

Université de Montréal

Nouvelle approche pour modifier le tropisme des vecteurs adénoviraux à l'aide de ligands bispécifiques

par

Maxime Pinard

Département de microbiologie et d'immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de doctorat

En microbiologie et immunologie

Octobre 2011
©Maxime Pinard, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse est intitulée :

Nouvelle approche pour modifier le tropisme des vecteurs adénoviraux à l'aide de ligands bispécifiques

Présenté par :

Maxime PINARD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hugo Soudeyns

Président-rapporteur

Bernard Massie

Directeur de recherche

Anne-Marie Mes-Massons

Membre du jury

Jacques J. Tremblay

Examineur externe

Édward Bradley

Représentant du doyen

Résumé

Mot-clé : Adénovirus, Changement de tropisme, IGF-IR, Tumeurs, Muscles

L'adénovirus a été étudié dans l'optique de développer de nouveaux traitements pour différentes maladies. Les vecteurs adénoviraux (AdV) sont des outils intéressants du fait qu'ils peuvent être produits en grandes quantités (1×10^{12} particules par millilitre) et de par leur capacité à infecter des cellules quiescentes ou en division rapide. Les AdVs ont subi bon nombre de modifications pour leur permettre de traiter des cellules tumorales ou pour transporter des séquences génétiques exogènes essentielles pour le traitement de maladies monogéniques. Toutefois, les faibles niveaux d'expression du récepteur primaire de l'adénovirus, le CAR (récepteur à l'adénovirus et au virus coxsackie), réduit grandement l'efficacité de transduction dans plusieurs tumeurs. De plus, certains tissus normaux comme les muscles n'expriment que très peu de CAR, rendant l'utilisation des AdVs moins significative. Pour pallier à cette limitation, plusieurs modifications ont été générées sur les capsides virales. L'objectif de ces modifications était d'augmenter l'affinité des AdVs pour des récepteurs cellulaires spécifiques surexprimés dans les tumeurs et qui seraient exempts dans les tissus sains avoisinant. On peut mentionner dans les approches étudiées: l'utilisation de ligands bispécifiques, l'incorporation de peptides dans différentes régions de la fibre ou la substitution par une fibre de sérotypes différents.

Notre hypothèse était que les domaines d'interaction complémentaire (K-Coil et E-Coil) permettraient aux ligands de s'associer aux particules virales et d'altérer le tropisme de l'AdV. Pour ce faire, nous avons inclus un domaine d'interaction synthétique, le K-Coil,

dans différentes régions de la fibre virale en plus de générer des mutations spécifiques pour abolir le tropisme naturel. Pour permettre la liaison avec les récepteurs d'intérêt dont l'EGF-R, l'IGF-IR et le CEA6, nous avons fusionné le domaine d'interaction complémentaire, le E-Coil, soit dans les ligands des récepteurs ciblés dont l'EGF et l'IGF-I, soit sur un anticorps à un seul domaine reconnaissant la protéine membranaire CEA6, l'AFAI.

Suite à la construction des différents ligands de même que des différentes fibres virales modifiées, nous avons déterminé tout d'abord que les différents ligands de même que les virus modifiés pouvaient être produits et que les différentes composantes pouvaient interagir ensemble. Les productions virales ont été optimisées par l'utilisation d'un nouveau protocole utilisant l'iodixanol. Ensuite, nous avons démontré que l'association des ligands avec le virus arborant une fibre modifiée pouvait entraîner une augmentation de transduction de 2 à 21 fois dans différentes lignées cellulaires. À cause de la difficulté des adénovirus à infecter les fibres musculaires occasionnée par l'absence du CAR, nous avons cherché à savoir si le changement de tropisme pourrait accroître l'infectivité des AdVs. Nous avons démontré que l'association avec le ligand bispécifique IGF-E5 permettait d'accroître la transduction autant dans les myoblastes que dans les myotubes de souris. Nous avons finalement réussi à démontrer que notre système pouvait induire une augmentation de 1,6 fois de la transduction suite à l'infection des muscles de souris MDX. Ces résultats nous amènent à la conclusion que le système est fonctionnel et qu'il pourrait être évalué dans des AdVs encodant pour différents gènes thérapeutiques.

Abstract

Key words : Adenovirus, Retargeting, IGF-IR, Tumours, Muscles

Adenoviruses have been studied as a way to develop new treatments for different diseases. Adenoviral vectors (AdV) are considered interesting tools for this propose, because they can be produced at high titers (1×10^{12} particles per millilitre) in laboratory and they have the capacity to infect non-dividing and dividing cells. AdV have been often modified in order to obtain the ability to kill tumour cells or to deliver exogenous genetic sequences essential to treat monogenic disease. However, weak expression of the primary adenovirus receptor, the CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) reduces greatly the transduction efficiency of AdV for the tumour cells. Moreover, some normal tissues express low amount of CAR, like the skeletal muscle, reducing the appeal of using AdV as a gene delivery vehicle for this tissue. To address this problematic, many modifications were done on the adenoviral capsid. The goal of these modifications were to generate an AdV able to target specific cellular receptors that were expressed in tumour cells but not in normal cells. Several approaches were done to modify the tropism of AdV, such as incubation with a bispecific ligands, incorporation of peptides within the adenoviral fiber structure or substitution of the viral fiber with a different serotype fiber.

The hypothesis of my project was to determine if an interaction domain fused within a ligand could bind the complementary domain incorporated on a virus and change the tropism of the AdV. The first step was to include a synthetic interaction domain, the K-

Coil, within specific region of the adenoviral fiber, as well as inserting two point mutations to abolish the natural tropism. To target the EGF-R, IGF-IR and the CEA6, we fused the complementary interaction domain, the E-Coil, to the respective ligand known as the EGF and the IGF-I or to a single domain antibody (known as AFAI) that bind specifically to CEA6. The specific interaction between the E-Coil and K-Coil was used to associate the ligand with the fiber in order to retarget the AdV toward the selected receptor.

We showed that the different ligands as well as the modified fibers could be produced and that both E-Coil and K-Coil expressing partners could interact together. We optimized the viral production by using an iodixanol purification protocol. More importantly, we clearly demonstrated that the ligand association with the fiber could increase the transduction efficiency between 2 to 21 fold against various tumour cells. The difficulty of adenovirus to infect muscle cells because of the lack of CAR expression brought us to evaluate the potential of our retargeted AdV to increase the transduction for the tissue. We showed that the use of IGF-E5 could increase the transduction efficiency in myoblasts as well as in myotubes. We finally demonstrated that our retargeting system could increase the transduction efficiency for skeletal muscle by 1,6 fold in new born MDX mice. In conclusion, our results show that the retargeting system is indeed functional. This system could be assessed using vectors that express therapeutic genes.

Table des matières

Table des matières	VII
Liste des figures	XI
Liste des tables	XV
Liste des abbréviations	XVI
Remerciements	XIX
Avant Propos	XXI
Section 1 : Introduction	1
1.1 La thérapie génique	2
1.1.1 Différents vecteurs viraux utilisés	3
1.2 L'adénovirus	8
1.2.1 Structure et classification	8
1.2.2 Cycle de vie des adénovirus	10
1.2.2.1 Interaction à la membrane, internalisation et mouvement cytoplasmique	11
1.2.2.2 Contrôle de la machinerie cellulaire et transcription des séquences virales	16
1.2.2.3 Formation des capsides virales, incorporation de la séquence virale et relâche des particules virales	22
1.2.3 Modification au niveau des structures génomiques	25
1.3 Utilisation des AdVs pour la thérapie génique	27
1.3.1 Vecteur utilisé pour la thérapie des myopathies	27
1.3.2 Utilisation de protéines cellulaires pour le traitement des tumeurs	29
1.3.3 Gènes suicides et vecteurs viraux	30
1.3.4 L'utilisation de virus oncolytiques	34
1.4 Problématiques induisant une réduction d'efficacité	37
1.5 Alternative pour améliorer l'efficacité des particules virales	39
1.5.1 Modification du génome viral	39
1.5.2 Changement de tropisme des vecteurs viraux	40
1.6 Les récepteurs choisis pour l'induction d'un changement de tropisme	49

1.6.1	Expression du CEA6	49
1.6.2	Le récepteur à l'EGF	50
1.6.3	Expression du récepteur à l'IGF-I dans les tumeurs et les tissus sains	52
1.7	Interactions protéiques	55
1.8	Objectif du projet de recherche	57
Section 2 : Matériel et méthodes		60
2.1	Entretien des cellules en culture	60
2.2	Génération des différentes constructions	61
2.2.1	Construction des fibres virales modifiées	61
2.2.2	Construction de l'IGF-E5, de l'EGF-E5-Coil et de l'AFAI-E5-Coil	66
2.3	Amplification et purification de l'EGF-E5-Coil inclus dans les corps d'inclusion	68
2.4	Amplification et purification de l'AFAI-E5-Coil inclus dans l'espace périplasmique	70
2.5	Transfection transitoire d'ADN plasmidique	71
2.5.1	Génération des particules virales par transfection transitoire	71
2.6	Récolte et dosage des différents extraits protéiques	72
2.7	Induction de la phosphorylation du récepteur à l'IGF-IR	75
2.8	Immunobuvardage de type Western	75
2.8.1	Coloration des SDS-PAGE par Coomassie Fluor Orange™	76
2.9	Essai de survie cellulaire	78
2.10	Production du ligand modifié IGF-E5 par « spin column »	79
2.11	Production du ligand modifié IGF-E5 par colonne d'affinité par gravité	80
2.12	Purification du ligand modifié IGF-E5 à grande échelle	81
2.13	Dosage des niveaux d'endotoxines	82
2.14	Essai ELISA modifié	83

2.15	Amplification, préparation et purification des différents virus	84
2.15.1	Amplification des différents virus	84
2.15.2	Purification des différents virus	85
2.15.3	Élimination de l'iodixanol	87
2.15.3.1	Utilisation de sac à dialyse	87
2.15.3.2	Utilisation d'une colonne d'échange d'anion DEAE	87
2.15.3.3	Utilisation des colonnes de concentration	88
2.15.4	Évaluation du nombre de particules totales	89
2.15.4.1	Dosage par spectrophotométrie	89
2.15.4.2	Dosage par HPLC	89
2.15.5	Titration des particules virales infectieuses	90
2.15.5.1	Titration des particules virales infectieuses par cytométrie de flux	90
2.15.5.2	Titration des particules virales infectieuses par TCID50	91
2.15.6	Mesure des particules adénovirales réplicatives compétentes (RCA)	92
2.16	Évaluation du changement de tropisme	93
2.17	Différentiation des myoblastes et utilisation des myotubes	95
2.18	Injection dans les animaux et traitement des muscles pour analyse	96
2.19	PCR quantitatif en temps réel	97
2.20	Immunofluorescences indirectes sur lames	99
2.20.1	Expression du récepteur à l'IGF-I sur les coupes de muscles de souris	99
2.20.2	Expression de la GFP sur les coupes de muscles de souris	99
Section 3 : Résultats		101
3.1	Production des ligands bispécifiques	103
3.1.1	Construction et vérification des séquences encodant l'IGF-E5	105
3.1.1.1	Production des clones stables dans les CHO pour le ligand IGF-E5	111
3.1.1.2	Productivité des meilleurs clones stables	112
3.1.1.3	Production et purification d'IGF-E5 à plus grande échelle	116
3.1.2	Production et purification de l'EGF-E5-Coil	120
3.1.3	Production et purification de l'AFAI-E5-Coil	124
3.2	Construction des différentes fibres virales et vérification de leur activité	126
3.2.1	Essai de trimérisation par immunobuvardage de type Western	128
3.2.2	Essai d'interaction entre les différentes fibres possédant le domaine K-Coil et les différents ligands	130
3.3	Production, amplification et purification des différents virus	134
3.3.1	Évaluation de la lignée 293E pour l'amplification des virus	

	avec un domaine d'interaction K-Coil	134
3.3.2	Amplification des différentes particules virales	136
3.3.3	Purification des virus modifiés par différentes méthodes	140
3.3.4	Amplification à l'aide de monocouches de 293E ou à l'aide de culture en suspension de 293F	152
3.4	Optimisation et changement de tropisme avec les virus arborant des fibres modifiées dans les modèles tumoraux	155
3.4.1	Temps d'expression optimal du transgène	155
3.4.2	Influence du temps sur la formation des complexes	157
3.4.3	Changement de tropisme par l'utilisation de l'EGF-E5-Coil avec le virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m	161
3.4.4	Courbe d'infectivité dans les A549	163
3.4.5	Changement de tropisme des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dans les A549	166
3.4.6	Changement de tropisme des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dans les U87MG et U87MG-Wt	171
3.5	Vérification du changement de tropisme à l'aide du IGF-E5	176
3.6	Changement de tropisme dans des cellules musculaires	185
3.6.1	Optimisation des conditions dans les myoblastes	185
3.6.2	Changement de tropisme dans les myotubes <i>in vitro</i>	191
3.7	Changement de tropisme dans les tissus musculaires de souris nouveau-nées MDX	198
Section 4 : Discussion		210
4.1	Production des ligands bispécifiques	212
4.2	Impact du K-Coil sur les fibres virales	217
4.3	Interaction entre les domaines K-Coil et E-Coil	221
4.4	Induction d'un changement de tropisme	224
4.5	Analyse des infections dans les muscles de souris nouveau-nées MDX	229
Section 5 : Conclusions		232
Section 6 : Bibliographie		237
Annexe I : Plasmides, virus et lignées cellulaires utilisées dans cette thèse		XXIII

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'adénovirus.	10
Figure 2 : Cheminement de l'adénovirus suite à l'interaction avec le CAR.	12
Figure 3 : Réplication du génome viral.	17
Figure 4 : Structure génomique des différentes générations de vecteurs adénoviraux.	24
Figure 5 : Fonctionnement de l'approche utilisant les gènes suicides.	32
Figure 6 : Élimination des cellules cancéreuses à l'aide de virus oncolytiques.	35
Figure 7 : Différentes stratégies pour induire un changement de tropisme.	42
Figure 8 : Représentation schématique des hélices α composant les domaines d'interaction K-Coil et E-Coil.	56
Figure 9 : Représentation du changement de tropisme induit par l'utilisation de ligands bispécifiques.	102
Figure 10 : Représentation schématique des différents peptides qui ont été évalués pour leur capacité à altérer le tropisme de particules virales.	104
Figure 11 : Sécrétion de l'IGF-E5 dans le milieu conditionné suite a une transfection transitoire.	107
Figure 12 : Expression et purification du ligand modifié IGF-E5.	109
Figure 13 : Courbe de survie des clones L et 4B4 dans le temps.	113
Figure 14 : Expression de l'IGF-E5 des différents clones dans différentes conditions expérimentales.	114
Figure 15 : Dosage d'une production d'IGF-E5 provenant de 2 préparations de 500 mL de l'IGF-E5.	117
Figure 16 : Interaction du ligand IGF-E5 avec le récepteur à l'IGF-IR.	119
Figure 17 : Expression et purification sur colonne de l'EGF-E5-Coil.	121
Figure 18 : Expression et purification du ligand modifié AFAI-E5-Coil.	125

Figure 19 : Trimérisation des différentes fibres virales dans des conditions expérimentales natives.	127
Figure 20 : Niveau d'expression des différentes fibres virales.	129
Figure 21 : Validation de l'interaction entre les domaines d'interaction retrouvés sur les fibres virales modifiées et les différents peptides bispécifiques.	131
Figure 22 : Démonstration de la spécificité du système d'interaction K-Coil et E-Coil.	132
Figure 23 : Avantage de la lignée de complémentation 293E chez les virus arborants le domaine d'interaction K5-Coil.	135
Figure 24 : Purification de particules virales sur différents gradients.	142
Figure 25 : Quantification des particules totales par HPLC.	144
Figure 26 : Impact de l'iodixanol sur l'infectivité dans les 293E.	147
Figure 27 : Présence de l'iodixanol dans les échantillons.	150
Figure 28 : Impact de la dialyse sur le changement de tropisme.	151
Figure 29: Variation de l'expression du transgène selon le virus utilisé.	156
Figure 30 : Impact de la période d'incubation sur le changement de tropisme.	159
Figure 31 : Impact de la présence du His-Tag sur l'efficacité du changement de tropisme du ligand EGF-E5-Coil.	160
Figure 32 : Impact de la présence de l'EGF-E5-Coil sur l'efficacité de Transduction.	162
Figure 33 : Estimation de la MOI optimale pour analyser l'infectivité des virus au tropisme altéré dans les cellules A549.	164
Figure 34 : Changement de tropisme à l'aide de l'AFAI-E5-Coil dans les A549.	166
Figure 35 : Changement de tropisme à l'aide de l'EGF-E5-Coil dans les A549.	167

Figure 36 : Impact des mutations ponctuelles introduites dans le domaine AB.	168
Figure 37 : Nécessité de la présence du domaine E-Coil pour induire un changement de tropisme.	170
Figure 38 : Expression de l'EGF-R dans différentes lignées cellulaires.	171
Figure 39 : Impact des modifications apportées sur les fibres virales au niveau de la multiplicité d'infection dans les U87MG.	172
Figure 40 : Changement de tropisme à l'aide de l'EGF-E5-Coil dans les U87MG.	173
Figure 41 : Changement de tropisme à l'aide de l'EGF-E5-Coil dans les U87MG-Wt.	174
Figure 42 : Comparaison des U87MG et des U87MG-Wt en fonction du changement de tropisme.	176
Figure 43 : Expression du récepteur à l'IGF-I dans différentes lignées cellulaires.	177
Figure 44 : Impact des modifications apportées sur les fibres au niveau de la multiplicité d'infection.	179
Figure 45 : Changement de tropisme à l'aide de l'IGF-E5 dans différentes lignées cellulaires.	181
Figure 46 : Spécificité du changement de tropisme avec l'IGF-E5 dans les H59 et les U87MG.	183
Figure 47 : Changement de tropisme dans des lignées cancéreuses de l'ovaire TOV-112D et OV-90.	184
Figure 48 : Infectivité des virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à différentes MOI dans des myoblastes de souris (C2C12).	186
Figure 49 : Augmentation de l'efficacité de transduction à différentes concentrations d'IGF-E5 dans la lignée C2C12.	187
Figure 50 : Changement de tropisme induit suite à l'association avec l'IGF-E5 ou avec l'IGF-I recombinant de souris.	189

Figure 51: Importance de l'association de l'IGF-E5 avec les particules virales.	190
Figure 52 : Expression de la GFP suite à transduction avec différents virus dans les myotubes.	192
Figure 53 : Optimisation des quantités d'IGF-E5 pour le changement de tropisme dans les myotubes.	194
Figure 54 : Expression de la GFP suite à transduction avec différents virus en absence ou en présence d'IGF-E5.	195
Figure 55 : Expression et quantification de la GFP dans les myotubes.	197
Figure 56 : Présence du récepteur à l'IGF-I dans les muscles de souris MDX nouveau-nés.	199
Figure 57 : Immunomarquage des sections de muscles transduites avec différents virus.	204
Figure 58 : Photo d'une section de muscle infecté immunomarkuée à une magnitude de 180X.	204
Figure 59 : Nombre de particules virales mesuré dans les différents muscles.	205
Figure 60 : Augmentation de la GFP dans différents échantillons de muscles par immunobuvardage de type Western.	208
Figure 61 : Évaluation de l'intensité de la GFP obtenue par immunobuvardage.	208

Liste des tables

Table 1 : Classification des différents sérotypes adénoviraux connus.	8
Table 2 : Poids moléculaire des différentes protéines et pourcentage d'acrylamides utilisés dans les gels de séparation.	75
Table 3 : Anticorps primaires utilisés dans le cadre des différentes expériences nécessitant leur utilisation.	77
Table 4 : Anticorps secondaires utilisés dans le cadre des différentes expériences nécessitant leur utilisation.	77
Table 5 : Dilution à effectuer pour déterminer le nombre de particules virales infectieuses contenu dans les préparations virales.	91
Table 6 : Nombre de cellulesensemencées par type cellulaire.	94
Table 7 : Différentes productions d'IGF-E5 par transfections transitoires.	111
Table 8 : Expression de l'IGF-E5 dans les différentes conditions expérimentales.	115
Table 9 : Différentes productions du ligand modifié EGF-E5-Coil.	123
Table 10 : Purification de différents virus par l'utilisation de deux gradients de CsCl consécutifs.	138
Table 11 : Production des particules virales dans les 293E avant purification.	140
Table 12 : Purification de virus possédant une fibre virale sauvage en utilisant deux approches différentes, soit le CsCl et l'iodixanol.	145
Table 13 : Taux de récupération entre un virus sauvage et un virus modifié en utilisant l'iodixanol.	145
Table 14 : Impact des différentes approches pour éliminer l'iodixanol des échantillons de virus Ad5GP Fibre HIK5 Dm.	149
Table 15 : Comparaison entre différentes lignées au niveau de la production virale et production de particules par cellules.	153
Table 16 : Production en suspension dans les 293F et purification en utilisant l'iodixanol.	154

Liste des abréviations

%	Pourcentage
5-FC	5-fluorocytosine
5-FU	5-fluorouracile
6-MePdR	Deoxy-ribofuanosyl-6-methylpurine
AAV	Virus associé à l'adénovirus
Ad5	Adénovirus de type 5
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adenovirus death protein
AdV	Vecteur adénoviral
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Albumine de serum bovin
CAT	Chlororamphénicol acétyltransférase
CAR	Récepteur à l'adénovirus et au virus Coxsackie
CD-CHO	Chemically define medium for CHO cell
CEA6	Carcinoembryonic antigen 6
CHO	Cellules ovariennes de hamster chinois
CRAd	Vecteur adénoviral répliatif conditionnel
CsCl	Chlorure de césium
DBP	DNA-binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
EGF	Epithelial growth factor
EGF-R	Epithelial growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
erB1	epidermal growth factor rector
F-araA	Arabinofuranosyl-2-fluoroadenine monophosphate
FBS	Fetal bovine serum

FGF	Fibroblast growth factor
FLSSM	Fluorescent Labelling in Semi-Solid Medium
GaLV	Virus de la leucémie du Gibbon
GFP	Protéine fluorescente verte
HER-1	Human epidermal growth factor receptor 1
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HPLC	High performance liquid chromatography
HPMA	Hydrolyzed Polymaleic Anhydride
HSV	Herpes simplex virus
IGF-I	Insulin-like growth factor type I
IGF-IR	Insulin-like growth factor type I receptor
IGFIBP	Insulin-like growth factor type I binding protein
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ITR	Inverse terminal repeat
kDa	KiloDalton
LAL	Lysate de Limulus amoebocyte
LC-SFM	Low calcium Serum Free Media
LTR	Long terminal repeat
M	Molaire
MAPK	Mitogen-associated protein kinase
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MOI	Moiety of infection
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
nM	Nanomolaire
NPC	Complexe de pore nucléaire
OAs	Oligonucléotides antisens
PBS	Phosphate buffer saline
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylèneimine

PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKR	Protein kinase RNA-activated
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PNP	Purine nucléoside phosphatase
PNPP	p-nitrophenyl phosphate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RCA	Replicative competent adenovirus
RPMI	Roswell park memorial institute medium
ScFv	Anticorps à une seule chaîne variable
SFDA	Administration de la nourriture et des drogues de Chine
SIN	Self-inactivating
siRNA	Small interfering RNA
SPR	Surface plasmon resonance
U	Unité
μM	Micromolaire
TA	Tibialis antérieure
TFA	Trifluoroacetic acid
TGF α	Transforming growth factor α
TGF β	Transforming growth factor β
TNF α	Facteur de nécrose tumoral α
TK	Thymidine Kinase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSV	Vesicular Stomatitis Virus

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Docteur Bernard Massie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir offert l'opportunité de travailler dans le domaine de la thérapie génique. Son aide m'a été très précieuse, dans mon cheminement, car il m'a permis de percevoir le domaine de la recherche sous un angle différent. Le projet a été particulièrement enrichissant, tant sur le plan personnel que pour ma carrière. Également, je tiens à souligner le soutien que m'a apporté le Docteur Rénald Gilbert. Grâce aux multiples discussions que nous avons eues, le projet a pu connaître des développements passionnants.

J'aimerais ensuite remercier tous mes collègues de travail, avec qui j'ai eu la chance d'interagir au quotidien durant mon séjour au laboratoire du Dr. Massie : Claire Guilbault, Lucie Bourget, Antoine Caron, Alice Bernier, Hafida Amori, Nasha Nassoury et Nancy Laroche. Sans leur présence et leur support, sans leurs connaissances et leur aide, je ne serais pas parvenu à ce stade de mes études doctorales. De la même façon, je voudrais dire merci à tous les membres du laboratoire, passés et présents, pour les nombreuses discussions fructueuses qui ont nourri ma réflexion.

Tout particulièrement, je voudrais remercier ma douce moitié, Lucie Fontaine, pour m'avoir soutenu lors des trois dernières années de mon doctorat. Cette période fut remplie de moments difficiles où son support moral a été crucial; à maintes reprises, elle fut là pour me pousser à continuer et à me dépasser. Sans son soutien constant, il m'aurait été difficile

d'accomplir autant. Je voudrais aussi remercier mes parents pour avoir toujours cru en mes capacités : leurs encouragements et leur confiance sont pour beaucoup dans la réalisation de cette thèse.. De même, j'adresse un immense merci à ma belle famille pour leur présence attentionnée durant les dernières années de mon doctorat. Pour finir, je ne peux pas passer sous silence le support de mes nombreux amis qui ont suivi mon évolution durant mes études doctorales. Leur appui de même que leur désir de me voir réussir ont été une grande source de motivation.

Ces recherches n'auraient pas été possibles sans le support financier de l'institut de recherche en santé du Canada (CIHR), l'institut national du cancer du Canada, de même que du conseil national de recherche du Canada (CNRC).

Avant Propos

Cette thèse de doctorat a été écrite de façon classique. Elle contient tout d'abord une section qui décrit les différents sujets pertinents pour le projet de recherche et les aspects futurs auxquels le projet peut mener. Par la suite, le matériel et les multiples méthodes qui ont été utilisés et développés au cours de ce projet sont présentés de manière détaillée. Dans une troisième section sont exposés les différents résultats qui ont été obtenus pour confirmer les hypothèses avancées. Enfin, les résultats sont analysés dans la portion discussion, de manière à faire ressortir les points positifs de mon projet de recherche en plus d'expliquer les essais qui n'ont pas donné les résultats attendus.

J'ai déjà utilisé des résultats présentés dans le cadre de cette thèse pour compléter le travail de plusieurs de mes collaborateurs et permettre la publication d'articles scientifiques (cités ci-dessous). Certains de ces résultats sont actuellement mis à contribution, dans la rédaction d'un article scientifique qui sera soumis d'ici peu. L'article portera sur le changement de tropisme induit par l'utilisation de différents ligands bispécifiques en association avec le vecteur adénoviral Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (cité ci-dessous).

Pinard M., Zeng Y., Kastberger B., Larochelle N., Nalbantoglu J., Gilbert R., Massie B.. Increase of Muscles Transduction Using an Altered Ad5 Vector in Association With an IGF-I Derived Bispecific Ligand (En préparation)

Caron,A.W.; Nicolas,C.; Gaillet,B.; Ba,I.; **Pinard,M.**; Garnier,A.; Massie,B.; Gilbert,R. 2009. Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins. *BMC Biotechnol.* 11;9:42

Le,P.U.; Lenferink,A.E.; **Pinard,M.**; Baardsnes,J.; Massie,B.; O'Connor-McCourt,M.D. 2009. Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. *Protein Expr Purif.* 64(2):108-17

Zeng,Y.; **Pinard,M.**; Jaime,J.; Bourget,L.; Uyen,Le P.; O'Connor-McCourt,M.D.; Gilbert,R.; Massie,B. 2008. A ligand-pseudoreceptor system based on de novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. *J. Gene Med.* 10(4): 355-67

Section 1 :
Introduction

1.1 La thérapie génique

Le but premier de la thérapie génique est de permettre le transfert de séquences génétiques dans l'optique de pouvoir traiter différentes maladies chez les patients. En fait, le transfert de gène via l'utilisation de différents vecteurs devrait permettre de corriger la fonction des gènes responsables de maladies monogéniques (Hida et al., 2011; Al-Allaf et al., 2010; Goyenvallé and Davies, 2011; Yagi et al., 2011), d'induire la mort de cellules tumorales (Witlox et al., 2007; Natsume and Yoshida, 2008; Vachani et al., 2010) ou de prévenir l'apparition de certaines maladies en utilisant le transfert de gène en tant que vaccin (Bodles-Brakhop and Draghia-Akli, 2008). En ce qui concerne les maladies monogéniques, les gènes transduits devraient être exprimés seulement dans les cellules défectueuses, et ce, sur une période assez longue pour assurer la correction des défauts. Les corrections devraient rétablir le phénotype normal des cellules ciblées. Dans le cas où la thérapie génique ciblerait des cellules tumorales, les vecteurs devraient être en mesure d'éliminer toutes les cellules tumorales sans altérer la survie des cellules normales avoisinantes.

Le transfert de séquences génétiques peut s'effectuer de différentes manières. En effet, énormément de travaux ont été effectués dans l'optique d'utiliser des vecteurs non viraux pour le traitement de plusieurs maladies. Ces vecteurs sont avantageux car ils sont versatiles, faciles à préparer et à entreposer (Elsabahy et al., 2011). Plusieurs approches peuvent être utilisées pour amener la séquence d'intérêt dans les cellules, dont l'ADN nu,

des complexes lipides-ADN ou encore, l'utilisation de différents types de polymères (Elsabahy et al., 2011). Les vecteurs viraux, pour leur part, sont beaucoup plus intéressants car ils peuvent transporter les séquences génétiques dans les cellules ciblées plus efficacement que les vecteurs non viraux. Par contre, les vecteurs viraux induisent souvent une réponse immunitaire contre les protéines virales. Mis à part ce désavantage, plusieurs vecteurs ont été étudiés à cause des avantages qui les caractérisent : l'intégration, leur vaste tropisme, leur facilité à être purifiés ou leur capacité d'encapsider de grands fragments d'ADN exogènes. En première partie, les rétrovirus, les virus associés à l'adénovirus (AAV) et les adénovirus seront abordés, mais l'emphase portera principalement sur les adénovirus.

1.1.1 Différents vecteurs viraux utilisés

Les rétrovirus sont des virus à ARN simple brin qui ont la capacité d'intégrer leur génome au niveau des chromosomes des cellules infectées. C'est l'un des virus les plus utilisés lors d'essais cliniques après l'adénovirus en 2011 avec 20.7% des essais cliniques (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). En fait, il s'agit du premier virus à avoir permis le traitement d'une déficience génétique chez l'humain en 2000 soit la correction de la maladie X-SCID (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Dans plusieurs patients, l'intégration de la séquence du rétrovirus s'est produite à proximité de l'oncogène LMO2. Cinq des patients traités ont développé une leucémie (Hacein-Bey-Abina et al., 2003) mais le traitement a tout de même permis la guérison des autres patients. Toutefois, il n'est pas clair si le développement de la leucémie chez les patients est lié directement à la

surexpression du gène LMO2. L'expression de l'IL2RG pourrait accroître le potentiel d'oncogène comme mentionné dans la revue de littérature de Biasco en 2012 (Biasco et al., 2012). De plus, il serait possible que d'autres facteurs soient impliqués dans le développement qui serait indépendant du transgène ou du site d'insertion (Ginn et al., 2010). Les lentivirus qui font partis de la famille des rétroviridae sont étudiés, ont aussi été impliqués dans des essais cliniques (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>). En plus des trois gènes retrouvés dans les rétrovirus (Gag, Pol et Env), le génome du lentivirus encode pour plusieurs protéines accessoires qui permettent aux lentivirus d'infecter des cellules quiescentes en plus des cellules en division rapide. Le tropisme naturel des rétrovirus ou des lentivirus est très limité mais il peut être changé en utilisant différentes glycoprotéines comme celle du VSV ou celle du GaLV mentionné dans la revue de Bouard (Bouard et al., 2009). Une autre limitation touche l'intégration non spécifique du génome viral. Dans certains cas, l'intégration du génome de rétrovirus ou de lentivirus peut mener à la surexpression des gènes trouvés à proximité des sites d'intégration. La surexpression serait causée par la présence des séquences LTR qui sont des promoteurs très puissants. De plus, après une certaine période de temps, une réduction de l'expression du transgène peut être mesurée. Cette diminution est attribuée à la méthylation des cytosines et à la déacétylation des histones (Rivella et al., 2000). La réduction d'expression et la surexpression des gènes à proximité peuvent être résolues par l'utilisation de vecteurs SIN qui ont la capacité de s'inactiver lors de la transcription inverse. En fait, les vecteurs SIN sont générés en éliminant une séquence précise dans le LTR retrouvé en 3' du génome viral qui est ensuite transférée sur la portion 5' lors de la transcription inverse (Yu et al., 1986). Ce transfert inactive l'activité transcriptionnelle du

virus. Les vecteurs SIN sont moins sensibles à la répression parce que les séquences du LTR qui sont ciblées par les méthylases ont été enlevées. De plus, l'inactivation des LTR empêche la surexpression des gènes qui pourraient se retrouver à proximité du site d'intégration (Yi et al., 2011). L'utilisation des vecteurs SIN produit par contre une moins grande quantité de particules virales et l'expression du transgène est réduite étant donné qu'elle n'est plus sous le contrôle des LTR (Yi et al., 2011). Tout de même, le transgène peut être placé sous le contrôle de différents types de promoteurs comme le CMV qui mène à un excellent niveau d'expression.

Les virus associés à l'adénovirus (AAV) sont des virus à ADN simple brin dont la capside est d'une taille de 20 nm. L'AAV requiert la présence des protéines adénovirales pour qu'ils puissent se répliquer dans les cellules infectées. Tout comme les rétrovirus, l'AAV a la capacité d'intégrer son matériel génétique dans le génome des cellules infectées. La différence entre les deux virus est que l'AAV s'intègre plus fréquemment sur le site AAVS1 qui se trouve sur le bras q du chromosome 19. L'AAV peut tout de même s'intégrer de façon non spécifique dans le génome des cellules (Deyle and Russell, 2009). L'intégration requiert cependant l'expression du gène REP qui est délété dans la majorité des vecteurs utilisés en essais cliniques. Cependant, les vecteurs AAV peuvent se maintenir de manière épisomique durant plusieurs années dans les tissus qui ne sont pas en division active, comme les tissus hépatiques ou les fibres musculaires (Duan et al., 1998; Nakai et al., 2001). Les AAV peuvent être produits en bonne quantité dans les laboratoires et la réponse immunitaire face à l'AAV est très faible. Lorsque l'AAV induit une réponse immunitaire, c'est que l'individu avait déjà été infecté par l'AAV ou que le système

immunitaire a bâti une réponse contre le transgène. L'induction d'une réponse immunitaire contre le transgène est problématique car elle réduit l'expression de celui-ci (Bouard et al., 2009). La petite taille de la capsidie et la présence de 11 différents sérotypes permettent aux AAV d'être utilisés pour infecter différents tissus comme les muscles squelettiques, les hépatocytes ou la rétine de l'œil (Mays and Wilson, 2011). Par contre, la taille de la cassette d'expression qui peut être encapsidée dans les vecteurs peut difficilement dépasser les 5 Kb. Pourtant, même avec plusieurs limitations, de nombreux essais cliniques ont été entrepris en utilisant l'AAV (Mingozzi and High, 2011). Le meilleur résultat provient probablement du rétablissement d'une protéine impliquée dans la maladie de Leber qui occasionne une perte graduelle de la vision chez l'humain. Le rétablissement de la protéine RPE65 a donc permis un rétablissement partiel de la vision des patients (Cideciyan, 2010).

Les vecteurs adénoviraux (AdV) sont des virus à ADN double brin avec une capsidie de 80 nM. L'adénovirus peut être utilisé pour de multiples raisons. D'une part, les adénovirus peuvent être produits en grande quantité (jusqu'à 1×10^{12} particules/mL) en laboratoire. Ensuite, comparativement à d'autres types de vecteurs, ils ont la capacité d'infecter autant des cellules quiescentes que des cellules en division rapide (Coughlan et al., 2010). L'intégration du génome adénoviral dans les chromosomes est un événement peu fréquent (Harui et al., 1999), favorisant l'utilisation de ceux-ci dans des systèmes où l'on cherche à obtenir une expression transitoire. De plus, certaines modifications sont à l'étude pour permettre l'intégration chromosomique du génome viral. L'énorme quantité d'encapsidation pouvant atteindre 37Kb qui peut être atteint chez l'adénovirus en fait un outil intéressant. Le meilleur exemple est le transport du gène de la dystrophine pour le

traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) dont l'ADN complémentaire fait au-dessus de 14kB (Gilbert et al., 2003). Le large tropisme des adénovirus permet aussi de les utiliser dans le cadre de différentes approches thérapeutiques. Les connaissances du génome viral ont permis la modification de plusieurs de ses composantes dont la base penton (Wickham et al., 1996), les hexons (Alba et al., 2010), la protéine de la capsid IX (Poulin et al., 2010), la protéine V (Puntener et al., 2011), de même que de la fibre virale et ce, de multiples manières (Coughlan et al., 2010). Les adénovirus ont été utilisés pour le transport d'une multitude de protéines cellulaires pour le traitement de maladies monogéniques comme la DMD. De plus, les adénovirus peuvent être armés avec différentes protéines pour éliminer les cellules tumorales comme des gènes suppresseurs de tumeurs, des protéines pro-apoptotiques ou des protéines immunorégulatrices. Les adénovirus ont aussi servi de vecteurs pour plusieurs gènes suicides (Kuhlmann et al., 2008). Bien qu'il ne fût pas le premier vecteur viral testé en essais cliniques, l'adénovirus est le premier virus à avoir été commercialisé pour le traitement des cancers. La GendicineTM est un AdV de première génération encodant pour le gène suppresseur de tumeur p53. Ce vecteur a été accepté par l'administration de la nourriture et des drogues de Chine (SFDA) comme traitement contre les cancers de la tête et du cou en 2003. Le virus ne contient pas la région E1 et la forme sauvage de p53 est sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous. Par la suite, en 2006, un autre type de vecteur adénoviral, le H-101, a aussi été accepté par la SFDA comme traitement pour les tumeurs de la tête et du cou (Shi and Zheng, 2009). Ce virus, similaire à l'ONYX-015, est un virus répliquatif compétent n'exprimant plus la protéine virale E1B-55K nécessaire à la séquestration de la protéine

cellulaire p53. Ce virus peut donc se répliquer dans les cellules tumorales mais pas dans les cellules normales exprimant la protéine p53.

1.2 L'adénovirus

1.2.1 Structure et classification

Les adénovirus ont été isolés pour la première fois dans les années 1950 à partir de cellules adénoïdes qui avaient été infectées (ROWE et al., 1953). Ce sont des nanoparticules icosaédriques de 90nm non enveloppées faisant partie de la famille des adénoviridae. Ils appartiennent au genre des mastadénovirus (virus de mammifère) qui sont

Table 1 : Classification des différents sérotypes adénoviraux connus.

Le tableau a été inspiré des travaux de Nicklin et de ses collègues (Nicklin et al., 2005).

Classes	Sérotypes	Propriété d'hémagglutination	Pourcentage de G:C	Récepteurs utilisés	Tropisme
A	12, 18, 31	IV (Peu ou pas d'agglutination)	48-49	CAR	Voie respiratoire, Tractus intestinal
B1	3, 7, 16, 21, 50	I (Agglutination complète d'érythrocytes de singes)	51-52	CD46, CD80, CD86	Rein, Voie respiratoire, Yeux, Tract urinaire
B2	11, 14, 34, 35, 55	I	48-49	CD46, CD80, CD86, Récepteur 'X'	Rein, Voie respiratoire, Tract urinaire
C	1, 2, 5, 6	III (Agglutination partielle d'érythrocytes de rat)	57-59	CAR, HSPG, α M β 2, α L β 2	Voie respiratoire, Yeux, lymphoïdes
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54	II (Agglutination complète d'érythrocytes de rat)	57-61	sCAR (Ad9, Ad19p), CD46, acide sialique (Ad37, Ad19a, Ad8)	Tractus intestinal, Yeux (Kérato-conjontivite)
E	4	III	57-59	CAR	Voie respiratoire, Yeux
F	40, 41	III	51-52	CAR (Fibre longue)	Tractus intestinal
G	52	?	55	ND	Tractus intestinal

divisés en huit classes distinctes (table 1) en fonction de leur caractère morphologique, de leur capacité à induire une hémagglutination ou selon le type de tissus qu'ils peuvent infecter (Horwitz, 2004). Chacun des virus des différentes familles a des caractéristiques précises tant au niveau de la taille de leur fibre (nombre de répétitions au niveau de la tige) que dans la charge isoélectrique de celle-ci (Arnberg et al., 2002). Le poids moléculaire des adénovirus de type 2 avoisine les 150×10^3 kDa dont 7% serait associé au génome viral (van and Burnett, 1985). Les particules sont relativement stables, mais certaines conditions physico-chimiques peuvent engendrer une perte d'infectivité chez les particules virales. En effet, une trop grande force ionique de même qu'un pH trop acide, une augmentation thermique ou l'effet de geler et dégeler les virus endommagent les particules (Rexroad et al., 2006; Rexroad et al., 2003; Yamamoto, 1967). Tous les membres des adénoviridae sont composés de 240 copies de trimère d'hexon (soit 720 copies par capsid de la protéine II), de 12 pentamères de bases pentons (soit 72 copies par capsid de la protéine III) et 12 d'homotrimères de fibre (soit 36 copies par capsid de protéine IV). Les adénovirus contiennent un cœur nucléo-protéique associé à des éléments protéiques qui font le pont entre le génome viral et la capsid (Figure 1). Le génome viral de l'adénovirus de type 5 est composé d'un fragment linéaire de 36 000 paires de base d'ADN double brin associé à une protéine terminale essentielle à la réplication du génome (Mei et al., 2003). Le génome viral est séparé en différentes régions qui sont exprimées les unes après les autres. La séquence génomique contient, en plus des séquences encodantes pour les différentes protéines virales, un signal d'encapsidation essentiel à l'incorporation du génome viral dans la particule et à la propagation du virus. De plus, la séquence virale possède deux séquences terminales inverses, à savoir les ITRs impliqués dans la réplication du génome viral.

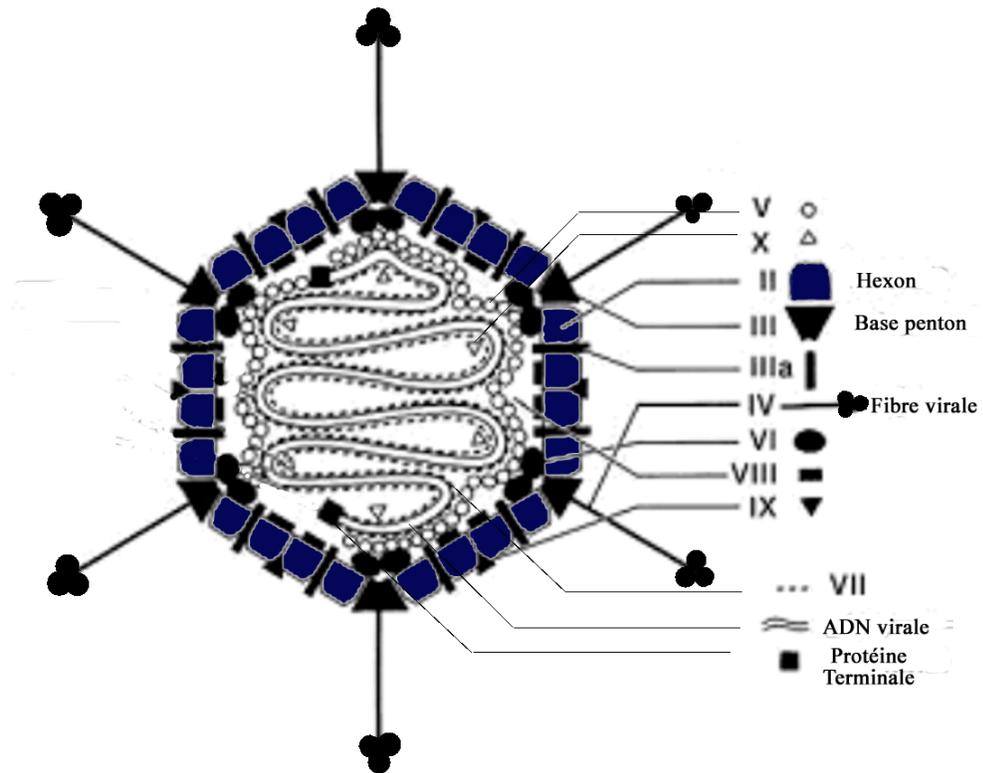


Figure 1 : Structure de l'adénovirus

Représentation schématique de la particule adénovirale de type 5 et positionnement des différentes composantes de la capsid virale. La figure a été adaptée de John J. Rux et Roger M. Burnett.

1.2.2 Cycle de vie des adénovirus

Le cycle de réplication débute par l'internalisation des particules virales suite à des changements conformationnels des intégrines engendrés par l'interaction avec les particules virales. L'adénovirus s'échappe ensuite des endosomes tardifs, se déplace vers le noyau de la cellule et les capsides partiellement dénaturées interagissent finalement avec les pores nucléaires (Figure 2). Le temps de propagation des particules adénovirales est variable selon les modifications qui ont été apportées à la capsid ou à la séquence génomique. Par

contre, pour un virus sauvage, le temps entre l'entrée du virus et la lyse des cellules est d'environ 20 à 24 heures (Thomas Shenk, 1996). Le relargage est causé par la cytolysse des cellules permettant ainsi à environ 10 000 nouvelles particules virales par cellules d'être produites.

1.2.2.1 Interaction à la membrane, internalisation et mouvement cytoplasmique

Les particules adénovirales reconnaissent en premier lieu le récepteur CAR (coxsackie adenovirus receptor) via le bouton de la fibre virale à l'aide d'une interaction de forte affinité dont la constante de dissociation est autour de 14.8 nM (Kirby et al., 2000). Le récepteur fait partie de la super famille des immunoglobulines. Il est exprimé au niveau des jonctions étanches de plusieurs types de tissus, dont ceux du cœur, de la cornée ou au niveau des tissus épithéliaux, dont ceux des poumons (Tsukita et al., 2008;Mandell et al., 2006;Sinnreich et al., 2005;Shaw et al., 2004;Noutsias et al., 2001). Le rôle normal du CAR est associé avec les interactions cellulaires pour permettre la formation des jonctions serrées (Farmer et al., 2009). Son expression est polarisée au niveau apical des cellules et requiert donc des dommages au tissu pour permettre l'interaction entre le récepteur et les particules virales. Par contre, les niveaux d'expression du CAR sont en relation avec le développement des organismes vivants donc, certains tissus dont les muscles possèdent une faible expression du récepteur. De plus, plusieurs types cancéreux dont les glioblastomes perdent l'expression du CAR (Li et al., 1999;Miller et al., 1998). Le CAR et la fibre virale interagissent l'un avec l'autre via le bouton de la fibre (Nicklin et al., 2005). L'interaction

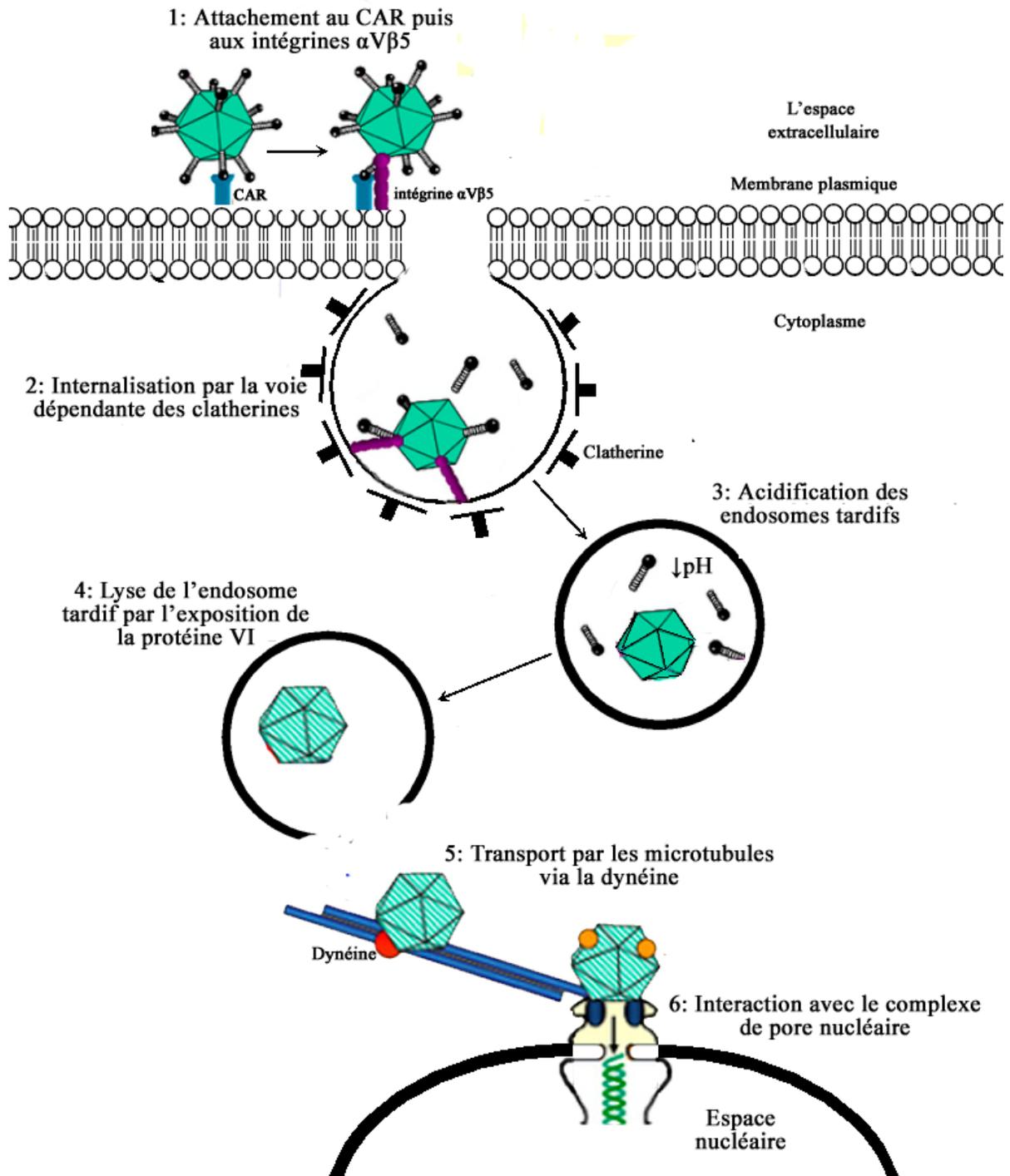


Figure 2 : Cheminement de l'adénovirus suite à l'interaction avec le CAR

Représentation schématique des voies intracellulaires utilisées par des adénovirus suite à l'interaction avec le CAR et les intégrines.

activerait la voie de signalisation p44/42 MAPK dans les cellules permettant le regroupement des molécules de CAR. Il a été suggéré que cette activation pourrait aussi moduler l'expression ou la localisation des intégrines à proximité de la liaison avec le CAR (Farmer et al., 2009).

