire.

Tableau 4 : Normalisation entre immuno-empreinte et dosage protéique au Qbit®. Exemple de production montrant une cohérence entre les bandes visualisées en Immuno-empreinte et le dosage protéique effectué par le Qbit®. Les valeurs numériques obtenues avec le Qbit® sont retenus pour quantifier les L1.

Tableau 5 : Comparaison du transfert de gène par les PsVs L1 seules et les PsVs L1/L2 chimériques sur cellules COS-7. L'efficacité de transfert gène est évaluée par l'expression de la luciférase (exprimé en 103RLU) après 48h d'infection par 10µg de PsVs encapsidant le plasmide pGL4.13. NT : non testé. Efficacité : Rapport de l'expression luciférase des PsVs L1/L2 et l'expression luciférase de PsVs L1. Données pour une expérience.

Tableau 6 : Augmentation du transfert de gène des différents PsV chimériques en cellules pulmonaires IB3-1, S9 et 16HBe (ratio de l'expression luciférase observé avec les PsV mutant comparé aux PsV sauvages) et indice de ciblage pulmonaire. Le ciblage est le ratio entre l'augmentation du transfert de gène observée en cellules pulmonaire et l'augmentation observée en cellules cervicales SiHa. Les valeurs en gras sont les ratios >5.

Tableau 7 : Réponses anticorps IgG anti-HEV observées dans le sérum et les LBA de rats immunisés par aérosol de PsV d'HPV16 encapsidant le plasmide codant l'ORF2 de l'HEV. (*Les titres en anticorps anti-HEV sont ajustés aux titres en anticorps anti-HPV L1). TGM = titre moyennegéométrique

Tableau 8 : Motifs de ciblage pulmonaire identifiés. Ces motifs ont été identifiés par phages display par sélection sur cellules d'origine pulmonaire ou trachéale.

Liste des publications

Articles scientifiques

- 1- **Carpentier A**, Chaussade H, Rigaud E, Rodriguez J, Berthault C, Boué F, Tognon M, Touzé A, Garcia-Bonnet N, Choutet P, Coursaget P. High HEV seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. J Clin Microbiol. 2012 Jun 20. [sous Presse]
 - 2- **Carpentier A**, E Alvarez, L Bousarghin, Combelas N, Montharu J, Sizaret PY, Patrice Diot, A Touzé, P Coursaget. Insertion of Peptide Ligands into the Major Capsid Protein of Human Papillomavirus pseudovirions Improved Gene Transfer to Human Airway Epithelial Cells. Soumis à J Transl Med.
 - 3- Samimi M, Touzé A, Laude H, Le Bidre E, Arnold F, **Carpentier A**, Carlotti A, Maubec E, Dupin N, Aubin F, Avril MF, Rozenberg F, Avenel-Audran M, Guyetant S, Lorette G, Machet L, Coursaget P. Greater tumor size at presentation and increased mortality in Merkel cell carcinoma patients are associated with low vitamin D levels. Soumis à Br J Dermatology.
 - 4- Nicol JTJ, Robinot R, **Carpentier A**, Carandina G, Mazzoni E, Tognon M, Touzé A, Coursaget P. Age-specific-seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, Human polyomaviruses 6, 7 and 9 and Trichodysplasia Spinulosa-associated polyomavirus. Soumis à Clin Vaccine Immunol.
- H. Chaussade, E. Rigaud, A. Allix, **A. Carpentier**, P. Choutet, N. Garcia-Bonnet, P. Coursaget. High HEV seroprevalence in pig handlers in France. Manuscript en preparation.
- A Touzé, M Fleury, F Arnold, **A Carpentier**, R Ballaire, O Mercey, N Combelas, M Samimi, JF Vautherot, T Moreau, G Lorette, P Coursaget. Identification of conformational epitopes on the VP1 capsid protein of Merkel cell polyomavirus (MCV). Manuscript en preparation

Brevets

- 5- **Carpentier A**, Coursaget P, Alvarez E, Touzé A. Targeting of papillomavirus gene delivery particles. Brevet déposé aux USA, références EM130463716US (A0915.70003-23628) du 30 septembre 2010 et USSN 61/247,504 du 30 septembre 2009, par AuraBiosciences et Inserm-transfer.