La fibre virale serait composée d'un homotrimère de protéine IV divisé en trois portions distinctes. Le trimère est ancré à la capsid virale via l'interaction du motif conservé FNPVYPY avec la base penton. Ce domaine se retrouve en N-Terminus de la fibre et il est conservé parmi un bon nombre de sérotypes (Zubieta et al., 2005). Le trimère est stabilisé par un autre domaine protéique YTFSYI qui est aussi conservé dans la fibre de différents sérotypes (Hong and Engler, 1996). De plus, l'interaction entre le bouton et le CAR est régie par plusieurs domaines. La génération de nombreuses mutations ponctuelles dans la séquence du bouton a permis de montrer l'importance des domaines AB et DG dans l'interaction avec le CAR (Kirby et al., 2000). Le groupe de Law a aussi montré que des mutations dans le domaine FG pouvaient diminuer énormément l'infectivité virale (Law and Davidson, 2005). La fibre virale peut aussi interagir avec d'autres récepteurs à la surface des cellules (Nemerow et al., 2009) ou avec des composantes de la matrice extracellulaire (Dehecchi et al., 2001; Zhang and Bergelson, 2005). La taille de la tige qui peut varier de 6 à 22 répétitions selon les sérotypes de même que les domaines qui se retrouvent sur le bouton confèrent au virus sa spécificité. Ces variations sur la fibre modulent l'efficacité d'interaction avec le CAR (Law and Davidson, 2005). Il peut aussi y avoir une liaison à partir d'autres éléments membranaires via une séquence retrouvée dans la tige de la fibre. Les héparans sulfates glycosaminoglycans (HSG), à l'aide du motif dans

la fibre, peuvent servir de point d'ancrage pour certaines particules virales (Nemerow et al., 2009).

L'internalisation des virus s'effectue suite à l'interaction entre la base penton et les intégrines $\alpha_v\beta_5$ ou $\alpha_v\beta_3$. La base penton est composée d'un pentamère de protéines III qui contiennent chacune une séquence peptidique RGD exposée à la surface des particules virales permettant l'interaction avec les intégrines (Lindert et al., 2009). Cette interaction génère un changement conformationnel entraînant la phosphorylation de la tyrosine retrouvée sur le motif NPXY de la queue cytoplasmique de la chaîne β . La phosphorylation du récepteur active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui recrute différentes protéines, dont Rab5, à proximité du site d'interaction. D'autres protéines de la famille des Rho, dont Rac1 et Cdc42, sont aussi recrutées (Jimenez et al., 2000; Kallergi et al., 2007). Cette cascade d'activation permettra aux clathrines de même qu'aux dynamines, une GTPase, de former l'endosome précoce. En fait, il a été démontré que l'internalisation passait par la voie des clathrines en utilisant un dominant négatif pour inhiber le processus d'internalisation (Meier et al., 2002). La formation des endosomes précoces suite à l'interaction des particules virales avec les intégrines est un processus rapide qui s'effectue dans un délai de 5 à 10 minutes (Thomas Shenk, 1996).

Différents mécanismes sont requis pour permettre à la capsid virale d'être libérée dans l'espace cytoplasmique. Le changement de pH occasionné par l'association avec des vésicules lysosomales mène à la déstabilisation des protéines de la capsid permettant

l'exposition de la protéine VI (Wiethoff et al., 2005). La portion N terminale de la protéine VI possède une structure tertiaire en forme d'hélice α avec une nature amphipatique. La nature hydrophobique de l'hélice lui permet de s'insérer dans la membrane lipidique de l'endosome et de la déstabiliser libérant ainsi la capsid virale dans le cytoplasme (Wiethoff et al., 2005). En effet, si une mutation est introduite dans la séquence de l'hélice α de la protéine VI ou que celle-ci n'est pas maturée par la protéase virale, il y a une réduction au niveau de la production virale (Wiethoff et al., 2005). La protéase virale, une cystéine protéase, est essentielle non seulement pour la maturation de la protéine virale VI mais aussi pour la maturation de six autres protéines virales dont la protéine IIIa, VIII, μ , les protéines terminales et les protéines liant l'ADN viral (Perez-Berna et al., 2009). Pour avoir une activité maximale, la protéase requiert un cofacteur qui augmente son efficacité de 120 fois. Ce peptide se retrouve à être la portion clivée sur la protéine VI, soit la séquence GVQSLKRRCF (Tong, 2002;Mangel et al., 1996). Sans la maturation de ces différentes protéines virales, l'adénovirus serait non infectieux (Greber et al., 1996). Ensuite, il est essentiel que la fibre virale se dissocie de la base penton pour permettre l'exposition de la protéine VI dans l'endosome. Une fois de plus, la protéase serait requise pour que la fibre puisse se dissocier correctement de la capsid lors du processus d'infection (Greber et al., 1996). La dissociation a lieu suite à l'association de l'intégrine avec la base penton (Nakano et al., 2000).

Après le relargage des endosomes, les capsides virales peuvent interagir avec les microtubules via un moteur cellulaire, la dynéine. L'interaction entre la dynéine et la capsid est modulée par l'hexon. Pour que cette interaction ait lieu, il est essentiel que la

structure de l'héxon ait été exposée à un pH relativement faible pour permettre aux structures spécifiques d'être accessibles. En effet, dans des conditions neutres à pH 7.4, il n'y a pas d'interaction entre les deux partenaires (Bremner et al., 2009). Contrairement au transport cellulaire classique qui est bidirectionnel, seulement la portion impliquée avec le transit nucléaire est requise ici. Les particules virales utilisent donc le transport cellulaire pour atteindre les pores nucléaires avec lesquels ils peuvent interagir (Strunze et al., 2005). Suite à l'interaction entre la capsid virale et le complexe d'échange nucléaire (NPC), l'ADN viral est transféré dans le noyau où la transcription est initiée. Le transfert de la séquence virale requiert la présence de calcium qui permet l'ouverture du complexe d'échange (Greber et al., 1997). Il a été aussi montré que l'association avec le complexe nucléaire entraîne la dissociation de la protéine VI (Puntener et al., 2011). Par contre, on ne sait pas si cette dissociation est essentielle au transfert du matériel génétique. Suite à la translocation de l'ADN viral, seulement les protéines de terminaison associées de manière covalente au génome viral et la protéine VII sont retrouvées dans le noyau (Greber et al., 1997; Schaack et al., 1990). La protéine terminale, d'une part, sert à fixer le génome viral à la matrice nucléaire (Schaack et al., 1990) et, d'autre part, est utilisée comme séquence initiatrice lors de la réplication de l'ADN.

1.2.2.2 Contrôle de la machinerie cellulaire et transcription des séquences virales

Le génome viral est séparé en plusieurs régions qui seront transcrites à différents temps durant le cycle de réplication. Il y a d'abord la transcription des éléments précoces

encodés par les séquences E1, E2, E3 et E4 qui servent à initier le cycle viral en prenant contrôle de plusieurs systèmes cellulaires. L'accroissement des signaux de survie, l'activation du cycle cellulaire et l'inhibition des réponses immunitaires innées font partie des modifications occasionnées par l'adénovirus (Braithwaite and Russell, 2001). Ensuite, les gènes tardifs comprenant les protéines de la capsid virale, dont la fibre, les hexons et la base penton, sont transcrits et assemblés dans l'espace nucléaire.

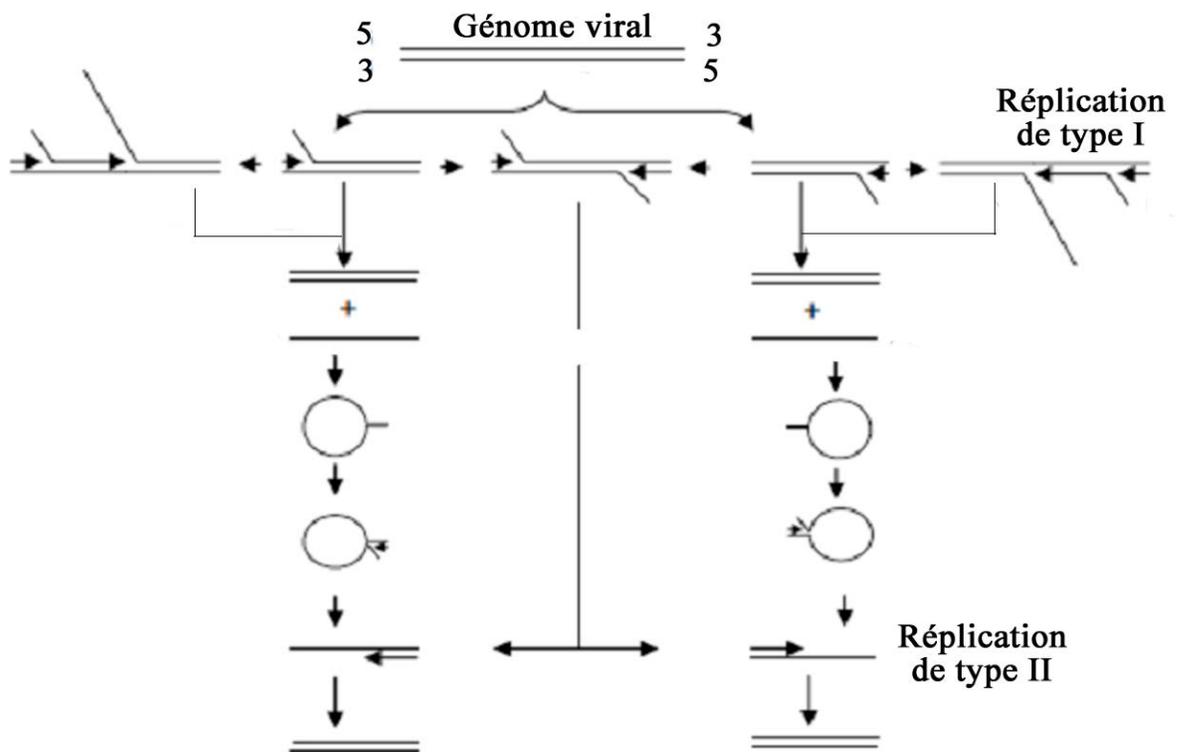


Figure 3 : Répllication du génome viral.

Schéma des deux méthodes employées par le virus pour effectuer la répllication du génome viral. D'une part, la polymérase virale utilise l'ADN double brin pour effectuer la répllication du génome viral (Répllication de type I). La deuxième méthode utilise le nouveau brin, qui forme une structure en forme d'épingle à cause des ITR, pour permettre à la polymérase de synthétiser le nouveau brin complémentaire. La figure a été adaptée de (Lechner and Kelly, Jr., 1977).

Pour permettre la formation de particules infectieuses, le génome viral doit se répliquer. Cette répllication peut s'effectuer de deux manières (Figure 3). La première méthode consiste à l'association de la polymérase avec le génome viral à l'une des extrémités déplaçant l'ancien brin pendant la polymérisation et permettant la formation de nouveaux brins. La deuxième méthode se produit lorsqu'un brin se circularise et que les ITR forment un fragment double brin pouvant servir de séquence initiatrice. La répllication requiert la présence du précurseur de la protéine terminale et de l'ADN polymérase virale (Schaack et al., 1990). La polymérase virale possède une activité polymérase 5'-3' pour générer le brin complémentaire de même qu'une fonction d'exonucléase 3'-5' qui sert à corriger les erreurs au niveau des nouvelles séquences (Thomas Shenk, 1996). La protéine terminale qui a une taille initiale de 80 kDa est associée au nouveau brin et est clivée en une protéine de 55 kDa par la protéase virale lors de l'assemblage des nouvelles particules. Sa fonction servirait à ouvrir l'ADN viral de manière à faciliter l'initiation de la répllication.

La première région du génome viral à être transcrite par la machinerie cellulaire est la portion E1. Cette région est sous le contrôle d'un promoteur unique dans le génome de l'adénovirus, car elle doit être transcrite très tôt lors de l'infection. La région promotrice est en fait constituée de plusieurs séquences qui permettent d'accroître l'expression de la protéine E1A (Berk, 1986). La structure unique de E1A contient de multiples motifs essentiels à ses différentes fonctions liées par des séquences flexibles. La protéine E1A possède quatre domaines conservés (CR domain) qui lui permettent d'interagir avec différentes protéines cellulaires impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ou au niveau de signaux pro-apoptotique dont pRB, p53 et CP300. Ensuite, E1B-19K est une protéine

dont la structure est similaire à celle des protéines de la famille de Bcl (Schmitz et al., 2006). Cette famille protéique module les signaux anti- et pro- apoptotiques en interagissant avec différents effecteurs de l'apoptose. Les protéines de la famille Bcl sont impliquées autant dans la voie mitochondriale (bax, bcl-2) que dans la voie induite par les récepteurs de mort cellulaire comme le Fas ou le TNF (Bcl-Xl). L'expression d'E1B-19K favoriserait les signaux anti-apoptotique de manière à stimuler la survie cellulaire. La troisième protéine de la séquence E1, soit E1B-55K, peut aussi lier la protéine p53 via un domaine retrouvé entre les acides aminés 224 et 354. La liaison de p53 peut avoir lieu en présence ou en absence de la protéine E4-Orf6 (Dobner et al., 1996). Le complexe protéine p53-E1B-55K est transloqué au cytoplasme pour induire la dégradation de p53 (Steegenga et al., 1998). En combinaison, les deux protéines de la portion E1B diminuent l'impact pro apoptotique que génère la protéine E1A. Sinon, le complexe E1B-55K/E4-Orf6 est nécessaire pour aider à la translocation de plusieurs protéines virales dans le noyau de même que pour le transport des ARN messagers viraux tardifs. L'exportation des ARN messagers nécessiterait l'association entre le complexe E1B-55KDa/E4-Orf6 et les récepteurs d'exportation nucléaire Nxf1/Tap (Yatherajam et al., 2011;Dobbelstein et al., 1997). L'expression de E1A dans les cellules permet d'augmenter l'expression des autres gènes précoces retrouvés sur le génome viral.

Ensuite, l'expression de la région E2 est essentielle pour la réplication des séquences virales. Les promoteurs de cette région auraient des éléments spécifiques permettant de contrôler l'expression des différents gènes dans le temps (Lu et al., 1997). La région E2 encode pour la polymérase virale qui permettra la réplication du génome viral. De plus, la

portion E2B encode pour la protéine terminale (80kDa) qui s'associera avec l'ADN viral et qui est essentielle à la réplication du génome viral. Cette dernière devra être clivée par la protéase virale pour pouvoir effectuer ses fonctions. La portion E2A encode pour la DNA-Binding protein (DBP) qui doit être présente pour permettre la réplication virale. Elle est aussi requise pour la formation de la structure nucléoprotéique qui sera encapsidée.

Les gènes de la région E3 sont impliqués dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Celle-ci est associée avec l'expression de différentes cytokines dont le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) et par l'expression de chémokines comme la MIP-2. En fait, l'activation de la réponse innée serait causée par les protéines de la capsid (Liu et al., 2003). La région possède plusieurs gènes dont le rôle reste à déterminer. D'autres systèmes cellulaires sont modulés via l'expression des protéines de la région E3. Cette région encode pour plusieurs protéines impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire innée des cellules (Lichtenstein et al., 2004). Le promoteur qui permet la transcription de la séquence E3 contient une boîte TATA avec différents éléments de transactivation (Berk, 1986). Parmi les différentes protéines retrouvées dans la région E3, il y a la protéine RID, composée des unités E3-10.4K et E3-14.5K, qui agit sur les récepteurs de mort cellulaire en forçant leur dégradation (Tollefson et al., 1998) en plus d'inhiber la transcription du facteur NF-kB (Tollefson et al., 1998; Friedman and Horwitz, 2002). E3-gp19k, l'un des éléments traduits à partir de la séquence E3, inhibe la translocation des MHC de classe I vers la membrane cellulaire en plus d'avoir un effet inhibiteur sur la tapasine (Bennett et al., 1999).

La région E4 encode pour des protéines ayant un rôle dans la réplication du génome viral ou avec le blocage de la traduction des protéines cellulaires. E4orf3 serait transcrite tôt lors du cycle viral et empêcherait la formation de concatémère d'ADN viral. Cette protéine serait principalement associée au niveau de la matrice nucléaire. De plus, certaines de ses fonctions seraient similaires à la protéine E4orf6. Pour sa part, E4orf6 peut lier la protéine virale E1B55K (Sarnow et al., 1984). L'un des rôles de ce complexe est de transporter les ARN viraux messagers vers le cytoplasme. De plus, le complexe E4orf6/E1B55K entraînerait la dégradation de p53 en le ciblant vers le protéasome. E4orf1, une autre protéine générée par la région E4, serait associée avec les étapes tardives du cycle viral. Toutefois, son rôle exact dans la cellule n'est pas connu. En effet, l'ajout de mutation dans la séquence de E4orf1 a peu d'impact sur la production de particules virales (Weiss et al., 1997). La fusion du transcript 6 et 7 permet l'expression de E4orf6/7 qui peut lier, sous la forme d'un duplexe, la protéine E2F. Cette liaison sert de transactivateur pour permettre la transcription de la région E2 (Huang and Hearing, 1989; Reichel et al., 1989).

Finalement, les gènes tardifs sont transcrits et la majorité de ces gènes encodent pour les protéines de la capsid. Il a été montré que la protéine IVa2 aurait un rôle important à jouer dans l'activation des promoteurs associés aux gènes tardifs (MLP) (Pardo-Mateos and Young, 2004).

1.2.2.3 Formation des capsides virales, incorporation de la séquence virale et relâche des particules virales

Les hémions, qui sont les protéines les plus abondantes, sont positionnés sous la forme d'hexamère au niveau de la capsidie virale (Rux and Burnett, 2004). Au point de vue de la thermodynamique, les multiples molécules d'hémion peuvent multimériser sans l'apport d'une source d'énergie ou de protéines accessoires. Contrairement à plusieurs protéines virales, elles ne possèdent aucun domaine NLS pour être transloquées au noyau. La protéine VI, essentielle à la lyse du lysosome lors de l'internalisation, aurait comme second rôle de permettre la translocation vers le noyau des molécules d'hémion via le complexe d'échange nucléaire (NPC) (Wodrich et al., 2010). Elle pourrait aussi effectuer le chemin inverse grâce à la présence de deux domaines d'exportation nucléaire (NES) pour permettre le transfert de plusieurs molécules d'hémion. Ces domaines NES ont des régions protéiques hydrophobiques riches en leucine (Wodrich et al., 2003). La structure en acide aminé de l'hémion comprend une région hyper variable. Il a été montré que cette portion pouvait interagir avec le domaine N Terminal du facteur X de coagulation sanguin. L'interaction entre le facteur X et l'hémion serait l'une des causes qui augmenterait la transduction des cellules hépatiques (Alba et al., 2009). Les trimères d'hémion interagissent avec les bases pentons de même qu'avec les protéines IX pour former la structure de la capsidie.

La protéine IX forme un tetramère dont trois des quatre portions C-terminales s'associeraient sous la forme d'une structure parallèle, tandis que la dernière molécule serait en position anti-parallèle (Fabry et al., 2009). La structure parrallèle formée par la

protéine IX servirait à stabiliser des trimères d'héxon (Poulin et al., 2010; Rux and Burnett, 2004). Finalement, cette dernière ne jouant qu'un rôle au niveau de la stabilité des capsides virales, elle se trouve à ne pas être essentielle à la formation de particules infectieuses (Colby and Shenk, 1981).

La forme pentamérique de la base penton serait stabilisée par la présence de la protéine IIIa. Elle aurait été positionnée suite à des études de microscopie électronique (Rexroad et al., 2003). De plus, cette protéine est essentielle, car son abolition réduit la génération de particules virales infectieuses (Molin et al., 2002). Le rôle de la protéine IIIa dans la structure de la capside n'est pas complètement connu, mais elle serait l'une des premières composantes de la capside à être impliquée lors de l'internalisation des particules virales. L'insertion de la séquence virale dans l'icosaèdre requiert une séquence spécifique, retrouvée au début du génome virale, appelée signal d'encapsidation. Cette séquence retrouvée entre les nucléotides 200 à 400 est composée de sept répétitions qui permettent l'association avec la protéine Iva2. La séquence est un consensus conservé TTTG-N₈-CG. Il a été montré que l'absence de la protéine Iva2 dans le cycle virale entraîne la formation de plusieurs capsides immatures avec peu ou pas de séquences génomiques adénovirales (Zhang and Imperiale, 2003).

La relâche des particules serait induite par lyse cellulaire et non par l'apoptose suite à une augmentation de l'expression de « l'adenovirus death protein » (ADP). Contrairement aux autres protéines encodées par la région E3, l'ADP est produite à

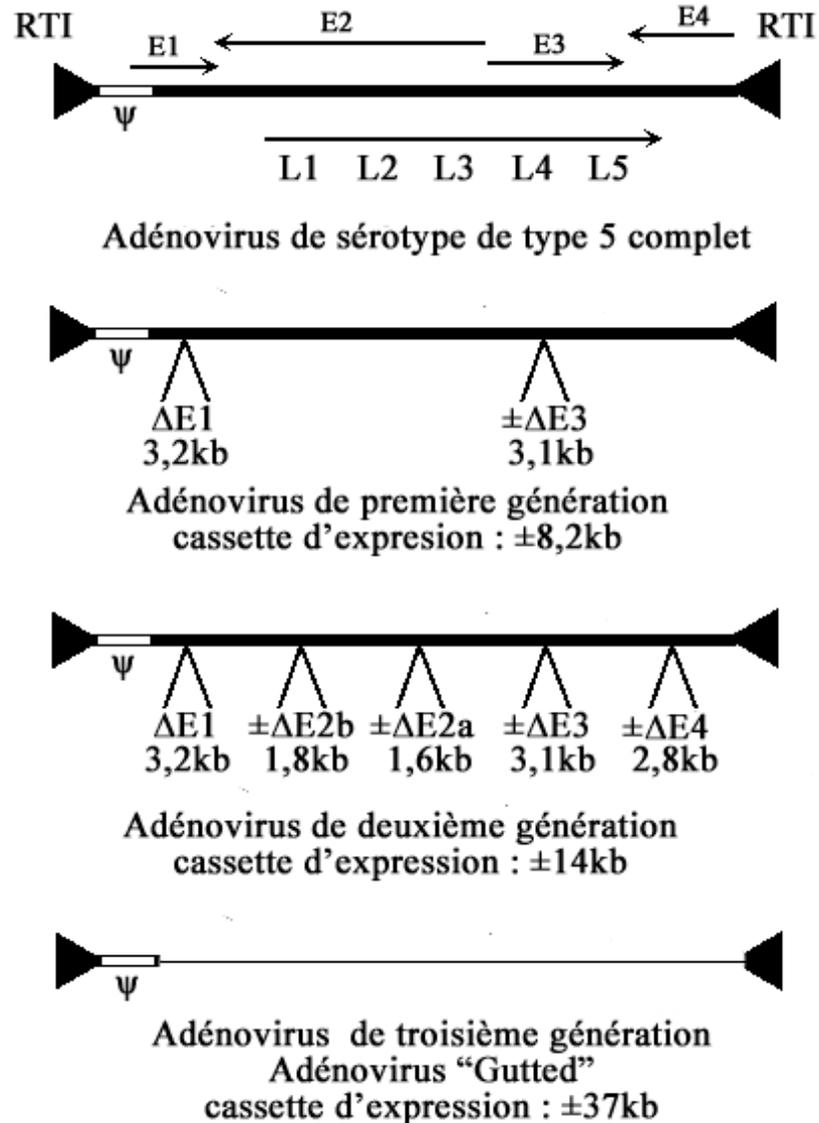


Figure 4 : Structure génomique des différentes générations de vecteurs adénoviraux.
 Les différentes structures génomiques adénovirales utilisées dans le cadre des multiples approches thérapeutiques développées à ce jour. Le virus de première génération ne contient pas la séquence E1 et peut ne pas contenir la région E3. Les vecteurs de première génération peuvent contenir des cassettes d'expression de plus ou moins 8.2kB. Les virus de deuxième génération ont plusieurs régions de délétées pour réduire le caractère immunogénique des adénovirus. Le vecteur de troisième génération ne contient pas de séquences virales autres que les ITR et le signal d'encapsidation permettant ainsi l'incorporation d'importantes cassettes d'expression d'environ 37kB. Ces vecteurs requièrent par contre la présence de virus de complémentation pour être amplifiés.

faible niveau durant la réplication virale et son niveau augmente de manière significative à la fin du cycle viral (Tollefson et al., 1992). Cette augmentation serait causée par la présence de séquence promotrice tardive (Tollefson et al., 1992). En fait, il a été montré que l'absence de l'expression de cette protéine est associée à une réduction de la taille des plages de lyse et à une augmentation du temps de relargage (Tollefson et al., 1996).

1.2.3 Modification au niveau des structures génomiques

Différents types de constructions virales ont été produites à ce jour. Ces vecteurs ont été conçus tant pour augmenter la quantité d'ADN pouvant être insérée dans le génome viral que pour réduire, dans certains cas, la réponse immunitaire induite par les protéines virales (Danthinne and Imperiale, 2000). Jusqu'à maintenant, les vecteurs adénoviraux ont été séparés en trois catégories, soit les vecteurs de première génération, de deuxième génération ou de troisième génération aussi nommés virus «gutless» (Figure 4). Les virus de première génération sont des particules virales qui ont une délétion dans les régions codantes E1 et E3. L'absence de la région E1 empêche la réplication des particules virales dans une majorité de cellules infectées tandis que l'abolition de E3 est utile pour augmenter la capacité de transport du vecteur, puisque cette région n'est pas nécessaire à la réplication en culture cellulaire. Pour permettre l'amplification de ces particules virales, une lignée de complémentation fournissant les protéines E1A et E1B est requise. Différentes lignées cellulaires, dont les HEK293, les A549, les 911, de même que les PerC6, expriment ces gènes viraux (Graham et al., 1977; Fallaux et al., 1996; Fallaux et al., 1998; Imler et al., 1996). L'utilisation de la lignée de complémentation 293 amène un problème majeur par

contre : la formation de RCA (replication competent adenovirus). Ces RCA sont formés lorsqu'il y a un échange par recombinaison homologue entre la séquence génétique de la région E1 contenue dans les cellules 293 et le génome des particules virales. Les particules virales qui sont générées ont alors la capacité de se propager dans des cellules qui ne contiennent pas la région E1. Les transgènes sont généralement inclus dans la région virale E1 délétée mais peuvent aussi être exprimés à partir d'autres régions comme la région E3 ou E4 (Amalfitano et al., 1998; Armentano et al., 1997). Les vecteurs de deuxième génération, en plus de ne pas avoir les régions E1 et E3, ont des délétions dans d'autres gènes impliqués dans la transcription, la réplication ou la formation du «core» d'ADN. Les vecteurs de troisième génération ne possèdent aucune séquence encodant pour des gènes viraux. Ils peuvent donc contenir des cassettes d'expression de grande taille avoisinant 37kB. Par contre, l'espace non comblé par l'insertion des séquences d'intérêt doit être compensé par des séquences dites de remplissage. Ces virus requièrent, pour être amplifiés, la présence d'un virus auxiliaire. L'un des désavantages de cette approche est la présence de contaminant provenant de l'amplification potentielle des virus auxiliaires. L'évaluation de la présence de ces virus auxiliaires dans les préparations virales est donc cruciale (Alba et al., 2005).

1.3 Utilisation des AdVs pour la thérapie génique

1.3.1 Vecteur utilisé pour la thérapie des myopathies.

Les muscles sont affectés par différentes formes de myopathies qui entraînent la perte du tonus musculaire avec l'âge et qui peuvent être mortelles (Park and Oh, 2010). Plusieurs approches de thérapies géniques ont été étudiées pour traiter ces maladies. L'utilisation de vecteurs non viraux a été considérée dans plusieurs cas, en particulier les oligonucléotides antisens (OAs), dans le cadre de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) qui est la myopathie faisant l'objet du plus grand nombre de recherches. En fait, plusieurs OAs qui ont été développés sont actuellement à l'étude dans des essais cliniques pour le traitement de la DMD (Lu et al., 2011). Pour ce qui est des vecteurs viraux, les principaux qui ont été examinés dans les muscles sont les AAV, les lentivirus de même que les adénovirus. Les AAV ont été évalués dans de nombreuses myopathies. La raison de cet intérêt est que, parmi les nombreux sérotypes d'AAV existant, plusieurs auraient une excellente infectivité au niveau des fibres musculaires, dont le sérotype 6 et 8. De plus, il a été démontré que la durée d'expression d'un transgène transduit par un AAV pouvait atteindre une période de deux ans dans des modèles murins. Actuellement, l'AAV est le seul virus qui a permis d'effectuer des études cliniques dans les muscles. Les AAV ont donc été utilisés pour transporter des séquences antisens, permettant de bloquer l'épissage de certains exons défectueux dans le gène de la dystrophine, afin de rétablir l'expression de la protéine dans la DMD (Mendell et al., 2009). Pour leur part, les lentivirus peuvent

transduire les fibres musculaires mais à un niveau trop faible pour être envisageable chez l'humain. Par contre, l'utilisation des lentivirus devient significative lors d'essais *ex vivo* où des gènes peuvent être intégrés dans les cellules souches avant que ces dernières ne soient transplantées chez les patients (Goyenvalle et al., 2011). Les adénovirus, quant à eux, sont intéressants dans la mesure où la taille du transgène qu'un virus de troisième génération peut contenir est d'environ 37Kb. De plus, la capacité d'exprimer les transgènes sur une plus longue période de temps a été démontrée chez les adénovirus de troisième génération (Goyenvalle et al., 2011). Néanmoins, leur utilisation est limitée par le fait que les muscles sont difficiles à transduire. Différentes raisons, parmi lesquelles la présence de la matrice extracellulaire et les faibles niveaux d'expression du CAR (Nalbantoglu et al., 1999; Kimura et al., 2001), expliquent ces faibles niveaux de transduction. En fait, le niveau d'expression du CAR dans les souris nouveaux-nés est suffisant pour permettre l'infection des cellules, mais l'expression du CAR diminue avec la maturation des muscles (Goyenvalle et al., 2011). De manière à pouvoir accroître l'infectivité des adénovirus dans les muscles, différentes approches ont été évaluées comme la modification du tropisme viral. Tout d'abord, une étude a permis d'isoler différents peptides par l'utilisation d'une approche de criblage à l'aide de phage. Parmi ces multiples peptides, l'incorporation d'un des peptides dans la boucle HI a permis d'accroître l'infectivité des vecteurs adénoviraux pour les muscles (Ghosh and Barry, 2005). En second lieu, le groupe de Bramson a démontré que l'insertion d'une séquence RGD ou d'une répétition de 7 lysine dans la boucle HI pouvait accroître l'infectivité des AdVs dans les muscles. Également, ces résultats montraient la possibilité d'ajouter les modifications dans des virus de troisième génération (Bramson et al., 2004). Pour terminer, le groupe de Menezes a montré la

possibilité d'augmenter l'infectivité en utilisant le polymère PEG associé avec le facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Menezes et al., 2006). Toutes ces études ont permis d'accroître la transduction de particules virales de 4 à 100 fois dans des modèles de cultures de myotubes (Menezes et al., 2006; Ghosh and Barry, 2005; Bramson et al., 2004). Une augmentation de 2 à 6 fois suite à l'infection de muscle de souris MDX a été observée avec les différents vecteurs (Menezes et al., 2006; Bramson et al., 2004).

1.3.2 Utilisation de protéines cellulaires pour le traitement des tumeurs

De nombreuses protéines ont été exprimées dans des cellules cancéreuses dans le but de les tuer ou d'empêcher la croissance des cellules tumorales via l'utilisation de vecteurs viraux. Les éléments ciblés sont généralement des protéines dérégulées de manière négative ou positive, faisant partie de systèmes essentiels au contrôle de l'état cellulaire, comme p53, certains récepteurs ou certaines cytokines. Des études ont utilisé différentes stratégies comme les ARN antisens, des siRNA ou des protéines dominantes négatives pour réduire le potentiel tumorigénique de différentes tumeurs (Feng et al., 2011; Kargiotis et al., 2008; Lakka et al., 2002; Nalabothula et al., 2007). Par exemple, le groupe de Feng a induit l'expression d'un siRNA contre le FGF dans des glioblastomes. Suite à leur transduction à l'aide d'un adénovirus encodant pour le siRNA spécifique pour le FGF, une diminution du niveau d'expression du facteur de croissance a pu être mesurée, entraînant du même coup une augmentation de la sensibilité des tumeurs contre certains agents de chimiothérapie (Feng et al., 2011). Par l'utilisation d'un HSV, le groupe de Saydam a montré qu'il pouvait exprimer un siRNA qui induisait une réduction du niveau d'expression du récepteur à

l'EGF dans des gliomes. L'expression du siRNA corrélait avec une inhibition de croissance chez les masses tumorales (Saydam et al., 2005). Par ailleurs, les siRNA ont aussi été utilisés dans le cadre d'autres tumeurs, dont celles du colon, du pancréas, du foie ou des poumons (Wang et al., 2010; Yin et al., 2008; Guoan et al., 2010; Shiina et al., 2009). La réactivation de certains gènes clés peut aussi entraîner une réduction du caractère tumorigénique. Les gènes comme p16INK4a ou p21 (WAF/CIP1) ont été évalués dans le cadre de plusieurs types tumoraux. L'utilisation des vecteurs adénoviraux a permis le transfert des séquences sauvages de ces gènes (Chintala et al., 1997; Chen et al., 1996; Ghaneh et al., 2001; Schreiber et al., 1999). Les métalloprotéinases sont aussi des cibles intéressantes, étant donné qu'elles sont associées au caractère invasif des tumeurs (Gabelloni et al., 2010; Choe et al., 2002). Plusieurs études ont aussi tenté de réduire les niveaux d'expression du VEGF pour inhiber l'activation de son récepteur et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui pourraient alimenter les masses tumorales et favoriser la formation de métastases (Gomez-Manzano et al., 2008; Bodey et al., 2006). Par contre, dans le cas du VEGF, certaines thérapies ciblant ce facteur de croissance dans les masses tumorales induisent, lors de récurrence, un patron plus agressif (Wick et al., 2011).

1.3.3 Gènes suicides et vecteurs viraux

Plusieurs types de vecteurs viraux comme l'adénovirus, l'herpès simplex virus (HSV) ou les lentivirus ont été utilisés jusqu'à ce jour pour apporter les gènes suicides au niveau des tumeurs cibles. Ces gènes encodent pour des enzymes qui ont la capacité de convertir une pro-drogue non toxique pour l'organisme en un métabolite toxique qui cause

la mort des cellules exposées (Figure 5) (Schepelmann and Springer, 2006). Plusieurs systèmes drogue/enzyme ont été étudiés au travers de la littérature dans le cadre de différentes tumeurs comme les tumeurs ovariennes (Kaur et al., 2009), pancréatiques (Kleeff et al., 2002), mammaires (Yu et al., 2011), gastriques (Nakaya et al., 2003) ou du cerveaux (Natsume and Yoshida, 2008). Ces systèmes ont comme avantage de pouvoir induire la mort de plusieurs cellules tumorales suite à un effet dit « bystander ». Cet effet consiste à la distribution de la drogue active dans des cellules adjacentes qui n'expriment pas l'enzyme de conversion occasionnant leur mort (Greco and Dachs, 2001).

Le système qui a été le plus étudié actuellement est celui du gène viral thymidine kinase (TK). La TK provient du HSV-I et sert généralement à compenser pour le manque de déoxyribonucléotides (Shen and Nemunaitis, 2006). En effet, les cellules expriment les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques seulement lorsqu'elles sont en division active. Pour que le HSV puisse infecter des cellules quiescentes, la présence de la thymidine kinase est donc essentielle. La TK est utilisée dans l'approche des gènes suicides pour phosphoryler une pro-drogue qui n'a pas d'effet physiologique dans les cellules normales, le ganglicovir. Par contre, une fois phosphorylée, le ganglicovir s'incorpore dans les brins d'ADN durant la réplication et cause l'inhibition de la réplication (Greco and Dachs, 2001). Sous sa forme phosphorylée, le ganglicovir ne peut pas traverser les membranes cellulaires, limitant son effet aux cellules qui ont été infectées par les vecteurs viraux. Par contre, lorsque les cellules communiquent via des jonctions GAP, la forme phosphorylée du ganglicovir peut diffuser d'une cellule à l'autre et induire la mort des cellules voisines (Mesnil and Yamasaki, 2000). La TK a été étudiée dans le but

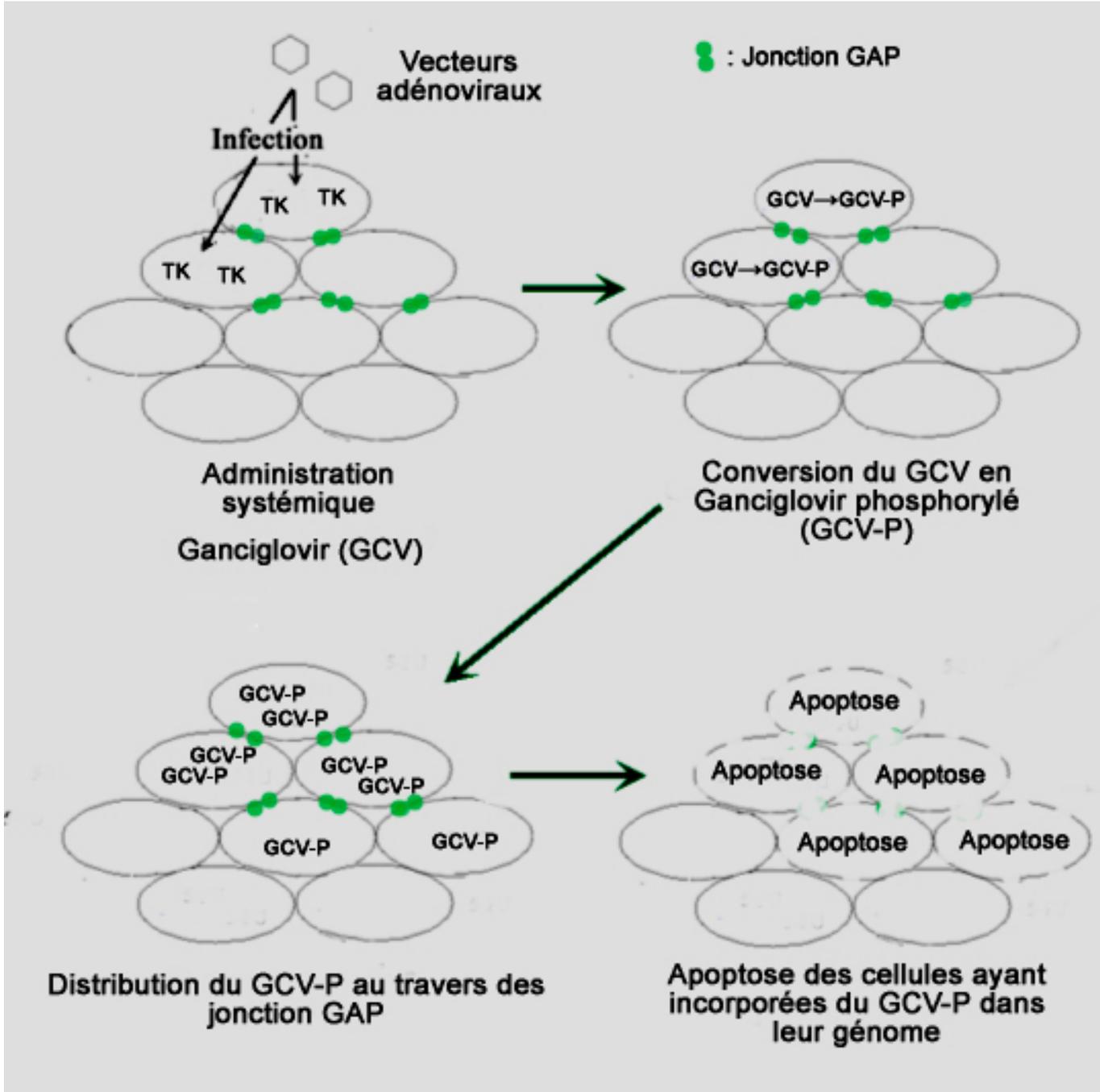


Figure 5 : Fonctionnement de l'approche utilisant les gènes suicides.

La pro-drogue non toxique ganciglovir est convertie en agent toxique pour les cellules, le ganciglovir phosphorylé, par la thymidine kinase (TK) transduite dans les cellules tumorales à l'aide de vecteurs viraux. Le ganciglovir phosphorylé ne peut pas traverser les membranes cellulaires, mais peut diffuser au travers de jonction GAP formée entre des cellules avoisinantes.

d'engendrer la mort de plusieurs types tumoraux, dont les tumeurs gastriques ou mammaires, et ce, via l'utilisation de vecteurs adénoviraux (van der Linden et al., 2005; Nakaya et al., 2003; Yu et al., 2011; Okada et al., 2005). Certains de ces essais ont mené à des essais cliniques. Malheureusement, le système n'a pas montré d'effet significatif chez les patients (Immonen et al., 2004; Germano et al., 2003).

La purine nucléoside phosphatase (PNP) est un autre exemple de gène suicide qui apparaît dans la littérature et qui est utilisé pour le traitement des tumeurs (Bharara et al., 2005). La PNP peut convertir différents analogues d'adénosine en métabolite toxique pour les cellules. Les deux pro-drogues qui ont été le plus utilisés en clinique pour le traitement de masses tumorales sont le 6-MePdR (deoxy-ribofuanosyl-6-méthylpurine) et l'arabinofuranosyl-2-fluoroadénine monophosphate (F-araA). Lorsqu'ils sont métabolisés par la PNP, les deux composés forment le 6-MeP (6-méthylpurine) et le 2-fluoroadénine (F-ada) respectivement. Ces composés, contrairement aux homologues produits par la présence de la TK, peuvent bloquer la synthèse protéique (Parker et al., 1998). Le blocage serait induit par le remplacement de l'ATP par le 6-MeP (Portsmouth et al., 2007). De ce fait, le 6-MeP et le F-ada peuvent non seulement affecter les cellules en division rapide, mais ils peuvent aussi affecter les cellules quiescentes. L'effet « bystander » peut se propager sans la présence de jonctions cellulaires au travers de la masse tumorale mais peut aussi causer la mort des cellules saines avoisinantes (Portsmouth et al., 2007). En considérant le potentiel des gènes suicides, plusieurs groupes ont tenté de limiter l'expression des gènes suicides dans les cellules tumorales. Une des manières d'éviter la

mort d'une trop grande quantité de cellules normales serait d'augmenter la spécificité des virus.

1.3.4 L'utilisation de virus oncolytiques

Les virus réplicatifs conditionnels sont des virus qui se répliquent difficilement dans des cellules normales, mais qui peuvent se répliquer dans certaines cellules cancéreuses. Le principe de la virothérapie est donc d'induire la mort des cellules tumorales en utilisant la propagation virale comme outil. L'infection des cellules tumorales permet la génération de nouvelles particules infectieuses qui, à leur tour, pourront infecter les cellules avoisinantes et continuer la propagation des particules virales oncolytiques jusqu'à l'éradication de la masse tumorale (Figure 6). Certains de ces virus peuvent se répliquer préférentiellement, sans aucune modification à leur génome, dans des cellules tumorales. Par exemple, les réovirus sont incapables de se diviser dans des cellules normales. Par contre, ils ont la capacité de se répliquer dans les cellules tumorales qui n'expriment pas la protéine kinase, activée par l'ARN double brin (PKR) (Hirasawa et al., 2003) ou par une activation incontrôlée de la protéine Ras (Coffey et al., 1998). L'activation de Ras inhibe l'autophosphorylation de PKR qui est essentielle à son activité permettant donc la réplication des réovirus (Everts and van der Poel, 2005). En effet, la protéine PKR fait parti d'un mécanisme de défense cellulaire qui entraîne la dégradation d'ARN double brin comme ceux retrouvés dans les réovirus.

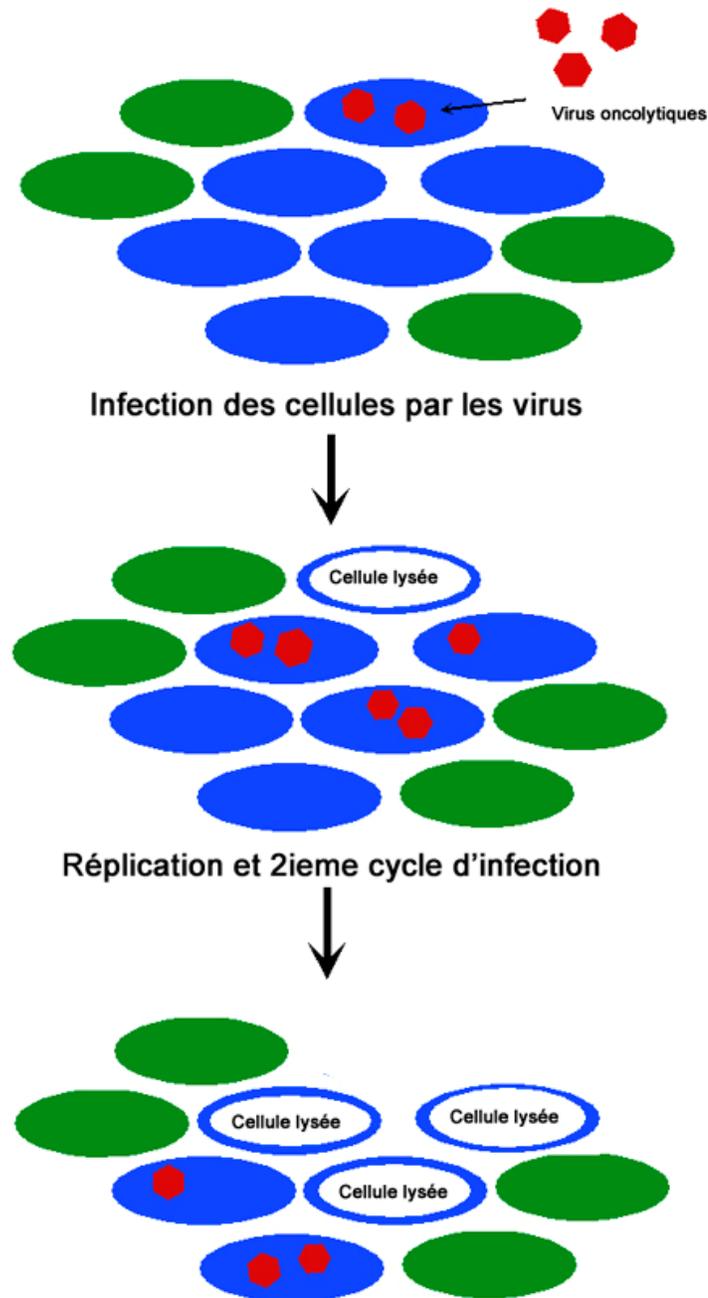


Figure 6 : Élimination des cellules cancéreuses à l'aide de virus oncolytiques.

Suite à l'infection d'une cellule tumorale, les virus peuvent se répliquer et entraîner la relâche de particules infectieuses à proximité des autres cellules tumorales par la lyse de la cellule infectée. Les nouvelles particules virales oncolytiques peuvent ensuite infecter soit une nouvelle cellule tumorale (bleue) ou une cellule normale (verte). Il n'aura pas de propagation dans les cellules normales infectées tandis que les cellules tumorales permettront un nouveau cycle de réplification.

Actuellement, plusieurs essais ont été effectués *in vitro* avec différents adénovirus réplicatifs conditionnels (CRAd). La possibilité de former des CRAd a été émise suite à l'étude de la réplication des particules virales démunies de la protéine E1B (Bischoff et al., 1996). La protéine virale E1B peut s'associer, entre autres, avec p53 pour inhiber sa fonction cellulaire (Steeenga et al., 1998). En absence d'E1B, les cellules normales peuvent répondre à la production d'E1A par la modulation de p53 qui entraîne l'apoptose des cellules infectées. Les cellules tumorales p53^{-/-} peuvent donc permettre la réplication d'un virus n'exprimant pas E1B étant donné que l'un des éléments régulateurs ne permet pas d'induire la mort des cellules. La délétion d'E1B a mené à la production du virus dl1520 ou ONYX-015 qui a été fortement étudié et évalué dans le cadre de multiples essais cliniques (Reid et al., 2002; Nemunaitis et al., 2001). Plusieurs groupes ont aussi effectué une altération dans la protéine E1A pour générer des CRAd (dl922-947). L'altération est une délétion d'une séquence de 24pb dans le domaine CR2 de E1A essentielle à l'interaction avec la protéine pRb (Heise et al., 2000). Sans cette séquence précise, l'adénovirus ne peut pas se répliquer dans les cellules qui exercent une répression active sur la transcription. Par contre, les cellules tumorales dont la protéine pRb est inactive ou absente peuvent permettre la réplication des virus. Pour accroître le potentiel des virus oncolytiques, certaines études ont montré que l'ajout d'un gène suicide comme la TK, la carboxylesterase ou la nitroreductase, pouvait augmenter le potentiel des virus oncolytiques (Ji et al., 2009; Singleton et al., 2007; Oosterhoff et al., 2005). Cependant, d'autres recherches ont prouvé que cette augmentation n'était pas toujours observée. L'incapacité à observer un accroissement d'efficacité dans certains cas serait associée à un équilibre entre

la propagation des virus et l'induction de l'apoptose dans les cellules transduites, suite à la métabolisation de la pro-drogue (Lambright et al., 2001; Rogulski et al., 2000).

Autant l'ONYX-015 que plusieurs autres virus oncolytiques ont permis d'obtenir des résultats intéressants dans le cadre d'essais sur différents types tumoraux, dont les cancers ovariens (Morrison et al., 2008), les tumeurs mammaires (Ranki et al., 2007; Stoff-Khalili et al., 2007), les glioblastomes (Fueyo et al., 2000) et les cancers pancréatiques (Onimaru et al., 2010). De plus, plusieurs vecteurs oncolytiques dérivés des adénovirus ont été testés dans des essais de phase I ou II (Nemunaitis et al., 2010; Opyrchal et al., 2009). Enfin, le virus H101, un virus oncolytique similaire à l'ONYX-015, a été accepté en Chine, en 2006, par la SFDA comme traitement pour les tumeurs (Shi and Zheng, 2009).

1.4 Problématiques induisant une réduction d'efficacité

L'utilisation des adénovirus a permis de produire plusieurs résultats positifs à l'aide de gènes suicides ou de virus oncolytiques (Richard et al., 2007; Onimaru et al., 2010; Everts and van der Poel, 2005; Wang et al., 2010; Yu et al., 2011; Oosterhoff et al., 2005). Certains des résultats ont mené à des traitements qui ont pu être commercialisés (Shi and Zheng, 2009). Néanmoins, des limitations sont encore présentes dans les approches utilisées réduisant l'efficacité des AdVs. En effet, il a été démontré que, suite à l'infection de masses tumorales par un virus oncolytique, la présence de différentes composantes, dont des cellules normales (Bernt et al., 2005; Heise et al., 2000), une portion de la matrice extracellulaire (Kuppen et al., 2001; Hong et al., 2010) ou la zone nécrotique (Shen and

Hermiston, 2005;Post et al., 2004), pouvaient réduire la distribution des particules virales dans la tumeur, empêchant ainsi les virus d'infecter toutes les cellules tumorales. Il apparaît également que la présence de cellules normales comme les fibroblastes peuvent entraîner la réduction de particules infectieuses étant donné qu'elles ne supportent pas la réplication des particules oncolytiques. En outre, si la relâche des particules virales oncolytiques n'est pas suffisamment efficace, les cellules infectées pourraient être reconnues par le système immunitaire et celui-ci éliminerait les cellules infectées, réduisant du même coup la quantité de particules infectieuses disponible pour continuer la propagation. Il a donc été démontré que la réintroduction de l'ADP, qui favorise le relargage des particules virales, pouvait augmenter le potentiel des virus oncolytiques dans des masses tumorales *in vivo* (Yun et al., 2005).

Un autre problème est associé à la mauvaise vascularisation des tumeurs. Ce phénomène serait, en partie, la cause de la zone nécrotique retrouvée dans les tumeurs. En effet, les cellules en hypoxie ne permettent pas une réplication efficace des particules virales à cause d'un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Shen and Hermiston, 2005). Dans le cas des gènes suicides, la spécificité des vecteurs viraux est un point important, car l'infection de cellules normales peut entraîner des dommages par l'apoptose de cellules, subséquentement à l'utilisation de certains systèmes comme la PNP (Cai et al., 2008;Martiniello-Wilks et al., 2002). De plus, l'infection de cellules normales réduit la quantité de particules infectieuses disponibles pour l'infection des cellules tumorales (Heise et al., 2000). Finalement, les faibles niveaux d'infectivité des virus, occasionnés par les faibles niveaux d'expression du CAR, nuisent aux virus encodant pour des gènes suicides

de même que pour la biodistribution des particules oncolytiques (Harvey et al., 2010;Raki et al., 2005).

1.5 Alternative pour améliorer l'efficacité des particules virales

1.5.1 Modification du génome viral

Plusieurs méthodes ont été étudiées pour accroître l'efficacité et la spécificité des différents vecteurs adénoviraux. Une manière de contrôler la réplication virale et d'augmenter la spécificité consiste à moduler l'expression de la protéine virale E1A à l'aide d'éléments régulateurs tissus spécifiques contrôlant sa transcription. Plusieurs de ces éléments ont déjà été utilisés, dont ceux du promoteur de la protéine PSA pour traiter les tumeurs de la prostate (Rodriguez et al., 1997), ceux du CXCR4 dans les tumeurs pulmonaires, mammaires ou ovariennes (Stoff-Khalili et al., 2007;Rocconi et al., 2007;Zhu et al., 2007b) et la télomérase dans différents essais tumoraux dont les tumeurs du pancréas (Onimaru et al., 2010;Bilsland et al., 2007). Pour augmenter d'un cran l'efficacité des particules virales, certains groupes de chercheurs ont modifié la structure de la fibre de manière à augmenter l'infectivité (Liu et al., 2011;Zhu et al., 2007a;Zhu et al., 2006;Van, V et al., 2003). Augmenter l'efficacité des adénovirus oncolytiques peut être atteint par le rajout de certaines composantes de la région E3, telle la protéine ADP. Celle-ci favorise le relargage des particules à la fin du cycle viral, en causant la lyse des cellules par un processus autre que l'apoptose, et augmente du même coup le nombre de particules virales pouvant infecter de nouvelles cellules tumorales (Doronin et al., 2003). Ces méthodes, qui

avaient une bonne efficacité *in vitro*, se sont révélées souvent beaucoup moins efficaces dans des systèmes *in vivo*. En effet, les tumeurs, de par leur nature, sont des structures complexes composées de cellules normales et cancéreuses. De plus, une portion des masses tumorales est formée par des tissus conjonctifs et certaines tumeurs possèdent des zones nécrotiques. Ces éléments rendent difficile la distribution des particules virales dans les tumeurs. Dans l'optique de résoudre ces problèmes, certains groupes ont incorporé des cassettes d'expression encodant pour des métalloprotéinases : les métalloprotéinases peuvent permettre la dégradation de la matrice extracellulaire et faciliter la distribution des particules virales dans les tissus tumoraux (Cheng et al., 2007).

1.5.2 Changement de tropisme des vecteurs viraux

L'induction d'un changement de tropisme est un outil qui a été mis à contribution dans le cadre de plusieurs types de vecteurs, dont les rétrovirus (Landazuri and Le Doux, 2004), le HSV (Grandi et al., 2010), l'AAV (Muzyczka and Warrington, Jr., 2005), de même que dans les AdVs. Il sert à contourner l'inefficacité de certains systèmes à transduire différentes cibles par le manque de récepteurs spécifiques. Différentes approches ont donc été élaborées, tant pour modifier le tropisme des vecteurs que pour abolir leur tropisme naturel. L'abolition du tropisme naturel est effectivement essentielle, puisque la reconnaissance de différentes cibles favorise la transduction de populations cellulaires non désirées. Comme pour la modification du tropisme, une multitude d'essais ont été effectués sur les composantes virales pour déterminer les portions nécessaires à l'attachement des virus avec les différents types cellulaires. Des mutations diverses ont été générées dans le

bouton de la fibre de l'adénovirus, afin de remplacer les acides aminés importantes dans l'interaction avec le récepteur primaire, à savoir le CAR (Kirby et al., 2000). D'autres altérations peuvent aussi réduire le tropisme naturel des AdVs: l'abolition du domaine RGD dans la base penton (Koizumi et al., 2003a); la modification du domaine HSG dans la tige de la fibre (Kritz et al., 2007); ou encore la modification de la séquence variable dans l'héxon, qui peut lier les facteurs sanguins X (Vigne et al., 1999; Yoon et al., 2000).

Il existe plusieurs approches pour induire un changement de tropisme (Figure 7). Une des méthodes consiste à incorporer des motifs peptidiques dans la fibre. Dans les premiers essais effectués en ce sens, les chercheurs ont eu recours à l'ajout d'un court peptide provenant de la séquence du peptide de relâche gastrique à l'extrémité C-Terminal de la fibre (Michael et al., 1995). Plusieurs groupes ont, par la suite, montré que l'ajout d'une séquence RGD dans la boucle HI de la fibre pouvait augmenter la transduction des particules virales via l'utilisation des intégrines à la surface des cellules (Borovjagin et al., 2005; Sandovici et al., 2006). D'autres recherches, enfin, ont permis de prouver que les répétitions de lysine (K7) à l'extrémité C-terminale de la fibre pouvaient permettre la liaison avec les héparanes sulfates exprimés à la surface des cellules (Koizumi et al., 2003b; Ranki et al., 2007; Gonzalez et al., 1999; Rein et al., 2004; Staba et al., 2000). L'ajout des séquences RGD ou K7 a permis d'augmenter l'efficacité de la transduction de 20 à 700 fois selon les tissus, sans toutefois augmenter la spécificité des vecteurs viraux.

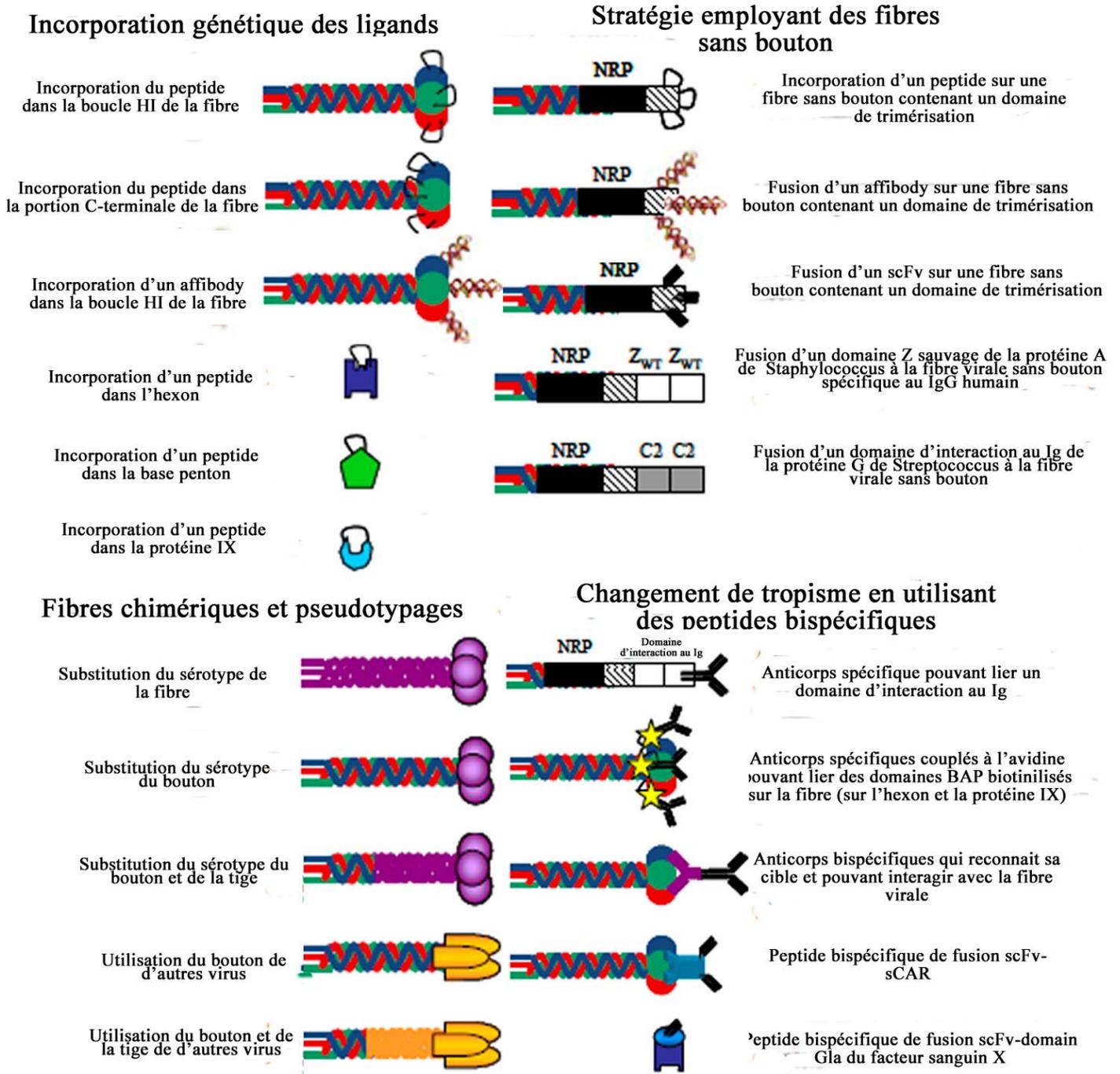


Figure 7 : Différentes stratégies pour induire un changement de tropisme.
 Représentation schématique des différentes altérations qui ont été apportées à la fibre virale pour induire un changement de tropisme.

Par la suite, la compréhension de la structure du bouton, grâce à des analyses de cristallographie, a permis d'identifier la boucle HI comme un site attractif pour l'incorporation de peptide (Xia et al., 1994). Contrairement à l'extrémité C-terminale, la boucle HI était positionnée sur la surface du bouton favorisant l'interaction avec l'élément ciblé. La première modification induite au niveau de la boucle HI fut l'ajout du peptide FLAG pour montrer la possibilité d'ajouter des séquences sans perdre la fonctionnalité de la fibre virale (Krasnykh et al., 1998). Plusieurs groupes ont tenté, en insérant des séquences dans la boucle HI, d'augmenter tant l'infectivité des particules virales que la spécificité du changement de tropisme. De nombreuses séquences ont donc été évaluées en fonction de ces deux caractéristiques : l'YSA ciblant le récepteur à l'éphrine A (van Geer et al., 2009); un peptide contenant une portion NGR pouvant interagir avec l'aminopeptidase N (Majhen et al., 2006); puis, différents peptides élaborés via une sélection par phage, pouvant lier différentes cibles, notamment les muscles lisses, les cellules endothéliales vasculaires ou des cellules neuronales (Gaden et al., 2004; Xia et al., 2000; Joung et al., 2005; Nicklin et al., 2001; Baker et al., 2005; Work et al., 2004). Il est aussi possible d'introduire un domaine d'interaction du fragment Fc des immunoglobulines dans la portion HI de la fibre virale et de garder l'affinité avec des anticorps (Volpers et al., 2003). Ce système, en association avec différents anticorps, a permis de générer un changement de tropisme contre le CEA, l'EGF-R et l'EpCam (Kawashima et al., 2011; Tanaka et al., 2006).

Étant donné que le bouton de la fibre contient les éléments essentiels à l'interaction avec le CAR, des chercheurs ont tenté de l'enlever de la fibre de manière à pouvoir diminuer le tropisme naturel des virus (Shayakhmetov et al., 2003; Magnusson et al., 2001).

Cependant, la perte de cette structure empêche la trimérisation de la fibre qui est essentielle à l'infectivité et à l'encapsulation des particules virales (Legrand et al., 1999; Henning et al., 2006; Franqueville et al., 2008). Initialement, différentes séquences peptidiques favorisant la formation de trimères ont été utilisées pour compenser l'abolition du bouton (Hedley et al., 2006; Schagen et al., 2006; Van, V et al., 2000). Actuellement, la séquence stabilisant l'homotrimère a été partiellement isolée et utilisée (Li et al., 2006). À partir de ces constructions dénuées de bouton, plusieurs peptides ont été fusionnés avec la fibre pour induire un changement de tropisme. Le groupe de Toh a enlevé le bouton en gardant le domaine de trimérisation, puis a ajouté un peptide RGD à l'extrémité C-terminale de la fibre (Toh et al., 2005). Parallèlement, certains chercheurs ont utilisé des bibliothèques contenant des multitudes de séquences peptidiques pour obtenir des vecteurs qui auraient un avantage. D'ailleurs, le groupe de Ghosh a trouvé, par cette approche, que le peptide TARGEHKEEELI permettait une meilleure infectivité de 20 fois, dans des myoblastes de souris, tandis qu'il pouvait accroître l'infectivité de 4 fois dans les myotubes (Ghosh and Barry, 2005). Le groupe de Hedley, par exemple, a montré qu'il pouvait fusionner un scFv sur une fibre exempte de bouton et augmenter l'infectivité des particules modifiées vis-à-vis des cellules exprimant la protéine reconnue par le scFv en question (Hedley et al., 2006).

Les fibres chimériques ou les substitutions du bouton de la fibre sont d'autres alternatives qui ont été étudiées. La substitution du bouton de la fibre de l'adénovirus de type 5 pour celui d'un autre sérotype a été effectuée à maintes reprises (He et al., 2011; Gustafsson et al., 2006; Kawakami et al., 2003). Les sérotypes comme l'Ad3, Ad11,

Ad16 (Kuhlmann et al., 2009) et l'Ad50 (Kuhlmann et al., 2009) ont été analysés. Ces constructions permettent de substituer le tropisme naturel du virus, soit le CAR, pour la protéine membranaire, le CD46 (Stone et al., 2005; Segerman et al., 2003). Ce marqueur est exprimé dans plusieurs types de tumeurs comme les glioblastomes (Ulasov et al., 2008). De plus, les virus de sérotype B peuvent lier aussi les récepteurs CD80 et CD86 (Short et al., 2006). L'utilisation d'un sérotype différent peut s'effectuer en substituant le bouton, la tige ou les deux portions de la fibre. Actuellement, les chimères Ad5/35 qui possèdent la tige du sérotype 5 et le bouton du sérotype 35 sont les plus fréquemment étudiées (Shayakhmetov et al., 2005; Nilsson et al., 2004). Par contre, il a été montré que la voie d'internalisation des virus utilisant le CD46 est moins rapide (Nicklin et al., 2005). En effet, l'internalisation de ces particules virales interagissant avec le CD46 ne passe pas par la même voie, ce qui augmente le temps nécessaire pour que le transgène soit exprimé (Amstutz et al., 2008). Néanmoins, plusieurs chercheurs ont aussi utilisé des portions des fibres du sérotype D pour permettre de modifier le tropisme du virus. L'utilisation de vecteurs arborant des fibres chimériques, lesquelles contiennent le bouton de la fibre de type 19, a pu permettre aux particules virales modifiées de cibler spécifiquement les tumeurs rénales au lieu d'être éliminées par le foie (Diaconu et al., 2009). De plus, d'autres chercheurs ont produit des fibres virales en utilisant des éléments provenant du réovirus. En effet, le site d'oligomérisation du réovirus ayant été fusionné au domaine de fixation à la base penton, des particules ont pu être générées (Schagen et al., 2006).

L'utilisation de peptides bispécifiques peut aussi être une alternative pour engendrer un changement de tropisme (Figure 7). Ces peptides peuvent être constitués de différents

domaines d'interaction ou de portions de certaines protéines. En effet, il est possible de conjuguer des anticorps, ou des scFv, ayant la capacité de reconnaître des domaines protéiques différents, pour former des anticorps bispécifiques. Sinon, il est possible de former des peptides bispécifiques en ajoutant un domaine d'interaction à un ligand spécifique, par exemple, l'ajout d'un domaine leucine zipper à un facteur de croissance (Blackwell et al., 1999; Glasgow et al., 2009; Kleeff et al., 2002). Dans la même perspective, des anticorps à une seule chaîne variable (scFv), ciblant la fibre virale et fusionnés à des ligands spécifiques, peuvent aussi être utilisés, de même que des scFv doubles interagissant avec la fibre virale et la protéine d'intérêt (Haisma et al., 2000; Whittington et al., 1998; Nettelbeck et al., 2001). Autrement, le récepteur du FGF (Kleeff et al., 2002), l'antigène carcinoembryonique (CEA) (Whittington et al., 1998; Li et al., 2007), le récepteur à l'EGF (Blackwell et al., 1999), le CD105 (Nettelbeck et al., 2001) et des antigènes spécifiques exprimés par des carcinomes hépatocytaires humains (Yoon et al., 2000) ont été ciblés par des anticorps bispécifiques de manière à modifier le tropisme des virus. Un des avantages des anticorps bispécifiques est qu'ils peuvent aisément réduire le tropisme naturel sans l'ajout de modifications majeures dans la fibre virale. La diminution s'explique par l'encombrement stérique, occasionné par la présence de l'anticorps à proximité du bouton, qui nuit à l'interaction avec le CAR (Korokhov et al., 2003). Des peptides bispécifiques peuvent aussi être bâtis, soit en utilisant les portions protéiques nécessaires à l'interaction avec le bouton de la fibre et avec la protéine d'intérêt (Harvey et al., 2010), soit par le biais de modifications pouvant être ajoutées à l'extrémité C-Terminale, ou encore dans la boucle HI (Henning et al., 2005; Pereboeva et al., 2007). À ce propos, des études ont montré la possibilité de remplacer le bouton par un domaine

d'interaction avec les immunoglobulines Fc. La présence du domaine d'interaction avec les immunoglobulines permet la liaison avec différents anticorps monoclonaux qui peuvent modifier le tropisme des vecteurs viraux vers différents récepteurs cellulaires, dont l'EGF-R (Henning et al., 2005; Volpers et al., 2003) ou le CD40 (Korokhov et al., 2003).

Des modifications dans la structure de l'héxon, de la base penton ou de protéine IX, peuvent aussi servir à induire un changement de tropisme. Au niveau de l'héxon, les recherches effectuées par le groupe de Wu ont démontré que la région hypervariable de l'héxon de l'adénovirus était accessible et n'affectait pas la formation des particules lorsque qu'un Tag histidine était incorporé dans sa séquence (Wu et al., 2005). Suite à ces découvertes, d'autres travaux ont mis en évidence la possibilité d'insérer des séquences qui pouvaient aller jusqu'à 36 acides aminés (McConnell et al., 2006; Vigne et al., 1999; Wu et al., 2005; Kurachi et al., 2007). Parmi ceux-ci, il résulte des travaux du groupe de Vigne que l'ajout d'un peptide RGD dans la portion hypervariable peut augmenter l'efficacité de transduction (Vigne et al., 1999), et ce même si l'utilisation de la séquence RGD dans une configuration similaire dans l'héxon ne permet pas d'obtenir une augmentation de la transduction (Kurachi et al., 2007).

Selon certaines études, il est possible de remplacer la séquence RGD retrouvée sur la base penton par différents peptides. En effet, il a été montré que les séquences HA ou FLAG peuvent être incorporées dans la base penton (Wickham et al., 1996; Einfeld et al., 1999), l'ajout du FLAG permet ensuite de changer le tropisme en utilisant des anticorps bispécifiques. Ces derniers peuvent d'une part reconnaître le peptide FLAG et d'autre part

reconnaître les intégrines à l'aide d'un anticorps spécifiques (Wickham et al., 1996). Des modifications peuvent être aussi apportées à la protéine IX pour permettre de modifier le tropisme. De ce fait, plusieurs modifications ont déjà été générées, comme l'ajout d'un peptide FLAG, d'un HIS-Tag ou d'un motif RGD (Campos et al., 2004; Dmitriev et al., 2002; Tang et al., 2008). Le groupe de Poulin a réussi à incorporer dans la capsid virale, par la protéine IX, un anticorps à un seul domaine, changeant ainsi le tropisme de ces virus (Poulin et al., 2010).

Lorsque l'adénovirus est injecté de manière systémique, il est principalement capté par les cellules de Kupfer du foie, ce qui induit une importante réduction dans la quantité de particules virales en circulation. Une façon de modifier les particules virales consiste à ajouter des polymères hydrophiliques pour masquer les éléments reconnus par l'organisme (Gao et al., 2007). Plusieurs auteurs ont utilisé le PEG pour masquer l'adénovirus, en plus d'ajouter des éléments permettant de générer un changement de tropisme. En effet, il a été montré qu'il était possible de complexer le FGF2 à des molécules de PEG pour induire un changement de tropisme (Lanciotti et al., 2003). Une autre étude a aussi démontré la possibilité d'utiliser le FGF pour induire un changement de tropisme dans des cellules musculaires : le groupe de Menezes a montré une augmentation de 6 fois dans les muscles de souris en utilisant un complexe PEG-FGF. Il a évalué aussi la possibilité d'utiliser l'IGF-I pour changer le tropisme des adénovirus, mais sans trop de succès (Menezes et al., 2006). Ensuite, le groupe de Kim a montré que l'herceptin pouvait aussi être complexé avec le PEG pour changer le tropisme et diminuer l'absorption par le foie (Kim et al., 2011). De plus, l'ajout de peptides est un autre type de modification qui peut être effectuée sur le

polymère (Eto et al., 2008). Un autre polymère moins utilisé est le N-[2-hydroxypropyl] méthacrylamide (HPMA). Pourtant, contrairement au PEG, l'avantage de ce polymère est qu'il permet de recouvrir les particules virales avec une concentration moins importante, réduisant ainsi la probabilité de former des agrégats (Fisher and Seymour, 2010).

1.6 Les récepteurs choisis pour l'induction d'un changement de tropisme

1.6.1 Expression du CEA6

La protéine CEA6, ou CEACAM6, fait partie d'une famille de protéines qui possède des caractéristiques des protéines d'adhésion mais aussi de certains marqueurs de grossesse. Il s'agit de protéines qui ont un fort niveau de glycosylation et qui ont des rôles divers dans les tissus normaux, selon leur domaine d'ancrage, ou en fonction des différents motifs qui peuvent se retrouver sur leur queue cytoplasmique (Kammerer and Zimmermann, 2010). Plusieurs récepteurs seraient reconnus par des anticorps du système humoral (Kuroki et al., 2005). Dans le cas de la protéine CEACAM6, elle serait surexprimée dans bon nombre de tumeurs, dont les tumeurs mammaires, pancréatiques, gastrointestinales (Lewis-Wambi et al., 2008) et pulmonaires (Blumenthal et al., 2007). À partir d'une banque de chaîne lourde, un anticorps à un seul domaine a été identifié pour lier spécifiquement le récepteur CEA6 (Zhang et al., 2004). Cet anticorps a montré sa capacité à pouvoir induire un changement de tropisme dans les A549 lorsqu'il a été incorporé dans la protéine IX de l'adénovirus (Poulin et al., 2010).

1.6.2 Le récepteur à l'EGF

Le récepteur au facteur de croissance épithéliale (EGF-R), erB1 ou HER-1 fait partie d'une famille de quatre récepteurs trans-membranaires à tyrosine kinase. Il est essentiel tant au développement qu'à la croissance des cellules, comme à la survie cellulaire (Gadji et al., 2009; Nicholas et al., 2006). La liaison de différents facteurs de croissance, dont le facteur de croissance épithéliale (EGF) et le facteur de croissance transformant alpha ($TGF\alpha$), peut engendrer l'activation du récepteur. Cette activation s'effectue suite à l'homodimérisation de HER-1 ou suite à l'hétérodimérisation de HER-1 avec HER-2 ou HER-4. La dimérisation entraîne la phosphorylation du domaine cytoplasmique et de différentes voies de signalisations dont celles des MAPK ou de PI3K (Nicholas et al., 2006).

Dans plusieurs types tumoraux, l'expression du récepteur est altérée, soit par une surexpression de celui-ci, soit par la transduction d'un récepteur constitutivement actif. Le récepteur est impliqué dans différents types de tumeurs, dont les tumeurs mammaires, pulmonaires, pancréatiques, voire dans les glioblastomes (Gadji et al., 2009; Hardy et al., 2010; Wilson et al., 2009; He et al., 2008; Heist and Christiani, 2009). En plus de subir une amplification, le récepteur peut être altéré. À ce titre, sept mutations pouvant générer un récepteur constitutivement actif ont été répertoriées dans la littérature (Zhang et al., 2003b). La plus fréquente d'entre elles serait la variante III, nommée EGFRvIII, qui est observée dans différents types de tumeurs (Li et al., 2011). Il est à noter que cette forme du récepteur

n'a pas été retrouvée dans des tissus sains, comme mentionné dans la revue de littérature de Mimeault en 2011 (Mimeault and Batra, 2011). La variante III est générée suite à une deletion des exons 2 à 7, tout en conservant le même cadre de lecture. De plus, la juxtaposition de l'exon 1 et 8 génère un site immunogénique qui pourrait être ciblé par différentes approches thérapeutiques. L'expression de la forme mutante ne serait pas aussi efficace dans l'activation des différents gènes, comparativement à la surexpression du récepteur (Ramnarain et al., 2006). Actuellement, plusieurs groupes tentent de générer des anticorps pouvant reconnaître spécifiquement l'EGF-RvIII (Li et al., 2011; Gupta et al., 2010). Néanmoins, trouver un anticorps réagissant seulement avec la forme mutante peut être difficile, car plusieurs anticorps réagissent aussi avec la forme sauvage du récepteur à l'EGF (Jungbluth et al., 2003). L'utilisation de tels anticorps pourrait s'avérer intéressante dans le cadre d'approches faisant appel au changement de tropisme pour cibler les tumeurs.

Tout de même, plusieurs approches thérapeutiques qui surexpriment le récepteur à l'EGF ont été évaluées pour traiter les tumeurs. Certaines drogues agissent sur l'activité kinase du récepteur, comme le GefitinibTM, pour entraîner la mort des cellules (Emdad et al., 2007). Il existe aussi plusieurs anticorps monoclonaux qui peuvent être avantageux dans un contexte de changement de tropisme. Par exemple, des études ont mené à la production de l'herceptinTM. Ce composé est, en fait, un anticorps monoclonal humanisé qui cible spécifiquement la protéine HER-2. La liaison de l'anticorps avec le HER-2 entraîne une réduction de la prolifération des masses tumorales (Shah and Chen, 2011). Dans un contexte de thérapie génique, l'herceptinTM a déjà été couplé à un AdV par l'utilisation de PEG et utilisé pour engendrer un changement de tropisme (Kim et al., 2011). De plus, un

autre anticorps monoclonal ciblant l'EGF-R, le Cetuximab, a aussi été combiné au PEG pour engendrer un changement de tropisme. Dans ce dernier cas, l'anticorps était associé à un virus oncolytique, permettant ainsi de réduire la taille de tumeurs ovariennes (Morrison et al., 2008b).

1.6.3 Expression du récepteur à l'IGF-I dans les tumeurs et les tissus sains

Le récepteur au facteur de croissance similaire à l'insuline I (IGF-IR) est un hétérotétramère dont les différentes chaînes qui le composent sont liées par la présence de ponts disulfures. Il est composé de deux sous-unités β , de 95 kDa chacune. Ces portions ont pour rôle d'ancrer le récepteur à la surface des cellules. Par ailleurs, les cellules tumorales possèdent deux sous-unités α de 132 kDa, tandis que les cellules normales expriment une sous-unité α de 115 kDa (Gammeltoft et al., 1988). La structure tridimensionnelle formée des deux sous-unités α permet la liaison avec différents types de ligands, dont l'insuline et le facteur de croissance similaire à l'insuline I ou II (IGF-I ou IGF-II) (Baserga, 2000; Gualco et al., 2009). Par contre, l'interaction avec l'IGF-II ou l'insuline s'effectue avec une affinité beaucoup plus faible, à savoir de 25 nM et de 100 nM respectivement (Schumacher et al., 1991; Germain-Lee et al., 1992), que celle avec l'IGF-I, dont l'affinité est de 1 nM (Germain-Lee et al., 1992). Pourtant, l'induction de ce récepteur n'est pas seulement contrôlée par les niveaux d'expression du ligand ou ceux du récepteur. Effectivement, la présence de la protéine liant l'IGF-I (IGFBP) a un rôle essentiel dans la modulation des signaux induits par l'IGF-IR. L'IGFBP possède une affinité plus

importante pour le ligand que celle observée pour le récepteur (Werner and Bruchim, 2009). Les protéines IGFBP permettent le transport de l'IGF-I au travers du flot sanguin, l'empêchent d'activer les cellules endothéliales et augmentent la demi-vie des facteurs de croissance. De plus, l'expression des IGFBP peut être utilisée par les cellules pour moduler l'activation du récepteur en altérant le nombre de molécules d'IGF-I disponibles dans l'espace extracellulaire (Duan, 2002). La stimulation du récepteur peut permettre la prolifération, la différenciation et l'envoi des signaux anti-apoptotiques (Gualco et al., 2009; O'Connor et al., 1997; Reiss et al., 1998). L'IGF-IR est un récepteur qui fait partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase et qui possède la capacité de s'autophosphoryler suite à l'interaction avec l'un des différents ligands. La phosphorylation s'effectue sur plusieurs des tyrosines retrouvées sur la queue cytoplasmique de la sous-unité β suite à un changement conformationnel. La phosphorylation est essentielle aux activités biologiques du récepteur, comme l'internalisation et la signalisation intracellulaire (Kato et al., 1993; Prager et al., 1994; Stannard et al., 1995). La séquence de l'IGF-IR possède aussi un site de liaison à l'ATP (Stannard et al., 1995) qui est essentiel à l'activité biologique du récepteur (Kato et al., 1993; Favelyukis et al., 2001).

L'activation du récepteur module plusieurs phénotypes associés avec les capacités tumorigéniques. En effet, il a été montré qu'il existe une association entre la diminution des niveaux d'expression de l'IGF-IR dans des cellules tumorales et l'induction de la mort cellulaire (Liu et al., 1998; Dunn et al., 1998; Yavari et al., 2010). L'IGF-IR aurait aussi une influence sur les capacités métastatiques via l'augmentation du potentiel d'invasion des cellules tumorales (Samani et al., 2004). De plus, la présence du récepteur à la surface des

tumeurs favoriserait le développement des nodules métastatiques dans les tissus hépatiques chez certains types de tumeurs, dont les tumeurs du colon ou pulmonaires (Reinmuth et al., 2002; Wang et al., 2009). Enfin, des études ont montré que l'inhibition du récepteur augmenterait la sensibilité à certains traitements de chimiothérapies (Duan et al., 2009).

L'IGF-I, ainsi que l'expression du récepteur à l'IGF-I, seraient reliés au développement des tissus musculaires, à leur régénération et à l'utilisation du glucose (Kim et al., 2005). En fait, il a été prouvé que l'IGF-I fait parti des facteurs qui permettent la différenciation des myoblastes en myotubes (Yoshiko et al., 2002). De plus, les niveaux d'expression du récepteur à l'IGF-I, de même que ceux de l'IGF-I, seraient stimulés suite à différents types d'exercices (Philippou et al., 2007). L'activité du récepteur à l'IGF-I serait moins efficace avec le vieillissement des muscles en plus d'être moins exprimé suite à l'exposition aux différents stimuli (Philippou et al., 2007). Pour démontrer l'importance du récepteur à l'IGF-I lors du développement, le groupe de Liu a généré un modèle de souris « knock down » pour le récepteur. Ils ont montré que les souris mourraient très tôt après leur naissance, d'une hypoplasie des différents muscles (Liu et al., 1993). Également, le groupe de Beguinot a montré que les niveaux d'expression dans les myoblastes, les précurseurs des fibres musculaires chez la souris, étaient plus élevés que dans les fibres différenciées. Même avec des niveaux relativement faibles, les chercheurs ont montré que l'activité suivant la stimulation du récepteur à l'IGF-I était aussi forte, même avec des niveaux d'expression plus faible (Beguinot et al., 1985).

1.7 Interaction protéique

L'utilisation d'un système d'interaction protéine-protéine est une alternative efficace pour effectuer la purification et la concentration, de même que pour trouver des partenaires d'interactions dans le cadre de différentes expériences. En effet, des éléments variés sont utilisés couramment pour isoler des protéines provenant d'extrait, de milieu conditionné ou de sérum. Il s'agit, notamment, de Tag histidine (Loetscher et al., 1992), de complexes de biotine et de streptavidine (Schmidt and Skerra, 1993), ou encore de la protéine A au niveau des purifications d'anticorps (Lowenadler et al., 1986). Par contre, la taille de certains de ces domaines d'interaction peut nuire à l'accessibilité des peptides à cause de l'encombrement stérique ou du repliement de la structure (Tripet et al., 1996). Les systèmes comme l'avidine/biotine ou les FLAG ont déjà été utilisés, dans le cadre d'approches permettant l'induction d'un changement de tropisme (Krasnykh et al., 1998; Campos et al., 2004).

Le système « Coiled-Coil » a été développé initialement pour obtenir un système universel qui permettrait de faciliter la purification protéique. Sa structure en forme d'hélice α (Figure 8) a été sélectionnée pour différentes raisons, parmi lesquelles la flexibilité de la structure, les forces d'interaction électrostatique, les domaines hydrophobiques, de même que de l'orientation des deux partenaires (Chao et al., 1998). La liaison des domaines d'interaction est possible grâce au résidu chargé (acide glutamique et lysine) retrouvé en position 5 et 7 (Figure 8). De plus, le positionnement des différents acides aminés favorise la formation d'hétérodimère, ce qu'a démontré le groupe de Tripet

(Tripet et al., 1996). À partir de ce moment, le système a été utilisé dans le cadre de multiples essais. Il s'est révélé un excellent capteur protéique dans le cadre de purification sur colonne (Chao et al., 1998). Le potentiel du système a aussi été évalué pour en faire un agent de détection pour des immunobuvardages de type Western (Boucher et al., 2010) ou, encore, pour être utilisé dans le cadre d'essai ELISA (Liberelle et al., 2010). Actuellement, le système n'a pas été évalué dans un contexte *in vivo*. Étant donné la nature synthétique des domaines d'interaction K-Coil et E-Coil, il pourrait y avoir une réponse immunitaire dirigée contre les domaines d'interaction. Finalement, il a été montré que les domaines d'interaction « Coiled-Coil » avaient un impact sur la séparation des protéines arborant l'un ou l'autre des domaines d'interaction. La forte charge électrostatique de ceux-ci serait la cause de cette variation (Tripet et al., 1996).

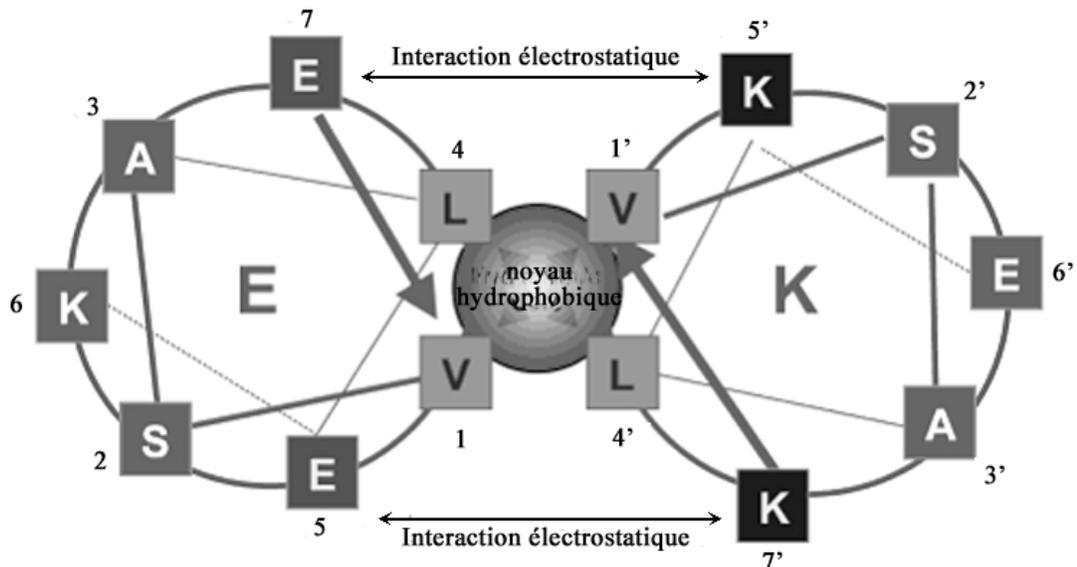


Figure 8 : Représentation schématique des hélices α composant les domaines d'interaction K-Coil et E-Coil.

Les domaines K-Coil et E-Coil ont été par la suite mieux caractérisés, grâce à l'utilisation de différentes mutations dans les hélices alpha (Litowski and Hodges, 2002), de même que par le système Biacore (surface plasmon resonance, SPR) (De et al., 2003). Les résultats des auteurs montraient que la variation entre le nombre de copies des Coils avait un effet sur la constante de dissociation des complexes : plus le nombre de copies était élevé, plus la stabilité du complexe était grande. Précisément, un complexe E4/K4 obtenait un K_d d'une valeur de $1.16 \times 10^{-7} M$, tandis qu'un complexe E5/K5 obtenait une valeur de $6.3 \times 10^{-11} M$ (De et al., 2003).

1.8 Objectif du projet de recherche

Tel que mentionné précédemment dans les sections 1.3 et 1.4, l'un des problèmes associés à l'utilisation des adénovirus pour la thérapie génique est la difficulté à infecter les différents types cellulaires ciblés. La limitation est causée par un faible niveau d'expression du récepteur primaire à l'adénovirus, le CAR. Cette problématique est aussi constatable dans des cellules tumorales que dans certains tissus normaux, comme les muscles. Différentes approches ont été élaborées dans la littérature pour accroître l'infectivité des AdVs. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un domaine d'interaction synthétique pourrait permettre l'association de l'adénovirus avec différents peptides bispécifiques, et que cette association pourrait permettre d'accroître l'infectivité des particules virales.

Le but du projet était donc de démontrer qu'il était possible de développer un système adénoviral capable de cibler spécifiquement différents types cellulaires, en utilisant différents récepteurs cellulaires, autres que le CAR, comme cible. Ce système serait subséquentement utilisé pour développer des vecteurs adénovirus plus efficaces et plus sécuritaires pour différentes thérapies géniques. Pour valider notre hypothèse, il est essentiel de démontrer les objectifs suivants :

- Qu'il est possible de construire des peptides bispécifiques fonctionnels arborant des domaines d'interaction et pouvant cibler un récepteur spécifique.
- Qu'on peut générer des fibres adénovirales arborant le domaine d'interaction pour le ligand, avec ou sans la présence de mutations dans l'un des domaines d'interaction au CAR.
- Que les domaines d'interaction retrouvés sur les ligands et les fibres virales peuvent interagir ensemble.
- Qu'il est possible de produire et purifier des vecteurs adénoviraux arborant les fibres modifiées.
- Que le tropisme des adénovirus peut être changé dans des lignées cellulaires tumorales.
- Que l'efficacité de transduction peut être augmentée dans les cellules musculaires.
- Et finalement, que le changement de tropisme peut accroître l'infectivité de vecteurs adénoviraux dans un contexte *in vivo*.

Section 2 :

Matériel et méthodes

2 Matériel et méthodes

2.1 Entretien des cellules en culture

La croissance de toutes les cellules a été effectuée à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les 293A (Graham et al., 1977), les 293E, cellules dérivées des 293A exprimant le pseudorécepteur à l'EGF-R/E5.Coil (Zeng et al., 2008), ainsi que les HeLa (Jones, Jr. et al., 1971) ont été maintenues dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Thermo scientist, Rockford, IL) contenant 5% de sérum foetale de bovin (FBS) (Thermo scientist, Rockford, IL) et 2 mM de Glutamine (Thermo scientific, Rockford, IL). Les 293F (Invitrogen, Carlsbad, CA) ont été maintenues en suspension dans des erlenmeyers de 125 mL (Corning, Lowell, MA), dans du SFM à faible concentration de calcium (LC-SFM) (Invitrogen, Grand Island, NY) contenant 5% de FBS (Thermo scientifique, Rockford, IL) et 2 mM de glutamine (Thermo scientific, Rockford, IL). Les CHO-IGF-E5 clone L et clone 4B4 (Caron et al., 2009) ont été maintenues en suspension dans des erlenmeyers stériles de 125 mL (Corning, Lowell, MA) dans du CD-CHO (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON) complémenté avec 2 mM de glutamine et 50 µg/mL de sulfate de dextran (Amersham Pharmacia biotech, Uppsala, Suède). Les lignées A549 (Giard et al., 1973) (cellules cancéreuses pulmonaires humaines) et A549tTA (Massie et al., 1998a) ont été maintenues dans du milieu DMEM (Thermo scientific, Rockford, IL) contenant 10% de FBS (Thermo scientific Rockford, IL) et 2 mM de Glutamine (Thermo scientific, Rockford, IL). Pour étudier le modèle de tumeurs de cerveau, les U87MG (Ponten and Macintyre, 1968) et les U87MG-Wt (cellules de glioblastomes humains surexprimant le récepteur à l'EGF) ont été

utilisées et maintenues dans du milieu DMEM (Thermo scientific, Rockford, IL) contenant 10% de FBS (Thermo scientific Rockford, IL) et 2 mM de Glutamine (Thermo scientific, Rockford, IL). La lignée H59 (cellules cancéreuses pulmonaires de souris) fournie par le laboratoire du Dr Brodt a été utilisée pour étudier le changement de tropisme dans un modèle qui forme des métastases dans le foie à cause de l'expression de l'IGF-IR. Les cellules ont été maintenues dans du milieu RPMI-1640 (Thermo scientific Rockford, IL) contenant 10% de FBS (Thermo scientific, Rockford, IL) et 2 mM de L-glutamine (Thermo scientific, Rockford, IL). La lignée TOV-112D et OV90 (cellules cancéreuses ovariennes) (Provencher et al., 2000) ont été maintenues dans du milieu F12/DMEM (Thermo scientific Rockford, IL) contenant 10% de FBS (Thermo scientific, Rockford, IL) et 2 mM de L-glutamine (Thermo scientific, Rockford, IL). Pour étudier l'efficacité de transduction dans les muscles, des cellules C2C12 (myoblastes de souris) (Yaffe and Saxel, 1977) ont été utilisées et maintenues dans du milieu DMEM (Thermo scientific, Rockford, IL) contenant 10% de FBS (Thermo scientific Rockford, IL) et 2 mM de Glutamine (Thermo scientific, Rockford, IL).

2.2 Génération des différentes constructions

2.2.1 Construction des fibres virales modifiées

Plusieurs des plasmides ont été utilisés et construits lors de ce projet. La liste des plasmides a été présentée dans l'annexe I pour faciliter la distinction entre ce qui était disponible dans notre laboratoire et ce qui a dû être bâti dans le cadre de cette thèse.

Les fibres virales arborant le domaine K-Coil en C-terminal ont été produites précédemment dans notre laboratoire (Zeng et al., 2008). Brièvement, les séquences du K4-Coil et du K5-Coil ont été insérées dans la portion C-terminale de la fibre virale après avoir été amplifiées par PCR à partir du vecteur pcDNA3-K5-Coil (produit par Mme Myriam Banville, Institut de recherche en biotechnologie). Pour ce faire, l'amorce sens 5'-CGCGGATCCAAGGTATCCGCTTTAAAG-3' a été utilisée en combinaison avec l'une des amorces antisens suivantes : pour le K4, 5'-CGGGATCCGAATTGTTATT CCTTCAAGGCTGACAC-3'; pour le K5, 5'-CGGGATCCCAATTGTTACTCTTTA AGTGCTGA -3'. Les amorces ont permis l'insertion d'un site BamHI (souligné) et d'un site MunI (caractères gras). Les séquences ont été insérées dans le plasmide pCMV-FB-BFPq (disponible dans le laboratoire), suite à la digestion du plasmide et des fragments PCR par l'enzyme de restriction BamHI, pour former les plasmides pCMV-FB4 et pCMV-FB5 (Zeng et al., 2008). Une mutation dans la fibre avec le K4 en C-terminal a été introduite dans le domaine AB en utilisant la trousse commerciale QuickChange™ (Stratagene, CedarCreek, Tx) pour former le plasmide pCMV-FBK4m (Zeng et al., 2008). La mutation a donc été introduite par mutagenèse dirigée (nucléotides soulignés) en utilisant des amorces spécifiques, à savoir 5'-ACCACACCAGCTCCAGAGCCTAACTGT AGACTAAATGC-3' et 5'-GCATTTAGTCTACAGTTAGGCTCTGGAGCTGGTGTGG T-3', selon les procédures du système commercial QuickChange™ (Stratagene, CedarCreek, Tx). La séquence FBK4m a été transférée dans le plasmide pE4 (contient la portion virale contenu entre les positions 84,5 et 100mu) (Zeng et al., 2008) pour générer le

vecteur plasmidique pE4-FBK4m en digérant le plasmide pE4 et le pCMV-FBK4m avec les enzymes de restriction NheI et MnuI (Zeng et al., 2008).

Nous avons ensuite introduit les 5 répétitions du domaine K-Coil dans la boucle HI pour former le vecteur pE4-HIK5 (Annexe I). Pour ce faire, la séquence TGF α , retrouvée dans le vecteur pE4-FBTGF α (disponible dans le laboratoire), contenu dans la boucle HI a été remplacée par le fragment K5-Coil obtenu suite à l'amplification de la séquence par PCR. Ce fragment a été amplifié en utilisant l'amorce sens 5'-CGCGGATCCAAGGTATC CGCTTTAAAAG-3' et l'amorce antisens 5'-TATTGGATCCTCCTTGATCCTCCACCG CCC TC-3'. La séquence de la fibre contenant le K5-Coil a, par la suite, été transférée dans le vecteur plasmidique pE4. L'insertion a été effectuée en clonant la séquence dans un site BamHI. Le plasmide pE4-HIK5 a été vérifié par séquençage. La fibre virale modifiée a été transférée dans le plasmide pCMV-FB-BFPq (Zeng et al., 2008) à l'aide des amorces 5'-T AATACGCGTGCCACCATGAAGCGCGCAAGACC-3' et 5'-CCGCGACGCGTTATTA TTCTTGGGCAATG-3', pour permettre de vérifier l'expression de la fibre contenant le domaine K5-Coil dans la boucle HI. Une séquence flexible a été introduite à chaque extrémité du domaine K5-Coil. La séquence de la fibre dans le plasmide pCMV-FBHIK5 (Annexe I) a été confirmée par séquençage. Les deux mutations dans le domaine AB (portions soulignées) ont été induites par mutagenèse dirigée, en utilisant des amorces spécifiques 5'-ACCACACCAGCTCCAGAGGCTAACTGTAGACT AAATGC-3' et 5'-G CATTAGTCTACAGTTAGCCTCTGGAGCTGGTGTGGT-3', toujours selon les procédures du système commercial QuickChangeTm (Stratagene, CedarCreek, Tx). Les mutations ont donc été effectuées dans le plasmide pE4-HIK5 (Annexe I) sur la séquence

arborant le domaine K5 au niveau de la boucle HI pour générer le vecteur pE4-HIK5Dm (Annexe I).

La production du plasmide pAdFK4m/GFP a été décrite (Zeng et al., 2008). En quelques mots, la fibre K4m a été transférée du plasmide pE4-FK4m dans le vecteur pAdeasy-1 (qbiogene, Carlsbad, CA) (He et al., 1998), suite à une digestion avec les enzymes de restriction MunI, PacI et SpeI. Le plasmide a été formé en combinant par ligation les fragments MunI/PacI et PacI/SpeI avec la fibre K4m. Une recombinaison homologue entre le vecteur pAdeasy contenant la fibre K4m et le vecteur pShuttle-Tr5/CuOGFP (Zeng et al., 2008) a permis la formation du plasmide pAdFK4m/GFP. Pour effectuer la recombinaison homologue, les séquences ont été transformées dans les bactéries BJ5183, en suivant les recommandations du fournisseur.