1 **High HEV seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France**

2

3

4 Audrey Carpentier¹, Hélène Chaussade², Emma Rigaud³, Josefa Rodriguez^{1,4}, Camille

5 Berthault¹, Franck Boué⁵, Mauro Tognon⁶, Antoine Touzé¹, Nathalie Garcia-Bonnet³,

6 Patrick Choutet^{2,3}, Pierre Coursaget¹.

7

8

9 1 INRA UMR 1282, Tours; and Université F Rabelais, Tours, France

10 2 Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, CHRU Bretonneau & Université François Rabelais,

11 Tours, France

12 3 Caisse Centrale de la Mutualité Sociale Agricole (CCMSA), Bagnole, France

13 4 Instituto Nacional de Cancerología and Universidad Del Rosario, Bogotá, Colombia

14 5- French Agency for Food, Anses, Nancy, France

15 6- Cell biology and molecular genetics, University of Ferrara, Ferrara, Italy

16

17

18

19 **Footnote:**

20

21 **Potential conflicts of interest:** none reported

22

23 **Financial support:** Financial support was provided by a grant from ARN (Project HEVZOONEPI, Grant

24 PRA-008-04), and the Mutualité Sociale Agricole (MSA).

25

26

27 **Correspondance :** Correspondence to P. Coursaget, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue

28 Monge, 37200 Tours, France. Tel: 33.247.36.72.56, Fax: 33.247.36.71.88, e-mail: coursaget@univ-tours.fr

29

30 **Summary**

31 HEV is a fecal orally-transmitted human pathogen of worldwide distribution. In industrial
32 countries, HEV is observed in an increasing number of autochthonous cases and is considered to be
33 an emerging pathogen. A growing body of evidence suggests that HEV is a zoonotic disease, and
34 pig handlers and pig veterinarians have been reported to be high-risk groups for HEV infection.
35 The aims of the present study were to establish the prevalence of anti-HEV in wild boar in France
36 and to identify whether forestry workers are at a higher risk of HEV infection. Three different anti-
37 HEV tests were used to compare their effectiveness in detecting anti-HEV in the general
38 population. The most sensitive test was then used to investigate HEV seroprevalence in 593
39 forestry workers and 421 wild boars.

40 Anti-HEV was detected in 31% of the forestry workers and 14% of the wild boar. Detection of
41 anti-HEV in humans was correlated with age, geographical location and occupational activity, and
42 in wild boar with geographical location. HEV infection is frequent in woodcutters in France, and it
43 varies geographically. Further studies are needed to confirm these findings and to elucidate the
44 transmission route and the exact virus reservoirs.

45

46

47 **Key words** : HEV, woodcutters, wild boar, forestry workers.

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

Insertion of Peptide Ligands into the Major Capsid Protein of Human Papillomavirus pseudovirions Improved Gene Transfer to Human Airway Epithelial Cells

Audrey Carpentier^{1, 3}, Eva Alvarez¹, Latifa Bousarghin^{1●}, Nicolas Combelas^{1, 3}, Jérôme Montharu¹, Pierre-Yves Sizaret², Patrice Diot¹, Antoine Touzé^{1,3}, Pierre Coursaget^{1,3}

1 : Inserm, U618, Tours, F-37200 France.

2 : Inserm, U966, Tours, F-37000 France.

3 : Univ. François Rabelais, Tours, F-37000 France ; IFR 136 « Agents transmissibles et infectiologie », Tours, 37000 France.

(● Present address: Faculty of Pharmacy, Rennes, France)

Corresponding author. Pierre Coursaget, Laboratoire “Vecteurs, Virus, Vaccins”, INSERM U618, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31 Ave. Monge, 37200 Tours, France. Phone: 00 33 2 47 36 72 56. Fax: 00 33 2 47 36 71 88. E-mail: coursaget@univ-tours.fr.

Key words: HPV, Virus-like particles, peptide ligands, cell targeting, airway epithelial cell.

Shortened title: retargeting HPV to airway cells

Abstract

Background Papillomavirus VLPs have the potential to deliver genes into different cells with varying efficiencies. The purpose of this study was to retarget and optimize the HPV-16 VLP tropism for airway cells by insertion of short amino acid sequences within the major capsid protein (L1).