La fibre arborant le K5-Coil dans la boucle HI sans les deux mutations a été transférée dans le vecteur pAdeasy- Δ Fibre (disponible dans le laboratoire). Le transfert de la séquence a été effectué par recombinaison homologue. Cette recombinaison a eu lieu entre le vecteur pAdeasy- Δ fibre linéarisé avec Swa I et le fragment encodant pour la fibre isolée avec les enzymes BsmI et KpnI à partir du vecteur pE4-HIK5. La sélection des bactéries BJ5183 (Stratagene, Cedar Creek, Tx) ayant généré une recombinaison a été effectuée en présence de kanamycine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). L'altération de la séquence du plasmide pAdeasy-FBHIK5 (Annexe I) a été évaluée par digestion enzymatique avec MnuI. Par la suite, le plasmide pAdenoVator-GFP encodant la cassette d'expression CMVGFP a été utilisé pour former des vecteurs plasmidiques pAdeasy-

Δ Fibre-CMVGFP et pAdeasy-FBHIK5/GFP (Annexe I). Pour ce faire, 10ng du vecteur pAdenoVator-GFP linéarisés avec PmeI et 1 μ g de vecteur pAdeasy- Δ Fibre ou pAdeasy-FBHIK5 ont été électroporés dans les bactéries BJ5183 (Stratagene, Cedar Creek, Tx). L'électroporation des bactéries a été effectuée à l'aide d'une impulsion de 25 millivolts générée pendant quelques secondes. Les bactéries ont été incubées pendant deux minutes sur glace puis ont été inoculées sur des géloses d'agar contenant 25 μ g/mL de kanamycine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Les colonies ont été piquées et amplifiées pour vérifier les séquences plasmidiques suite à une lyse alcaline des bactéries. Les plasmides positifs ont été déterminés par leur taille moléculaire (40 Kb) et par une digestion avec l'enzyme PacI (New England Biolabs, NEB, Ipswich, MA). La digestion enzymatique confirme les colonies positives par la formation d'un fragment de 3.0 Kb. Les constructions positives ont été transformées dans des bactéries Top10 pour l'amplification. Les bactéries positives ont été amplifiées dans 500 mL de LB en présence de 50 μ g/mL de kanamycine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON).

La séquence de la fibre arborant le K5-Coil dans la boucle HI avec les deux mutations a été transférée dans le vecteur pAdeasy- Δ Fibre-CMVGFP (disponible dans le laboratoire). Le transfert de la séquence de la fibre a été effectué par recombinaison homologue dans le vecteur pAdeasy- Δ fibre-CMVGFP suite à une digestion avec Swa I. Le fragment encodant pour la fibre HIK5 avec mutation a été isolé après digestion avec BsmI et KpnI, à partir du vecteur pE4-HIK5 Dm (voir Annexe I) contenant la fibre modifiée avec les mutations. Les fragments linéarisés ont été électroporés dans les BJ5183. La sélection des bactéries BJ5183 (Stratagene, Cedar Creek, Tx) ayant généré une recombinaison a été

effectuée en présence d'ampiciline (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) et l'altération de la séquence a été évaluée par digestion enzymatique avec MnuI. Les colonies ont été piquées et amplifiées pour vérifier les séquences plasmidiques suite à une lyse alcaline des bactéries. Les plasmides positifs ont été déterminés par leur taille moléculaire (40 Kb) et par une digestion avec l'enzyme PacI (New England Biolabs, NEB, Ipswich, MA). La digestion enzymatique confirme les colonies positives par la formation d'un fragment de 3.0 Kb. Les constructions positives ont été transformées dans des bactéries Top10 pour l'amplification. Les bactéries positives ont été amplifiées dans 500 mL de LB en présence de 50 µg/mL de kanamycine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON).

2.2.2 Construction de l'IGF-E5, de l'EGF-E5-Coil et de l'AFAI-E5-Coil

La séquence de l'IGF-I de souris complète (GenBank ID:BC012409), provenant du plasmide pSport6.0 (ATCC, Manassas VA), a été amplifiée par PCR avec les amorces 5'-GGATCCGGCACCATGTCGTCTTCACACCTC-3' et 5'-GGTACCTCCACCTGAACCGCTGCTTTTGTAGGCTTC-3'. Le fragment PCR obtenu a été transféré dans le vecteur pMPGB43k (Mercille et al., 1999), après que la séquence de B43k ait été excisée par digestion enzymatique avec BamHI (New England Biolabs, NEB, Ipswich, MA), pour former le plasmide pMPG-IGF-I (Annexe I). Le domaine His-Tag, le domaine E5-Coil et la séquence flexible (6XGly) ont, subséquentement, été amplifiés par PCR à l'aide des amorces 5'-TATTGGTACCGGCGGGCACCATC-3' et 5'-GCGAGGTACCGCTAGCTTATTACTTCTCAAGTGCTG-3' et insérés dans le site KpnI du plasmide pMPG-IGF-I retrouvé à l'extrémité 3' de la séquence de l'IGF-I. Le plasmide a été amplifié dans les

DH5 α , purifié par Maxi Prep, en utilisant les recommandations de la trousse de Qiagen (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada), puis évalué par transfection transitoire dans des 293A.

La construction de l'EGF-E5-Coil a été décrite en détail dans l'article du Dr O'Connor (Le et al., 2009). Si nous résumons la démarche, la séquence de l'EGF humain a été amplifiée à partir du vecteur plasmidique pEZZ18-EGF par PCR en utilisant les amorces suivantes : sens 5'-GATCGAATTC AACAGCGACTCTGAATGCCCG-3' et antisens 5'-GATCAAGCTTTTATTAACGGAGCTCCCACCA -3'. L'amorce sens a permis l'ajout d'un site EcoRI (souligné), tandis que l'amorce antisens a, pour sa part, permis d'inclure un site HindIII (souligné). Pour ce qui est du domaine E5-Coil, sa séquence a été amplifiée à partir du vecteur pcDNA3-E5-Coil (Le et al., 2009) en utilisant les amorces sens 5'-GATCCATGGAGGTATCCGCTTTAGAGAA AGAA-3' et antisens 5'-GATCGAATTCAGAGCCACCGCCACCGCTGCCACCGCCACCAGAGCCACC **GCCACC**TTCTCAGGTGCTGATACTTCCTT-3'. L'amorce sens a permis d'inclure un site NcoI (souligné) tandis que l'amorce antisens a permis d'inclure une région flexible de 15 acides aminés (en gras) en plus d'un site de restriction EcoRI (souligné). Les fragments ont été ligés dans le vecteur plasmidique pGEMT formant les plasmides pGEMT-EGF et pGEMT-E5-Coil. La séquence de l'EGF a ensuite été digérée avec les enzymes de restrictions EcoRI et NotI, puis insérée dans les plasmides pGEMT-E5-Coil digéré avec EcoRI. Cette même séquence a été transférée, suite à une digestion avec NcoI et HindIII dans le vecteur d'expression bactérien, dans le même cadre de lecture que la thioredoxine contenu dans le plasmide pET32c, pour former le plasmide pET32c-E5-Coil-EGF. La séquence de l'E5-Coil-EGF a été confirmée par séquençage.

La séquence de l'AFAI fusionné avec l'E5-Coil a été obtenue par le groupe du Dr MacKenzie (Zhang et al., 2004). La séquence d'E5-Coil a été amplifiée à l'aide du vecteur pcDNA3-E5-Coil avec l'amorce sens 5'-AAATTTGGATCCGGTGGTGGTTCTGAGGTA TCCGCTTTAGAGAAAG-3', permettant l'ajout d'un site BamHI (souligné), et l'amorce antisens 5'-AAATTTAGATCTTCCTTCTCA AGTGCTGATACTTC-3', permettant, cette fois, l'ajout d'un site BglII (souligné). La séquence de l'E5-Coil a été ajoutée en C-terminal à la séquence de l'AFAI contenue dans le vecteur pSJF2 (Tanha et al., 2003) après digestion enzymatique avec BglI et BamHI. La digestion du plasmide a permis d'enlever le tag Myc et de cloner le fragment entre l'AFAI et un His-Tag, pour former le plasmide pSJF2-AFAI-E5-Coil. Le plasmide a été vérifié par séquençage avant d'être transformé dans les bactéries *E. coli* TG1 pour permettre l'expression de la protéine de fusion.

2.3 Amplification et purification de l'EGF-E5-Coil inclus dans des corps d'exclusion

Le protocole dont il est ici question a été décrit dans l'article du Dr O'Connor (Le et al., 2009). Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) contenant le plasmide encodant pour l'EGF-E5-Coil ont été inoculées dans 500 mL de milieu LB avec ampiciline. La production du plasmide a été induite par l'ajout de 1 M d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fisher scientific, Ottawa, ON), suite à l'obtention d'une densité optique à 600 nm d'environ 0.8. L'EGF-E5-Coil a été extrait des corps d'inclusion. Pour ce faire, on a

d'abord extrait les corps d'inclusion des culots bactériens avec 100 µg/mL de lysozyme, avant de procéder à une sonication des extraits bactériens pour briser l'ADN génomique. Les protéines des corps d'inclusion ont été resuspendues dans du guanidine-HCl 6M (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Les lysats ont été centrifugés à 10 000Xg pendant 10 minutes, puis le surnageant a été passé sur une colonne de sépharose couplé avec un ion métallique de nickel. Une fois immobilisée dans la colonne, cette dernière a été nettoyée avec 10 volumes de colonne de tampon phosphate contenant 10 mM d'imidazole. Un gradient d'imidazole (30mM à 200mM) a été utilisé pour éluer l'EGF-E5-Coil de la colonne. Les échantillons ont été passés sur une colonne PD10 pour éliminer la présence de l'imidazole, puis ont été analysés et dosés par Coomassie Fluor OrangeTM (Invitrogen, Burlington, ON).

L'EGF-E5-Coil a été dilué à une concentration de 0.5 mg/mL et dénaturé à 22°C pendant 90 minutes dans un tampon contenant 0.1 M de Tris HCl pH 8.4, 6 M de guanidine HCl et 5 mM de L-cystéine. Le repliement a été effectué en enlevant l'agent réducteur des échantillons à l'aide d'une colonne PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech) équilibré avec une solution de 100 mM Tris-HCl pH 8.4. La protéine a été récupérée dans un volume de 3.5 mL, puis diluée immédiatement dans le tampon Tris HCl contenant 2.5 mM de L-cystéine, pour obtenir une concentration protéique finale de 0.5 mg/mL. La solution protéique a été ensuite incubée pendant 24 heures à 22°C. Le His-Tag a été enlevé suite à une incubation avec une entérokinase recombinante (1 unité par 50 µg d'EGF-E5-Coil-HisTag) pendant 16 heures à 22°C. Après le clivage, 0.1 M de PMSF a été ajouté à la solution pour neutraliser l'entérokinase recombinante. De l'acide trifluoroacétique (TFA)

(Sigma-Aldrich, Oakville, ON) a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 1% pour permettre la purification sur HPLC. L'EGF-E5-Coil replié correctement et clivé a été purifié par HPLC (Waters, ON, Canada) sur une colonne de 4.6 x 250 mm Vydac C₁₈, en utilisant un gradient linéaire de CH₃CN dans un volume de 0.1% (v/v) de TFA à un débit de 1 mL/min. Les fractions contenant la protéine ont été combinées.

2.4 Amplification et purification de l'AFAI-E5-Coil inclus dans l'espace périplasmique

Les bactéries contenant le plasmide encodant pour l'AFAI-E5-Coil ont été inoculées dans 500 mL de milieu M-9 (42 mM de Na₂HPO₄, 22 mM de KH₂PO₄, 18.7 mM de NH₄Cl, 8.5 mM de NaCl, de 1 M MgCl₂, 1 M CaCl₂, 1 mg/mL de vitamine B, 20% Glucose, 20% d'acide casaminique) avec ampiciline. La production du plasmide a été induite par l'ajout de 136 mM d'IPTG (Fisher scientific, Ottawa, ON) suite à l'obtention d'une densité optique à 600 nm d'environ 0.8. L'AFAI-E5-Coil a été extraite de l'espace périplasmique. Pour ce faire, les protéines sont extraites des culots bactériens avec 100 µg/mL de lysozyme. L'ADN bactérien a été digéré par la DNase I (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). La solution est centrifugée à 12 000 RPM pour éliminer les débris. Le surnageant a été passé sur une colonne de sépharose couplé avec des ions métalliques de nickel. Une fois l'AFAI-E5-Coil immobilisé sur la résine, cette dernière a été nettoyée avec 10 volumes de colonne de tampon phosphate contenant 10 mM d'imidazole. Un gradient d'imidazole (30mM à 200mM) a été utilisé pour éluer la protéine de la colonne.

Les échantillons ont été passés sur une colonne PD10 pour éliminer la présence de l'imidazole.

2.5 Transfection transitoire d'ADN plasmidique

L'expression des différentes séquences plasmidiques a été évaluée en effectuant des transfusions transitoires dans des 293A par la méthode utilisant le polyéthylèneimine (PEI) (Durocher et al., 2002). Les cellules ont donc étéensemencées, à une densité de 5×10^5 cellules/puits, dans une plaque de 6 puits, et ce, 18 heures avant l'expérience. $3 \mu\text{g}$ d'ADN plasmidique a été diluée dans du milieu de culture DMEM (Thermo scientific Rockford, IL) sans sérum. Ensuite, $3 \mu\text{g}$ de PEI (Polyscience, Warrington, PA) ont été ajoutés à la solution et mélangés. Le mélange a été incubé 15 minutes à la température de la pièce. Les complexes PEI:ADN ont été ajoutés délicatement sur les cellules. Les cellules ont finalement été incubées à 37°C pendant 120 heures pour permettre l'expression des protéines d'intérêt.

2.5.1 Génération des particules virales par transfection transitoire

Les plasmides pAdeasy modifiés, obtenus par recombinaison homologue, ont été linéarisés par un clivage enzymatique à l'aide de PacI (New England Biolabs, NEB, Ipswich, MA). $3 \mu\text{g}$ d'ADN plasmidique, linéarisé et non purifié, ont été transfectés dans 2×10^6 cellules 293Eensemencées 18 heures avant la transfection. 24 heures après la

transfection transitoire, les cellules ont été divisées dans trois pétris de 10 cm et incubées jusqu'à l'obtention d'une monocouche avec une confluence d'environ 80%. Les cellules ont été recouvertes avec 6mL d'agarose 1% dilués dans du DMEM contenant 5% de FBS. Les cellules ont été incubées pendant trois à quatre semaines selon les virus, en ajoutant 1mL d'agarose 1% à tous les 4 jours. Les plages de lyses ont été récoltées et transférées dans une plaque 96 puits, contenant 5000 cellules 293E par puits. Les virus ont été amplifiés par la suite, en augmentant le nombre de cellules infectées à chacune des rondes d'amplification jusqu'à l'obtention d'une concentration suffisante pour infecter 30 fois 1×10^7 cellules 293E adhérentes ou 5×10^8 293F en suspension. Un aliquot a été conservé à -80°C à chacune des étapes de la purification.

2.6 Récolte et dosage des différents extraits protéiques

Pour les protéines sécrétées dans le milieu de culture, les milieux conditionnés ont été récoltés puis transférés dans un tube conique. Par la suite, les milieux conditionnés ont été centrifugés pendant 10 minutes à 1000 RPM pour faire culotter les débris cellulaires. De nouveau, les milieux conditionnés ont été transférés dans une autre série de tubes et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Pour récolter les protéines membranaires, le milieu de culture a été aspiré, puis les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS stérile. À l'aide d'un grattoir à cellules, les cellules ont été décollées sans l'utilisation de trypsine. Les cellules ont été culottées par centrifugation à 1000 RPM puis ont été resuspendues dans 200 μL de tampon de lyse (142

mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM HEPES pH 7.5, 2 mM EGTA, 0.3% NP-40) contenant 100µg/mL d'inhibiteur de protéase (Roche, Laval, Qc, Canada). Les débris cellulaires ont été enlevés suite à une centrifugation à 13000 RPM pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines a été transféré dans un nouveau tube eppendorf et conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Pour récolter les protéines qui sont produites dans le cytoplasme, le milieu de culture a été aspiré puis les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS 1X stérile. 200 µL de tampon de lyse, tel que décrit ci-dessus, contenant 100 µg/mL d'inhibiteur de protéase (Roche, Laval, Qc, Canada) ont été ajoutés sur les cellules. Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 4°C sous agitation. Les débris cellulaires ont été enlevés suite à une centrifugation à 13000 RPM pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines a été transféré dans un nouveau tube eppendorf et conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Les différentes protéines extraites ont été dosées selon une démarche précise. Une courbe standard en duplicata a d'abord été produite à l'aide de 0, 10, 20, 30 et 40 µg de BSA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) sur une plaque 96 puits. 5µL de tampon de lyse a été distribué dans chacun des puits appropriés suivis par 5 µL de chaque échantillon. Les échantillons ont été distribués en duplicata. 25 µL de solution S' (1 µL de solution S pour 50 µL de solution A) (BioRad, Mississauga, ON), provenant de la trousse de BioRad, ont été distribués dans les puits contenant la courbe standard de même que dans les puits contenant les échantillons protéiques à doser. 200 µL de solution B ont été ensuite

distribués dans les mêmes puits, et la plaque 96 puits a été incubée pendant 15 minutes à la température de la pièce. La plaque a été lue par un spectrophotomètre de plaque 96 puits à une longueur d'onde de 490 nm. La quantité de protéines a été calculée à l'aide de la courbe standard obtenue à partir des quantités de BSA en fonction de l'intensité mesurée à 490 nm.

2.7 Induction de la phosphorylation du récepteur à l'IGF-IR

1 million de cellules HeLa ont étéensemencées. Les cellules ont été placées sur glace et nettoyées à deux reprises avec du PBS froid pour permettre de démarrer la stimulation au même moment pour chacune des conditions. 5mL de milieu contenant, soit 100 ng/mL d'IGF recombinant de souris (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN), soit 500 ng/mL d'IGF recombinant de souris, soit 500 ng/mL d'IGF-E5, ont été ajoutés sur les cellules qui ont été, par la suite, incubées pendant 10 minutes à 37°C avant d'être replacées sur glace. Les cellules ont été décollées et lysées avec 100 µL de tampon de lyse (283 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM HEPES pH 7.5, 4 mM EGTA, 0.6% NP-40 contenant 100 µg/mL d'inhibiteur de protéase, de même que 100 mM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) et de 50 mM de fluorure de sodium (NaF)). Les protéines ont été extraites, centrifugées pour éliminer les débris, dosées et, pour terminer, analysées par immunobuvardage.

2.8 Immunobuvardage de type Western

Les protéines extraites ont été diluées dans une solution de Laemmli 6X (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% de Glycérol, 0.1% de bleu de bromophénol) pour obtenir des quantités équivalentes entre chacune des pistes. La concentration finale de Laemmli utilisée était de 1X par échantillon. Les échantillons ont été chargés dans les pistes appropriées sur des gels de polyacrylamide de 10%, 12% ou sur des gradients 4-20% (Invitrogen, Burlington, ON), selon les protéines qui devaient être analysées (table 2). Une électrophorèse à 150 Volts a été effectuée en présence de tampon d'électrophorèse (25 mM de Tris, 200 mM de glycine et 1% SDS) pour séparer les protéines selon leur taille moléculaire. Les protéines contenues dans le gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) à l'aide d'un montage de

Table 2 : Poids moléculaire des différentes protéines et pourcentage d'acrylamides utilisés dans les gels de séparation.

Protéines analysées	Poids moléculaire	Pourcentage d'acrylamide utilisé
	kDa	%
Fibre virale	62	10
EGF-E5-Coil	17	4-20
AFAI-E5-Coil	16	4-20
IGF-E5	17	4-20
EGF-R	150	10
IGF-IR β	95	10
Phospho-IGF-IR	98	10
GFP	27	4-20
CAT-GFP	32	4-20

transfert protéique. Le transfert a été effectué à 4°C pendant 1h30, à un ampérage constant de 275 mA, en présence de tampon de transfert (25 mM de Tris, 750 mM de glycine et 25% d'éthanol). Les sites non spécifiques sur la membrane de nitrocellulose ont été bloqués à l'aide d'une solution de PBS-Tween20 contenant 5% de lait (PBS-T-Lait) pendant 45 minutes. L'anticorps primaire a été dilué à la bonne concentration en suivant les informations énumérées dans la table 3. La membrane a été incubée, soit pendant toute la nuit en présence de l'anticorps primaire, soit pendant 1 heure à la température de la pièce. Suite à l'incubation de l'anticorps primaire, 6 lavages de 5 minutes avec du PBS-Tween ont été effectués. L'anticorps secondaire dilué à la bonne concentration selon les conditions de la table 4 a été ajouté sur la membrane puis incubé pendant 1 heure à la température de la pièce. Après l'incubation de l'anticorps secondaire, 6 autres lavages de 5 minutes à l'aide de PBS-Tween ont été effectués. Les bandes protéiques ont été observées sur la membrane, soit en exposant celle-ci avec un film Kodak (anticorps secondaire couplé à la HRP), soit en excitant le Cy5 couplé à l'anticorps secondaire (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) à l'aide du laser de 633 nm d'un Typhoon trio⁺ (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC).

2.8.1 Coloration des SDS-PAGE par Coomassie Fluor Orange™

Les protéines extraites ont été diluées dans une solution de Laemmli 6X (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% de Glycérol, 0.1% de bleu de bromophénol) pour obtenir des quantités équivalentes entre chacune des pistes. La concentration finale de Laemmli utilisée était de 1X. Tous les échantillons ont été chargés dans les pistes appropriées sur un gel de polyacrylamide de 4-20% (Invitrogen, Burlington, ON) pour analyser l'efficacité des

purifications ou, en même temps qu'une courbe standard de 25 ng à 1000 ng de BSA (Sigma), pour mesurer la quantité de protéines contenues dans nos échantillons. Une électrophorèse de 150 volts constants a été effectuée en présence de tampon d'électrophorèse (25 mM de Tris, 200 mM de glycine et 1% SDS) pour séparer les

Table 3 : Anticorps primaires utilisés dans le cadre des différentes expériences nécessitant leur utilisation.

Anticorps utilisé	Utilisation	Compagnie (clone)	Espèce reconnue	Dilué dans	Dilution
Anticorps primaire					
A-actin	Immunobuvardage	BD Transduction	Souris	Lait 5%	1 :10 000
A-GFP	Immunobuvardage	Sérum	Lapin	Lait 5%	1:250
α -Fiber	Immunobuvardage	Lab vision	Souris	Lait 5%	1:500
	ELISA	Lab vision	Souris	PBS BSA 3%	1:500
α -His-Tag	Immunobuvardage	Qiagen	Souris	Lait 5%	1:250
α -EGF-R	Immunobuvardage	BD Transduction	Lapin	Lait 5%	1:250
α -IGF-IR β	Western blot	Santa Cruz	Lapin	Lait 5%	1:100
	Immunofluorescence	Santa Cruz	Lapin	PBS BSA 1%	1:5
α -phospho-IGF-IR β	Immunobuvardage	Upstate	Souris	Lait 5%	1 :250

Table 4 : Anticorps secondaires utilisés dans le cadre des différentes expériences nécessitant leur utilisation.

Anticorps secondaire				
Anticorps utilisé	Utilisation	Compagnie (clone)	Dilué dans	Dilution
α -souris-Alcaline phosphatase	ELISA	Jackson immunoresearch	PBS BSA 3%	1:1000
α -lapin-HRP	Immunobuvardage	Invitrogen	Lait 5%	1:1000
α -souris-HRP	Immunobuvardage	Invitrogen	Lait 5%	1:3000
α -lapin-Cy5	Immunobuvardage	Invitrogen	Lait 5%	1:1000
α -mouse-Cy5	Immunobuvardage	Invitrogen	Lait 5%	1:5000
α -lapin-Alexa Fluor 488	ImmunoFluorescence	Jackson immunoresearch	PBS BSA 1%	1:2000

protéines selon leur taille moléculaire. Le gel de polyacrylamide a été coloré à l'aide de Coomassie Fluor OrangeTM (Invitrogen, Burlington, ON) pendant une heure, sous agitation, à la température de la pièce. Le gel a été rincé à l'aide d'une solution d'acide acétique à 7.5% pendant 1 minute, avant d'être rincé à nouveau en présence d'eau bidistillée, cette fois pendant 15 minutes. La présence des bandes protéiques a alors été révélée par l'utilisation d'un Thyphoon Trio+ (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC). Les bandes ont pu être analysées à l'aide du logiciel ImageQuant version 5.0 (Molecular dynamic) pour comparer l'intensité entre les différentes pistes.

2.9 Essai de survie cellulaire

Les niveaux de survie des clones exprimant l'IGF-E5 ont été évalués après avoir ensemencé 5×10^5 ou 3×10^6 cellules en suspension dans 25 mL de milieu CD-CHO. Les cellules ont été cultivées pendant une période de 10 jours à 30°C ou 37°C. Le nombre de cellules vivantes et mortes a été quantifié chaque jour par un compte manuel à l'aide d'un hémacytomètre. Les cellules mortes ont été distinguées des cellules vivantes grâce à l'ajout d'érythrosine à la dilution cellulaire. Chacun des échantillons a été centrifugé après le décompte pour éliminer les cellules et les débris cellulaires. Les milieux conditionnés ont été conservés à -20°C pour analyser leur contenu protéique.

2.10 Purification du ligand modifié IGF-E5 par « spin column »

Les cellules 293A ont été transfectées transitoirement avec les plasmides encodant les protéines d'intérêt et incubées pendant 96 heures à 37°C pour produire les protéines. Les milieux conditionnés ont été récoltés. Le milieu de conservation a été enlevé des colonnes TalonTM-Nx metal resin quick-spin (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA) en centrifugeant à 1750 RPM. La résine a été équilibrée avec du tampon phosphate pH 7.4 (78 mM de NaH₂PO₄, 122 mM de Na₂HPO₄ et 300 mM de NaCl) contenant 10 mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). 750 µL des milieux conditionnés ont été chargés sur la colonne, puis incubés pendant 5 minutes, pour permettre l'association de l'IGF-E5 avec la résine. La colonne a été centrifugée à 1750 RPM. Les dernières étapes ont été répétées jusqu'à ce que tout l'échantillon soit passé sur la colonne. La résine a été lavée en ajoutant 750 µL de tampon phosphate pH 7.4 contenant 10 mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), puis centrifugée à 1750 RPM. Un gradient d'imidazole, ayant de 30 mM à 150 mM, a été passé au travers de la colonne et fractionné. Les protéines d'intérêt ont été éluées de la colonne à l'aide d'un tampon phosphate contenant 300 mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Les protéines ont été centrifugées à 3000 RPM, sur des colonnes de concentration Ambion d'une porosité de 3 kDa (Millipore, Billerica, MA), pour éliminer la présence d'imidazole. Les échantillons ont été dosés, soit sur gel d'acrylamide, suite à une coloration au Coomassie Fluor OrangeTM (Invitrogen, Burlington, ON), pour déterminer les niveaux de la protéine d'intérêt, soit par Lowry (BioRad, Mississauga, ON) pour mesurer le niveau de protéine totale dans les échantillons, afin d'analyser l'efficacité des purifications.

2.11 Production du ligand modifié IGF-E5 par colonne d'affinité par gravité

La colonne a été chargée avec 5mL de Fractogel[®] (Merck chemical, Gibbstown, NJ). Par la suite, la résine a été rincée avec 5 volumes de colonne avec du NaCl 0.5 M, avant d'être traitée avec 2 volumes de colonne de chlorure de cobalt à 200 mM (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). La résine a été rincée une fois de plus avec du NaCl 0,5M, puis la colonne a été équilibrée avec du tampon phosphate pH7,4 (78 mM de NaH₂PO₄, 122 mM de Na₂HPO₄ et 300 mM de NaCl) contenant 10mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). 300mM de NaCl ont été ajoutés dans les milieux conditionnés contenant les ligands bispécifiques, puis l'échantillon a été déposé sur la colonne. Une fois que l'échantillon a traversé la colonne par gravité, 10 volumes de colonne de tampon phosphate pH 7,4, contenant 10mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), ont été passés au travers de la colonne pour éliminer les protéines liées de manière non spécifiques. Un gradient d'imidazole de 30 mM à 150 mM a été passé au travers de la colonne et fractionné. Les protéines d'intérêt ont été éluées de la colonne à l'aide d'un tampon phosphate contenant 300 mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Les protéines ont été centrifugées à 3000 RPM sur des colonnes de concentration Ambion (Millipore, Billerica, MA) d'une porosité de 3 kDa pour éliminer la présence d'imidazole. Les échantillons ont été dosés, d'une part, sur gel d'acrylamide après coloration au Coomassie Fluor Orange[™] (Invitrogen, Burlington, ON) pour déterminer les niveaux de la protéine d'intérêt et, d'autre part, par Lowry (BioRad, Mississauga, ON) pour mesurer le niveau de protéine totale dans les échantillons pour analyser l'efficacité des purifications.

2.12 Purification du ligand modifié IGF-E5 à grande échelle

Le clone stable CHO-IGF-E5 clone L a été cultivé pour atteindre sa phase de croissance exponentielle. Les cellules ont alors étéensemencées à une densité de 3 millions de cellules par mL dans un volume de 500 mL de milieu CD-CHO (Gilco, Invitrogen, Burlington, ON) contenant 2 mM de glutamine et 50 µg/mL de sulfate de dextran (Amersham Pharmacia biotech, Uppsala, Suède). Les cellules ont été cultivées pendant 9 jours à 30°C pour favoriser la production des protéines d'intérêt. Le milieu de culture a été centrifugé pour enlever les débris cellulaires et conservé à -20°C. La purification des échantillons a été faite sur une colonne de fractogel associé à un système automatisé de pompe ÄKTA (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC). Une portion de l'extrait a été conservée pour permettre l'analyse du rendement de la production de même que le taux de récupération de la méthode. Les solutions ont été méticuleusement préparées de manière à ce qu'elles soient exemptes d'endotoxines, c'est-à-dire en utilisant de l'eau traitée via des filtres destinés à capter les endotoxines et passée aux UV. Il faut préciser que les poudres servant à faire les solutions sont réservées exclusivement à cette fin. De plus, les récipients de verre utilisés pour faire les solutions ont été traités pendant 24 heures avec du NaOH 0.5 M pour détruire les endotoxines, avant d'être rincés à plusieurs reprises avec de l'eau sans endotoxine. La colonne a été chargée avec 10 mL de Fractogel[®] (Merck Chemical, Gibbstown, NJ) avant d'immobiliser du cobalt à la résine en faisant passer une solution de 200 mM de chlorure de cobalt (sigma). La résine a, par la suite, été rincée par un lavage avec 10 volumes de NaCl 0.5 M. Avant de charger la colonne avec la solution contenant la protéine d'intérêt, du NaCl a été mélangé avec le milieu conditionné à une concentration

finale de 300 mM pour favoriser les interactions électrostatiques spécifiques des protéines d'intérêt avec la résine chargée. La solution contenant les protéines qui n'ont pas été fixées à la résine a été conservée pour être analysée sur gel. En outre, la résine a été lavée avec 10 volumes de colonne de tampon phosphate pH 7.4 (78 mM de NaH_2PO_4 , 122 mM de Na_2HPO_4 et 300 mM de NaCl) contenant 10 mM d'imidazole (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). La protéine d'intérêt a été éluée en présence de 300 mM d'imidazole et fractionnée en volume de 1 mL. Les différentes fractions ont été déposées sur gel, colorées au Coomassie Fluor OrangeTM (Invitrogen, Burlington, ON) et les fractions qui étaient positives ont été combinées. Le mélange des différentes fractions a alors été passé sur une colonne de concentration d'une porosité de 3 kDa (Ambion, Millipore, Billerica, MA), traitée au NaOH 0.5 M, pour éliminer l'imidazole. La protéine d'intérêt a été dosée par coloration au Coomassie Fluor OrangeTM (Invitrogen, Burlington, ON). En plus d'analyser la quantité totale de protéines avec un essai de Lowry (BioRad, Mississauga, ON), les niveaux d'endotoxines ont aussi été évalués.

2.13 Dosage des niveaux d'endotoxines

Pour mesurer les niveaux d'endotoxines, nous avons eu recours à la trousse d'endochromeK (Charles River, Wilmington, MA). Sur une plaque 96 puits, 100 μL de chaque point de la courbe standard (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 et 1U d'endotoxine) ont été distribués en duplicata. Les échantillons ont été dilués avec de l'eau exempte d'endotoxines fournie par la trousse, puis 100 μL de chacun des échantillons ont été ajoutés dans deux séries de puits. L'une a servi à mesurer les niveaux d'endotoxines, l'autre à déterminer

l'influence de la composition de la solution sur l'efficacité de la réaction enzymatique nommée le « pic ». L'enzyme provenant du lysat de *Limulus* amebocyte (LAL) a été ajoutée dans chacun des puits. La réaction enzymatique a été suivie par colorimétrie à une longueur d'onde de 405nm sur une période d'une heure, à l'aide d'un SpectraFluor Plus (Tecan, San Jose, CA). Les niveaux d'endotoxines ont été évalués en traçant une régression linéaire à l'aide des valeurs analysées par le logiciel Magellan v6.5 (Tecan, Durham, NC). Les valeurs d'endotoxines obtenues ont été considérées comme satisfaisantes lorsque la valeur du pic était dans un ordre de grandeur entre 50% et 200% de la valeur calculée.

2.14 Essai ELISA modifié

Les plaques 96 puits pour ELISA ont été initialement recouvertes par 50 ng de l'un des ligands modifiés avec lesquels l'interaction devait être analysée. Les protéines ont été diluées dans du tampon carbonate 1X pH 9.6 (16 mM de Na_2CO_3 et 34 mM de NaHCO_3) pour favoriser l'absorption par le plastique, puis incubées 24 heures à 4°C. Les interactions non spécifiques ont été bloquées à l'aide de BSA 1% pendant 45 minutes à 37°C. Les extraits protéiques contenant la protéine complémentaire au système (fibre virale K3-Coil, K4-Coil ou K5-Coil) ont été ajoutés à une concentration finale de 300 ng/ μL dilués dans du PBS-BSA 1% et distribués dans les puits appropriés. Les plaques ont été incubées pendant 2 heures à 37°C pour permettre l'interaction entre les deux partenaires. Les puits ont été nettoyés à deux reprises avec du PBS-Tween 0.1% et, à deux autres reprises, avec du PBS 1X seulement. L'anticorps primaire contre la fibre virale a suivi trois étapes : tout d'abord, il a été dilué 1:500 dans du PBS-BSA 1% (voir table 3); puis, il a été ajouté dans les puits

appropriés; enfin, il a été incubé pendant 1 heure à 37°C. Comme précédemment, les puits ont été nettoyés à deux reprises avec du PBS-Tween 0.1% et, encore à deux reprises, avec du PBS seulement. L'anticorps secondaire, couplé à l'alcaline phosphatase, a également été dilué 1:3000 (voir table 4) dans du PBS-BSA 1% et ajouté dans les puits appropriés, avant d'être incubé pendant 1 heure à 37°C. 50 µL de p-nitrophenyl phosphate (PNPP) a été ajouté dans chacun des puits et l'intensité de la réaction a été mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque 96 puits, après une incubation de 15 minutes.

2.15 Amplification, préparation et purification des différents virus

2.15.1 Amplification des différents virus

Les cellules ont été amplifiées sur des pétris de 15 cm, jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire de 10 millions de cellules, ou d'une densité de 1 million de cellules par mL lorsqu'elles ont été cultivées en suspension.

Le milieu de culture a été aspiré dans les essais en adhésion et 3 mL contenant le virus, à une multiplicité d'infection (MOI) de 3, ont été ajoutés à la monocouche. Les pétris ont été incubés pendant 4 heures à 37°C avec agitation et le volume a été complété à 25 mL avec du milieu contenant 5% FBS et 2 mM de glutamine. Pour les cellules en suspension, les cellules ont été diluées à une densité de 1 million de cellules par mL et infectées avec une MOI de 5. Les cellules ont été incubées pendant 48 heures pour l'amplification des

virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5CBLacZ Fibre sauvage. Pour les virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m, Ad5GFP Fibre HIK5 Wt et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm, les cellules ont été incubées pendant 72 heures. Les cellules ont été par la suite récoltées, dénombrées à l'aide d'un hémacytomètre, culottées à 1000 RPM, puis resuspendues dans un volume de 20 mL de LC-SFM sans rouge de phénol (Tom, 2007). Trois cycles de gel et dégel ont été effectués sur les cellules pour relâcher les particules virales. Les extraits ont été ensuite centrifugés à 3000 RPM pendant 30 minutes pour éliminer tous les débris cellulaires et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. L'extrait a été de nouveau centrifugé à 3000 RPM puis le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et conservé à -80°C jusqu'à la purification. Deux aliquots de 500 μL ont été conservés pour permettre l'analyse du contenu en particules totales et en particules infectieuses.

2.15.2 Purification des différents virus

Pour une purification par chlorure de césium (CsCl), le surnageant a été transféré sur un gradient discontinu de CsCl (Massie et al., 1998b). Le gradient discontinu a été produit en déposant 6 mL de CsCl filtré ayant une densité de 1.4 dans le fond d'un tube de polycarbonate de 39 mL (Beckman, Mississauga, ON). 8 mL de CsCl d'une densité de 1.2 ont été ajoutés délicatement sur la solution de 1.4, de manière à pouvoir observer la formation d'une seconde interface. La solution contenant les particules a été transférée par la suite avec délicatesse pour permettre la formation d'une troisième interface. Les tubes ont été transférés dans des godets en titane (Beckman, Mississauga, ON), équilibrés, puis ultracentrifugés en appliquant une force de 100 000Xg pendant 1h30, à l'aide d'une

ultracentrifugeuse (Optima Ultracentrifuge, Beckman, Mississauga, ON). 12 mL de la phase supérieure ont été aspirés, avant que la bande inférieure contenant les particules virales matures n'ait été prélevée à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 20G1/2. La fraction a été diluée pour avoir un volume final de 10 mL. Un gradient continu a été formé lors de la centrifugation, en utilisant un système permettant leur formation (BioRad, Mississauga, ON). Les dilutions ont été déposées sur le gradient continu, équilibrées et ultracentrifugées avec une force de 100 000Xg, durant 18 heures. 12 mL de la phase supérieure ont été aspirés et la bande inférieure a été prélevée à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 20G1/2. La bande a été passée sur une colonne de dessalage NAP-25 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC), équilibrée avec un tampon de congélation (20 mM de Tris pH 8.0, 25 mM de NaCl et 2.5% de glycérol), fractionnée, et enfin conservée à -80°C.

Pour effectuer une purification à l'aide de l'iodixanol (Optiprep[®], Axis Shield, Norton, MA) (Peng et al., 2006), des tubes de 39 mL à embout étroit (Beckman, Mississauga, ON) ont été utilisés. 20 mL de la solution virale ont été déposés dans le fond du tube, puis 5 mL des différentes concentrations d'iodixanol ont été ajoutés en commençant par la moins concentrée (15% >25% >40% >54%). Les tubes ont été équilibrés, scellés, puis centrifugés en appliquant une force de 300 000Xg pendant 1h30 sur une ultracentrifugeuse (Optima Ultracentrifuge, Beckman, Mississauga, ON). La bande inférieure, contenant les particules virales matures et qui se trouve à l'interface entre les concentrations de 25% et de 40% d'iodixanol, a été récoltée à l'aide d'une seringue de 5 mL munie d'une aiguille 20G1/2. Les virus ont été conservés à -80°C, ou encore dialysés en suivant l'un des protocoles subséquents.

2.15.3 Élimination de l'iodixanol

2.15.3.1 Utilisation de sac à dialyse

Le virus a été transféré dans un sac à dialyse dont la membrane possède une porosité de 100 kDa. Le sac à dialyse a été traité pendant 10 minutes dans une solution de 2% bicarbonate de sodium et 1mM d'EDTA pH 8.0, puis rincé avec de l'eau bidistillée à deux reprises. Les sacs à dialyse immergés dans de l'eau bidistillée ont été stérilisés pendant 30 minutes par autoclave en utilisant un cycle pour liquide, tandis que les autres instruments ont été décontaminés dans l'éthanol 70%. Le virus a été dialysé une première fois pendant 1 heure à 4°C contre un tampon de dialyse (50 mM d'HEPES, 2 mM de MgCl₂, 150 mM de NaCl et 5% de sucrose). Ensuite, le virus a été récupéré et transféré dans un nouveau sac de dialyse pour être dialysé une seconde fois dans les mêmes conditions, pour une période de 24 heures. Après cela, le virus a été récolté du sac de dialyse et fractionné en portions de 100 µL, lesquelles ont été conservées à -80°C. En dernier lieu, les virus ont été dosés par HPLC (Klyushnichenko et al., 2001) pour obtenir la quantité totale de particules, et par cytométrie de flux pour déterminer le nombre de particules infectieuses (Cote et al., 1997).

2.15.3.2 Utilisation de colonne d'échange d'anion DEAE

Les différentes solutions ont été passées dans la colonne à l'aide d'une seringue de 10 mL (Millipore, Billerica, MA) rincée avec du PBS stérile entre chaque étape. La colonne

d'échange d'anion possédant 1 mL de résine a été au préalable équilibrée avec 10 volumes de tampon de congélation (50 mM d'HEPES, 2 mM de MgCl₂, 150 mM de NaCl et 5% de sucrose). L'application sur la colonne de l'échantillon contenant les particules virales s'est faite à l'aide d'une seringue de 5 mL. L'iodixanol (Optiprep[®], Axis Shield, Norton, MA) a alors été éliminé de l'échantillon en passant 20 volumes de colonne de tampon de congélation sur la résine. Les virus ont été dissociés de la résine en ajoutant 300 mM de NaCl à la solution de congélation décrite plus haut. Tout comme l'élution, les différentes fractions recueillies après le chargement et le lavage de la résine ont été évaluées pour mesurer la présence potentielle de particules totales et infectieuses, de même que pour déterminer la concentration d'iodixanol (Optiprep[®], Axis Shield, Norton, MA).

2.15.3.3 Utilisation de colonne de concentration

Les colonnes de concentration (Millipore, Billerica, MA) avec une membrane ayant une porosité de 100 kDa ont été traitées avec 750 µL d'éthanol 70% pour éliminer les contaminations. Les colonnes ont ensuite été rincées avec quatre volumes de 750 µL de tampon de congélation pour éliminer les traces d'éthanol. Les échantillons contenant les particules virales ont été appliqués sur les colonnes traitées puis centrifugées avec une force centrifuge équivalente de 2000 X g pendant 10 minutes. Cette étape a été effectuée à quatre autres reprises en prenant soin de conserver chacune des fractions. Les particules virales ont été récupérées dans la colonne en ajoutant suffisamment de tampon de congélation pour avoir un volume final de 100 µL. Les virus purifiés sur la colonne ont été évalués pour la présence d'iodixanol, ainsi que pour le nombre de particules totales et

infectieuses. Les particules virales ont aussi été évaluées dans les différentes fractions passées au travers de la colonne de concentration.

2.15.4 Évaluation du nombre de particules totales

2.15.4.1 Dosage par spectrométrie

Pour déterminer le nombre de particules totales contenu dans les préparations virales, le virus a été dilué dans du tampon de lyse (0.1% SDS, 10mM de Tris pH 7.4 et 1mM d'EDTA). Les virus ont été incubés pendant 30 minutes à 56°C de manière à dissocier complètement toutes les particules virales. Un blanc a été effectué sur le spectrophotomètre (Biospectrometer, Eppendorf, Mississauga, ON) à l'aide de la solution de lyse et du tampon de congélation. Chacun des échantillons a été mesuré à 260 nm, à 280 nm et à 320 nm. Précisons que la densité optique à 260 nm est obtenue grâce à la présence de l'ADN viral et que, lorsque la valeur à 260 nm est multipliée par 1.1×10^{12} et par le facteur de dilution, on obtient la concentration en particule totale par mL. Le ratio permet d'assurer qu'il s'agit de particules virales lorsque la valeur est de 1.2.

2.15.4.2 Dosage par HPLC

La méthode choisie ici a respecté le protocole du groupe de Klyushnichenko (Klyushnichenko et al., 2001). Brièvement, 500 µL d'extrait viral, dilué ou non, ont été

centrifugés pendant 2 minutes en exerçant une force de 4600 X g. Le surnageant a été filtré à l'aide d'une unité de filtration de 22 µm fixée à une seringue de 1 mL. 300 µL de la solution virale filtrée ont été transférés dans un tube pour HPLC et disposés dans un carrousel pour permettre au système automatisé d'effectuer les injections (WISP™ automatic sample injection system, Millipore, Billerica, MA). Une portion entre 25 µL et 200 µL a été cueillie par l'appareil, passée sur une colonne Uno-Q (BL) (BioRad, Mississauga, ON) et analysée suite à l'élution des particules virales, avec une solution de NaCl ayant une concentration finale de 300 mM. La quantité de particules virales a été déterminée par l'évaluation de l'aire sous la courbe des pics obtenus par l'absorbance des particules à 260 nm et 280 nm. Le protocole Emp UNOQ_Ad5_140910ext a été utilisé pour l'acquisition des valeurs et pour l'analyse des profils obtenus à l'aide des densités optiques mesurée à 260 nm et 280 nm.

2.15.5 Titration des particules virales infectieuses

2.15.5.1 Titration des particules virales infectieuses par cytométrie de flux

24 heures avant l'infection des 293E (EGF-R/E5.Coil), celles-ci ont été ensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de 500 000 cellules par puits. La journée de l'infection, le nombre de cellules dans chacun des puits a été mesuré par un

décompte manuel à l'aide d'un hémacytomètre. Les dilutions virales ont été effectuées en suivant celles présentées dans le tableau 5 en fonction de la concentration assumée

Table 5 : Dilution à effectuer pour déterminer le nombre de particules virales infectieuses contenues dans les préparations virales.

Concentration attendue	Dilutions utilisées					
$\sim 1 \times 10^{10}$	4×10^{-7}	1×10^{-6}	3.7×10^{-6}	1×10^{-5}	3.3×10^{-5}	1×10^{-4}
$\sim 1 \times 10^9$	1×10^{-5}	4×10^{-5}	1×10^{-4}	3.7×10^{-4}	1×10^{-3}	3.3×10^{-3}
$\sim 1 \times 10^8$	4×10^{-5}	1×10^{-4}	3.7×10^{-4}	1×10^{-3}	3.3×10^{-3}	1×10^{-2}

lors des productions précédentes. 1 mL des dilutions a été distribué dans les puits appropriés et incubé pendant 36 heures sous agitation à 37°C. Les cellules ont été récoltées et centrifugées à 1000 RPM pendant 5 minutes pour culotter la totalité des cellules. Les cellules ont, par ailleurs, été resuspendues dans 500 µL de Trypsine-EDTA (Thermo scientist, Rockford, IL), puis fixées avec 500 µL de paraformaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Le pourcentage de cellules positives pour la GFP a été évalué par cytométrie de flux. Le nombre exact de cellules, ajusté par la dilution virale en fonction du nombre de cellules positives pour la GFP, permet de calculer la concentration en particule virale infectieuse à l'aide d'une régression linéaire. La pente de la droite représente le nombre de particules infectieuses par mL (Cote et al., 1997).

2.15.5.2 Titration des particules virales infectieuses par TCID50

Une plaque 96 puits a étéensemencée avec 5000 293E par puits pour chacun des virus qui devait être évalué. Les deux premières colonnes de puits ont été utilisées comme

contrôle pour suivre la survie des cellules dans le temps. Les 10 autres colonnes ont servi à effectuer des dilutions 1:10 pour avoir des concentrations allant de 10^{-2} à 10^{-10} particules par puits. Les plaques ont été incubées pendant 7 jours à 37°C. Puis, tous les puits contenant des cellules cytopathiques ou des tapis cellulaires ont été dénombrés. Les plaques ont été exposées à trois cycles de gels et dégel. Le milieu de culture a été transféré dans une nouvelle série de plaques 96 puits contenant 5000 293E par puits pour s'assurer que les effets observés étaient causés par l'infection des cellules et non par la mort prématurée des cellules.

2.15.6 Mesure des particules adénovirales répliquatives compétentes

(RCA)

Les 293 possèdent la séquence de la région E1 de l'adénovirus dans leur génome. Cette séquence peut, s'il y a des régions d'homologie dans le génome viral amplifié, occasionner une recombinaison homologue et remplacer la séquence retrouvée entre les régions d'homologie. Généralement, la cassette d'expression est insérée dans la région E1 manquante et, lors de la formation de RCA, la cassette d'expression est remplacée par la région E1 formant ainsi des particules virales qui ont la capacité de se répliquer sans nécessiter la présence d'éléments de complémentations (Lochmuller et al., 1994). Pour mesurer la quantité de RCA contenus dans une préparation de virus, des cellules qui n'encodent pas la région E1 sont utilisées, comme les A549. Ce type de cellules permet aux RCA de se propager tandis que les particules virales répliquatives déficientes ne peuvent pas se répliquer. Pour mesurer les RCA, 5×10^5 d'A549 ont étéensemencées dans des plaques

de 6 puits. Les cellules ont été infectées avec 1mL de milieu contenant différentes dilutions virales entre 10^{-2} et 10^{-6} . Elles ont, en outre, été incubées pendant 4 heures avec agitation avant d'être recouverte par 3 mL de milieu de culture DMEM 10%FBS contenant 1% d'agarose. Une incubation de ces cellules pendant 3 semaines a permis la formation de plaque de lyse. Le nombre de plages a été dénombré dans le puits qui contenait entre 10 et 50 plages. La quantité de plages a été divisée par le facteur de dilution pour donner le nombre de particules répliquatives compétentes ayant acquises la région E1 de l'adénovirus retrouvé dans la suspension virale (Schalk et al., 2007).

2.16 Évaluation du changement de tropisme

24 heures avant l'infection, la quantité de cellules indiquée par le tableau 6 a étéensemencée dans des plaques de 6 puits. La journée de l'infection, les cellules ont été dénombrées de manière à obtenir une MOI précise. Les complexes ont été préparés en distribuant en premier lieu le milieu de culture contenant du FBS dans les puits appropriés d'une plaque de 96 puits. Ensuite, selon l'expérience, différents virus Ad5TR5GFP Fibre K4m, l'Ad5GFP Fibre sauvage, l'Ad5GFP HIK5 Wt, ou l'Ad5GFP HIK5 Dm ont été distribués de manière à obtenir les MOI désirées dans chacun des puits. Par la suite, un ou plusieurs des peptides bispécifiques comprenant l'AFAI-E5-Coil, l'EGF-E5-Coil ou l'IGF-E5, ou encore des peptides recombinants tels l'IGF-I de souris (R&D systems Inc., Minneapolis, MN) et l'EGF humain (Calbiochem, San Diego, CA), ont été ajoutés dans les puits appropriés à la quantité requise pour l'expérience. Les complexes ont été incubés pendant 2 heures à 37°C avant d'être ajoutés aux cellules. Le milieu dans les plaques de 6

puits a été aspiré, puis 1 mL de milieu frais a été distribué dans chacun des puits avant d'inclure les complexes virus:ligands. Le nombre de particules totales a été pris en considération pour s'assurer que toutes les particules virales soient associées avec la même quantité de ligands.

L'analyse des différentes expériences a été effectuée en plusieurs étapes. Pour commencer, les cellules ont été préparées en les décollant à l'aide de 800 μ L de Trypsine-EDTA (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Une fois mélangées et transférées dans des tubes eppendorf propres, elles ont été fixées en utilisant du formaldéhyde à une concentration finale de 2% (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), pour ensuite être filtrées sur une mesh de 0.4 μ m. Les cellules ont finalement été analysées par cytométrie de flux à l'aide d'un FC500 MPL (Beckman Coulter, Mississauga, ON) pour déterminer les niveaux d'expression de la GFP dans les cellules concernées.