Methods Three different amino acid sequences described as airway cell ligands were selected and inserted into 3 different external loops of L1 protein, as two new sequences identified by phage display. Mutant VLPs were investigated for their ability to transfect human airway cells *in vitro*, and aerosol immunization of rats was used for two of them to investigate their ability to deliver a gene into the lung.

Results Pseudovirions encoding luciferase were produced with the different L1 protein mutants and the L2 protein of HPV16 wt. Luciferase gene expression was increased by a factor close to 7 in human airway cells for two mutants compared to wt pseudovirions. Targeting to human airway cells is increased up to 360-fold. Aerosol immunization of rats with two of the mutant pseudovirions encoding the capsid protein of hepatitis E virus induced a 3 to 4-fold increase in local and systemic anti-HEV antibodies compared to the wt pseudovirions.

Conclusions Our results indicate that cell tropism of HPV16 can be effectively reengineered by insertion of short peptide ligands within the L1 protein external loops, and that some of the HPV 16 L1 mutants target delivery to human airway cells *in vitro* and into the rat lung *in vivo*.



- (51) International Patent Classification:
C12N 7/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2010/002654
- (22) International Filing Date:
30 September 2010 (30.09.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/247,504 30 September 2009 (30.09.2009) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): IN-
SERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE) [FR/FR]; 101 Rue
De Tolbiac, F-75013 Paris (FR).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): CARPENTIER,
Audrey [FR/FR]; Apartment 390, 3 Place Ingres,
F-37200 Tours (FR). COURSAGET, Pierre, L.
[FR/FR]; Laboratoire "veteurs, Virus, Vaccins", Inserm
U618, Faculte Des Sciences Pharmaceutiques, Francois
Rabelais University, 31 Avenue Monge, F-37200 Tours

(FR). ALVAREZ, Eva [FR/FR]; Laboratoire "vecteurs,
Virus, Vaccins", Inserm U618, Faculte Des Sciences
Pharmaceutiques, Francois Rabelais University, 31 Av-
enue Monge, F-37200 Tours (FR). TOUZE, Antoine, A.
[FR/FR]; Laboratoire "vecteurs, Virus, Vaccins", Inserm
U618, Faculte Des Sciences Pharmaceutiques, Francois
Rabelais University, 31 Avenue Monge, F-37200 Tours
(FR).

(74) Agent: KIRKHAM, Nicholas, A.; Graham Watt & Co
LLP, St Botolph' s House, 7-9 St Botolph' s Road,
Sevenoaks TN13 3AJ (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: TARGETING OF PAPILLOMA VIRUS GENE DELIVERY PARTICLES

(57) Abstract: Aspects of the invention provide modified
virus-like particles for delivery of diagnostic or therapeutic
agents. In particular, aspects of the invention provide mod-
ified viral capsid proteins that are modified to display tar-
geting peptides when assembled in virus-like particles to
direct the virus-like particles to specific sites in vivo. As-
pects of the invention further provide methods for treating
subjects with one or more modified virus-like particles.

WO 2011/039646 A2

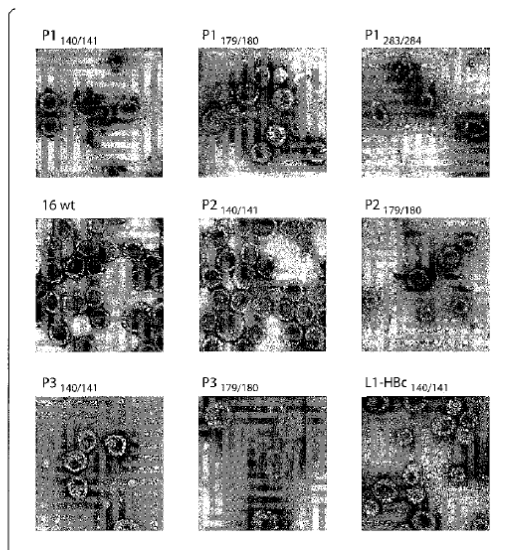


Fig. 3

Liste des communications (orateur*)