Table 6 : Nombre de cellulesensemencéepar type cellulaire.

Type cellulaire utilisé	Nombre de cellules
	Cellules/puits
A549	50 000
U87MG	80 000
U87MG-Wt	80 000
H59	60 000
TOV112D	50 000
OV90	50 000
C2C12	15 000

2.17 Différentiation des myoblastes et utilisation des myotubes

50 000 C2C12 à bas passage (myoblaste de souris) ont étéensemencés dans des plaques de 24 puits. Les cellules ont été cultivées 16 heures à 37°C pour permettre leur adhésion. Le milieu de culture a été ensuite aspiré et remplacé par 1 mL de milieu de culture DMEM, contenant 2% de sérum équin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) et 2 mM de glutamine. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 5 à 6 jours jusqu'à l'obtention de myotubes.

La préparation des complexes virus:ligand a été effectuée en suivant le protocole décrit à la section 2.16. Pour rappel, les myotubes ont été infectées avec la MOI appropriée en présence ou en absence d'IGF-E5 selon le type d'expérience. Pour éviter la mort des myotubes, ces derniers ont été incubés avec le virus pendant une période de 48 heures. Les myotubes ont ensuite été pris en photo à l'aide d'un microscope (Leica microsystem Inc., Buffalo Grove, IL) associé à une caméra (Retiga 2000R, QImaging, Surrey, BC) pour montrer l'expression de la GFP. Afin de quantifier la différence entre les conditions distinctes, les myotubes ont été lysés pour isoler les protéines. Enfin, l'expression de la GFP a été évaluée en effectuant un immunobuvardage de type Western avec 30 µg provenant des différentes extractions protéiques.

2.18 Injections dans les animaux et traitement des muscles pour analyse

2×10^{10} particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre Sauvage ou du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été diluées dans du tampon de congélation (50 mM d'HEPES, 2mM de $MgCl_2$, 150mM de NaCl et 5% de sucrose). Les virus ont été injectés dans les tibialis antérieures (TA) de souris MDX (Jackson Labs C57BL/10ScSn-mdx/J). 16 souris de 10 jours ont été injectées avec 10 μ L de virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm, associé ou non à de l'IGF-E5. Également, deux cohortes, dont l'une de 6 souris de 9 jours et l'autre de 7 souris de 11 jours, ont été injectées avec 10 μ L du virus Ad5GFP Fibre sauvage, ici encore avec ou sans la présence de l'IGF-E5. Les souris ont été anesthésiées avant d'être injectées à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de taille 29G1/2. Les muscles droits ont été injectés avec le virus en absence d'IGF-E5 tandis que les muscles gauches ont été injectés avec le virus associé à l'IGF-E5. Les souris ont été gardées pendant 10 jours avant d'être sacrifiées par dislocation cervicale après avoir été euthanasiées par CO_2 . 15 souris injectées avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été sacrifiées en plus de 12 souris qui ont été injectées avec le virus Ad5GFP Fibre sauvage. Les deux TA ont été retirés et congelés dans de l'isopentane refroidi à l'aide d'azote liquide. Les blocs congelés de muscles ont été tranchés en section de 0.5 μ m, lesquelles ont été utilisées pour évaluer les niveaux d'expression de la protéine fluorescente verte (GFP), soit par immunobuvardage de type Western, soit par immunofluorescence indirecte sur lame, et pour déterminer la présence de particules infectieuses par PCR en temps réel.

2.19 PCR quantitatif en temps réel

Les ADN viraux ont été extraits en traitant les sections de souris dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 10 mM d'EDTA, 5 mM de MgCl₂, 0.6% SDS et 20 µg/mL de Protéinase K). Les tissus ont été incubés toute la nuit à 56°C. Les protéines de même que les composantes de la membrane ont été éliminées de la solution par une extraction phénol:chloroforme. Pour ce faire, l'ADN viral a été mélangé avec un volume d'une solution contenant un ratio de 25 parties de phénol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), de 24 parties de chloroforme et d'une partie d'alcool isoamyle. L'ADN et le phénol ont été mélangés vigoureusement puis séparés par centrifugation à 13000 RPM de 10 minutes à 4°C. Cette étape a été effectuée une seconde fois sur la phase supérieure (portion aqueuse contenant l'ADN) avant d'être nettoyée par deux lavages avec une solution de 24 parties de chloroforme et d'une partie d'alcool isoamyle. L'ADN contenu dans les échantillons a été précipité en ajoutant de l'acétate d'ammonium 3M à un ratio final de 1:10 avec 2.5 volumes d'éthanol 100% froid. L'ADN a été incubé pendant 30 minutes à -80°C avant d'être précipité par centrifugation à 13000 RPM pendant 30 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot a été nettoyé avec 750 µL d'éthanol 70%. Le culot a été centrifugé à nouveau à 13000 RPM pendant 5 minutes puis l'éthanol a été enlevé des tubes. L'ADN a été dissout dans 50 µL d'eau bidistillée, puis dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (Biospectrometer, Eppendorf, Mississauga, ON).

Pour effectuer le PCR en temps réel, des capillaires de 20 µL ont été utilisés. 40 ng d'ADN provenant des extractions de muscles ont été utilisé pour les différentes

réactions. 4 amorces, dont deux contre une portion dans la région E4 (5'-AGCGCGCGAA TAAACTGCT-3' et 5'-AGGAGACCACTGCCATGTTGT-3') de l'adénovirus (Coughlan et al., 2009) et deux amorces contre la séquence de l'adipsine de souris (5'-GCCAAGCAG TGCACAGATAA-3' et 5'-TTCCTTTCTGGTGTGTGAAGC -3') (Deol et al., 2007), ont été utilisées. Le mélange pour l'amplification de la séquence virale contient des concentrations finales de 2.5 mM de MgCl₂ de même que des concentrations finales de 5 nM pour chaque amorce. Les concentrations finales dans les solutions utilisées pour amplifier l'adipsine étaient de 2 mM de MgCl₂ et 50 nM pour les amorces. La polymérase, l'agent intercalant (SYBR green) et les dNTPs provenaient d'une trousse FastStart SYBR Green Master (Roche, Laval, QC). L'amplification des séquences a été effectuée dans un LightCycler® (Roche, Laval, QC) en effectuant 45 cycles comprenant une dénaturation de l'ADN de 10 secondes, un rapprochement des amorces de 15 secondes et une élongation de 15 secondes. La lecture de l'intensité a été prise après chacune des étapes d'élongation. Le logiciel du PCR a permis de déterminer le point d'inflexion de chacune des courbes, appelé « Cp ». Le « Cp » du contrôle interne a été combiné aux valeurs d'une courbe standard d'ADN et aux valeurs des différents échantillons pour déterminer la quantité de particules virales infectieuses retrouvées dans les muscles de souris.

2.20 Immunofluorescences indirectes sur lames

2.20.1 Expression du récepteur à l'IGF-I sur coupes de muscles de souris

Les cryosections de muscles de souris ont été déposées sur des lamelles de verre, et fixées pendant 10 minutes dans une solution de 2% de paraformaldéhyde. Les interactions non spécifiques ont été bloquées par l'utilisation d'une solution de PBS-BSA 3%. L'anticorps primaire contre le récepteur à l'IGF-I a été dilué 1:5 dans du PBS-BSA 3% et incubé pendant une heure. Les lames ont été rincées à 3 reprises dans du PBS avant d'ajouter le deuxième anticorps. L'anticorps secondaire marqué par l'ALEXA Fluor[®] 488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a été dilué 1 dans 2000 dans du PBS-BSA 3% puis incubé pendant 45 minutes. Les lames ont été lavées à trois reprises avant d'être scellées en présence de tampon de fixation. La fluorescence a été analysée à 488 nm pour l'ALEXA Fluor[®] 488 et à 532nm pour le Hoesch33342 (Invitrogen, Burlington, ON), et ce, à différentes magnitudes, sur un microscope confocale (Olympus corporation, Leek Crescent Richmond Hill, ON), en utilisant le logiciel Fluoview version 2.0 (Olympus corporation, Leek Crescent Richmond Hill, ON).

2.20.2 Expression de la GFP sur coupes de muscles de souris

Les cryosections de muscles de souris ont été déposées sur des lamelles de verre. Les sections ont été fixées pendant 10 minutes dans une solution de 2% de

paraformaldéhyde. Les interactions non spécifiques ont été bloquées par l'utilisation d'une solution de PBS-BSA 3%. L'anticorps primaire contre la GFP a été dilué 1:100 dans du PBS-BSA 3% et incubé pendant une heure. Les lames ont été rincées à 3 reprises dans du PBS avant d'ajouter le second anticorps. L'anticorps secondaire marqué par l'ALEXA Fluor[®] 488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a été dilué 1 dans 2000 dans du PBS-BSA 3% puis incubé pendant 45 minutes sur les lames. Les lames ont été lavées à trois reprises avant d'être scellées en présence de tampon de fixation. La fluorescence a été analysée à 488 nm pour l'ALEXA Fluor[®] 488 à différentes magnitudes sur un microscope confocale (Olympus corporation, Leek Crescent Richmond Hill, ON) en utilisant le logiciel Fluoview version 2.0 (Olympus corporation, Leek Crescent Richmond Hill, ON).

Section 3 :

Résultats

3 Résultats

Nous avons émis l'hypothèse que l'insertion d'un domaine d'interaction protéique synthétique dans la fibre virale pourrait induire un changement de tropisme en utilisant des ligands bispécifiques. La figure 9 représente schématiquement l'approche que nous voulions utiliser pour modifier le tropisme des particules adénovirales. Les modifications qui ont été apportées à la fibre virale devaient permettre, en premier lieu, de réduire l'interaction avec le CAR et, en second lieu, de favoriser l'interaction avec les différents ligands bispécifiques. La formation du complexe virus:ligand devait diriger l'interaction des particules virales vers les récepteurs d'intérêt qui

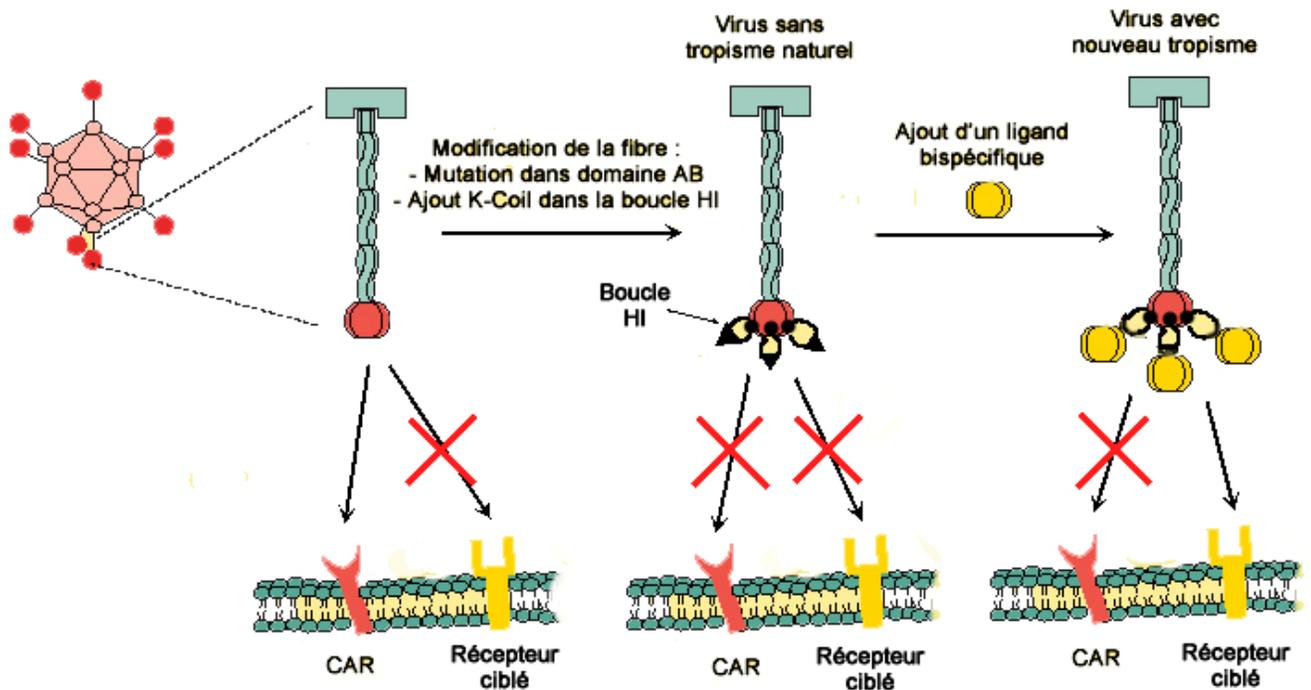


Figure 9 : Représentation du changement de tropisme induit par l'utilisation de ligands bispécifiques.

peuvent être exprimés au travers de plusieurs types cellulaires. Les objectifs initiaux étaient donc d'insérer les domaines d'interaction dans la fibre virale et dans les différents ligands avant de valider la capacité à lier les récepteurs avec leur partenaire d'interaction. Les AdVs doivent par la suite être produits et purifiés. La capacité de nos trois ligands à induire un changement de tropisme a été évaluée dans différentes lignées cellulaires tumorales. Pour démontrer que le système pouvait être utilisé dans le cas de différentes maladies, les ligands bispécifiques ont été testés dans des contextes tumoraux en utilisant des lignées cellulaires cancéreuses en plus de valider la possibilité d'accroître l'infectivité des AdVs chez les muscles de souris.

3.1 Production des ligands bispécifiques modifiés

Le système d'interaction K-Coil et E-Coil peut montrer une certaine flexibilité car il peut être inséré dans différents types de protéines. Pour démontrer ce potentiel, plusieurs peptides bispécifiques différents, dont l'IGF-E5, l'EGF-E5-Coil et l'AFAI-E5-Coil, ont été construits. L'IGF-E5 (Figure 10A) devrait interagir avec le récepteur de l'IGF-I et, de ce fait, accroître l'infectivité dans les H59 qui expriment l'IGF-IR (Samani et al., 2001) ou bien dans les tissus musculaires (Palsgaard et al., 2009). La capacité de lier le récepteur à l'EGF de l'EGF-E5-Coil humain (Figure 10B) a été démontrée par le groupe du Dr O'Connor (Le et al., 2009). Les récepteurs à l'EGF et à l'IGF-I sont surexprimés dans plusieurs types tumoraux (Fujiuchi et al., 1997;Tanno et al., 2006;Reinmuth et al., 2002;Ohgaki and Kleihues, 2007) et pourraient augmenter l'efficacité de transduction dans les glioblastomes ou dans les tumeurs pulmonaires. Finalement, l'AFAI-E5-Coil est un

anticorps à un seul domaine variable lié par une séquence flexible qui peut lier le récepteur CEA6, sur-exprimé sur plusieurs types de cellules tumorales comme les tumeurs pulmonaires (Zhang et al., 2004) (Figure 10C). L'utilisation de différentes structures, notamment des facteurs de croissance (IGF-I, EGF) ou des anticorps spécifiques,

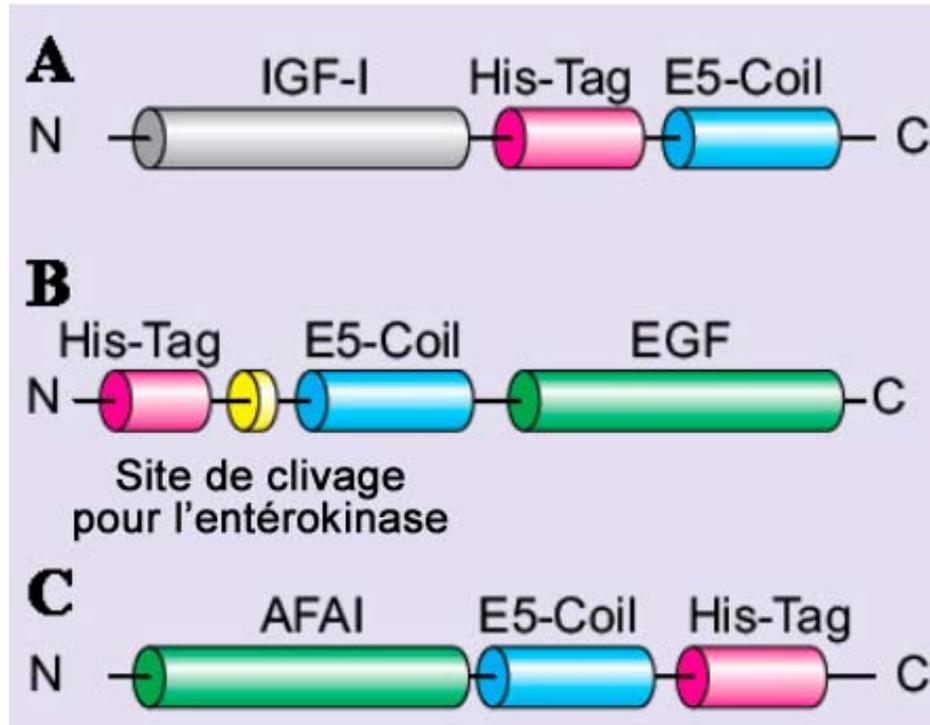


Figure 10 : Représentation schématique des différents ligands qui ont été évalués pour leur capacité à altérer le tropisme de particules virales.

Schéma des différents ligands bispécifiques, dont (A) l'IGF-E5, générés en fusionnant 5 répétitions du E-Coil et un domaine His-Tag à l'IGF-I. (B) L'EGF-E5-Coil a été généré en fusionnant, en N-terminal, 5 répétitions du E-Coil et un domaine His-Tag au facteur de croissance EGF humain. Le His-Tag est séparé du domaine E5-Coil par un site de clivage pour l'entérokinase. (C) L'AFAI-E5-Coil a été produit en ajoutant le domaine E5-Coil et His-Tag en C-terminal. Les différents peptides ont été construits, produits, caractérisés puis utilisés pour induire un changement de tropisme à partir de différents virus.

tel l'anticorps à un seul domaine, pourrait permettre de cibler différemment les récepteurs cellulaires. De plus, l'utilisation d'anticorps à un seul domaine pourrait être avantageux vu

qu'il pourrait cibler des récepteurs moins bien caractérisés ou remplacer des ligands naturels difficiles à produire avec les systèmes de productions cellulaires actuels.

3.1.1 Construction et vérification des séquences encodant l'IGF-E5

Il y a une forte homologie entre la séquence de l'humain et celle de la souris (94%) (Humbel, 1990). Ainsi, l'IGF-I de souris peut interagir avec le récepteur de différentes espèces, y compris l'humain. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser la séquence de l'IGF-I de souris. De plus, plusieurs des modèles étudiés ont été évalués avec des cellules murines, que ce soit les H59 ou les myoblastes de souris. Une portion de la séquence de l'IGF-I de souris a donc été transférée à proximité de la séquence promotrice CMV5. Ce promoteur est constitué du promoteur CMV fusionné au domaine tripartite retrouvé sur la séquence de l'adénovirus, ce qui augmente l'efficacité de l'expression de la séquence en aval du promoteur (Massie et al., 1998a). La séquence d'origine de l'IGF-I qui a été utilisée pour construire la protéine de fusion provenait du plasmide d'expression pSPORT6.0 contenant la séquence complète du ligand murin. Le CMV5 a été choisi comme promoteur pour permettre l'expression de la protéine de fusion dans des cellules de mammifères. D'ailleurs, ce système possède l'avantage de permettre les multiples modifications post-traductionnelles qui sont essentielles à la fonction de plusieurs protéines cellulaires (Jensen, 2004). Le transfert de la séquence a été effectué, suite à l'amplification de la séquence par PCR, à l'aide d'amorces spécifiques. Ces amorces ont non seulement permis d'incorporer le peptide signal essentiel à la sécrétion des protéines, mais elles ont aussi permis d'enlever la portion en C-terminale qui fait partie de la pré-pro-protéine, aussi nommée peptide E. Cette

portion peptidique est tronquée lors de la maturation de l'IGF-I durant les différentes étapes post traductionnelles (Chen et al., 2004). L'abolition de ce domaine est essentielle, étant donné que le His-Tag et les 5 répétitions du domaine E-Coil ont été fusionnés à cette extrémité de la protéine dans le même cadre de lecture (Figure 10A). Le domaine d'interaction His-Tag a été ajouté à la séquence pour faciliter la purification de l'IGF-E5 mais aussi pour permettre l'analyse des échantillons qui ont été produits subséquemment. L'utilisation du His-Tag a été préférée à celle d'autres systèmes, étant donné qu'il s'agit d'une approche déjà utilisée dans le cadre de plusieurs études de production dans des cellules de mammifères CHO (Chisholm et al., 1999). Les 5 répétitions de la séquence peptidique EVSALEK forment le domaine E5-Coil, qui sert à générer l'interaction avec les différentes fibres virales modifiées. Pour s'assurer que le positionnement de la séquence était correct au niveau de la structure tridimensionnelle du ligand bispécifique, des séquences flexibles contenant quatre glycines ont été ajoutées entre le domaine His-Tag et la portion E5-Coil.

Après avoir confirmé par séquençage que le cadre de lecture du plasmide était correct, nous avons validé que les différentes modifications n'empêchaient pas l'IGF-E5 d'être sécrétée par les cellules de mammifère. Pour ce faire, l'expression de l'IGF-E5 a été mesurée suite à une transfection transitoire dans des 293A. Les extraits cellulaires et les milieux conditionnés provenant des cellules transfectées de manière transitoire ont été déposés sur gel d'acrylamide pour montrer à quel niveau était produit le ligand bispécifique. L'observation d'une bande dans la piste contenant le milieu conditionné, mais

non dans celle chargée avec les extraits totaux, a permis de tirer plusieurs conclusions (Figure 11). En premier lieu, la construction du plasmide est correcte par la production de

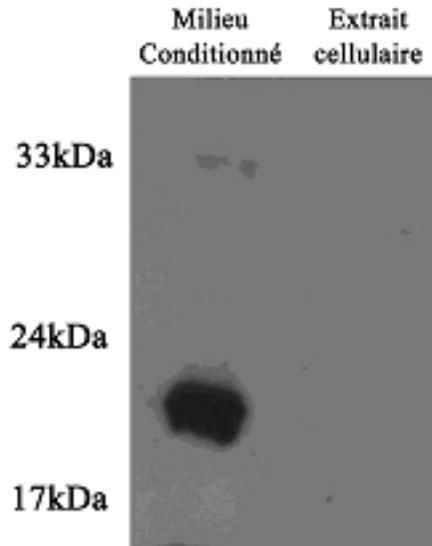


Figure 11 : Sécrétion de l'IGF-E5 dans le milieu conditionné suite à une transfection transitoire.

15 μ L de milieu conditionné et 25ug d'extrait cellulaire ont été chargés sur un SDS-PAGE avec un gradient d'acrylamide de 4-20%, avant d'être séparés selon leur poids moléculaire. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose qui a été ensuite bloquée. La membrane a d'abord été marquée par un anticorps primaire contre le His-Tag dilué 1 dans 250. On a procédé ensuite à une incubation avec un anticorps secondaire couplé à la HRP, dilué 1 dans 3000. Les bandes ont été révélées par l'exposition de la membrane sur un film Kodak pendant 30 secondes.

la protéine par les cellules qui ont été transfectées. En deuxième lieu, la présence d'une bande, suite à l'incubation avec l'anticorps contre le domaine His-Tag, démontre que le domaine His-Tag est au moins fonctionnel dans des conditions dénaturantes. En troisième lieu, l'immunobuvardage indique que la protéine est principalement sécrétée par les cellules qui ont été transfectées et qu'il n'y a pas d'accumulation à l'intérieur des cellules. L'utilisation d'un anticorps contre l'IGF-I nous a permis d'obtenir un patron similaire à celui observé avec l'anticorps contre le His-Tag (résultat non présenté). Par contre, le

patron de migration ne concorde pas avec la taille attendue du ligand bispécifique qui serait théoriquement de 17 kDa. La bande observée se retrouve plutôt autour de 20 kDa. Le domaine E5-Coil aurait un impact sur la migration des protéines. Ce phénomène avait déjà été observé lors de la génération du système K-Coil et E-Coil (Tripet et al., 1996) et avait été attribué aux fortes charges contenues dans les éléments de dimérisation E-Coil et K-Coil. La présence d'une seconde bande autour de 33kDa pourrait être associée à des dimères générés à cause des fortes charges électrostatiques. La bande d'un poids moléculaire plus faible serait probablement un produit de dégradation.

Après avoir démontré que la construction plasmidique permettait l'expression du peptide IGF-E5, il fallait analyser si la structure tridimensionnelle et le positionnement du His-Tag dans la séquence permettraient de purifier l'IGF-E5. De nouvelles transfections transitoires ont été effectuées et les milieux conditionnés ont été purifiés à l'aide d'une colonne contenant 1 mL de billes A-sépharose sur lesquelles des ions nickel ont été immobilisés. Après avoir immobilisé l'IGF-E5, les billes ont été lavées avec 10 volumes de colonne à l'aide du tampon d'équilibration contenant 10 mM d'imidazole. Un gradient d'imidazole (30, 50, 90 et 200 mM) a, par la suite, été utilisé pour faire décrocher la protéine des ions métalliques. L'utilisation d'un gradient permet généralement d'éliminer des protéines qui seraient associées de manière non spécifique aux billes. Les échantillons qui ont été élués ont été passés sur des colonnes de concentration d'une porosité de 3 kDa pour éliminer l'imidazole, d'une part, et permettre d'accroître la concentration de l'IGF-E5, d'autre part. Les

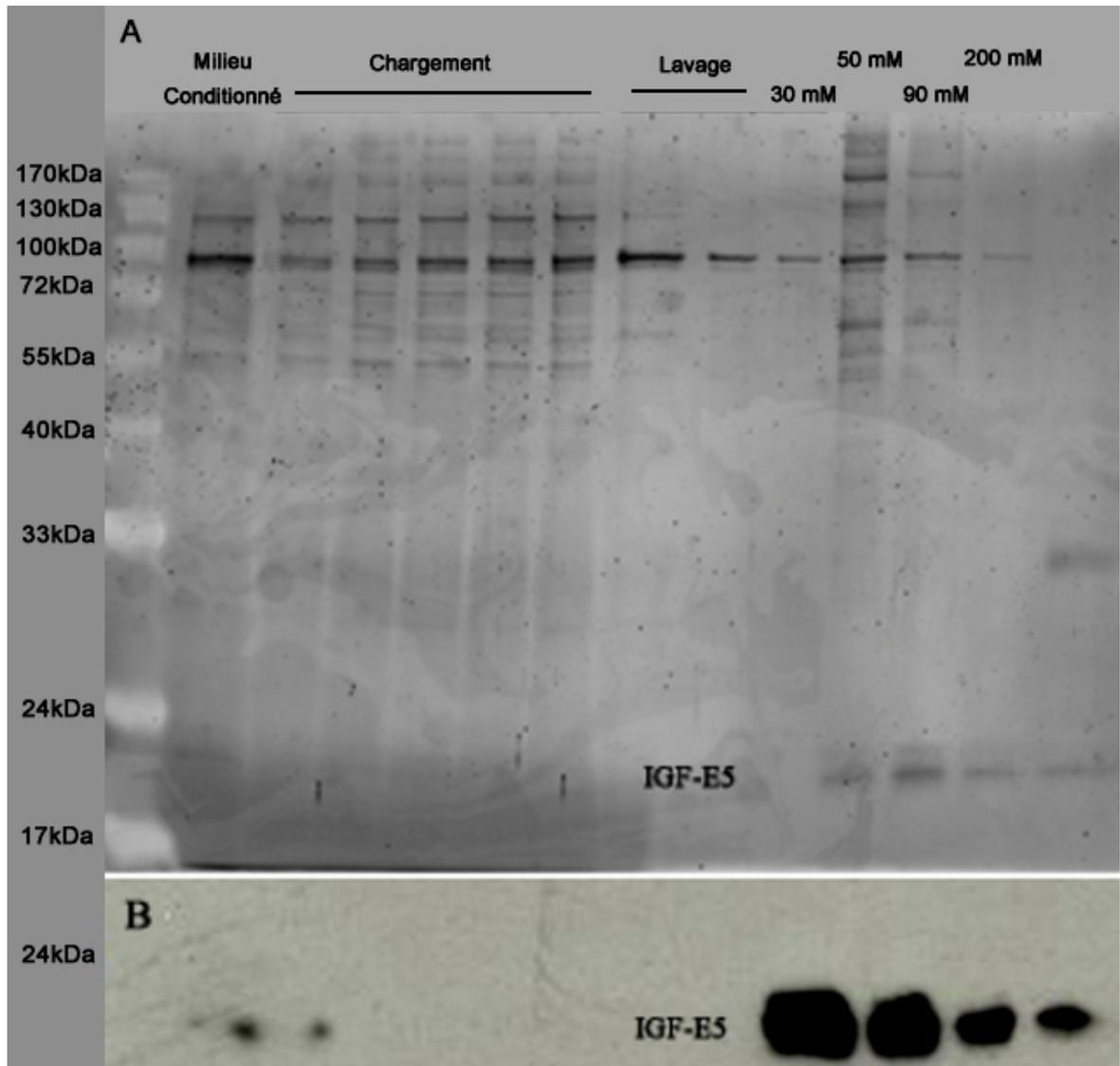


Figure 12 : Expression et purification du ligand modifié IGF-E5.

Les protéines ont été purifiées sur colonne d'affinité et éluées à 200mM d'imidazole suite à l'utilisation d'un gradient d'imidazole de 30 mM à 90 mM. 11,75 μ L de protéine provenant du milieu conditionné, du milieu passé sur colonne (chargement) et des différentes fractions du gradient d'imidazole (30 mM, 50 mM, 90mM et 200 mM) ont été déposés sur un gel avec un gradient d'acrylamide de 4% à 20%. (A) Le gel a été coloré en présence de Coomassie Fluor OrangeTM et révélé à l'aide d'un typhoon Trio+. (B) Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose puis bloquées. La membrane a été marquée à l'aide d'un anticorps primaire contre le His-Tag dilué 1 dans 250, puis incubée avec un anticorps secondaire couplé à la HRP et dilué 1 dans 3000. Les bandes ont été révélées par l'exposition de la membrane sur un film Kodak pendant 30 secondes.

niveaux d'expression dans les milieux conditionnés, c'est-à-dire dans une portion de l'échantillon purifié et dans les échantillons concentrés d'IGF-E5, ont été estimés grâce à une analyse par coloration au Coomassie OrangeTM (figure 12a) et par immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps contre le His-Tag (figure 12b). L'observation du gel provenant de la coloration au Coomassie Orange montre la présence d'une bande de la taille de l'IGF-E5 dans les différentes fractions de l'élution. Des bandes de taille similaire ont aussi été observées sur l'immunobuvardage de type Western, après un marquage à l'aide d'un anticorps ciblant le domaine His-Tag. Ces résultats démontrent qu'il est possible de purifier le peptide bispécifique IGF-E5 en utilisant de la résine chargée à l'aide d'ion nickel. La figure 12a permet, en plus, de déterminer qu'il faut des concentrations faibles d'imidazole pour faire décrocher l'IGF-E5 de la résine. En effet, les analyses démontrent qu'une concentration de 50 mM d'imidazole est suffisante pour éluer une bonne partie de l'IGF-E5. Par contre, l'utilisation des concentrations d'imidazole de 50, 90 ou de 200 mM n'est pas suffisante pour faire décrocher tout l'IGF-E5 associé aux ions métalliques, étant donné qu'il est possible d'observer des bandes dans chacune des pistes. Cet essai à faible échelle montre que la concentration qui permettrait de décrocher le maximum d'IGF-E5 serait de 200 mM d'imidazole. La piste contenant l'IGF-E5 obtenu suite à l'élution avec 200 mM montre que l'utilisation d'un gradient favorise l'élimination de la majorité des contaminants. La purification sur colonne devrait permettre théoriquement de concentrer la protéine d'intérêt. Plusieurs préparations ont été produites par transfection transitoire et, suite à la production, leur niveau a été mesuré par la méthode employant la coloration au Coomassie Fluor OrangeTM (Table 7). Par contre, à cause des

pertes associées avec les différentes étapes, nous n'avons pas réussi à concentrer les protéines. Quoi qu'il en soit, le volume final de même que la concentration

Table 7 : Différentes productions d'IGF-E5 par transfections transitoires.

Production	Volume initial	Quantité initiale	Volume après purification	Quantité après purification
	mL	ng/μL	μL	ng/μL
#1	20	---	350	4.88
#2	20	1.20	350	0.72
#3	20	4.00	350	6.04
#4	20	20.12	350	19.99

de plusieurs de ces productions ont été suffisants pour effectuer des essais *in vitro* à petite échelle. Toutefois, l'évaluation du changement de tropisme dans des essais *in vivo* nécessitaient des concentrations protéiques beaucoup plus importantes. Pour ce faire, nous avons donc produit des clones stables pour accroître la quantité de protéine initiale tout en améliorant le rendement de la purification.

3.1.1.1 Production des clones stables dans les cellules CHO pour le ligand IGF-E5

Pour faciliter la production du ligand lors des études de changement de tropisme, des clones stables ont été générés de manière à pouvoir effectuer des productions à grande échelle. Plusieurs clones exprimant l'IGF-E5 ont donc été produits dans des cellules CHO qui prolifèrent en suspension dans du milieu chimiquement défini. Les cellules CHO ont

été choisies étant donné qu'il s'agit d'un modèle de culture cellulaire animale qui est largement utilisé pour la production de protéines recombinantes. Les clones dans les cellules CHO ont été produits par transfection avec un plasmide encodant le IGF-E5 suivie d'une sélection avec l'hygromycine pour isoler des clones ayant intégrés de façon stable le plasmide. De nombreux clones ont été isolés en utilisant des dilutions limites ou via l'utilisation d'une méthode de marquage contre la protéine sécrétée en milieu semi-solide (FLSSM) pour isoler chacun des clones (Caron et al., 2009). Les niveaux d'expression dans les milieux conditionnés étaient très variables, mais les meilleurs clones ont pu être repêchés puis analysés. Pour les expériences subséquentes, le clone le plus fort (L et 4B4) dans chacune des deux méthodes (dilution limite et FLSSM) a été utilisé pour déterminer lequel permettrait d'obtenir la meilleure production d'IGF-E5 en suspension.

3.1.1.2 Productivité des meilleurs clones stables

Il est essentiel qu'un clone puisse survivre pendant une longue période de temps pour permettre la meilleure production possible. Les clones L et 4B4 ont donc été évalués à différentes températures, puisque que la production protéique est augmentée à 30°C (Nicklin et al., 2005; Jenkins and Hovey, 1993; Fox et al., 2004; Schatz et al., 2003). Différentes quantités de cellules des clones 4B4 et du clone L, précisément 5×10^5 cellules par mL (Figure 13a) et 3×10^6 cellules par mL (Figure 13b), ont étéensemencées dans des erlenmeyers de 125 mL (T=0 heure) puis incubées à 37°C ou à 30°C pendant 10

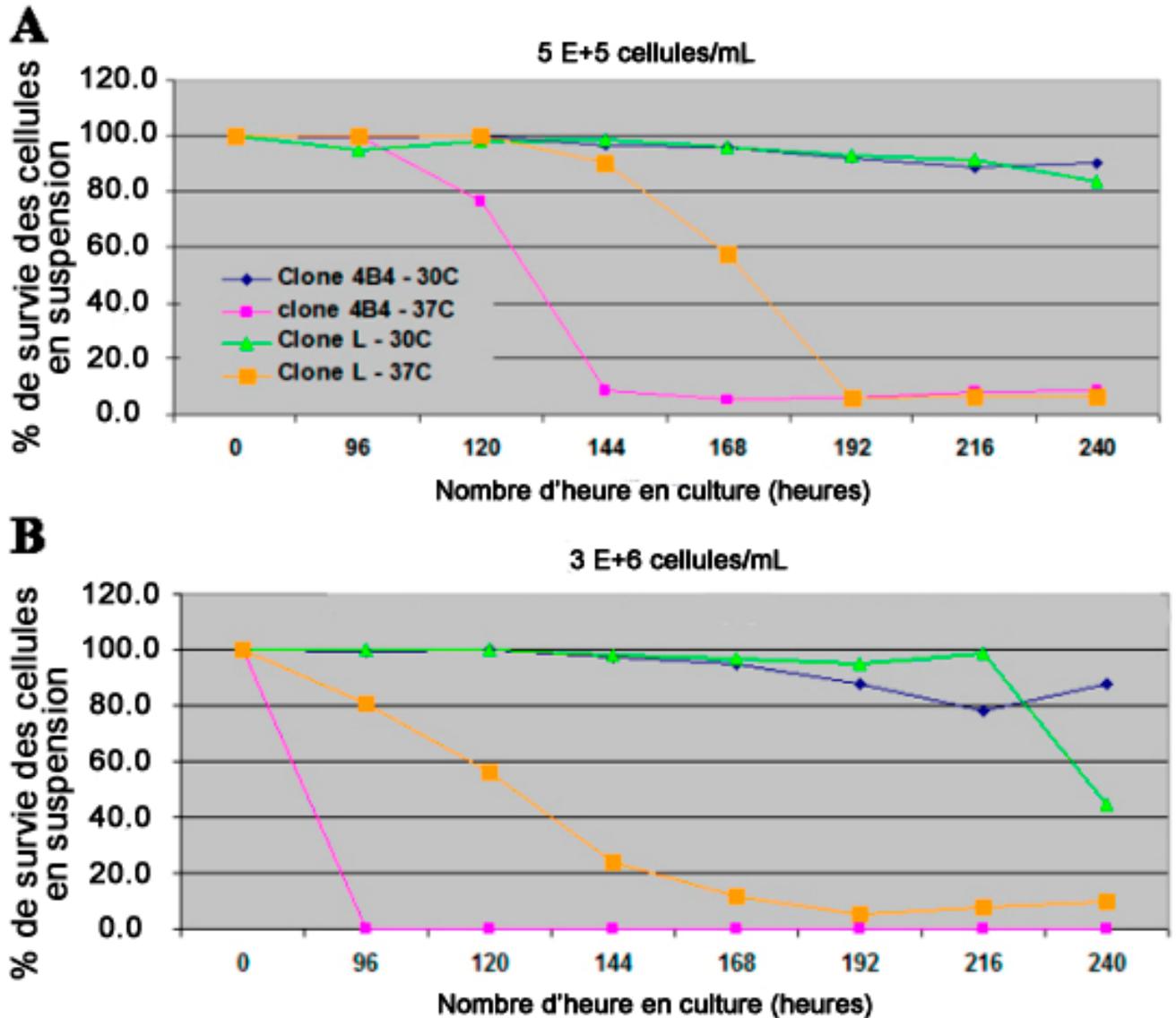


Figure 13 : Courbe de survie des clones L et 4B4 dans le temps.

Les cellules ont étéensemencées à 5×10^5 cellules par mL (A) et à 3×10^6 cellules par mL (B) dans du milieu CD-CHO contenant 2 mM de glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfate de dextran et 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'hygromycine. Les cellules ont été incubées pendant 10 jours à 37°C ou à 30°C. 200 μL de milieu de culture ont été prélevés chaque jour pour effectuer un compte cellulaire. Clone 4B4 à 30°C (Courbe bleu), Clone 4B4 à 37°C (Courbe rose), Clone L à 30°C (Courbe verte) et Clone L à 37°C (Courbe orange).

jours. Le nombre de cellules a été dénombré après différents temps (96, 120, 144, 168, 196, 216 et 240 heures) pour déterminer le meilleur taux de survie chez les clones exprimant l'IGF-E5. Les observations montrent que les deux clones commencent à mourir rapidement

après 96 heures lorsqu'ils sont incubés à 37°C. Au contraire, lorsque la production se déroule à 30°C, la quantité de cellules ne semble pas être affectée et la proportion de cellules vivantes reste au dessus de 90% pendant 8 jours. Néanmoins, l'état du clone L de même que celui du clone 4B4 commencent à décroître (taux de survie de 80%) à partir du dixième jour d'incubation, suggérant que la production ne devrait pas dépasser 9 jours.

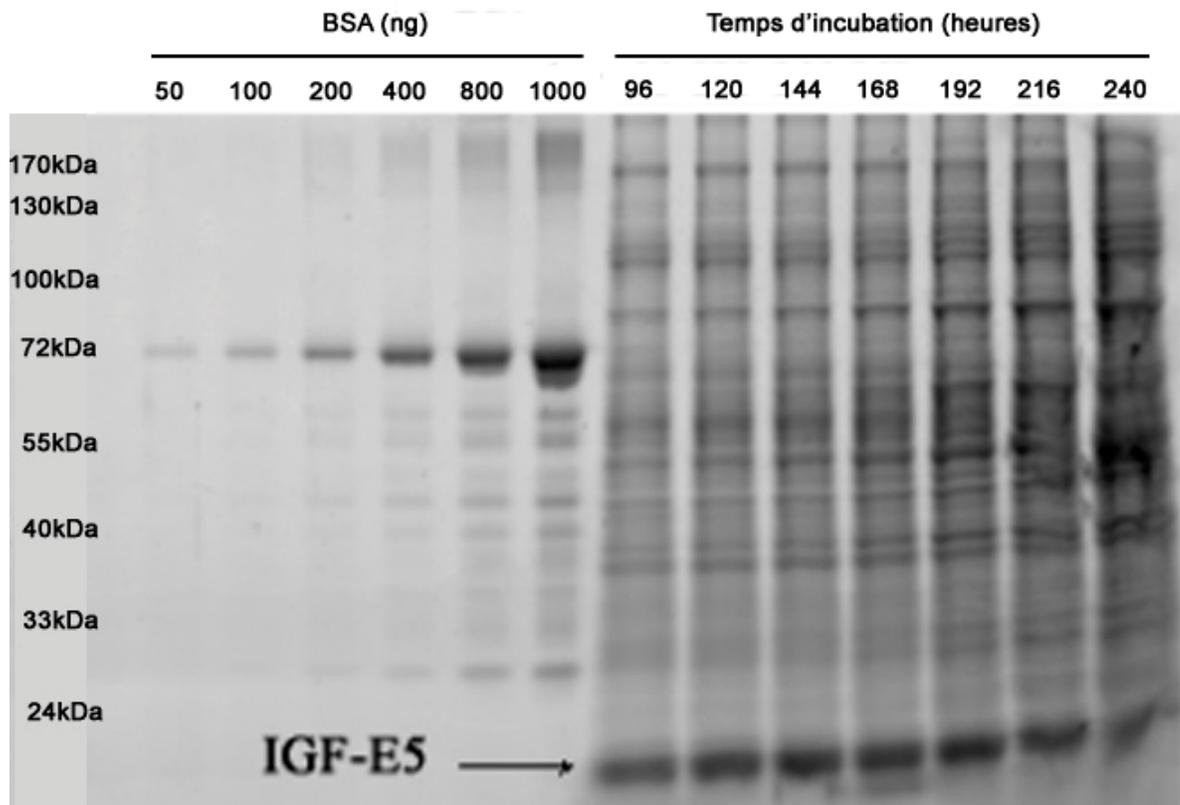


Figure 14 : Expression de l'IGF-E5 des différents clones dans différentes conditions expérimentales.

Les milieux conditionnés proviennent de différents temps, suite à l'incubation de 3×10^6 CHO-IGF-E5; clone L à 30°C. Les milieux conditionnés ont été centrifugés et 11.75 μ L de milieu ont été chargés. Une courbe standard de BSA a été chargée au même moment (50 à 1000 ng de protéine par piste). Les protéines ont été séparées selon leur taille puis les gels ont été colorés pendant 1 heure en présence de Coomassie Fluor OrangeTM. Les bandes ont été révélées à l'aide d'un Typhoon Trio+ par excitation effectuée à 495 nm, tandis que le signal a été capté 635 nm. La quantité de protéines dans chacune des pistes a été évaluée à l'aide du logiciel ImageQuant.

Table 8 : Expression de l'IGF-E5 dans les différentes conditions expérimentales.

		96 heures	120 heures	144 heures	168 heures	192 heures	216 heures	240 heures
		µg/mL						
Clone 4B4	500 000c/mL	20.34	20.82	25.10	36.95	35.70	36.03	33.91
	3 000 000 c/mL	20.46	20.70	23.87	47.50	46.24	31.18	29.58
Clone L	500 000c/mL	39.94	46.16	48.64	58.62	53.10	54.77	50.79
	3 000 000 c/mL	112.15	136.32	150.37	153.19	163.93	153.40	117.88

La quantité d'IGF-E5 produit par les cellules a aussi été mesurée chaque jour, à partir des milieux conditionnés provenant des échantillons prélevés pour calculer la viabilité. Les échantillons ont été centrifugés pour enlever les cellules et les débris cellulaires. Puis, les milieux conditionnés ont été transférés et conservés pour pouvoir être analysés sur le même gel. La quantité d'IGF-E5 dans chacun des échantillons a donc été mesurée suite à une coloration au Coomassie Fluor OrangeTM (Figure 14). Les cellules incubées à 37°C n'ont pas été analysées étant donné leur faible niveau de survie. Les niveaux d'expression d'IGF-E5 ont seulement été évalués dans les conditions expérimentales à 30°C. L'analyse des colorations au Coomassie Fluor Orange des différents gels à l'aide du logiciel ImageQuant v2.0 a permis d'évaluer une augmentation des niveaux d'expression entre 120 et 216 heures dans chacune des conditions expérimentales (Table 8). Les résultats obtenus montrent, en outre, que le clone L produit une plus grande quantité d'IGF-E5 dans le milieu conditionné que le clone 4B4, quelles que soient les conditions évaluées. En effet, à une densité de 5×10^5 cellules par mL, le clone L produit 54.77 µg/mL d'IGF-E5, comparativement à 36.03 µg/mL pour le clone 4B4. En plus, à une densité de 3×10^6 cellules par mL, le clone L peut produire jusqu'à 153.4 µg/mL

au lieu de 31.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produit par le clone 4B4 pour une quantité de cellules équivalentes. Ces résultats confirment les observations qui avaient déjà été effectuées par notre groupe (Caron et al., 2009).

3.1.1.3 Production et purification d'IGF-E5 à plus grande échelle

Les infections chez la souris requièrent l'utilisation d'importante quantité d'IGF-E5 dans des volumes les plus petits possibles. Il a donc fallu produire des quantités élevées d'IGF-E5 avec des concentrations élevées pour pouvoir effectuer les différents essais. L'IGF-E5 a été produit en ensemençant 2 productions de 500 mL de CHO-IGF-E5 clone L, à une densité cellulaire de 3×10^6 cellules par mL, et en les incubant à 30°C pendant une période de 9 jours. Le taux de survie des cellules après 9 jours a été évalué en mesurant le nombre de cellules vivantes et de cellules mortes. La valeur obtenue, à savoir 86% de survie cellulaire, nous a indiqué que nous pouvions continuer avec la purification. Celle-ci a donc été effectuée sur une colonne contenant 5 mL de fractogel[®] sur lequel des ions nickel ont été immobilisés, suivi par un lavage avec une solution de NaCl 0.5 M. La colonne a été fixée à un système de pompe automatisée AKTA pour contrôler le débit appliqué sur la colonne lors des différentes étapes de la purification. La majorité des étapes ont été effectuées à un débit de 1 mL par min. L'évaluation des différentes fractions, obtenues lors de l'élution avec 300 mM d'imidazole par coloration au Coomassie Fluor Orange[™], a permis de combiner toutes les fractions qui étaient positives. Le tampon de cette solution a été changé pour éliminer l'imidazole avant que la solution protéique ne soit concentrée. Ces étapes différentes ont permis d'obtenir une solution finale de 1.2 mL,

contenant une concentration finale de 6.79 mg/mL d'IGF-E5 et avec une concentration protéique totale de 10.5 mg/mL. La purification a donc permis d'éliminer plusieurs protéines contaminantes, comme on peut l'observer à la figure 15. En effet, la bande obtenue dans le milieu conditionné contient beaucoup plus de protéines de haut poids moléculaire contrairement aux extraits protéique

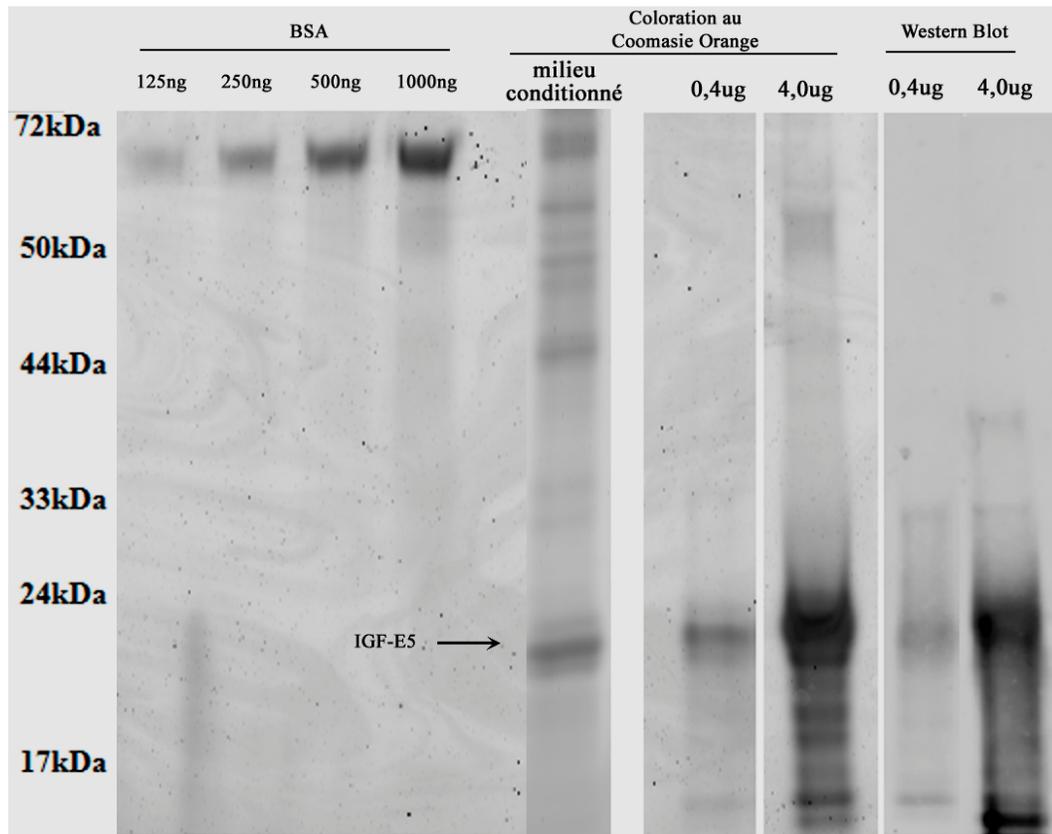


Figure 15 : Dosage d'une production d'IGF-E5 provenant de 2 préparations de 500 mL.

Les milieux conditionnés et les protéines concentrées ont été dosés à l'aide d'une courbe standard de BSA (125 à 1000 ng) suite à une coloration au Coomassie Fluor OrangeTM. Les bandes ont été révélées à l'aide du laser de 488 nm d'un Typhoon Trio+ et analysées à l'aide du logiciel ImageQuant v2.0. Un second gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose puis a été bloqué. Un anticorps primaire contre le His-Tag dilué 1 dans 250 a été utilisé, suivi par une incubation en présence d'un anticorps secondaire couplé au Cy5 dilué 1 dans 3000. Les bandes ont été révélées suite à l'excitation du Cy5 avec le laser de 633 nm sur un typhoon Trio+.

purifiée. Contrairement à la figure 14, l'intensité des bandes contaminantes de la figure 15 est moins importante, car il s'agit d'une production différente dont il a fallu réduire l'intensité du signal pour permettre la quantification des bandes d'IGF-E5 à 0,4 μ g et à 4,0 μ g. L'observation du gel à la figure 15 montre, par contre, la présence de plusieurs bandes, en dessous de la protéine purifiée, qui pourraient provenir d'une dégradation protéolytique. La présence de produits de dégradation peut être problématique lors d'essais de changement de tropisme car ceux-ci peuvent réduire la disponibilité des sites d'interaction. Néanmoins, la méthode a permis de concentrer l'IGF-E5 provenant des milieux conditionnés du clone L par un facteur de 161 fois. Le recouvrement de la protéine d'intérêt a aussi été analysé dans notre échantillon. Suite à la purification sur colonne, 43.7% de l'IGF-E5 initiale ont été récupérés. Finalement, les niveaux d'endotoxine, pouvant provenir des différentes étapes de la purification et de la concentration, ont été évalués avec la trousse Endosafe pour s'assurer d'injecter des niveaux acceptables lors de nos expériences *in vivo*. La régression linéaire a permis de calculer un niveau d'endotoxine de 0.94 EU/mg. De plus, l'analyse des niveaux d'endotoxines permet aussi de déterminer si le tampon ou la protéine peuvent interférer avec la méthode d'évaluation. Dans notre cas, la valeur de 167% obtenue lors de l'essai nous indique que l'une ou l'autre des composantes de la préparation protéique n'a pas eu d'impact sur la réaction enzymatique.

Par la suite, il a fallu démontrer que l'IGF-E5 avait le potentiel de s'associer avec le récepteur retrouvé à la surface des cellules. Cette interaction a été validée en analysant une des réponses induites suite à liaison du ligand avec son récepteur, soit l'autophosphorylation de la portion intracellulaire de la chaîne β . L'expérience exige que

les protéines membranaires soient récoltées rapidement suite à l'induction, étant donné que la phosphorylation est un état transitoire dans les cellules qui mène à l'internalisation du récepteur cellulaire. L'utilisation

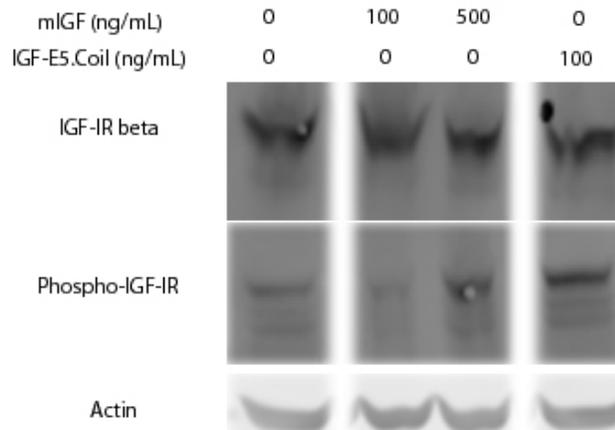


Figure 16 : Interaction du ligand IGF-E5 avec le récepteur à l'IGF-IR.

2 millions de HeLa ont été induites avec 100 ng/μL ou 500 ng/μL de mIGF-I, ou encore avec 100 ng/μL d'IGF-E5. 100 μg de protéines dénaturées ont été chargés sur un gel SDS-PAGE de 10%. L'anticorps primaire contre le récepteur à l'IGF-IRβ a été dilué 1 dans 250. Celui contre la forme phosphorylé du récepteur a aussi été dilué à 1 dans 250, tandis que l'anticorps contre l'actine a été dilué 1 dans 10 000. L'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy5 a été dilué 1 dans 1000 pour le récepteur et sa forme phosphorylée, tandis que l'anticorps secondaire utilisé pour l'actine a été dilué 1 dans 6000. Les bandes ont été révélées à l'aide du laser de 633nm d'un typhoon Trio+ et analysées par le logiciel ImageQuant V2.0.

d'inhibiteur de phosphatase est nécessaire car les phosphatases cellulaires peuvent entraîner une déphosphorylation des différentes protéines phosphorylées. La figure 16 démontre que l'IGF-E5 a la capacité d'activer le récepteur à l'IGF-IR : il est possible d'observer une bande à la hauteur de l'IGF-IR, suite à l'incubation avec l'anticorps contre la phosphotyrosine 1131 de la chaîne bêta. En effet, la phosphorylation peut aussi être observée dans le cas des cellules traitées avec une dose de 100 ng/mL d'IGF-E5, alors qu'une activation similaire requiert 500 ng/mL d'IGF-I recombinant de souris. La phosphorylation du

récepteur, induite par l'IGF-E5, nous permet de conclure que celui-ci est fonctionnel. Ce résultat démontre, soit que l'IGF-E5 pourrait être plus actif que l'IGF-I recombinant de souris, soit que la différence de la structure tridimensionnelle affecte la capacité à lier le récepteur. à ce propos, il est important de mentionner que L'IGF-I recombinant a été produit dans des bactéries et que l'absence des protéines chaperonnes dans ce système pourraient affecter le repliement de l'IGF-I, son efficacité ou favoriser son agrégation (Gasser et al., 2008;Carrio and Villaverde, 2002;Fink, 1999).

3.1.2 Production et purification de l'EGF-E5-Coil

L'EGF-E5-Coil (Figure 10B) nous permettra de démontrer la possibilité d'induire un changement de tropisme, soit dans des glioblastomes humains en utilisant la lignée U87MG, soit dans les tumeurs pulmonaires en regardant l'effet sur les A549. Par ailleurs, l'utilisation d'un second ligand via le même vecteur viral nous permettra de prouver la flexibilité de notre système. Contrairement à l'IGF-E5, l'EGF-E5-Coil a déjà été caractérisé par le groupe du Dr O'Connor (Le et al., 2009). Ces chercheurs ont montré que l'EGF-E5-Coil pouvait interagir avec le récepteur à l'EGF, en mesurant la phosphorylation de celui-ci. Ils ont aussi montré la fonctionnalité du domaine E-Coil en effectuant des essais par *SPR (surface plasmon resonance)* et en immobilisant un peptide contenant le K-Coil. L'EGF-E5-Coil doit être produit dans un système bactérien et les protéines se retrouvent à l'intérieur des corps d'inclusion. Le ligand bispécifique doit, en plus, subir plusieurs modifications avant d'être utilisé dans les différentes expériences de changement de tropisme. En effet l'EGF-E5-Coil doit être replié pour lui permettre d'être actif. Qui

plus est, le domaine His-Tag doit être enlevé en effectuant une digestion avec une entérokinase. La production de l'EGF-E5-Coil débute

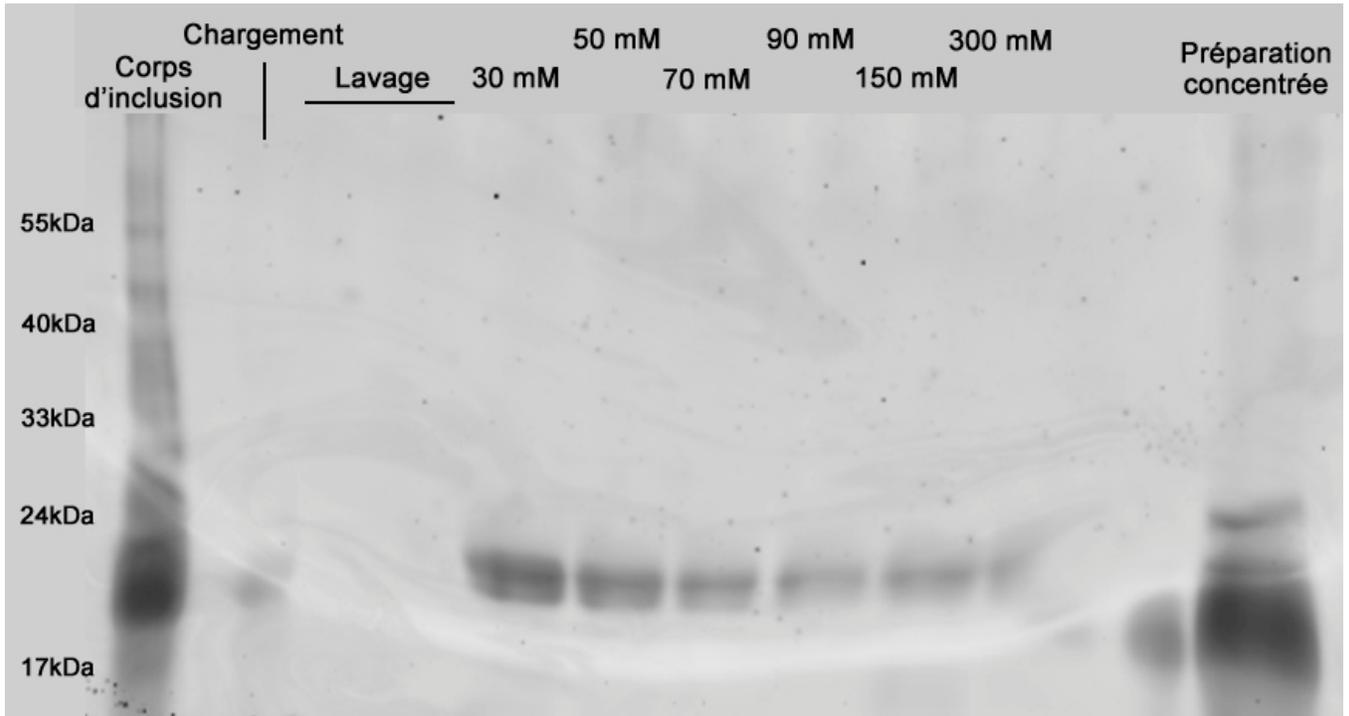


Figure 17 : Expression et purification sur colonne de l'EGF-E5-Coil.

Les protéines ont été purifiées sur colonne d'affinité et éluées à 300mM d'imidazole, suite à l'utilisation d'un gradient d'imidazole de 30mM à 150mM. 11,75 μ L de protéines proviennent à la fois des extraits des corps d'inclusion, du milieu qui a passé au travers de la colonne (chargement), des différentes fractions de lavage, des différentes étapes du gradient et de la protéine concentrée. Les protéines ont été séparées sur un gel possédant un gradient d'acrylamide de 4% à 20%, puis ont été colorées en présence de Coomassie Fluor OrangeTM. Les bandes ont été révélées à l'aide du laser de 488 nm d'un typhoon Trio+.

en amplifiant les bactéries ayant été transformées avec le plasmide encodant pour l'EGF-E5-Coil. Lorsque les bactéries ont atteint une densité optique à 600 nm d'environ 0,8, l'expression de l'EGF-E5-Coil a été induite par l'ajout d'une concentration de 100 mM d'IPTG. Les bactéries ont été par la suite culottées et lysées. Les corps d'inclusion ont été ensuite isolés des autres composantes bactériennes par centrifugation. L'EGF-E5-Coil a

alors été extrait des corps d'inclusion en utilisant du chlorure de guanidium à une concentration de 6 M. Enfin, l'EGF-E5-Coil a été purifié à l'aide d'une colonne Talon® sur laquelle avaient été immobilisés des ions de cobalt. Un gradient d'imidazole de 30 à 150 mM a été utilisé pour réduire les contaminants protéiques potentiels puis l'élution a été effectuée avec une concentration finale d'imidazole de 300 mM. L'analyse des fractions a été effectuée sur gel pour s'assurer que la purification pouvait réduire la quantité de contaminants (Figure 17). En fait, l'absence de protéines contaminantes démontre que toutes les fractions peuvent être combinées pour permettre de recueillir un maximum d'EGF-E5-Coil. De plus, ce résultat montre que l'utilisation d'un gradient d'imidazole n'est pas essentielle pour purifier l'EGF-E5-Coil. La figure 17 démontre aussi qu'une concentration de 30 mM d'imidazole peut induire la dissociation de l'EGF-E5-Coil de la résine. Par contre, cette concentration n'est pas suffisante pour éluer complètement l'EGF-E5-Coil lié à la résine. En effet, les fractions subséquentes éluées avec des concentrations plus importantes (50 mM, 70 mM, 90 mM et 150 mM) d'imidazole contiennent encore de l'EGF-E5-Coil. Une concentration de 300mM est donc nécessaire pour faire décrocher la totalité des protéines associées à la résine. De toutes les expériences effectuées, seulement les fractions de l'expérience contenant 3.71 g de culture bactérienne ont été combinées (table 9). L'imidazole a été retiré des échantillons à l'aide d'une colonne de dessalage PD10. La purification sur colonne et le dessalage nous ont permis de concentrer l'échantillon par un facteur de 20 fois. L'EGF-E5-Coil a été dénaturé en utilisant du chlorure de guanidium, puis la protéine a été repliée correctement en utilisant une solution contenant 5 mM de L-glutamine. Ces conditions permettent à la protéine de reprendre une structure tridimensionnelle fonctionnelle et ayant la capacité d'activer le récepteur

cellulaire, comme démontré par le groupe de O'Connor (Le et al., 2009). La protéine de fusion a été construite de manière à pouvoir éliminer le domaine His-Tag grâce à la présence d'un site de digestion protéolytique entre le His-Tag et le domaine E5-Coil. L'excision du domaine C-terminal contenant le His-Tag a été effectuée à l'aide de 2.5 U d'entérokinase. Cette étape a pour but de simplifier la protéine et d'éviter l'interférence de la portion His-Tag dans les différents processus dans laquelle le peptide pourrait être impliqué. La protéine d'intérêt est alors purifiée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pour éliminer la présence du fragment contenant le domaine His-Tag. Suite à plusieurs productions, suffisamment de protéines ont été obtenues pour permettre d'effectuer nos essais *in vitro*. Les productions qui ont permis d'effectuer nos expériences ont été répertoriées dans la table 9. Ces rendements sont moins importants que ceux obtenus par le groupe de O'Connor (Le et al., 2009). Nous avons tout de même pu obtenir des quantités qui étaient autour de 2.54 mg pour 500 mL de culture bactérienne. Les pertes observées lors de la purification ou lors du repliage de la protéine ont été relativement faibles, comparativement à ce qui avait été constaté dans des essais faits précédemment (Le et al., 2009). Par contre, la quantité finale de protéine clivée obtenue a été très faible, avec

Table 9 : Différentes productions du ligand modifié EGF-E5-Coil.

Productions bactériennes	Avant purification	Après purification	Après repliage	HPLC	Recouvrement
g	Mg	mg	Mg	µg	%
1.22	0.203	0.022	---	---	---
1.73	0.195	0.019	---	---	---
3.71	2.54	1.87	1.47	3.75	0.26

seulement 3.75 µg d'EGF-E5-Coil dans 2 mL. Étant donné qu'aucune expérience *in vivo* n'a été planifiée avec ce peptide bispécifique, les niveaux d'endotoxines n'ont pas été évalués dans les différentes préparations.

3.1.3 Production et purification de l'AFAI-E5-Coil

L'AFAI-E5-Coil est un anticorps à un seul domaine, auquel a été fusionné un domaine contenant 5 répétitions du E-Coil (figure 10C). Il provient de l'immunisation d'un lama, réalisée à l'aide d'un peptide provenant d'un extrait de la lignée cellulaire A549 (Zhang et al., 2004). La protéine de fusion a été construite et validée par le groupe de MacKenzie (résultat non publié). Nous avons utilisé l'AFAI-E5-Coil dans l'optique de démontrer la capacité des anticorps à un seul domaine à pouvoir induire un changement de tropisme. Ces informations nous permettraient d'affirmer que des ligands, autres que ceux qui sont naturels, pourraient être utilisés par notre système de changement de tropisme. L'AFAI-E5-Coil a été produit pour vérifier si nous pouvions l'utiliser pour générer un changement de tropisme. L'AFAI-E5-Coil a donc été produit à partir de cultures bactériennes et a été récupéré dans l'espace périplasmique des bactéries. L'anticorps qui peut reconnaître la protéine CEA6 a été partiellement purifié sur une colonne Talon® sur laquelle ont été immobilisés des ions de cobalts. La protéine a été nettoyée par un gradient d'imidazole, similaire à ce que nous avons utilisé dans les cas de l'EGF-E5-Coil et de l'IGF-E5, pour être finalement éluée à l'aide de 200 mM d'imidazole (Figure 18). La coloration au Coomassie Fluor OrangeTM permet de constater que la purification sur

colonne élimine une grande partie des contaminants protéiques provenant de l'extraction. La fraction contenant 200 mM d'imidazole a été passée sur une colonne de dessalage PD10 pour enlever l'imidazole de l'échantillon.

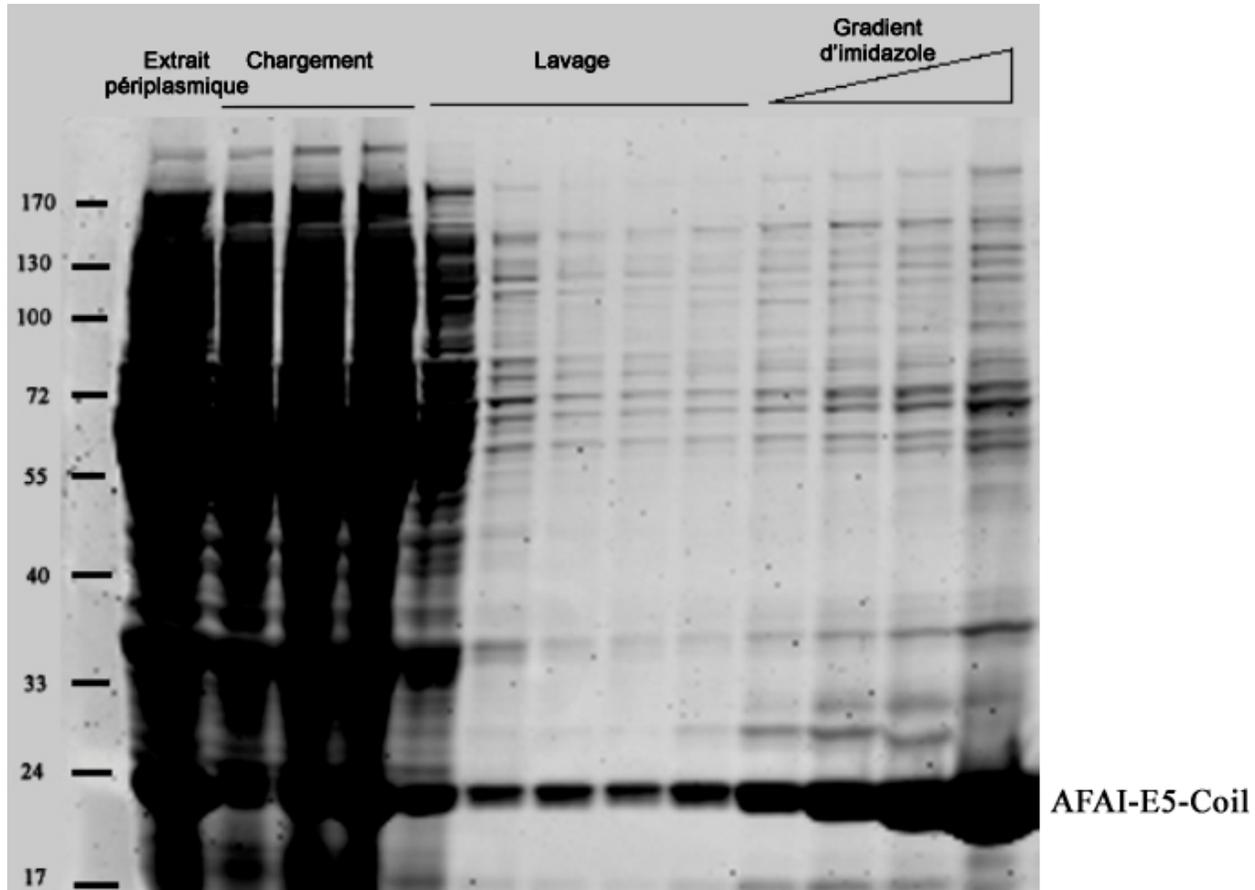


Figure 18 : Expression et purification du ligand modifié AFAI-E5-Coil.

Les protéines provenant d'une extraction périplasmique ont été purifiées sur colonne d'affinité et éluées à 200mM d'imidazole, suite à l'utilisation d'un gradient d'imidazole de 30 mM à 90 mM. 11,75 μ L de protéines provenant de l'extrait périplasmique, du milieu passé sur colonne (chargement) et des différentes fractions du gradient d'imidazole (30 mM, 50 mM, 90mM et 200 mM) ont été déposés sur un gel avec un gradient d'acrylamide de 4% à 20%. Les protéines ont été séparées selon leur taille moléculaire et ont été colorées en présence de Coomassie Fluor OrangeTM. Les bandes ont été révélées à l'aide d'un typhoon Trio+ en utilisant le laser de 488nm.

3.2 Construction des différentes fibres virales et vérification de leur activité

Pour altérer le tropisme des particules virales infectieuses, des modifications ont été apportées à la fibre virale. L'ajout d'un domaine contenant de multiples répétitions du K-Coil devait permettre l'interaction de la fibre avec différents peptides bispécifiques arborant le domaine d'interaction complémentaire, le E-Coil. À ce jour, plusieurs études ont démontré qu'il était possible d'inclure des éléments exogènes dans la boucle HI ou à l'extrémité C-terminale de la fibre (Borovjagin et al., 2005; Koizumi et al., 2003b; Bilbao et al., 2002; Wu et al., 2002). Différents domaines peptidiques K-Coil contenant 3, 4 ou 5 répétitions ont donc été introduits, soit en C-Terminal, soit dans la boucle HI de la fibre virale. Les séquences de la fibre sauvage et des fibres modifiées ont été clonées dans un vecteur pMPG, à proximité de la séquence promotrice CMV5, pour permettre l'évaluation des modifications apportées par des transfections transitoires dans des cellules de mammifères.

Lorsque le tropisme des particules virales est modifié, il est important d'abolir le tropisme naturel du virus. Parmi les procédures répertoriées dans la littérature, l'une d'elles consiste à introduire des mutations spécifiques dans les différents domaines d'interaction avec le CAR retrouvés dans le bouton de la fibre virale (Kirby et al., 2000). Des mutations ponctuelles ont donc été générées dans les différentes fibres virales au niveau de leur domaine AB par mutagenèse dirigée. Au niveau de la fibre contenant 4 répétitions de K-Coil, une seule mutation a été effectuée pour changer la sérine 408 en acide glutamique

dans le domaine AB. Dans le cas de la fibre contenant 5 répétitions du K-Coil dans la boucle HI, deux mutations dans le domaine AB ont été générées : pour changer de la sérine 408 en acide glutamique et la proline 409 en alanine. Il a été démontré que l'insertion de ces deux mutations pouvait abolir l'interaction entre la fibre virale et le CAR (Kirby et al., 2000). Les mutations ponctuelles ont été validées par séquençage.

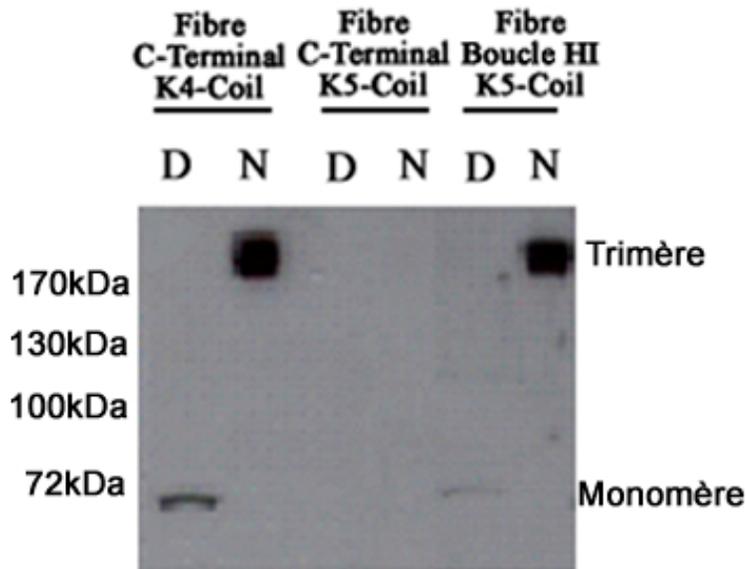


Figure 19 : Trimérisation des différentes fibres virales dans des conditions expérimentales natives.

Des 293A ont été transfectés avec les plasmides encodant pour les différentes fibres virales modifiées. Les protéines provenant de transfection ont été diluées dans du tampon de chargement sans agent de dénaturation (N: condition non réduite) ou en présence de 20 mM de DTT (D: condition dénaturante). 30 µg de protéines contenant la fibre arborant 4 répétitions du K-Coil dans la portion C-terminal (Fibre C Terminal K4-Coil), 5 répétitions dans la portion C-terminal sans mutation (Fibre C-Terminal K5-Coil) et 5 répétitions dans la boucle HI (Fibre Boucle HI K5-Coil) ont été séparés selon leur poids moléculaire et ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Un anticorps primaire contre la fibre virale dilué 1 dans 500 a été utilisé, suivi par l'incubation avec un anticorps secondaire couplé à la HRP dilué 1 dans 3000. Les bandes ont été révélées en présence d'ECL et exposées à un film Kodak pendant 30 secondes. Les trimères de fibres, de même que les monomères, sont identifiés sur le gel.

3.2.1 Essai de trimérisation par immunobuvardage de type Western

Avant de remplacer la séquence de la fibre virale contenue dans le vecteur pAdeasy par notre séquence encodant pour l'une des fibres modifiées, l'expression et la capacité à trimériser des fibres modifiées ont été étudiées. En effet, lors de la propagation normale des adénovirus dans les cellules hôtes, les fibres virales s'associent pour former des trimères dans le noyau des cellules infectées. Cette structure trimérique est essentielle pour l'interaction entre la base penton et la fibre, de même que pour l'infectivité des particules virales (Nicklin et al., 2005). Pour vérifier ces deux éléments, les séquences contrôlées par un promoteur CMV5 ont été transfectées de manière transitoire dans des cellules 293A, puis extraites après 96 heures. La formation de trimères a donc été évaluée de même que l'expression totale des différentes fibres. Les protéines cellulaires ont été extraites, dosées et diluées, en présence ou en absence d'agent dénaturant, avant d'être analysées par immunobuvardage de type Western. L'ajout de 3 ou de 4 répétitions à l'extrémité C-terminale de la fibre virale avait été analysé auparavant, en comparant cela à une fibre sans modification. Ce résultat nous a indiqué qu'il n'y avait pas de différence au niveau de l'expression ou de la trimérisation (Zeng et al., 2008). L'expression de la fibre arborant 5 répétitions dans la boucle HI peut être analysée en regardant la Figure 19. La capacité de trimériser de la fibre contenant 5 répétitions dans la boucle HI a été évaluée, en la comparant avec celle de la fibre ayant 4 répétitions à son extrémité C-Terminale (Figure 19). La figure 19 révèle que l'ajout de 5 répétitions K-Coil dans la boucle HI n'affecte pas la trimérisation de la fibre contrairement à l'incorporation des 5 répétitions K-Coil à l'extrémité C-terminale. Cette dernière a un impact sur la production de la fibre dans les

cellules transfectées. En effet, l'ajout des 5 répétitions à l'extrémité C-terminale affecte de manière importante l'expression, concordant avec les résultats que nous avons déjà publiés (Zeng et al., 2008); la plus grande instabilité résulterait de l'ajout d'une répétition supplémentaire en C-Terminal. Comme pour les ligands, l'ajout des séquences K-Coil dans

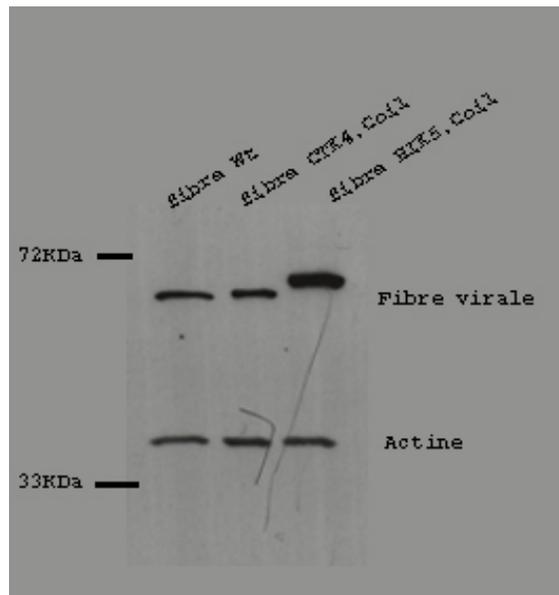


Figure 20 : Niveau d'expression des différentes fibres virales.

Les protéines ont été dosées puis diluées dans du tampon de chargement contenant 20 mM de DTT. 30 μ g de protéines ont été chargés et séparés selon leur poids moléculaire. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, laquelle a été ensuite bloquée. Un anticorps primaire contre la fibre dilué 1 dans 500, de même qu'un anticorps primaire contre l'actine dilué 1 dans 10 000 ont été utilisés, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire couplé à la HRP dilué 1 dans 3000. Les bandes ont été révélées en présence d'ECL, puis exposées à un film KODAK pendant 30 secondes.

la fibre altère son patron de migration (Figure 20). De plus, les niveaux d'expression sont similaires lorsque les fibres virales sont comparées les unes avec les autres en présence d'un contrôle β -actine (Figure 20). Finalement, les figures 19 et 20 montrent que

l'expression et la trimérisation ne sont pas affectées par l'ajout des modifications au niveau du domaine AB, étant donné que la fibre contenant 4 répétitions du K-Coil qui a été utilisée possédait déjà une mutation dans son domaine AB.

3.2.2 Essai d'interaction entre les différentes fibres possédant le domaine K-Coil et les différents ligands

Les fibres virales sauvages comme les K4m et HIK5 Dm peuvent être produites à des quantités équivalentes dans des cellules de mammifère. Par ailleurs, plusieurs de ces fibres modifiées n'ont aucun problème à trimériser dans des conditions non dénaturantes. Pour s'assurer que le système d'interaction pouvait fonctionner dans des particules virales, il fallait montrer que le positionnement spatial des domaines d'interaction dans les fibres virales ou dans les ligands bispécifiques n'affectait pas leur capacité à interagir. Pour vérifier cette hypothèse, les ligands bispécifiques contenant le domaine E5-Coil ont été immobilisés dans les puits d'une plaque ELISA de 96 puits. Les différentes fibres ont ensuite été ajoutées aux puits appropriés. L'interaction a été démontrée en ciblant la fibre virale à l'aide d'un anticorps spécifique, puis en utilisant un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline. L'augmentation de l'intensité dans les conditions expérimentales comprenant à la fois le ligand et la fibre, contrairement à ce que l'on peut observer dans les différentes conditions contrôles, permet de conclure qu'il y a une interaction entre les deux domaines. Cette interaction peut-être observée, non seulement avec l'EGF-E5-Coil (Figure 21a), mais aussi avec l'IGF-E5 (Figure 21b), ainsi qu'avec l'AFAI-E5-Coil (Figure 21c). L'intensité obtenue, pour la fibre contenant 5 répétitions du K-Coil dans la boucle HI en

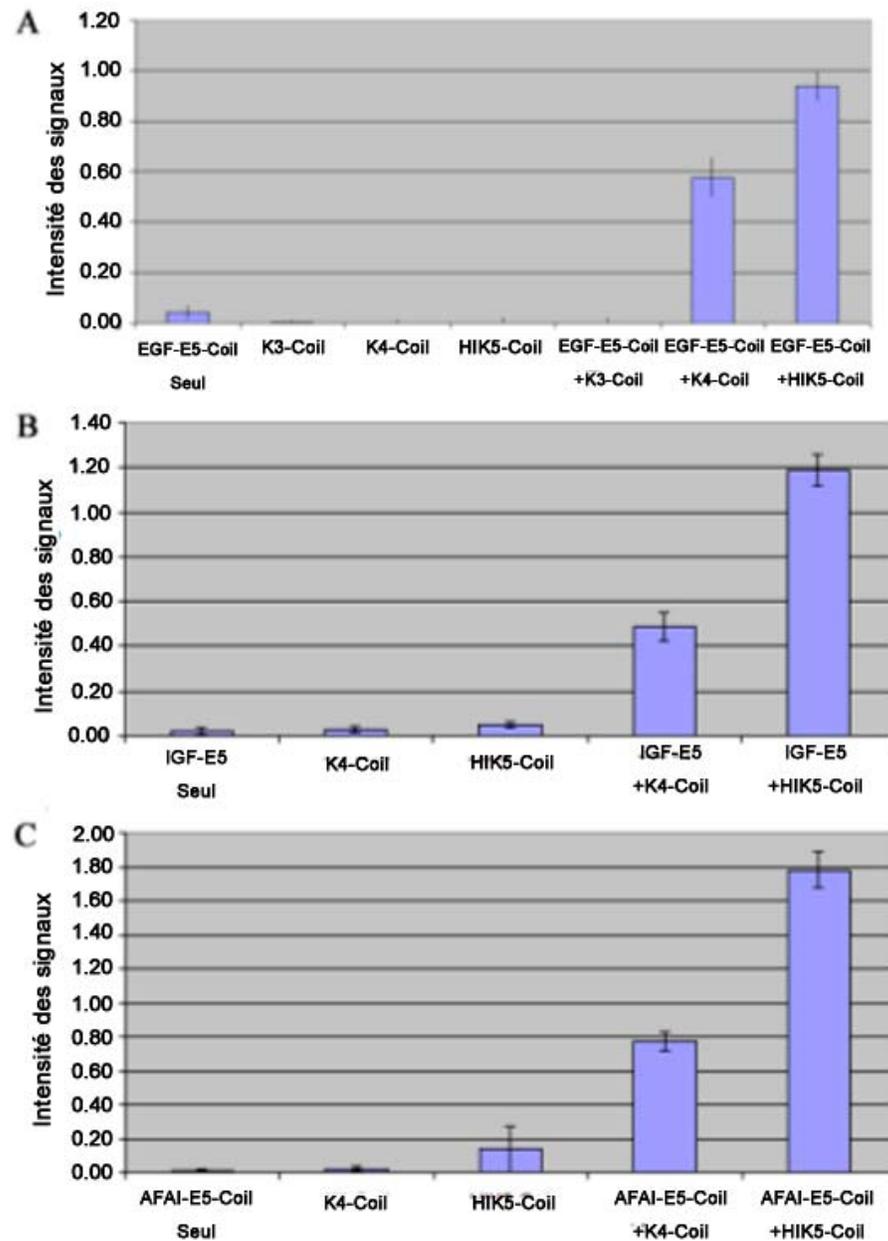


Figure 21 : Validation de l'interaction entre les domaines d'interaction retrouvés sur les fibres virales modifiées et les différents peptides bispécifiques.

L'EGF-E5-Coil (n=6) (A), l'IGF-E5 (n=9) (B) et l'AFAI-E5-Coil (n=6) (C) ont été utilisés pour couvrir les puits d'une plaque 96 puits. Les sites non spécifiques ont été bloqués, puis 300 ng de lysat protéique contenant les fibres virales modifiées ont été ajoutés dans les puits appropriés. L'interaction a été mesurée en procédant à l'ajout d'un anticorps primaire dirigé contre la fibre dilué 1 dans 500, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué 1 dans 1000. 50 μ L du substrat p-nitrophenyl phosphate (PNPP) ont été ajoutés dans chacun des puits et la réaction enzymatique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405nm.

présence d'IGF-E5, atteint 1.19, tandis que la valeur obtenue pour la fibre contenant 4 répétitions du K-Coil est de 0.475. Ces résultats démontrent que le domaine contenant 5 répétitions possède une force d'interaction plus importante que le K4. Des valeurs de 0.577 et de 0.77 ont été obtenues pour la fibre avec 4 répétitions tandis que la fibre avec 5

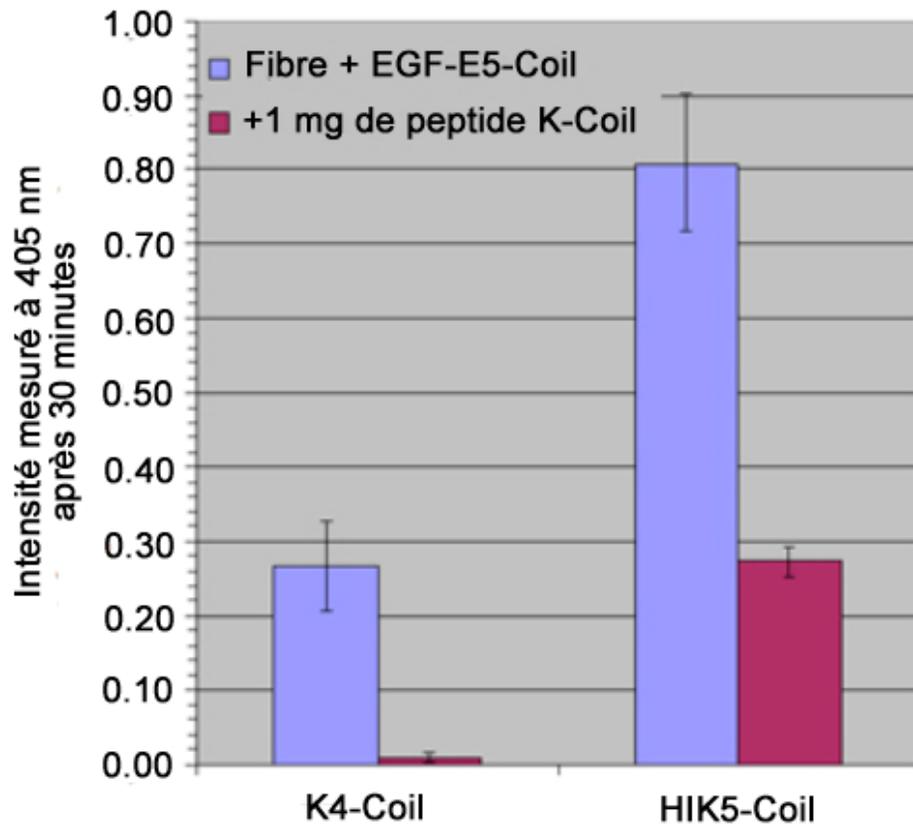


Figure 22 : Démonstration de la spécificité du système d'interaction K-Coil et E-Coil
 L'EGF-E5-Coil (n=3) a été utilisé pour couvrir les puits d'une plaque 96 puits. Les sites non spécifiques ont été bloqués. Par la suite, 300 ng de lysat protéique contenant les fibres virales modifiées ont été ajoutés dans les puits appropriés, avec ou sans la présence de 1mg de peptide K-Coil non-associé. L'interaction a été mesurée par l'ajout d'un anticorps primaire, dirigé contre la fibre et dilué 1 dans 500, puis par une incubation avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline et dilué 1 dans 1000. 50 μ L de substrat PNPP ont été ajoutés dans chacun des puits et la réaction enzymatique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm.

répétitions avaient des valeurs de 0.938 et de 1.78, pour les peptides EGF-E5-Coil et l'AFAI-E5-Coil respectivement. Les forces d'interaction entre les domaines avaient déjà été mesurées par une approche faisant appel au SPR (BiaCore), où les différents complexes K-Coil/E-Coil avaient été comparés (De et al., 2003). La fibre virale possédant trois répétitions dans le domaine C-terminal a aussi été évaluée en présence du ligand EGF-E5-Coil (figure 21a). L'intensité observée pour cette condition expérimentale montre qu'il n'y a pas eu d'interaction entre le K-Coil et l'E-Coil. Une explication serait que l'interaction entre les deux domaines, soit le K3-Coil et l'E5-Coil, n'est pas suffisamment forte pour permettre la formation d'un signal dans notre essai ELISA. Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus par SPR (De et al., 2003). Il est possible, par contre, que l'absence de signal soit causée par un mauvais positionnement du domaine d'interaction sur la fibre virale.

Pour valider le postulat selon lequel l'augmentation d'intensité serait causée par l'association entre l'E-Coil du ligand et le domaine K-Coil de la fibre, un peptide K-Coil non associé a été ajouté dans une série d'expérience. Les résultats présentés à la figure 22 démontrent que l'ajout de 1 mg de peptide K-Coil non-associé peut réduire l'interaction entre les deux partenaires. Ceci confirme qu'il y a une association entre les différents ligands et les fibres modifiées.

Sachant que chaque ligand peut lier son récepteur, nous avons décidé de construire nos virus modifiés. D'une part, nous devons évaluer si les fibres virales modifiées pouvaient être incorporées dans les particules virales sans affecter leur production. Ensuite,

nous devons déterminer s'il était possible d'accroître l'efficacité de transduction dans différentes lignées arborant les récepteurs cellulaires ciblés, dont l'IGF-IR, l'EGF-R et le CEA6. Seules les fibres possédant 4 répétitions en C-Terminal et 5 répétitions dans la boucle HI ont été utilisées pour générer des virus car elles avaient toutes les caractéristiques essentielles à la fibre virale, à savoir une expression équivalente à une fibre sauvage et la capacité de trimériser.

3.3 Production, amplification et purification des différents virus

3.3.1 Évaluation de la lignée 293E pour l'amplification des virus avec un domaine d'interaction K-Coil

Pour valider la possibilité d'induire un changement de tropisme à l'aide de nos différents ligands, les virus arborant une fibre avec 4 répétitions du K-Coil en C-terminal et avec 5 répétitions de K-Coil dans la boucle HI ont été générés. Les

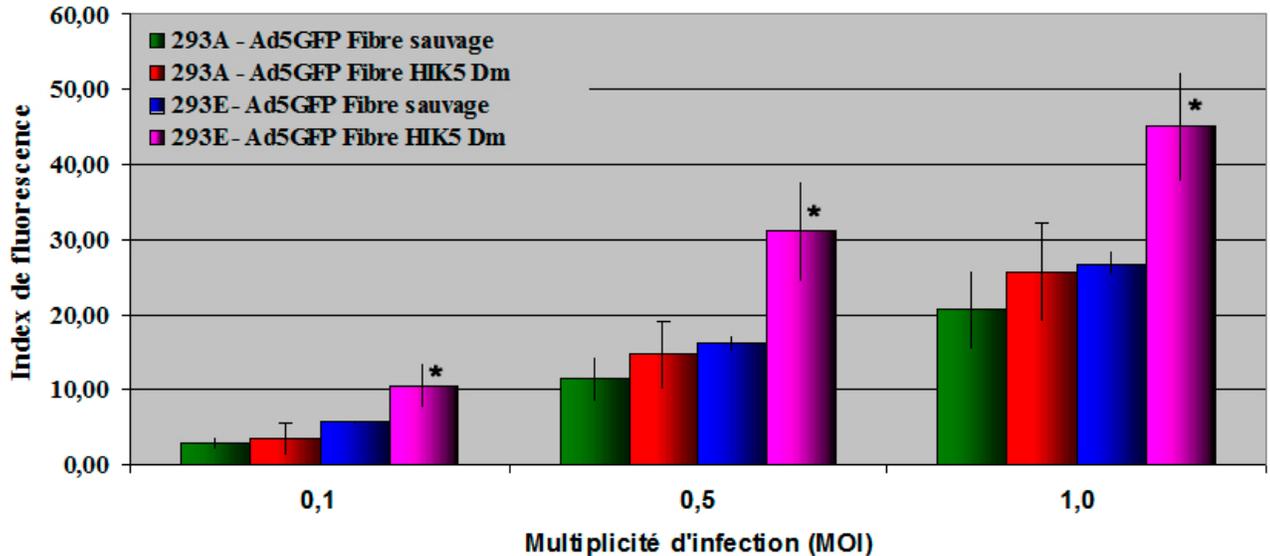


Figure 23 : Avantage de la lignée de complémentation 293E chez les virus arborant le domaine d'interaction K5-Coil.

Les 293E ont été dénombrées puis infectées avec des multiplicités d'infection de 0.1, 0.5 et 1.0, par les virus Ad5GFP fibre sauvage ou par les virus Ad5GFP fibre HIK5 Dm (n=9). Les cellules ont été infectées pendant 24 heures puis analysées par cytométrie de flux pour l'expression de la GFP. L'index de fluorescence des différentes multiplicités a été comparé. * L'augmentation est significative comparé avec les 293A infectés avec les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm.

séquences encodant les différentes fibres modifiées ont été incluses dans le vecteur pAdeasy[®], suite à une recombinaison homologue entre le vecteur linéarisé contenant la séquence de la fibre modifiée et le vecteur pAdeasy[®]. Après vérification, le nouveau vecteur plasmidique a été linéarisé par PacI et transfecté dans des 293A. Les cellules ont été divisées et recouvertes d'agarose pour permettre la formation de plaque de lyse contenant théoriquement des virus purs. Plusieurs plaques de lyse ont été piquées et les différents virus ont été amplifiés sur des cellules 293E pour permettre la propagation des particules virales. La lignée cellulaire de complémentation 293E exprime un pseudo-récepteur contenant la queue cytoplasmique de l'EGF-R mais dont la portion extracellulaire a été tronquée et remplacée par une séquence comprenant 5 répétitions du E-Coil (Zeng et al., 2008). Il a été montré que cette lignée de complémentation avait un avantage pour permettre

l'amplification des particules virales ayant une altération au niveau du domaine AB. En effet, le virus qui arbore une fibre possédant 4 répétitions à l'extrémité C-terminale a une augmentation d'infectivité d'environ deux fois par rapport à la lignée parentale (Zeng et al., 2008). Pour s'assurer que le modèle était fonctionnel avec d'autres virus modifiés, l'infectivité des particules virales arborant 5 répétitions du K-Coil dans la boucle HI, en plus de deux mutations abolissant l'interaction avec le CAR, a été comparée entre les 293A et la lignée de complémentation 293E. La figure 23 montre que la présence du pseudo-récepteur favorise les particules virales ayant le domaine K-Coil, en doublant l'index de fluorescence à une MOI de 0.5 et de 1.0. Étant donné que les cellules peuvent propager le virus, l'expression de la GFP a été évaluée après 24 heures, suite à l'infection des cellules. Les résultats obtenus suggèrent que la lignée de complémentation 293E serait meilleure pour permettre l'amplification des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. L'une des raisons est que l'amplification du virus pourrait être faite avec des multiplicités d'infection inférieures à celles qui seraient employées dans la lignée parentale, à cause de l'interaction entre le pseudo-récepteur de la lignée 293E et la fibre arborant le K-Coil.

3.3.2 Amplification des différentes particules virales

Pour permettre d'effectuer des expériences reproductibles, il fallait purifier les différents virus qui allaient être utilisés au cours des expériences *in vitro* et *in vivo*. La méthode de purification classique consiste à séparer les particules virales en fonction de leur densité sur des gradients de chlorure de césium (CsCl). Cette méthode est couramment utilisée et elle permet l'obtention d'excellentes concentrations pour des virus de première

génération. Elle consiste à appliquer une force de 100 000Xg par centrifugation sur les particules virales à purifier en présence d'un gradient discontinu ou continu de CsCl. Le virus se déplace en fonction de sa densité dans le gradient pour se séparer du contenu génomique et des protéines cellulaires. La méthode permet une séparation entre les capsides vides, dites immatures, et les capsides virales qui sont matures (Ostapchuk and Hearing, 2005). Le CsCl est ensuite éliminé par l'utilisation d'une colonne de dessalage ou par l'utilisation de sac à dialyse. Le nombre de particules virales totales est mesuré par spectrophotométrie en évaluant la valeur à 260 nm qui représente le contenu génomique (Croyle et al., 2001). Les particules virales infectieuses sont analysées par cytométrie de flux, suite à l'infection d'une quantité précise de cellules avec différentes concentrations de virus. La relation entre le pourcentage de cellules infectées et la concentration utilisée permet de déterminer la concentration de particules infectieuses par mL. Les particules infectieuses de chaque virus ont été titrées par cytométrie après une infection de 36 heures dans les 293E. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour mesurer la concentration en particules infectieuses, comme celle des plages de lyse. Les virus utilisés lors de nos expériences doivent être analysés de la même manière pour éviter les fluctuations entre les différentes expériences.

Pour des virus de première génération, les ratios de préparation virale (particules virales totales (PVT)) en fonction du nombre de particules virales infectieuses (PVI) se situent entre 10 et 20 PVT/PVI (Mittereder et al., 1996). Dans le cas du virus contrôle Ad5GFP Fibre sauvage, la table 10 montre que son ratio est de 7.52. Cette valeur signifie que la préparation virale amplifiée est correcte et qu'elle peut être utilisée dans les

différentes expériences. L'analyse des autres virus amène des résultats différents. L'ajout du K-Coil à l'extrémité C-terminale ou dans la boucle HI, de même que les différentes mutations au niveau du domaine AB, semble avoir un impact sur les particules virales, comme on peut l'observer par l'augmentation des ratios (table 10). En effet, la valeur de 995.3 du virus ayant 4 répétitions et la valeur de 611.9 du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm démontrent que les modifications apportées à la fibre influencent la production au niveau des cellules ou lors de l'une des étapes de la purification. Néanmoins, l'ajout de 5 répétitions dans la boucle HI de la fibre sans la présence des mutations semble avoir un impact peu important sur la production des particules infectieuses (320,1 PVI par cellule), contrairement au virus possédant

Table 10 : Purification de différents virus par l'utilisation de deux gradients de CsCl consécutifs.

Conditions expérimentales *		Purification par CsCl
Ad5GFP Fibre Sauvage	Infectieuses	975 PVI/cellule
	Totales	7340 PVT/cellule
	Ratio PVT/PVI	7.52
Ad5 Tr5 GFP Fibre K4m	Infectieuses	6.44 PVI/cellules
	Totales	6410 PVT/cellules
	Ratio PVT/PVI	995.3
Ad5GFP Fibre HIK5 Wt	Infectieuses	320.1 PVI/cellule
	Totales	1633.9 PVT/cellule
	Ratio PVT/PVI	5.10
Ad5GFP Fibre HIK5 Dm	Infectieuses	5.34 PVI/cellule
	Totales	3267.9 PVT/cellule
	Ratio PVT/PVI	611.9

* Les particules infectieuses ont été titrées dans des 293E après une infection de 36 heures. Les particules totales ont été dosées par spectrophotométrie en tenant compte de la DO à 260nm

deux mutations dans le domaine AB (5,34 PVI par cellule). De plus, son ratio à proximité de 10 indique que la production virale ne semble pas être affectée par l'ajout des 5

répétitions dans la boucle HI. Pour ce qui est du virus Ad5Tr5 Fibre K4m, le nombre de particules totales par cellule est similaire à ce qui a été observé pour l'Ad5GFP Fibre sauvage. Ce résultat suggère, soit que l'impact des modifications sur la réduction des particules infectieuses pourrait être causé par une moins grande production par cellule, soit que l'effet serait associé à l'une des étapes de purification.