- 1- **Carpentier A**, Alvarez E, Bousarghin L, Touzé A and Coursaget P. Cell-targeting in gene transfer: Identification of new human airway epithelial cell ligands and selection of infectious papillomavirus mutants for gene therapy for Cystic Fibrosis. 9^{ème} colloque des Jeunes Chercheurs pour Vaincre La Mucoviscidose, Institut Pasteur, 21 mars 2008. (poster)
- 2- **Carpentier A**, Delannoy A, Touzé A, and Coursaget P. Cell-targeting in gene transfer: Identification of new human airway epithelial cell ligands and selection of infectious papillomavirus mutants for gene therapy for Cystic Fibrosis. 32nd European Cystic Fibrosis Conference, Brest, 10-13 juin 2009. (poster)
- 3- **Carpentier A***, Alvarez E, Bousarghin L, Touzé A and Coursaget P. Vecteurs dérivés de papillomavirus pour la thérapie pulmonaire: identification de ligand des cellules pulmonaires et modification du tropisme de ces vecteurs. IIèmes Journées Scientifiques du Groupe Francophone de Recherche sur les Papillomavirus, Malbuisson, 30 septembre au 02 octobre 2009.
- 4- **Carpentier A**, Alvarez E., Boursarghin L. and Coursaget P. Retargeting human papillomavirus-mediated gene transfer to human airway epithelial cells. 11^{ème} colloque des Jeunes Chercheurs pour Vaincre La Mucoviscidose, Institut Pasteur, Paris, 8 mars 2010. (poster)
- 5- **Carpentier A**, Delannoy A, Touzé A, and Coursaget P. Thérapie génique contre la Mucoviscidose : Identification d'un ligand spécifique des cellules pulmonaires et Sélection de mutants de pseudovirus de papillomavirus capable de transduire des cellules pulmonaires. 10^{ème} colloque des Jeunes Chercheurs pour Vaincre La Mucoviscidose, Institut Pasteur, 16 mars 2009. (poster)
- 6- **Carpentier A**, Montharu J, Le Guellec S, Diot P, Touzé A, Coursaget P. Thérapie Génique de la mucoviscidose: Identification de ligands des cellules pulmonaires, modification du tropisme des vecteurs derives des papillomavirus et selection de pseudovirus modifies. 12ème Colloque des jeunes Chercheur de VLM. 4 mars 2011, Paris. (Poster)
- 7- **Carpentier A***, Combelas N, Montharu J, Diot P, Touzé A, Coursaget. Ciblage pulmonaire des pseudovirions d'HPV16 par insertion de ligands dans la protéine L1. 4èmes Journées Scientifiques de l'Association Francophone pour l'étude des Infections par les Papillomavirus et les Polyomavirus. Amboise, 17-19 octobre 2011.
- 8- **Carpentier A**, Alvarez A, Bousarghin L, Combelas N, Montharu J, Sizaret PY, Diot P, Touzé A, Coursaget P. Insertion of Peptide Ligands into the Major Capsid Protein of Human Papillomavirus pseudovirions Improved Gene Transfer to Human Airway Epithelial Cells. 27th International Papillomavirus Conférence, Berlin, 18-22 septembre 2011. (poster)
- 9- Liais E, **Carpentier A**, Fleury M, Nicol J, Mazzoni E, Tognon M, Touzé A, Coursaget P. Antibodies against Human Papillomavirus Type 16 and Newly Discovered Polyomaviruses in

Adolescents and Young Adults. 27th International Papillomavirus Conférence, Berlin, 18-22 septembre 2011.

10- H. Chaussade, **A. Carpentier**, E. Rigaud, A. Allix, L. Bernard, A. Touzé, N. Garcia-Bonnet, P. Coursaget. Séroprévalence élevée de l'hépatite E en France chez les travailleurs en contact avec les réservoirs animaux. Journées Nationales d'Infectiologie, 13-15 juin 2012, Tours. (Poster)

11- M. Samimi*, A. Touzé, H. Laude, E. Le Bidre, F. Arnold, **A. Carpentier**, A. Carlotti, E. Maubec, N. Dupin, F. Aubin, M. F. Avril, F. Rozenberg, M. Avenel Audran, S. Guyetant, G. Lorette, L. Machet, P. Coursaget. La taille tumorale, la survie sans récurrence et la survie spécifique dans le carcinome à cellules de Merkel sont associées aux concentrations sériques de vitamine D. Journées de Dermatologie de Paris, décembre 2012.