Pour déterminer la raison de la perte observée, nous avons mesuré la quantité de particules virales produites dans les cellules avant d'effectuer la purification. Nous voulions ainsi déterminer le ratio avant la purification et le comparer au ratio d'un virus possédant une fibre sauvage. Pour des raisons qui seront abordées dans la section 3.4, les essais servant à augmenter le ratio ainsi que la concentration des virus modifiés ont été effectués avec seulement le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm et comparés avec un virus arborant une fibre sauvage. La table 11 permet de constater que le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm avant la purification produit une quantité de particules totales équivalentes à celle du virus sauvage, montrant que la formation des capsides n'est pas affectée par les altérations apportées à la fibre. Par contre, la réduction de 1135.2 PVI à 114 PVI par cellule indique que l'ajout des mutations a un impact, soit sur l'infectivité, soit sur la stabilité des particules infectieuses. La différence du nombre de particules infectieuses avant et après purification indique que l'utilisation du CsCl n'est peut-être pas appropriée au niveau de ces particules virales. De plus, la comparaison entre avant et après la purification démontre clairement un problème de stabilité, étant donné qu'une bonne partie des particules totales est perdue. Ces résultats ont mené à l'évaluation de nouvelles méthodes de purifications pour améliorer le ratio des virus modifiés Ad5GFP Fibre HIK5 Dm.

Table 11 : Production des particules virales dans les 293E avant purification.

Conditions expérimentales		Avant purification
Ad5GFP Fibre Sauvage	Infectieuses	1135.2 PVI/cellule
	Totales	8360 PVT/cellule
	Ratio PVT/PVI	7.36
Ad5GFP Fibre HIK5 Dm	Infectieuses	114 PVI/cellule
	Totales	8640 PVT/cellule
	Ratio PVT/PVI	75.8

Les particules infectieuses ont été mesurées par cytométrie de flux après une incubation de 36 heures dans des 293E. Les particules totales ont été évaluées par l'utilisation d'un HPLC.

3.3.3 Purification des virus modifiés par différentes méthodes

Lorsque la capsid ne possède aucune modification majeure, l'utilisation de la méthode impliquant le CsCl, qui s'effectue en environ 20 heures, permet la récupération d'un ratio de particules infectieuses par particules totales tournant autour de 10. Par contre, lorsque cette méthode est appliquée au virus ayant une modification au niveau du domaine HI et AB, non seulement on obtient un ratio très élevé, mais on peut également constater la formation d'agrégats (Figure 24B); contrairement à un virus sauvage qui forme une bande homogène au travers du gradient (figure 24A). La production ayant généré des agrégats a été récoltée, et les ratios obtenus ont été présentés dans le table 10, soit un ratio de 611.9 avec une production de 5.14 particules infectieuses par cellules. On sait que la formation d'agrégats peut nuire à l'infectivité virale des particules sauvages (Huyghe et al., 1995). Ces agrégations sont généralement causées par des concentrations trop élevées de particules virales en solution (Rexroad et al., 2006). En évaluant la production du virus Ad5GFP Fibre

HIK5 Dm, on peut déduire que l'agrégation n'a pas été causée par une trop grande quantité de particules virales, considérant qu'un virus sauvage ayant des quantités équivalentes ne génère pas d'agrégats sur CsCl.

Ayant émis l'hypothèse que la purification pouvait être une cause majeure de la perte d'infectivité, suite à l'agrégation des particules virales, une nouvelle alternative a été évaluée. Il a été montré qu'en utilisant un composé non ionique, l'iodixanol, il était possible de purifier différents types de virus de même que d'augmenter l'efficacité de la purification de particules adénovirales modifiées (Peng et al., 2006). En utilisant une méthode dérivée du protocole lié à l'iodixanol, le virus modifié Ad5GFP Fibre HIK5 Dm a été purifié. La figure 24 montre la différence de profil au niveau de l'ultracentrifugation des bandes virales qui ont été obtenues lors de la purification d'une préparation d'Ad5GFP Fibre sauvage ou de virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Les photos montrent clairement que l'ultracentrifugation des lysats viraux sur un gradient discontinu d'iodixanol ne forme pas d'agrégats. En fait, le profil de centrifugation observé pour le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm est similaire à celui obtenu pour un virus arborant une fibre sauvage (Figure 24C et D).

La méthode par iodixanol a plusieurs avantages, dont celui d'être plus rapide à exécuter, soit environ 8 heures au lieu de 20 heures. L'impact mineur de l'iodixanol sur les particules virales peut permettre de combiner plusieurs préparations virales et augmenter la concentration par mL dans des productions qui produisent très peu de particules infectieuses par cellules. De plus, comme l'utilisation de deux gradients de CsCl sert à augmenter la pureté des préparations virales, l'utilisation de deux gradients d'iodixanol

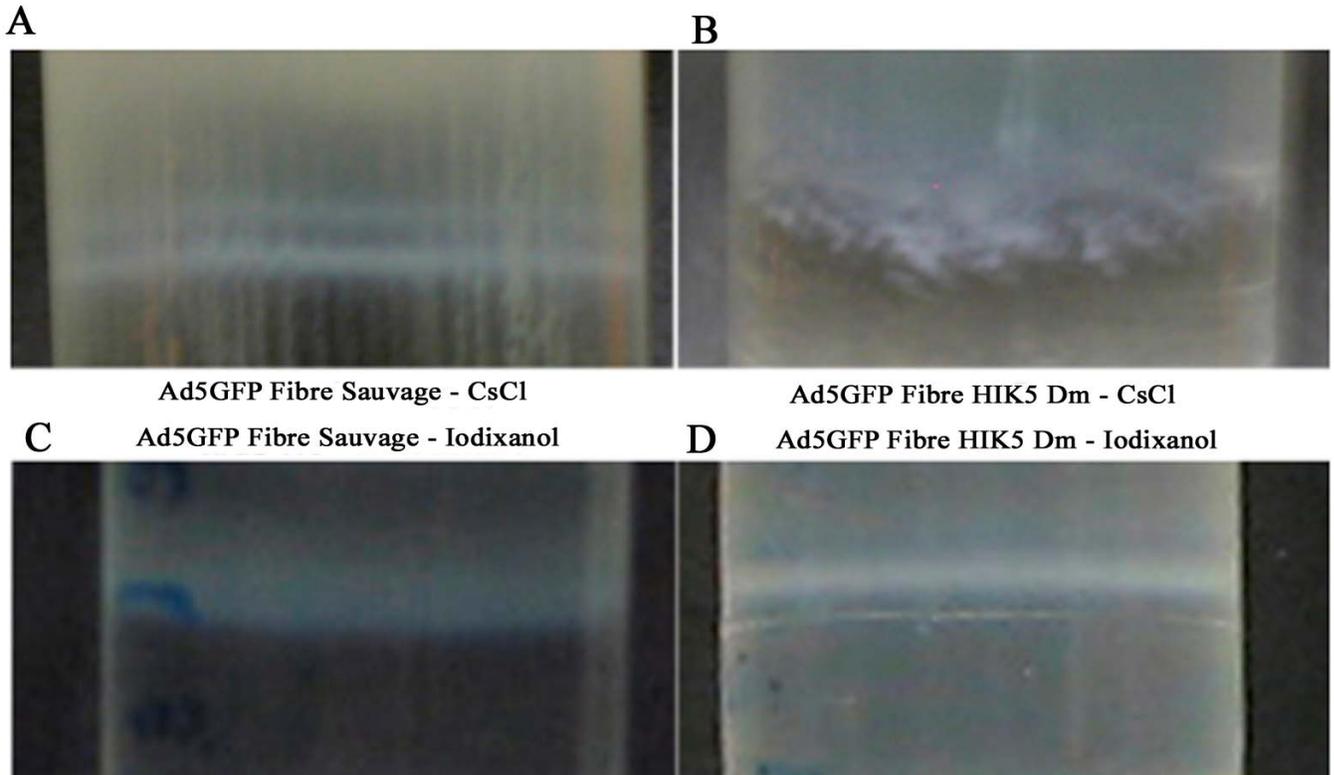


Figure 24 : Purification de particules virales sur différents gradients.

Les extraits viraux ont été déposés sur un gradient discontinu de chlorure de césium (A et B) ou sur un gradient discontinu d'iodixanol (C et D). Suite à leur centrifugation respective, les tubes ont été photographiés.

consécutifs permet de réduire les contaminants génomiques et protéiques (figure 25). En effet, les pics retrouvés à 12 minutes représentent les contaminants protéiques des préparations, tandis que ceux retrouvés entre 18 et 22 minutes représentent les contaminants génomiques. Suite à la deuxième purification, la dimension des pics apparaît beaucoup moins importante, ce qui démontre que l'échantillon analysé contient moins de contaminants. La technique employant l'iodixanol présente, cependant, quelques désagréments au niveau de certaines expériences, dont les essais de changement de tropisme. La nature du composé fait qu'il est difficile d'éliminer la solution par des colonnes de dessalage et sa forte absorbance à 280 nm empêche l'utilisation d'un

spectrophotomètre pour mesurer le nombre de particules totales. Par conséquent, le nombre de particules totales des préparations contenant de l'iodixanol a dû être analysé par HPLC. Le HPLC, associé à une colonne d'échange d'anion, permet de lier les particules virales et de les éluer à un temps précis, en effectuant un gradient de NaCl. Une lecture à 280 nm et à 260 nm est alors effectuée pour mesurer les quantités de particules virales totales. Étant donné la forte absorbance de l'iodixanol, plusieurs volumes de colonne ont été passés pour permettre d'éliminer le maximum d'iodixanol des échantillons (Figure 25). La quantité de virus est déterminée en calculant l'aire sous la courbe de chacun des pics obtenus autour de 13 minutes sur les profils. Lors de l'expérience, pour s'assurer que le pic représente bien les particules virales, on calcule le ratio 260/280, dont la valeur doit être à proximité de 1.2 (Klyushnichenko et al., 2001).

Pour faire la preuve que le protocole utilisant l'iodixanol était aussi efficace que celui faisant appel aux gradients de CsCl, des quantités initiales équivalentes de virus de première génération arborant une fibre sauvage ont été purifiées par l'une ou l'autre des méthodes. Les niveaux de récupération entre les particules produites dans les cellules et ceux mesurés après les différentes méthodes de purification ont été évalués par TCID₅₀. Les valeurs sont résumées dans la table 12. L'analyse des ratios montre un ratio de 2.91 après purification, pour la purification sur CsCl, tandis que la purification par iodixanol a permis l'obtention d'un ratio de 3.53. La différence de ratio observée dans la table 12, comparée à ce qui avait été obtenu dans les tables 10 ou 11, a possiblement été causée par l'utilisation d'une autre méthode de titration (TCID₅₀ au lieu de la cytométrie de flux) pour mesurer le nombre de particules infectieuses. Ces ratios étaient similaires aux ratios qui avaient été

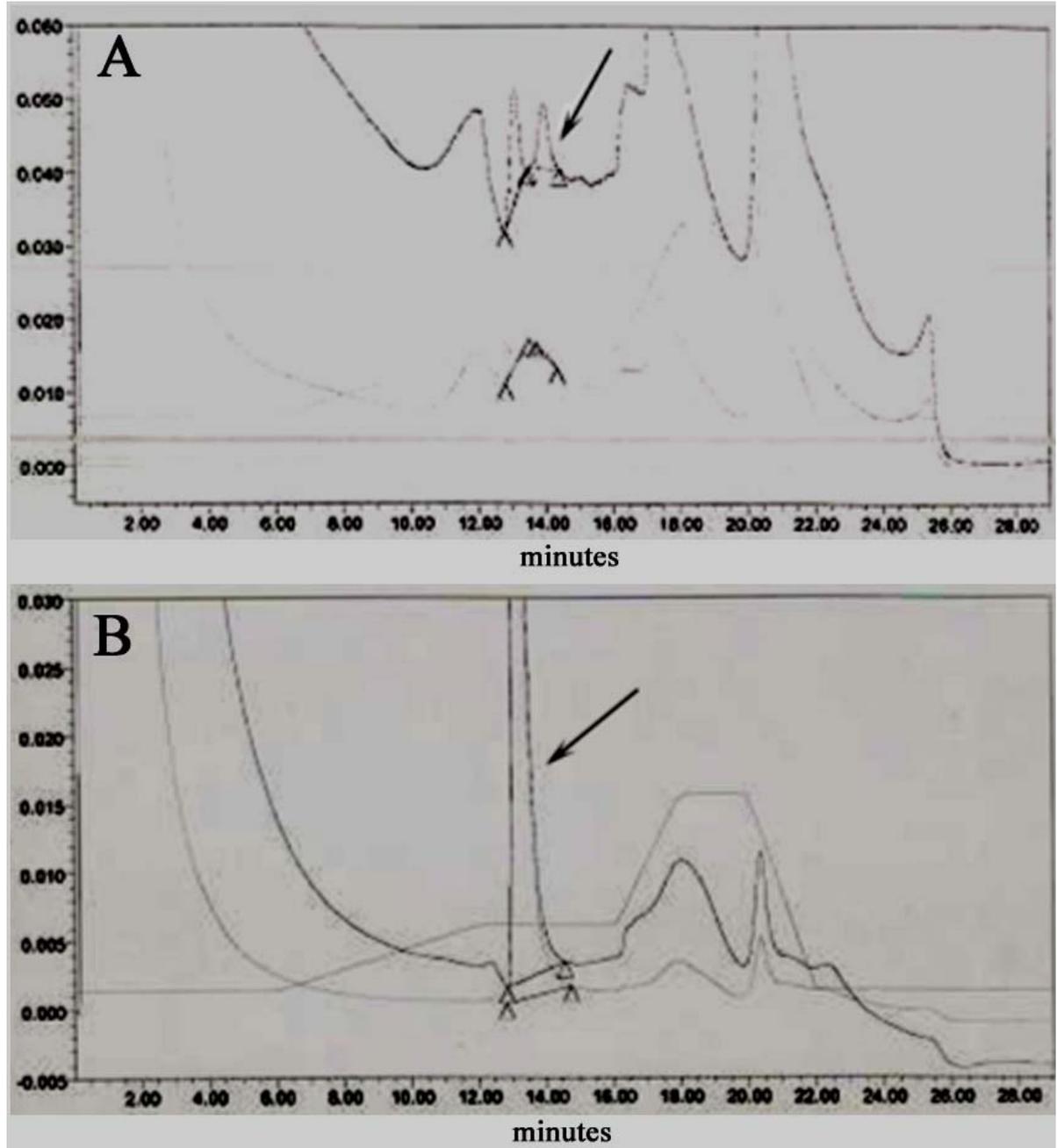


Figure 25 : Quantification des particules totales par HPLC.

50 μ L d'extraits viraux purifiés par du iodixanol provenant, soit d'une préparation (A), soit de 6 productions combinées après une deuxième purification (B), ont été dilués dans 450 μ L de PBS, puis centrifugés à 6700Xg pendant 2 minutes. Les extraits ont été passés sur un filtre de 40 μ m et déposés dans un tube à HPLC. Les virus ont été injectés dans la colonne et analysés en suivant le protocole EMP UNOQ_Ad5_140910ext, généré pour effectuer un lavage de 10 minutes avant d'appliquer le gradient de NaCl. Les flèches indiquent le positionnement des pics représentant l'adénovirus.

Table 12 : Purification de virus possédant une fibre virale sauvage en utilisant deux approches différentes soit: le CsCl et l'iodixanol.

Conditions expérimentales		Avant purification	Après purification	Taux de récupération
Purification avec du CsCl	Infectieuses	4.92×10^{12}	1.29×10^{12}	26.2%
	Totales	9.85×10^{12}	3.75×10^{12}	38.1%
	Ratio	2.00	2.91	
Purification avec l'iodixanol	Infectieuses	2.42×10^{12}	1.70×10^{12}	70.2%
	Totales	1.08×10^{13}	6.00×10^{12}	55.5%
	Ratio	4.46	3.53	

Les particules infectieuses ont été mesurées par TCID₅₀ après une incubation de 7 jours dans des 293E. Les particules totales ont été évaluées par l'utilisation d'un HPLC.

obtenus dans les extraits totaux avant purification. Ces résultats dénotent qu'il n'y a pas de changement majeur entre l'une ou l'autre des méthodes de purification. La différence entre les deux méthodes se trouve, en fait, au niveau du pourcentage de récupération des particules totales et infectieuses. Même si la production est très similaire, l'iodixanol permet de récupérer au-dessus de 50% des particules totales, tandis que le chlorure de

Table 13 : Taux de récupération entre un virus sauvage et un virus modifié en utilisant l'iodixanol.

Conditions expérimentales		Après purification	
		Particules	Particules/cellule
Ad5GFP Fibre Sauvage	Infectieuses	6.88×10^{10}	550.4 PVI/cellule
	Totales	1.40×10^{12}	11 200 PVT/cellule
	Ratio	20.3	
Ad5GFP Fibre HIK5 Dm	Infectieuses	1.47×10^{10}	88.2 PVI/cellules
	Totales	4.97×10^{11}	2982 PVT/cellules
	Ratio	33.8	

Les particules infectieuses ont été mesurées par cytométrie de flux après une incubation de 36 heures dans des 293E. Les particules totales ont été évaluées par l'utilisation d'un HPLC.

césium a seulement permis de récupérer en dessous de 38.1% des particules virales totales. La différence majeure se trouve donc au niveau des particules infectieuses. En effet, l'iodixanol permet un taux de récupération de 70.2%, contrairement au 28% obtenu par CsCl. On peut s'attendre à un meilleur ratio avec l'iodixanol, étant donné qu'une plus grande quantité de particules infectieuses a été récupérée, et ce, bien que la méthode utilisée n'ait pas permis la séparation entre les particules matures et immatures, comme le protocole employant le CsCl le permet. Néanmoins, les pourcentages élevés de particules infectieuses récupérées peuvent présenter plus d'intérêt, dans le cas des virus ayant une faible production de particules infectieuses par cellule, comme les virus possédant les fibres modifiées.

Semblant avoir un avantage intéressant pour les virus arborant une fibre sauvage, la méthode utilisant l'iodixanol a été évaluée dans le cas des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Si l'on compare les valeurs de la table 13 avec celles obtenues dans la table 10, on s'aperçoit que les niveaux du virus Ad5GFP Fibre sauvage sont relativement similaires, confirmant les résultats qui avaient été observés dans les expériences précédentes. Notons, au passage, que l'utilisation de l'iodixanol a tout de même permis de gagner une journée de travail. Par contre, il apparaît que, lorsque le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm est purifié en utilisant l'iodixanol, il n'a pas d'agrégation comme il a été présenté dans la figure 24D. De plus, une augmentation du nombre de particules infectieuses/cellule peut être obtenue. Pour être précis, les purifications par CsCl permettaient, dans les meilleurs cas, d'avoir 5.14 PVI/cellules, tandis que la purification sur iodixanol permet d'obtenir des concentrations de 88.2 PVI/cellules.

Le système de changement de tropisme étant dépendant de l'accessibilité du domaine K-Coil, il a fallu vérifier si l'iodixanol n'avait pas un impact sur les particules virales et le système en général. Pour vérifier cette hypothèse, des 293A et 293E ont été infectées par des particules infectieuses, à l'aide d'une multiplicité d'infection de 1, en comparant les purifications qui ont été effectués par iodixanol ou par CsCl. Les virus qui ont été purifiés par iodixanol n'ont pas semblé réagir de la même manière que ceux qui avaient été purifiés par CsCl. Aucune différence n'a été observée suite à l'infection des

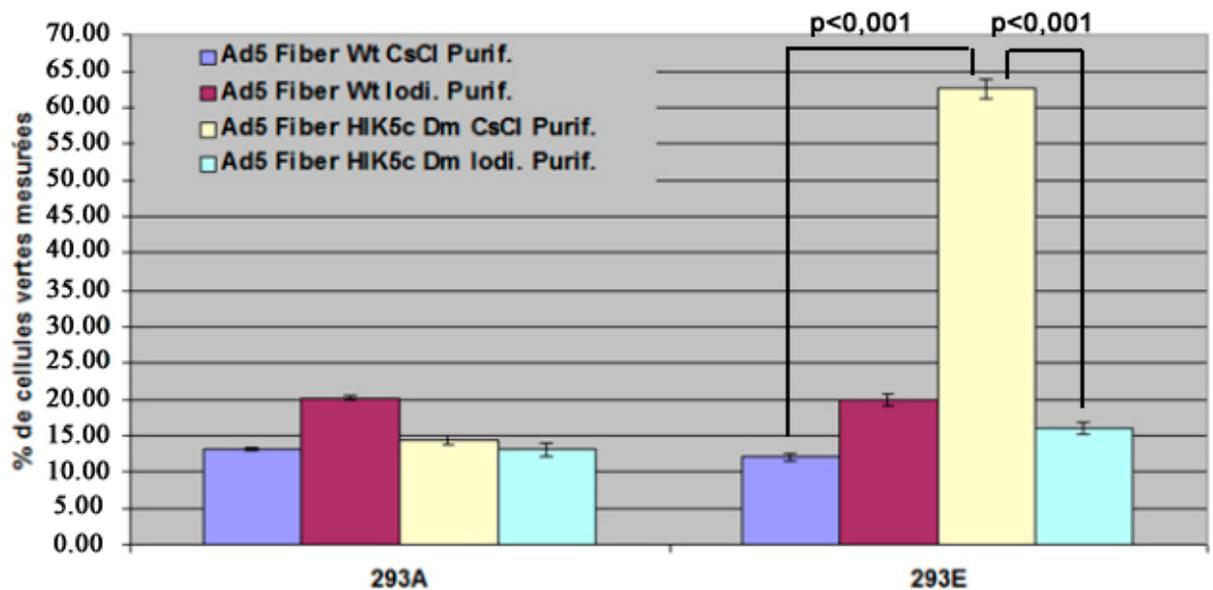


Figure 26 : Impact de l'iodixanol sur l'infectivité dans les 293E.

Les cellules 293A ou 293E ont été infectées avec des particules infectieuses à une MOI de 1 (n=3). Les cellules ont été incubées en présence du virus pendant 24 heures, décollées puis fixées en présence de formaldéhyde 2%. Les cellules ont été filtrées et l'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux dans les différentes conditions expérimentales. Les différences observées sont statistiquement significatives suite à l'évaluation des valeurs par un test statistique de student.

293A, que ce soit avec le virus Ad5GFP Fibre sauvage ou avec les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm comme prévu. Pour le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm purifié à l'aide d'un gradient de CsCl, nous avons pu observer une augmentation similaire à ce qui avait été obtenue auparavant dans les 293E, soit une augmentation de l'infectivité de 15% à 62% (Figure 26). Par contre, le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm purifié par iodixanol infecte les cellules 293E avec une efficacité comparable à celle observée avec le virus Ad5GFP Fibre sauvage. Cette perte d'efficacité démontre que le domaine K-Coil serait non-accessible pour permettre l'interaction avec le pseudo-récepteur. Cette perte d'interaction pourrait aussi nuire à la liaison des ligands bispécifiques, pouvant donc réduire l'efficacité du système de changement de tropisme.

Pour montrer que la présence de l'iodixanol est l'élément de la purification qui interfère avec le système, différentes approches pour éliminer l'iodixanol des échantillons viraux ont été évaluées. La table 14 résume les taux de récupération des différentes méthodes testées. Ces différentes méthodes n'affectent pas les ratios de particules totales par particules infectieuses après le traitement, ce qui est positif. Les colonnes de concentration constituent une méthode qui prend énormément de temps et qui a un haut risque d'introduire des contaminants. De plus, la méthode permet de récupérer seulement 3% des particules infectieuses. Tout de même, une bonne portion de l'iodixanol peut être éliminée durant les multiples étapes de centrifugation. Pour sa part, la colonne d'échange d'anion DEAE FastFlow[®] de 1 mL, qui est l'équivalent de ce qui est utilisé lors des évaluations des particules totales par HPLC, permet d'éliminer une bonne portion de l'iodixanol (Figure 27C). En plus, le taux de récupération des particules infectieuses est de

13.7%. L'utilisation des sacs à dialyse implique plusieurs étapes pouvant entraîner l'introduction de contaminations. Par contre, leur utilisation a permis de conserver un excellent ratio et la dialyse a permis d'obtenir un taux de récupération impressionnant : au-dessus de 75%, autant au niveau des particules totales qu'infectieuses. À partir de là, la purification des différents virus aura désormais été effectuée dans l'iodixanol, suivi par une double dialyse dans des sacs à dialyse ayant une porosité de 100 kDa. Autre fait satisfaisant, l'évaluation des niveaux d'iodixanol montre que les échantillons en contiennent très peu (Figure 27B).

Table 14 : Impact des différentes approches pour éliminer l'iodixanol des échantillons de virus Ad5GP Fibre HIK5 Dm.

Conditions expérimentales		Avant traitement	Après traitement	Taux de récupération
Colonne de concentration à 2000Xg	Infectieuses	6.97×10^9	2.17×10^8	3.11%
	Totales	4.975×10^{11}	1.01×10^{10}	2.03%
	Ratio	71.4	46.5	---
Colonne Fast Flow DAEA à échange d'anion – HiTrap de 1mL	Infectieuses	6.97×10^9	9.59×10^8	13.7%
	Totales	4.975×10^{11}	7.04×10^{10}	14.2%
	Ratio	71.4	73.5	---
Dialyse à l'aide d'un tube Cutoff de 100kDa	Infectieuses	3.63×10^{10}	2.96×10^{10}	81.0%
	Totales	1.245×10^{12}	9.39×10^{11}	75.1%
	Ratio	34.3	31.7	---

Les particules infectieuses ont été mesurées après une incubation de 36 heures dans des 293E par cytométrie de flux. Les particules totales ont été mesurées par l'utilisation d'un HPLC

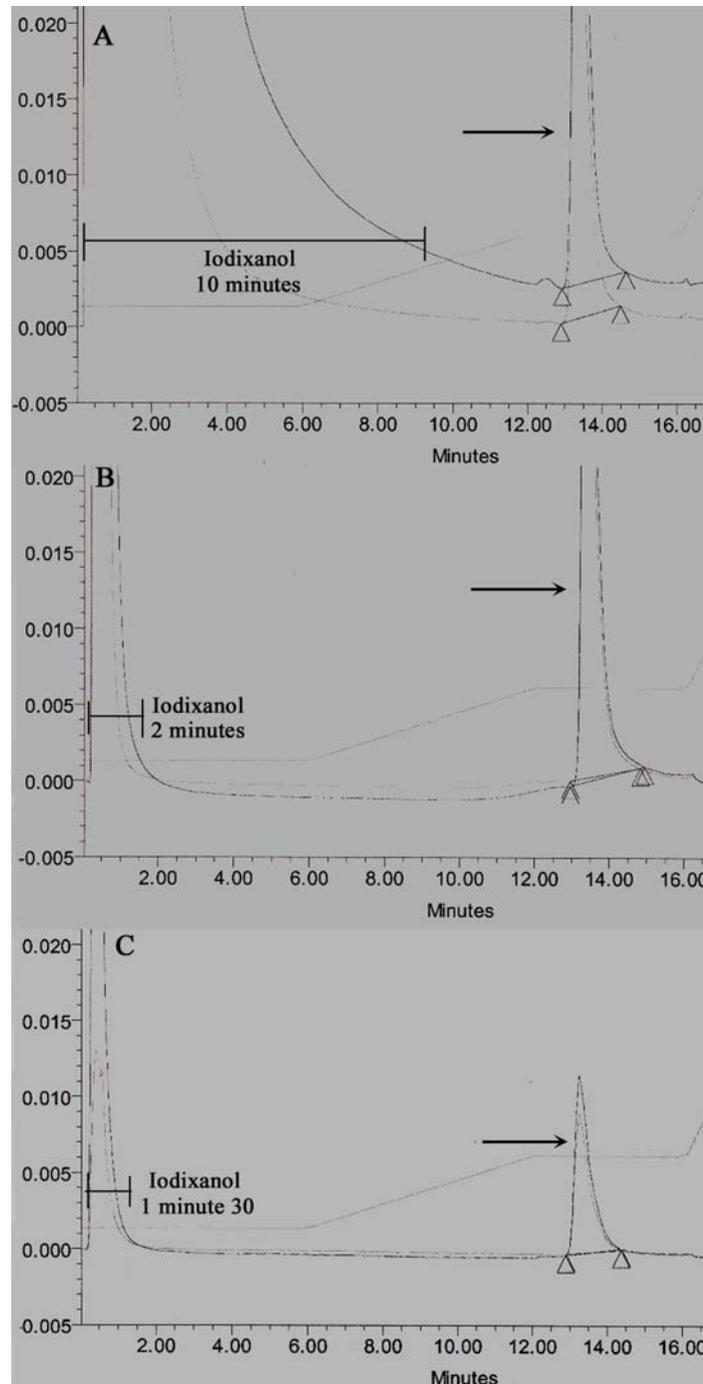


Figure 27 : Présence de l'iodixanol dans les échantillons.

Les extraits viraux purifiés par iodixanol provenant d'une préparation en présence d'iodixanol (A), purifiés par dialyse (B) ou par une colonne d'échange d'anion Fast Flow DAEA (C) ont été injectés dans la colonne du HPLC et analysés en suivant le protocole EMP UNOQ_Ad5_140910ext généré pour effectuer un lavage de 10 minutes avant d'appliquer le gradient de NaCl. L'aire sous la courbe des pics à 13 minutes (flèches noires) a été analysée pour déterminer la concentration des virus en particules totales par mL. Les pics entre 0 et 10 minutes représentent la quantité d'iodixanol dans les échantillons.

Suite à l'élimination de l'iodixanol des différents échantillons viraux, nous avons voulu déterminer si le domaine K-Coil était de nouveau accessible. Une des manières pour démontrer cette accessibilité du domaine d'interaction est d'évaluer si le tropisme des virus modifiés peut être altéré par l'ajout d'un ligand bispécifique, suite à l'élimination de l'iodixanol. Nous avons donc cherché à savoir si la dialyse réduisait suffisamment les niveaux d'iodixanol pour récupérer l'accroissement observée avec les virus purifié avec le CsCl. L'expérience a donc été effectuée en combinant $3,6 \times 10^6$ molécules d'IGF-E5 sur les différents virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm provenant des différentes purifications : ceux

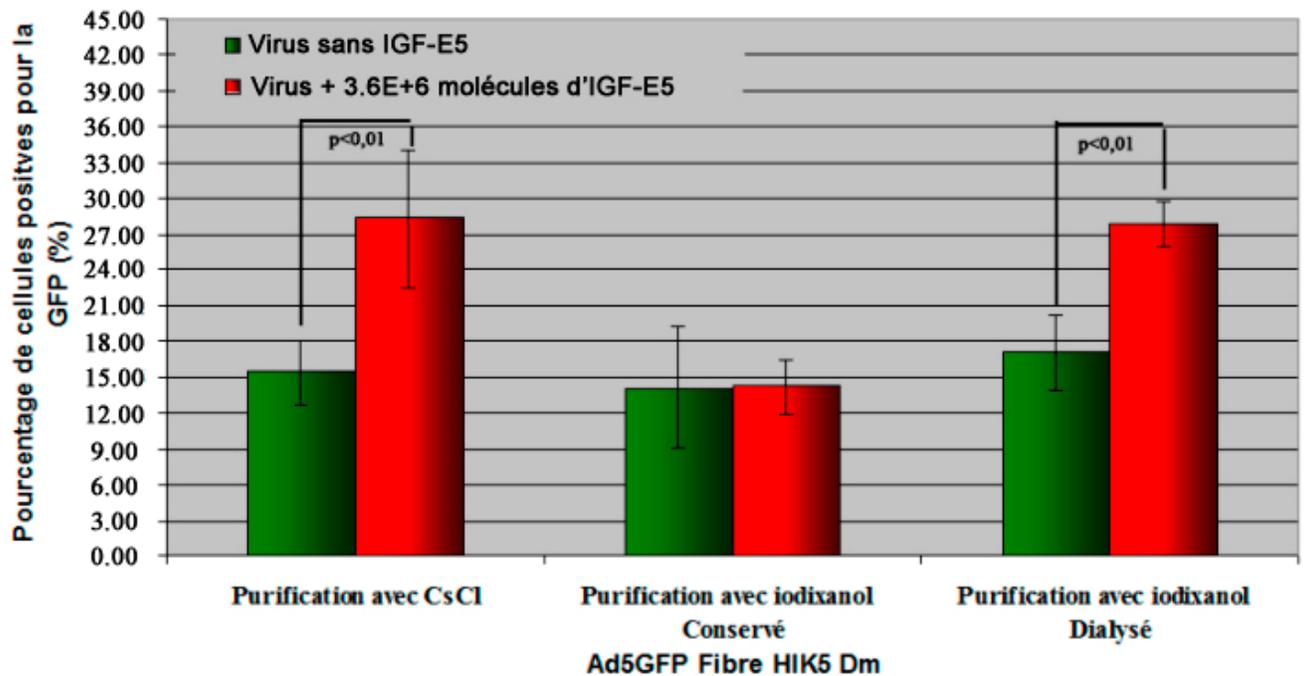


Figure 28 : Impact de la dialyse sur le changement de tropisme.

Le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm a été purifié par CsCl ou par iodixanol. Les virus purifiés en présence d'iodixanol ont été, soit conservés en présence d'iodixanol, soit dialysés pour éliminer l'iodixanol. Les U87MG ont été infectées avec des particules infectieuses à une MOI de 10, avec ou sans la présence de $3,6 \times 10^6$ d'IGF-E5. Après 96 heures, les cellules ont été décollées, fixées en présence de formaldéhyde 2%, filtrées, puis analysées pour l'expression de la GFP par cytométrie de flux. Les augmentations observées sont statistiquement significatives suite à l'évaluation des valeurs par un test statistique de student ($p < 0,01$).

purifiés par CsCl et ceux purifiés par iodixanol, avant ou après avoir éliminé l'iodixanol à l'aide des sacs à dialyse. Par la suite, les différentes préparations virales ont été comparées sur le plan de l'infectivité dans la lignée cellulaire U87MG. La figure 28 démontre, d'ailleurs, que le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dilué dans l'iodixanol perd son potentiel d'induire un changement de tropisme ce qui concorde avec les résultats présentés à la figure 26. La dialyse de l'iodixanol permet de rétablir le changement de tropisme à un niveau équivalent à ce qui était observé avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm purifié par CsCl.

3.3.4 Amplification à l'aide de monocouches de 293E ou à l'aide de cultures en suspension de 293F

L'utilisation de la lignée de complémentation 293E permet de réduire la MOI qui est utilisée pour obtenir des niveaux d'infection équivalents à ceux observés dans la lignée 293A. Par contre, la faible production en particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm par les 293E est problématique quand il faut faire de multiples productions pour obtenir une préparation virale suffisamment concentrée. En effet, pour obtenir une bonne concentration, il faut infecter au moins 50 boîtes de pétris de 15 cm avec la lignée de complémentation 293E avant d'effectuer la purification. De plus, l'infection doit être effectuée en monocouche, ce qui requiert énormément de temps et de matériel, car il faut pouvoir ensemercer, infecter et récolter les cellules infectées (environ 10 heures). Dans le but d'accroître la production, tout en réduisant le coût du matériel utilisé et le temps passé à manipuler les cellules, une approche alternative a été envisagée. La nouvelle optique

consistait à infecter des cultures de cellules 293F qui sont des cellules adaptées pour croître à haute densité, dans des conditions sans adhésion et en absence de sérum. L'utilisation de cellules en suspension a permis d'accélérer l'infection des cellules et de faciliter la production de préparation de virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. De plus, le milieu dans lequel les cellules 293F ont été adaptées ne contient pas de rouge de phénol, simplifiant les préparations qui doivent être analysées par HPLC. Les valeurs obtenues (table 15) permettent de constater que très peu de particules infectieuses sont produites dans les cellules 293E; nombre faible de 28.5 particules. Lorsque les 293F ont été utilisés, 46.2 particules infectieuses ont pu être produites par cellule. Ces résultats montrent que l'utilisation des 293F permet d'obtenir des quantités équivalentes, voire supérieures, à celles obtenues avec les 293E.

Afin d'obtenir des concentrations de particules virales utilisables *in vivo*, il a fallu combiner plusieurs productions. En effectuant celles-ci en suspension dans les cellules 293F et en les combinant avec la purification sur iodixanol, il a été possible de générer des

Table 15 : Comparaison entre différentes lignées au niveau de la production virale et de la production de particules par cellules

Conditions expérimentales		Ad5 CMVGFP Fibre HIK5.Coil
Production dans les 293E	Nombre de cellules	1.73×10^8
	Particules infectieuses	4.96×10^9
	Particules / cellules	28.5
Production dans les 293F	Nombre de cellules	3.0×10^9
	Particules infectieuses	4.62×10^{10}
	Particules / cellules	46.2

Les particules infectieuses ont été mesurées après une incubation de 36 heures dans des 293E par cytométrie de flux.

virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une concentration de 4.2×10^{10} particules infectieuses par mL avec un ratio PVT/PVI de 32.11. Pour ce qui est d'un virus Ad5GFP Fibre sauvage, la production d'un 500mL a permis de produire 2.21×10^{11} particules infectieuses par mL avec un ratio de 8.6. Par contre, la production de virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm possède 0.02% de particules répliquatives compétentes, soit 1 RCA par 4000 particules infectieuses. Contrairement aux virus modifiés, les productions de virus Ad5GFP Fibre sauvage avaient

Table 16 : Production en suspension dans les 293F et purification en utilisant l'iodixanol

Conditions expérimentales		Concentration
Ad5GFP Fibre sauvage	Particules infectieuses	2.21×10^{11} PVI/mL
	Particules totales	1.9×10^{12} PVT/mL
	Ratio	8.6
	RCA	3.0×10^2 PVI/mL
	Contamination	<0.0001%
Ad5GFP Fibre HIK5 Dm	Particules infectieuses	4.2×10^{10} PVI/mL
	Particules totales	1.35×10^{12} PVT/mL
	Ratio	32.11
	RCA	1.0×10^7 PVI/mL
	Contamination	0.02%

Les particules infectieuses ont été mesurées par cytométrie de flux après une incubation de 36 heures dans des 293E. Les particules totales ont été évaluées par l'utilisation d'un HPLC. Les RCA ont été mesurés en évaluant la formation de plaque de lyse sur des A549.

peu de RCA (moins de 0.0001%). Une particule répliquative compétente est produite, lorsque la séquence de la région E1 de l'adénovirus retrouvée dans la lignée de complémentation 293 remplace la cassette d'expression des virus qui sont amplifiés. Le transfert des séquences génétiques a lieu par recombinaison homologue lors des amplifications des particules virales. La recombinaison homologue est un événement rare,

mais les particules répliquatives peuvent prendre le dessus si trop de passages sont utilisés pour amplifier les particules virales. Pour éviter des réactions immunitaires chez les animaux, il faut conserver le nombre de RCA à de faibles niveaux.

3.4 Optimisation et changement de tropisme avec les virus arborant des fibres modifiées dans les modèles tumoraux

3.4.1 Temps d'expression optimal du transgène

Plusieurs séries d'expériences ont permis de constater que l'expression de la GFP dans les virus possédant une fibre modifiée était toujours plus faible que celle des virus encodant une fibre sauvage. Pour s'assurer que nos observations étaient effectuées au bon moment, l'expression du transgène a été mesurée pour le virus Ad5GFP Fibre sauvage et pour le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à différents temps d'incubation. Les valeurs d'expression qui ont été mesurées toutes les 12 heures ont permis d'obtenir le graphique présenté à la figure 29. Le graphique montre qu'il faut 82 heures pour permettre au virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm d'atteindre un niveau équivalent de cellules infectées. La figure 29B, représentant l'index de fluorescence en fonction du temps, démontre que les cellules infectées avec le virus Ad5GFP Fibre sauvage conservent une expression de la GFP élevée, même si le nombre de cellules positives diminue légèrement, confirmant que tous les virus pouvant infecter les cellules ont transduits des cellules. Les niveaux d'expression de virus

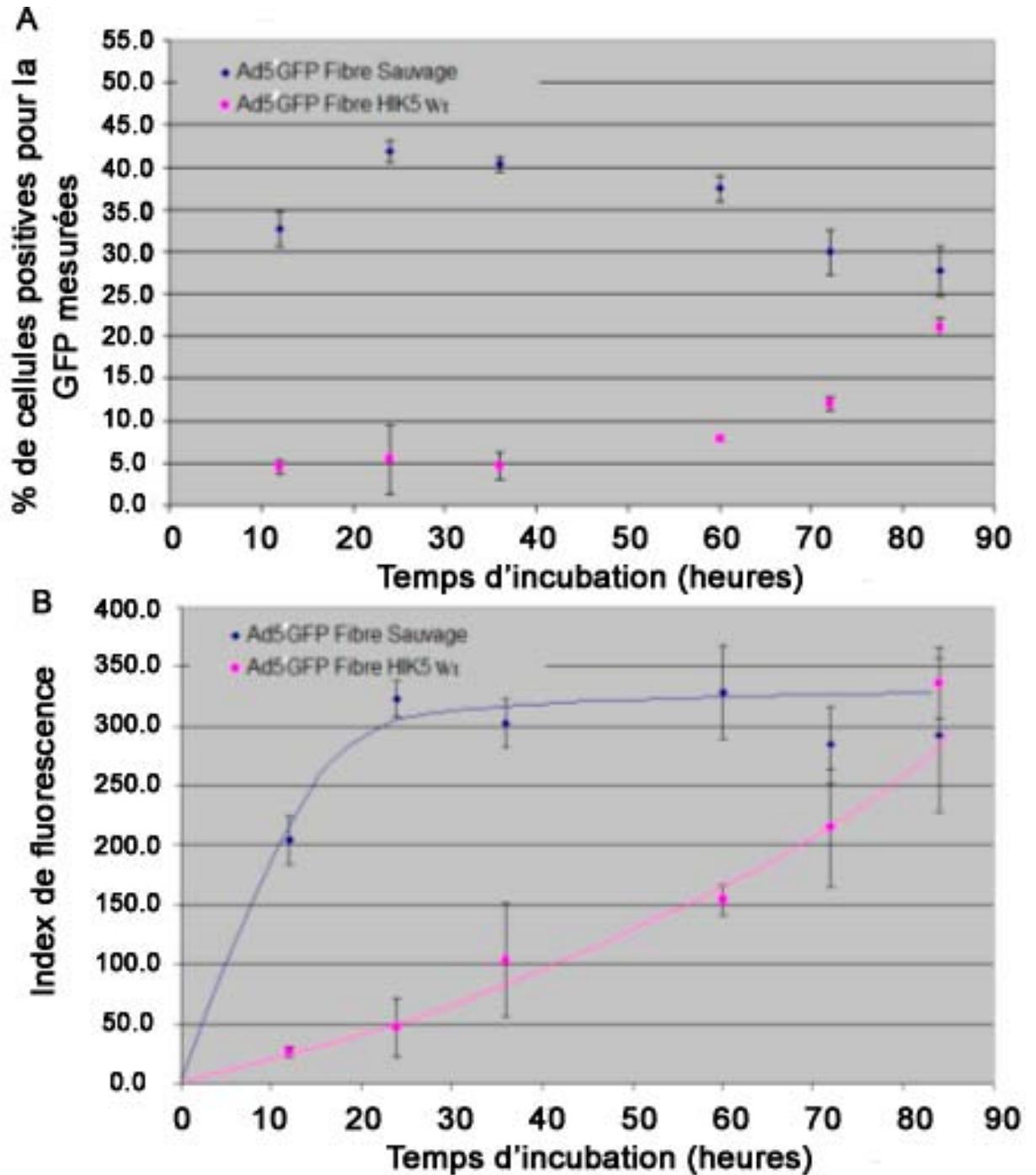


Figure 29: Variation de l'expression du transgène selon le virus utilisé.

Les A549 ont été dénombrées pour les infecter avec des particules infectieuses à une MOI de 3 (n=3). Les cellules ont été infectées à différents temps, de manière à ce qu'elles soient toutes fixées au même moment. La journée de l'analyse, les cellules ont été décollées puis fixées en présence de 2% formaldéhyde. Les cellules ont été filtrées puis analysées par cytométrie de flux.

Ad5GFP Fibre HIK5 Wt peuvent atteindre une intensité équivalente après 82 heures suivant le nombre de cellules infectées. Ces résultats démontrent que la modification apportée à la fibre virale affecte la transduction des particules durant au moins l'une des étapes du cycle viral avant la transcription du gène. En prenant en considération que le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt n'a pas la même dynamique d'infection, les expériences touchant le changement de tropisme ont été évaluées, suite à des incubations de 96 heures, pour permettre la comparaison entre les différents résultats. Certaines exceptions ont dû être faites, par contre, à cause de la sensibilité de certains types cellulaires à la présence des virus.

3.4.2 Influence du temps sur la formation des complexes

Le changement de tropisme peut s'effectuer seulement lorsqu'il y a une association entre les ligands et les fibres virales modifiées. Étant donné que nous avons deux éléments dynamiques qui peuvent s'associer et se dissocier, le temps et la concentration peuvent influencer l'efficacité du système. Le virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m a donc été incubé en présence de 3.6×10^4 molécules d'EGF-E5-Coil pendant différents temps, avant d'être transféré sur des A549tTA. Les cellules A549tTA ont été utilisées pour ce virus car l'expression de la GFP dans le génome viral est sous le contrôle d'un promoteur régulable par la tétracycline. Pour être exprimé, le transgène requiert la présence du transactivateur tTA pour avoir une expression efficace de la GFP. Dans des cellules comme les 293 où l'ADN viral est répliqué, il peut y avoir expression d'un niveau basal, même en absence du transactivateur, qui peut être détectée par cytométrie de flux. Étant donné que les A549 ne

supportent pas la réplication des virus, quelques copies du génome ne permettent pas d'avoir un niveau d'expression suffisant pour pouvoir détecter l'expression du transgène. Pour pouvoir mesurer la différence suite à l'ajout du peptide bispécifique, il est donc important d'avoir une bonne expression du transgène et, pour cette raison, la présence du transactivateur tTA est essentielle. La figure 30 démontre que le changement de tropisme peut être induit dans les A549tTA en utilisant le virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m associé à l'EGF-E5-Coil. De plus, ayant incubé le virus modifié K4m avec l'EGF-E5-Coil durant différentes périodes de temps (0, 3, 6, 18 et 24 heures), on peut constater que l'association entre le ligand et le virus s'effectue rapidement et que l'incubation n'est pas essentielle pour effectuer un changement de tropisme. En effet, l'ajout de l'EGF-E5-Coil sans incubation a pu augmenter le nombre de cellules infectées de 10%, comme montré par l'axe des Y de droite à la figure 30. En plus, l'index de fluorescence représenté par l'histogramme (axe des Y de gauche) montre que l'expression de la GFP a augmenté de 1.8 fois. Cette première expérience permet donc de conclure qu'il est possible d'induire un changement de tropisme et que le temps d'incubation n'influe pas sur la formation des complexes. De plus, le résultat montre que les virus peuvent être incubés à 37°C sans affecter l'infectivité des particules virales. Pour des raisons techniques, l'association entre les ligands et les virus est effectuée sur une période de 4 heures, de manière à pouvoir conserver une référence déjà établie entre chacune des expériences.

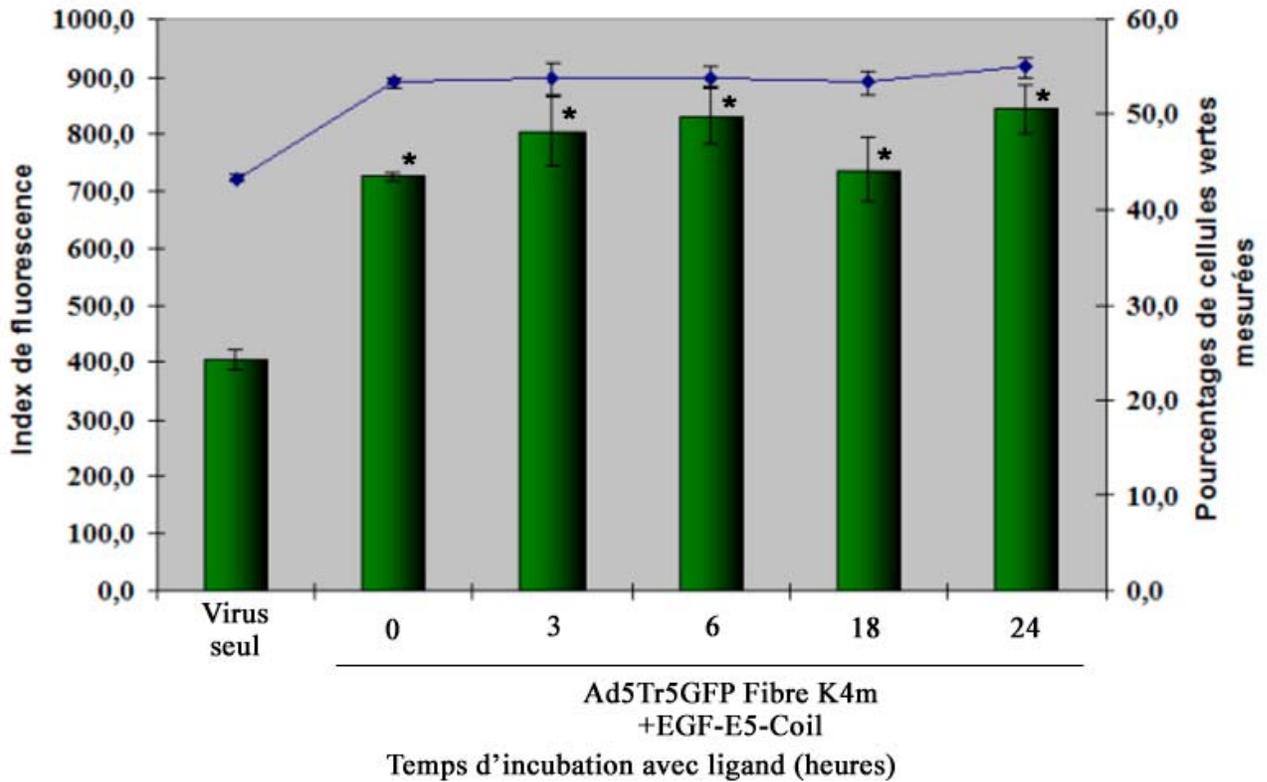


Figure 30 : Impact de la période d'incubation sur le changement de tropisme.

Les A549tTA ont été infectées avec les particules infectieuses du virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m à une MOI de 3 (n=3). Les virus ont été incubés en présence de 3.6×10^4 molécules d'EGF-E5-Coil pendant différentes périodes de temps : 0, 3, 6, 18 ou 24 heures. Les A549tTA ont été infectées avec les complexes virus:ligand, puis incubées pendant 96 heures. Les A549tTA ont été décollées, fixées en présence de formaldéhyde 2%, filtrées et, finalement, analysées par cytométrie de flux. *Les augmentations observées sont statistiquement significatives suite à l'évaluation des valeurs par un test statistique de student ($p < 0,05$).

La formation des complexes est importante pour engendrer un changement de tropisme chez les différentes particules virales. Étant donné que les purifications de particules virales génèrent des particules non infectieuses démontrées par la perte observée durant plusieurs de nos purifications, il est important de prendre en considération la présence de ces particules non infectieuses dans les calculs menant aux quantités de ligands qui devront être utilisés pour induire le changement de tropisme.

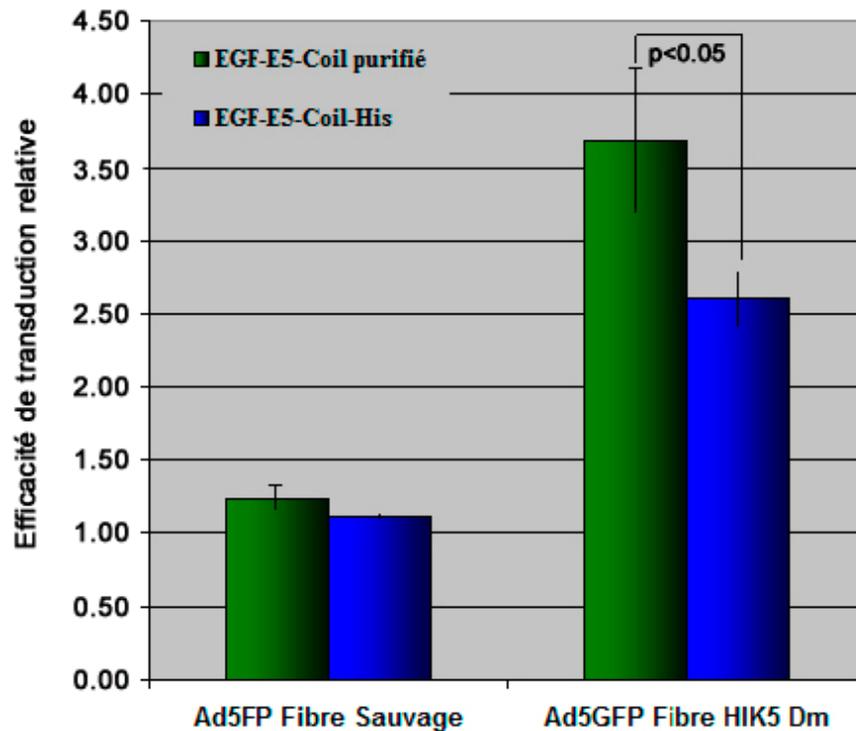


Figure 31 : Impact de la présence du His-Tag sur l'efficacité du changement de tropisme du ligand EGF-E5-Coil.

Les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été diluées pour obtenir une MOI de 5, en présence ou en absence de 3600 molécules d'EGF-E5-Coil, avec (bleu) ou sans (vert) le domaine His-Tag (n=3). Les U87MG ont été infectés et incubés pendant 96 heures. Les cellules ont été décollées, fixées en présence de 2% formaldéhyde, filtrées, puis analysées par cytométrie de flux, pour déterminer le niveau d'expression de GFP. La diminution observée est statistiquement significative suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student ($p < 0.05$).

L'utilisation du ligand EGF-E5-Coil sans le domaine His-Tag a montré qu'il pouvait induire une augmentation dans l'efficacité de transduction (Figure 30). Sachant que des étapes de purification subséquentes au repliage peuvent réduire la quantité finale produite, l'interférence du domaine His-Tag a été évaluée dans des essais de changement de tropisme (Figure 31). La figure 31 démontre que la présence du domaine His-Tag a un

impact significatif sur la capacité à augmenter l'efficacité de transduction. Ce résultat suggère qu'il est préférable d'enlever le domaine His-Tag dans le cadre des expériences impliquant le peptide bispécifique EGF-E5-Coil.

3.4.3 Changement de tropisme par l'utilisation de l'EGF-E5-Coil avec le virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m

Le premier virus à avoir été produit est le Ad5Tr5GFP Fibre K4m. Le ligand bispécifique EGF-E5-Coil a été sélectionné initialement pour montrer la possibilité d'induire un changement de tropisme. En effet, il avait déjà démontré que ce ligand avait la capacité de lier le récepteur de la même manière que le facteur de croissance EGF (Le et al., 2009). Par ailleurs, nous avons, de notre côté, constaté qu'il pouvait lier les fibres virales modifiées (Figure 21). Pour évaluer le potentiel d'effectuer un changement de tropisme, des cellules A549tTA ont été choisies car elles expriment le transactivateur à la tétracycline. Celui-ci est nécessaire à l'expression de la cassette d'expression de la GFP retrouvé dans le génome du virus. De plus, la lignée A549tTa a été choisie car cette lignée cellulaire provient d'un clone de la lignée A549 qui exprime fortement le récepteur à l'EGF (Rachwal et al., 1995)

L'infection des A549tTA a été effectuée en utilisant une MOI de 30 des virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5Tr5GFP Fibre K4m, avec ou sans l'EGF-E5-Coil (Figure 32).

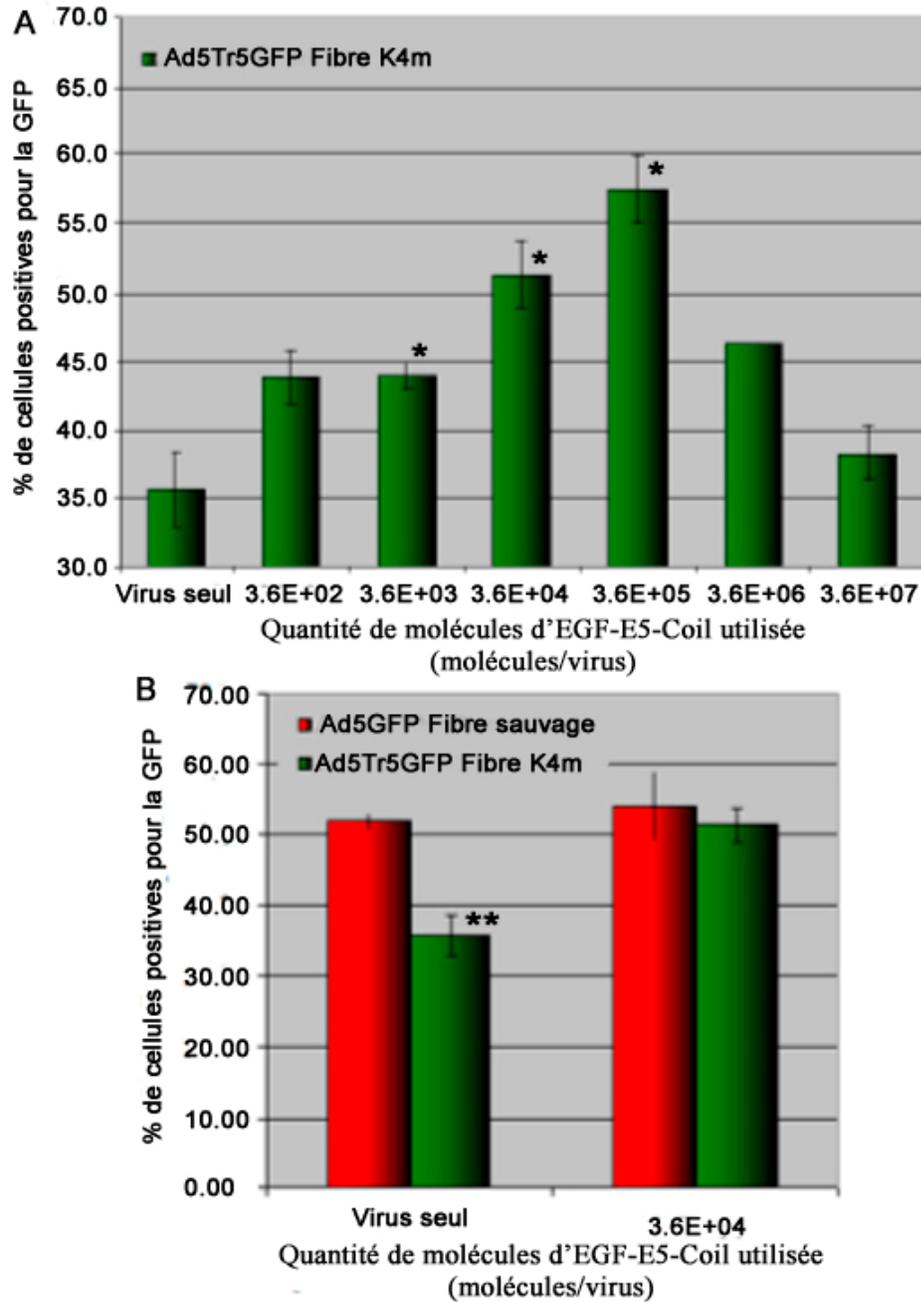


Figure 32 : Impact de la présence de l'EGF-E5-Coil sur l'efficacité de transduction.

(A) Des A549tTA ont été infectées avec des particules infectieuses du virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m à une MOI de 30. Différentes quantités d'EGF-E5-Coil en nombre de molécules par virus ont été associées aux particules virales (n=3). Les cellules infectées ont été incubées pendant 96 heures, décollées, fixées, filtrées, puis analysées par cytométrie de flux. (B) 3.6×10^4 molécules d'EGF-E5-Coil ont été associées avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre K4m et du virus Ad5GFP Fibre sauvage (n=6). Les cellules ont été incubées 96 heures en présence des virus, décollées, fixées, puis analysées par cytométrie de flux. Les variations observées sont statistiquement significatives suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student * $p < 0.05$ et ** $p < 0,025$.

La figure 32A montre que l'utilisation de différentes quantités d'EGF-E5-Coil, en prenant les particules virales non infectieuses en considération, permet d'augmenter l'efficacité de transduction de manière significative, à savoir d'environ deux fois. Si le virus modifié avec 4 répétitions est comparé avec un virus arborant une fibre sauvage, les résultats démontrent que le virus modifié sans la présence d'EGF-E5-Coil infecte moins de cellules. L'ajout d'une quantité optimale d'EGF-E5-Coil permet au virus modifié d'infecter un nombre de cellules équivalent à celui obtenu avec un virus possédant une fibre sauvage (Figure 32B). Il est donc possible d'induire un changement de tropisme dans les cellules A549 en utilisant l'EGF-E5-Coil; la présence de la mutation dans le domaine AB réduit l'infectivité des particules virales.

3.4.4 Courbe d'infectivité dans les A549

L'augmentation observée avec le virus encodant pour la fibre avec 4 répétitions à son extrémité C-Terminale a été analysée dans l'article de Zeng en 2008 (Zeng et al., 2008). Les expériences qui vont suivre ont été effectuées avec des virus arborant des fibres contenant 5 répétitions au niveau de leur boucle HI. Ces virus ont été sélectionnés pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le promoteur permettant l'expression de la GFP y est similaire à celui qui est utilisé dans les virus arborant une fibre sauvage. Le remplacement du Tr5 par un CMV permet aussi d'analyser plus aisément les virus dans différents modèles cellulaires sans la présence de transactivateur. De plus, étant donné que le complexe K5/E5 est plus fort que le complexe K4/E5 (Figure 21), l'utilisation d'un K5-Coil devrait

permettre d'obtenir un meilleur potentiel de changement de tropisme que celle d'un K4-Coil.

Ne connaissant pas exactement les niveaux d'expression du CAR ou des intégrines dans les différentes lignées cellulaires, il a fallu déterminer la meilleure multiplicité d'infection pour obtenir des résultats qui étaient à la fois reproductibles et significatifs. La MOI optimale a donc été déterminée en premier dans les A549 pour vérifier l'efficacité de l'EGF-E5-Coil et de l'AFAI-E5-Coil à induire un changement de tropisme avec les virus arborant une fibre avec 5 répétitions dans la boucle HI. Les A549 ont été sélectionnées, étant

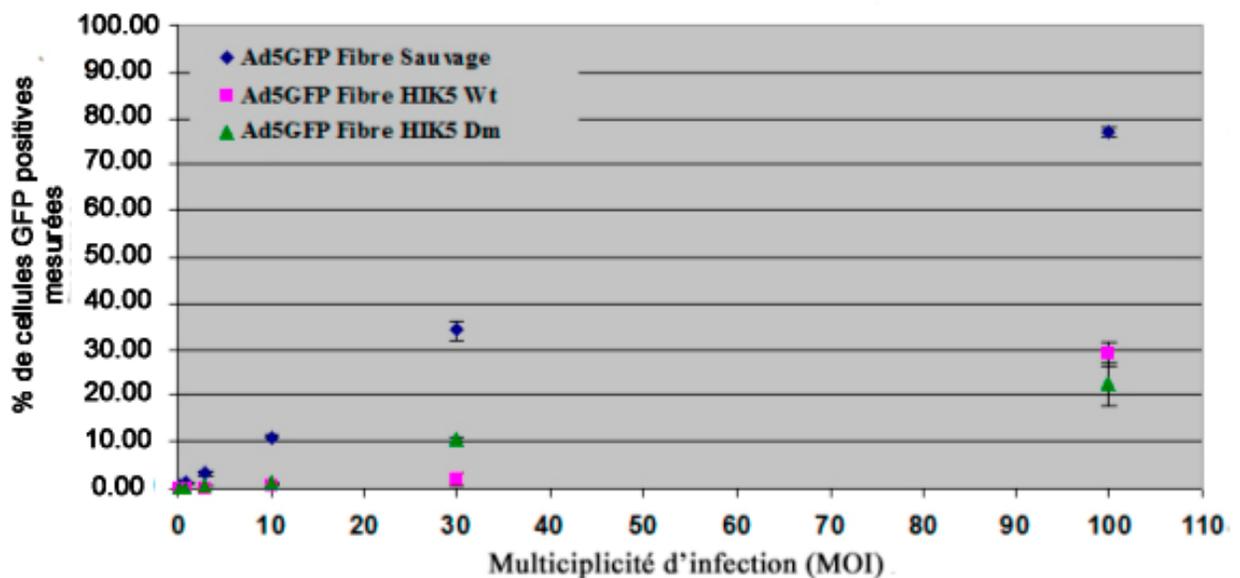


Figure 33 : Estimation de la MOI optimale pour analyser l'infektivité des virus au tropisme altéré dans les cellules A549

Des A549 ont été dénombrées, puis les particules infectieuses ont été diluées pour obtenir des MOI de 0.3, 1, 3, 10, 30 et 100 (n=3). Les cellules infectées ont été incubées pendant 96 heures, décollées, fixées avec une solution de 2% formaldéhyde, filtrées, puis analysées par cytométrie de flux.

donné que cette lignée cellulaire exprime les deux récepteurs reconnus par nos ligands soit l'EGF-R (pour EGF-E5-Coil) et le CEA6 (pour le AFAI-E5-Coil) (Henning et al., 2005; Zhang et al., 2004; Fujiuchi et al., 1997). Pour valider la meilleure MOI, les cellules ont été infectées à différentes MOI allant de 0.3 à 100 dans un volume final de milieu de culture équivalent. Par la suite, l'expression de la GFP a été mesurée 96 heures après l'infection. Différentes MOI ont été mesurées car l'utilisation d'une MOI trop faible pourrait mener à des valeurs en dessous d'un seuil acceptable nécessitant la reproduction des expériences. De la même manière, une valeur trop élevée générée par l'utilisation d'une trop forte MOI empêcherait d'analyser la totalité du potentiel de l'effet d'un ligand sur le changement de tropisme. Pour permettre l'obtention de résultats significatifs dans les A549, différentes MOI ont été utilisées de manière à trouver la quantité qui pourrait donner une valeur avoisinant les 5 à 10% de cellules transduites. La figure 33 montre que les deux virus modifiés soit l'Ad5GFP Fibre HIK5 Wt et l'Ad5GFP Fibre HIK5 Dm requièrent une plus grande MOI pour obtenir une infection proche de 5%. Pour cette raison, les expériences subséquentes dans les A549 ont été effectuées avec une MOI de 30. L'analyse de la courbe obtenue pour le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt permet de constater que celui-ci a une plus grande difficulté à infecter les cellules que le virus Ad5GFP Fibre sauvage et ce, même en présence d'un domaine AB intact. Ce résultat suggère que l'altération de la fibre par l'ajout du domaine K5-Coil dans la boucle HI est suffisante pour réduire l'infectivité des particules virales dans les cellules A549.

3.4.5 Changement de tropisme des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dans les A549

Suite aux expériences avec le Ad5Tr5GFP Fibre K4m, nous avons voulu déterminer s'il était possible d'obtenir une meilleure efficacité de transduction en associant les différents ligands aux vecteurs viraux Ad5GFP Fibre HIK5 Wt et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. L'utilisation de

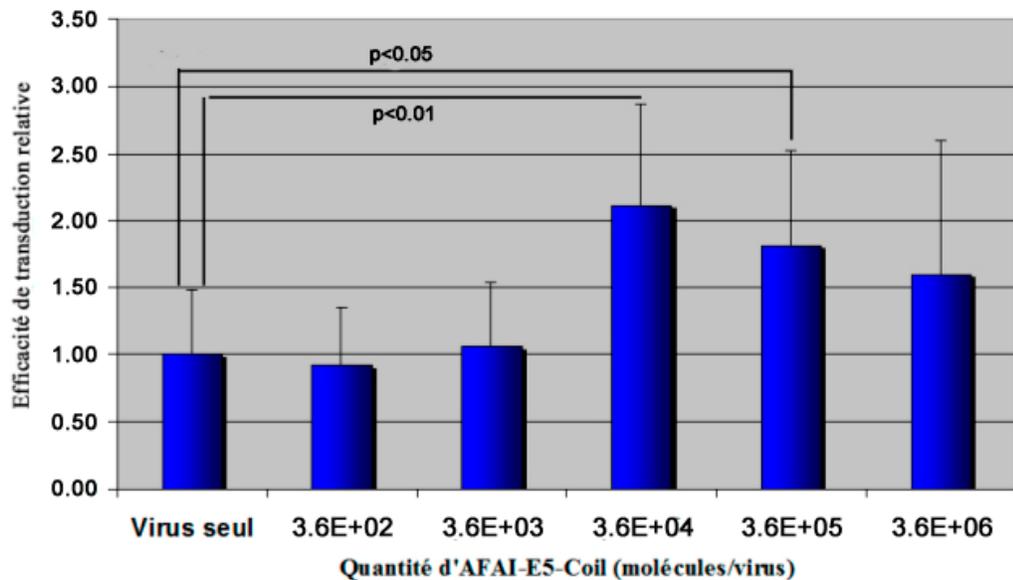


Figure 34 : Changement de tropisme à l'aide de l'AFAl-E5-Coil dans les A549.

Les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été diluées à une MOI de 30, puis différentes quantités d'AFAl-E5-Coil en nombre de molécules par virus ont été associées aux particules virales (n=3). Les A549 ont été infectées puis incubées 96 heures. Les A549 ont été décollées, fixées en présence de formaldéhyde 2%, filtrées, puis analysées par cytométrie de flux pour mesurer l'expression de GFP. L'analyse relative de l'efficacité d'infection a été effectuée en utilisant l'index de fluorescence. Les augmentations observées avec $3,6 \times 10^4$ et $3,6 \times 10^5$ molécules sont statistiquement significatives suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student.

l'AFAl-E5-Coil en association avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt a permis, tout d'abord, d'observer une augmentation de l'infectivité au niveau des A549 (Figure 34). L'utilisation de différentes quantités montre qu'il faut au dessus de 3.6×10^4 molécules d'AFAl-E5-Coil pour induire une augmentation significative de 2.11 fois. De manière à déterminer s'il est possible d'obtenir une augmentation plus importante d'infectivité, l'EGF-E5-Coil a été évalué à différentes concentrations avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm sur des cellules A549. L'association de l'EGF-E5-Coil avec le vecteur Ad5GFP Fibre HIK5 Dm permet

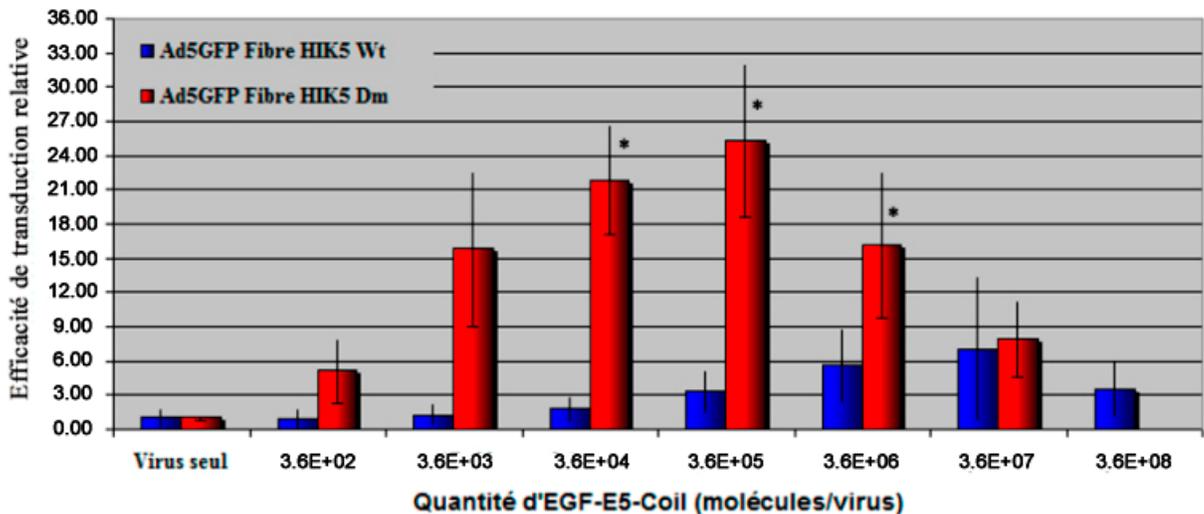


Figure 35 : Changement de tropisme à l'aide de l'EGF-E5-Coil dans les A549.

Les particules infectieuses des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt (n=3) et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (n=6) ont été diluées à une MOI de 30, en présence de différentes quantités d'EGF-E5-Coil en nombre de molécules par virus. Les A549 ont été infectées avec les complexes, puis incubées pendant 96 heures; les A549 ont été décollées, fixées en présence d'une solution de 2% de formaldéhyde et filtrées. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux pour mesurer l'expression de GFP. L'analyse de l'efficacité d'infection a été effectuée en utilisant l'index de fluorescence. *: $p < 0.005$

d'induire une augmentation significative de 25 fois dans les A549 en présence de 3.6×10^5 molécules d'EGF-E5-Coil par virus (Figure 35). L'association des différentes quantités d'EGF-E5-Coil sur le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt ne permet pas d'accroître l'efficacité

des vecteurs viraux. Même avec 100 fois plus d'EGF-E5-Coil, il n'a pas été possible d'accroître de manière significative l'infectivité du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Wt. Le but principal du projet était d'induire un changement de tropisme par l'utilisation de différents ligands bispécifiques. Donc, n'ayant pas subi d'accroissement d'infectivité, probablement à cause de la présence du domaine d'interaction avec le CAR, ce virus était moins intéressant à étudier. De plus, l'abolition du tropisme naturel est une étape importante pour modifier le tropisme des particules virales et accroître la spécificité. Pour ces raisons, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation du vecteur viral Ad5GFP Fibre HIK5 Dm.

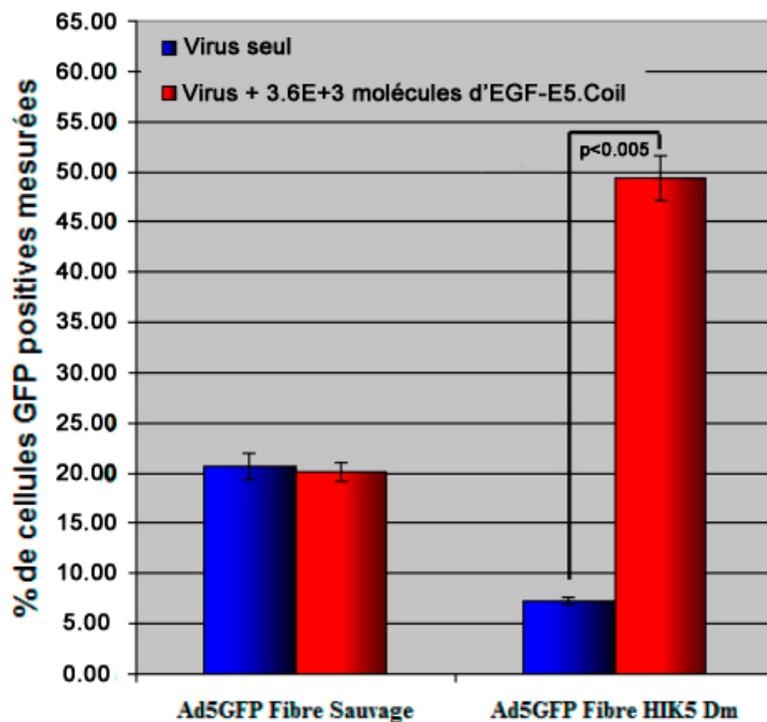


Figure 36 : Impact des mutations ponctuelles introduites dans le domaine AB.

Les A549 ont été infectées avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre sauvage ou Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 30 (n=6). Les virus ont été associés sans ou en présence de 3.6×10^3 molécules d'EGF-E5-Coil. Après 96 heures d'incubation avec les virus, les cellules ont été décollées, fixées en présence de formaldéhyde 2%, filtrées puis analysées par cytométrie de flux pour déterminer le niveau d'expression de la GFP. Les variations observées sont statistiquement significatives suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student.

Un autre point important observable au niveau de la figure 35 est la diminution de l'efficacité, suite à l'ajout d'une quantité trop importante d'EGF-E5-Coil. En effet, dans le cas des A549, nous avons observé que l'ajout d'une quantité 100 fois plus importante d'EGF-E5-Coil que celle permettant d'obtenir l'augmentation la plus élevée, réduisait l'efficacité d'infection de 3 fois. Cette réduction d'efficacité est significative comparativement aux virus, en absence d'EGF-E5-Coil. La réduction pourrait être expliquée par la compétition entre les molécules non associées et les ligands associés aux virus. Les molécules non associées pourraient lier les récepteurs à la surface des cellules et empêcher la liaison des particules virales.

L'impact des deux mutations qui ont été introduites dans le domaine AB du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm a été analysé en comparant le nombre de cellules pouvant être infectées par le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ou par le virus Ad5GFP Fibre sauvage. L'expérience a été effectuée à une MOI de 30 déterminée précédemment et ce, en présence ou en absence de 3.6×10^3 molécules d'EGF-E5-Coil. La figure 36 démontre qu'en utilisant des quantités équivalentes de virus dosées sur des cellules 293E, il est possible d'observer une réduction d'environ 3 fois (20.6% à 7.2%) des cellules infectées. Cette réduction pourrait être associée à la mutation, étant donné qu'il a été démontré dans la littérature que ces deux mutations dans le domaine AB pouvaient interférer avec l'interaction avec le CAR (Kirby et al., 2000). L'ajout d'une quantité optimale d'EGF-E5-Coil rétablit l'infectivité du virus en augmentant l'infectivité à 49.6%. Cette infectivité est plus importante que celle observée suite à l'infection avec le virus Ad5GFP Fibre sauvage. Le système est donc

intéressant, car la perte de reconnaissance du CAR en plus de l'augmentation de l'efficacité de transduction en fait un modèle qui pourrait présenter des avantages *in vivo*.

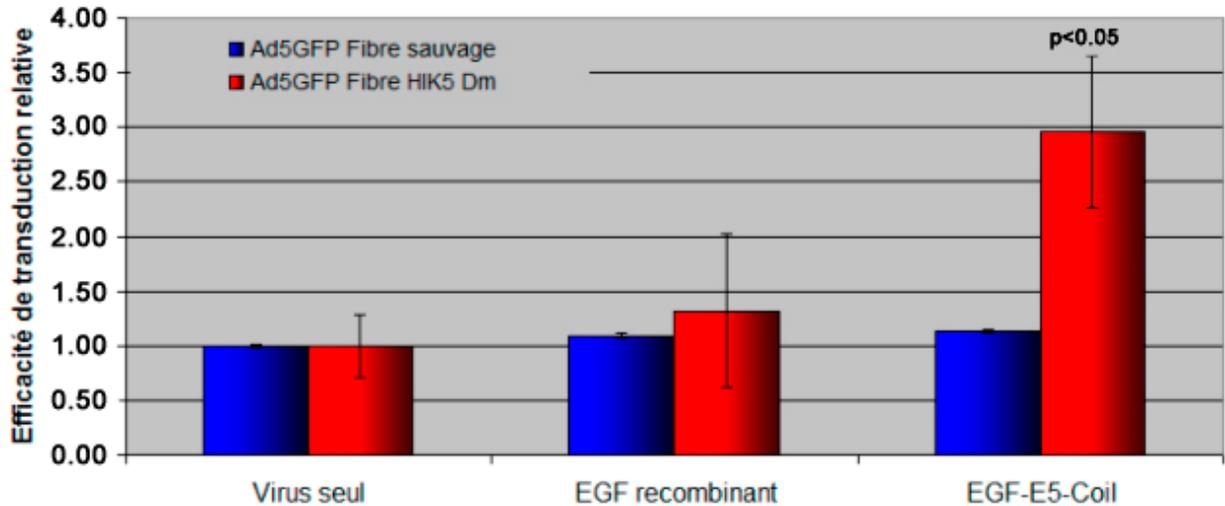


Figure 37 : Nécessité de la présence du domaine E-Coil pour induire un changement de tropisme.

Les A549 ont été infectées avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre sauvage ou Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 30. Les particules infectieuses ont été associées avec 3.6×10^3 molécules d'EGF-E5-Coil ou d'EGF recombinant (n=9). Les A549 ont été infectées puis incubées 96 heures à 37°C. Les cellules ont été décollées, fixées en présence de formaldéhyde 2%, filtrées, puis analysées par cytométrie de flux pour déterminer le niveau d'expression de la GFP. Ensuite, l'efficacité relative a été analysée en utilisant l'index de fluorescence. L'augmentation observée est statistiquement significative suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student.

La validité des augmentations qui ont été observées dans les figures 35 et 36 a été évaluée en incluant, comme contrôle, de l'EGF recombinant humain. L'essai représenté à la figure 37 montre que la présence du K-Coil, sur la fibre (EGF-E5-Coil associé au virus Ad5GFP Fibre sauvage), comme celle d'E-Coil, dans la structure du ligand (via l'utilisation de l'EGF recombinant humain), sont essentielles à l'augmentation de l'efficacité (Figure 37). Par contre, on observe que l'augmentation de transduction obtenue avec l'ajout de l'EGF-E5-Coil à la figure 37 est moins importante que ce qu'indique la figure 35.

3.4.6 Changement de tropisme des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dans les U87MG et U87MG-Wt

Suite à la démonstration de la possibilité d'induire un changement de tropisme dans les A549, le système a été analysé dans les glioblastomes humains par l'utilisation de la lignée cellulaire U87MG. L'induction d'un changement de tropisme dans les U87MG pourrait être intéressant, vu le faible niveau d'expression du CAR dans cette lignée cellulaire (Bruning and Runnebaum, 2003). De plus, il

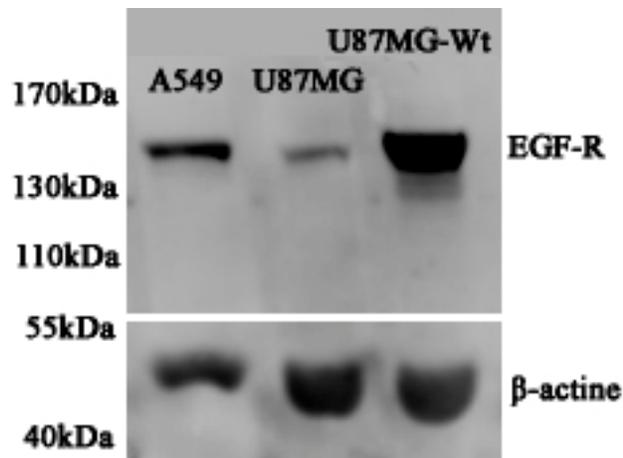


Figure 38 : Expression de l'EGF-R dans différentes lignées cellulaires.

50 μ g de protéines ont été chargés sur un gel SDS-PAGE de 10% et séparés selon leur poids moléculaire. Les protéines cellulaires ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose puis la membrane a été bloquée. Un anticorps primaire contre l'EGF-R 1 dans 250 a été utilisé suivi par une incubation avec un anticorps secondaire couplé aux Cy5 dilué 1 dans 1000. Les bandes ont été révélées suite à une excitation du Cy5 avec le laser de 633 nm sur un typhoon Trio+.

a été montré que plusieurs récepteurs sont surexprimés dans les glioblastomes, dont l'EGF-R et l'IGF-IR. Pour s'assurer de l'expression de l'EGF-R, celle-ci a été évaluée par immunobuvardage de type Western (Figure 38). Ce résultat montre qu'il y a bien

expression du récepteur, mais à un niveau moins important que dans les A549. Toutefois, l'expression est plus importante dans les U87MG-Wt, ce qui concorde avec la littérature, car cette lignée est supposée surexprimer le récepteur à l'EGF (Huang et al., 1997).

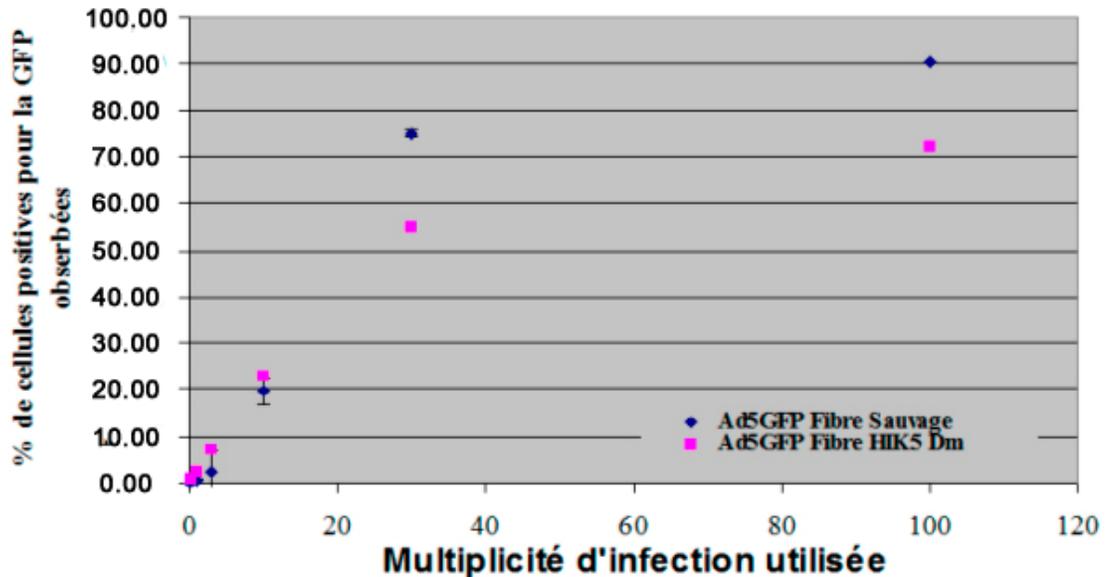


Figure 39 : Impact des modifications apportées sur les fibres virales au niveau de la multiplicité d'infection dans les U87MG.

Des U87MG ont étéensemencées 24 heures avant l'infection puis ont été dénombrées pour les infecter avec des MOI précises allant de 0.3 à 100 (n=6). Les cellules infectées ont été incubées pendant 96 heures avant d'être analysées. Les cellules infectées ont été décollées, fixées en présence d'une solution de formaldéhyde 2%, filtrées puis analysées par cytométrie de flux pour l'expression de la GFP.

Comme pour les A549, l'analyse de l'infectivité des particules virales a été évaluée pour déterminer la meilleure multiplicité d'infection à utiliser dans le cas d'essais de changement de tropisme. La figure 39 montre qu'il y a très peu de différences entre les virus Ad5GFP Fibre sauvage et les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Cette similarité supporte les conclusions qui ont été tirées avec les A549. Étant donné la faible expression du CAR dans les U87MG, les mutations dans le domaine AB n'affectent pas l'infectivité

dans ce modèle cellulaire. Pour les essais, une multiplicité d'infection de 5 sera donc utilisée, étant donné que le nombre de cellules infectées à cette concentration serait d'environ 5% pour chacun des virus.

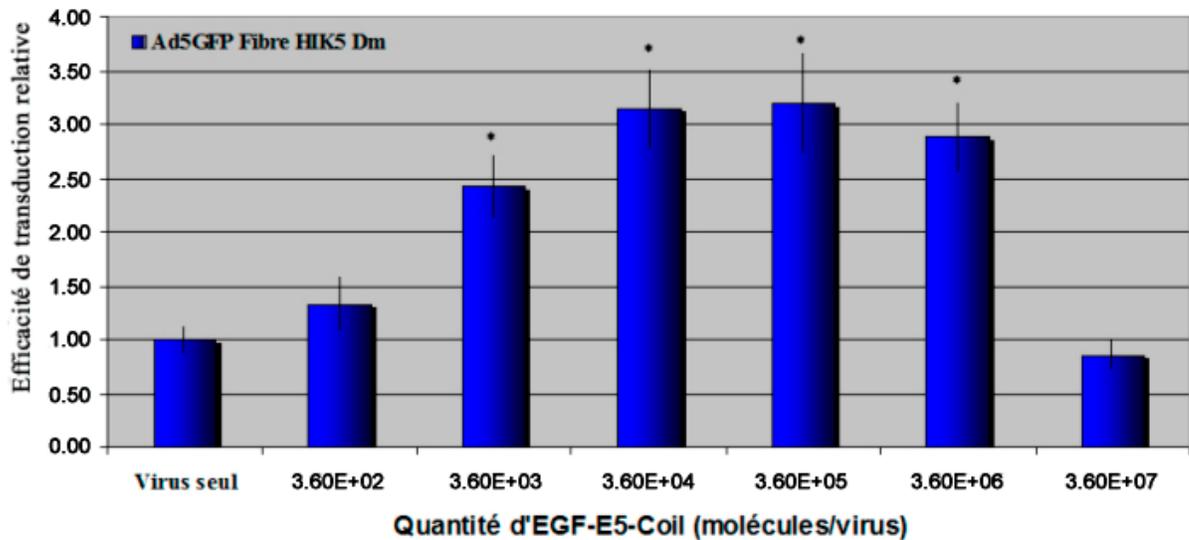


Figure 40 : Changement de tropisme à l'aide de l'EGF-E5-Coil dans les U87MG.

Les U87MG ont été infectées avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 5 (n=3). Différentes quantités de molécules d'EGF-E5-Coil ont été associées avec les particules virales. Les U87MG ont été incubées pendant 96 heures après l'infection. Les U87MG ont été, par la suite, décollées, fixées en présence de formaldéhyde et filtrées. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'analyse entre les échantillons a été effectuée en utilisant l'index de fluorescence. *: $p < 0.005$

Pour montrer le potentiel de changement de tropisme dans les U87MG, les cellules ont été infectées avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm en présence de différentes quantités de molécules d'EGF-E5-Coil. Les résultats présentés par la figure 40 montrent que l'ajout d'une quantité de 3.6×10^5 molécules permet d'augmenter de manière significative le potentiel du virus modifié de 3.2 fois. L'utilisation d'une concentration trop élevée d'EGF-E5-Coil a le même effet sur l'efficacité du virus que dans les A549, soit une réduction de la transduction.

Sachant que les U87MG n'exprimaient pas un niveau d'EGF-R similaire à celui retrouvé dans les A549 (figure 38), le système de changement de tropisme a été testé dans des U87MG-Wt qui sont des cellules dérivées des U87MG et qui surexpriment le récepteur à l'EGF. L'immunobuvardage de type Western de la figure 38 confirme que la lignée U87MG-Wt exprime un niveau plus important du récepteur à l'EGF-R que les U87MG. Cependant, les niveaux d'expression sont similaires à ce qui est exprimé dans les A549. Les niveaux ont été normalisés en fonction de l'actine. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a été démontré dans la littérature (Huang et al., 1997). Les cellules ont été traitées avec la même approche expérimentale que lors des expériences précédentes effectuées dans le

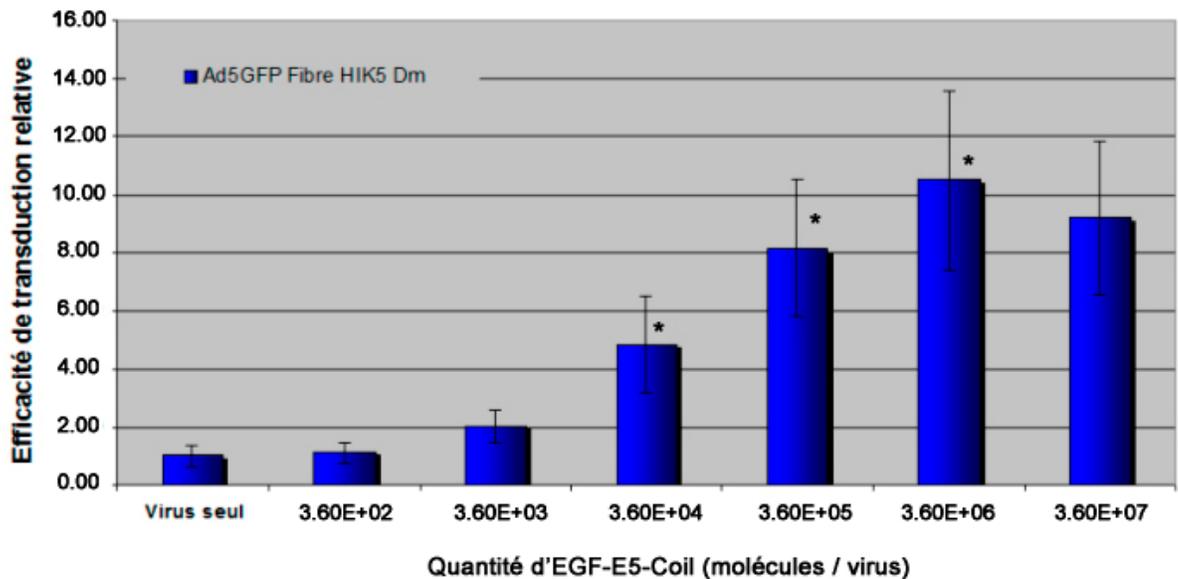


Figure 41 : Changement de tropisme à l'aide de l'EGF-E5-Coil dans les U87MG-Wt. Les U87MG-Wt ont été infectées avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 5. Différentes quantités de molécules d'EGF-E5-Coil ont été associées avec les particules virales (n=3). Les U87MG-Wt ont été incubées pendant 96 heures après l'infection avec les complexes. Les U87MG-Wt ont été décollées, fixées en présence de formaldéhyde, puis filtrées. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'analyse entre les échantillons a été effectuée en utilisant l'index de fluorescence. *: $p < 0.005$

U87MG et dans les A549. L'analyse de l'histogramme présenté à la figure 41 démontre l'impact de l'augmentation du niveau d'expression du récepteur à l'EGF-R. En effet, l'utilisation d'une quantité équivalente de 3.6×10^5 molécules d'EGF-E5-Coil permet une augmentation significative de 8.1, au lieu de l'élévation de 3.2 fois observée chez les U87MG. De plus, l'utilisation de 3.6×10^6 molécules d'EGF-E5-Coil accroît le potentiel de changement de tropisme de façon significative de 10.5 fois. En comparant les figures 41 et 42, on constate qu'il n'a pas de différence au niveau du changement de tropisme en présence de faible quantité d'EGF-E5-Coil mais que l'ajout de suffisamment de ligand induit une augmentation rapide de l'efficacité de transduction.

Ces résultats démontrent que dans des conditions optimales, une augmentation de l'expression du récepteur à l'EGF permet d'accroître de l'infectivité par un facteur de trois. Pour valider ces valeurs, la lignée U87MG et les U87MG-Wt ont été évaluées côte à côte (Figure 42). Les valeurs obtenues dans cette expérience appuient les conclusions qu'une expression plus importante du récepteur à l'EGF permet une meilleure augmentation du potentiel de changement de tropisme. En fait, l'ajout de la concentration optimale augmente le nombre de cellules infectées de 4.55% à près de 40%, tandis que le nombre de cellules ayant été infectées dans les U87MG n'atteint que 19%, que ce soit avec des quantités de 3.6×10^4 ou 3.6×10^5 molécules d'EGF-E5-Coil.

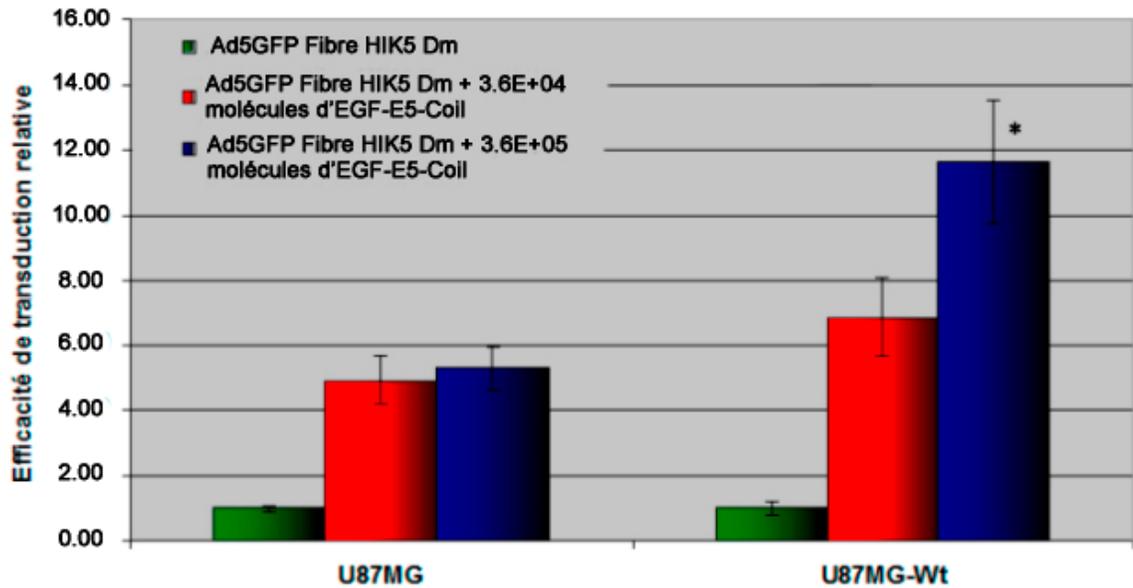


Figure 42 : Comparaison des U87MG et des U87MG-Wt en fonction du changement de tropisme.

Le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm a été dilué à une MOI de 5, puis associé avec 3.6×10^4 ou 3.6×10^5 molécules d'EGF-E5-Coil. Les complexes ont été déposés sur des U87MG (n=3) ou des U87MG-Wt (n=3) et les cellules ont été incubées pendant 96 heures. Les U87MG et les U87MG-Wt ont été décollées, fixées en présence d'une solution de 2% formaldéhyde et filtrées. Puis, l'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'efficacité de transduction relative a été analysée à partir de l'index de fluorescence. La différence entre les deux lignées cellulaires à 3.6×10^5 est statistiquement significative suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student * $p < 0.005$.

3.5 Vérification du changement de tropisme à l'aide du IGF-E5

Afin d'obtenir des augmentations élevées et significatives avec le ligand IGF-E5, l'expression du récepteur à l'IGF-I a été déterminée dans plusieurs types cellulaires pour sélectionner les cellules qui seraient utilisées lors des expériences subséquentes. Pour ce faire, l'expression du récepteur a été évaluée par immunobuvardage de type Western sur différentes lignées. Les protéines ont donc été isolées par la lyse de différents types

cellulaire, séparées par une électrophorèse, puis détectées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique reconnaissant la chaîne β du récepteur. Les échantillons ont pu être comparés en vérifiant que la même quantité de protéines a été chargée sur gel en analysant l'expression de la bêta actine. Toutefois, la légère différence de taille observée entre les différentes lignées ne peut s'expliquer ni par le caractère tumorigénique ou normal des cellules, ni par leur provenance (souris versus humain). Elle pourrait avoir été causée, par contre, par la quantité de protéines chargées dans certaines pistes. Tout de même, la figure 43 démontre que plusieurs lignées cellulaires ont des niveaux d'expression intéressants pour le récepteur

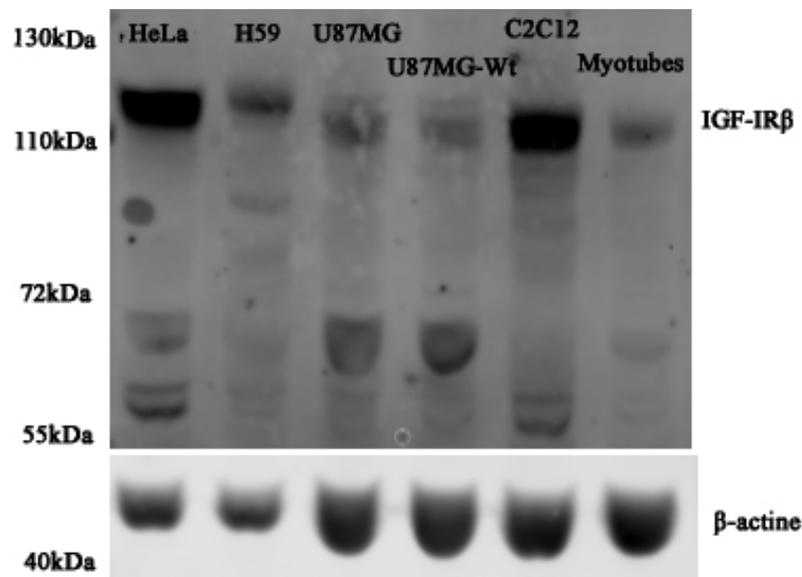


Figure 43 : Expression du récepteur à l'IGF-I dans différentes lignées cellulaires.

50 μ g de protéines ont été chargés puis séparés sur un gel d'acrylamide de 10%. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'anticorps primaire contre le récepteur à l'IGF-IR β dilué 1 dans 100 et celui contre l'actine 1 dans 10 000 ont été utilisés, suivi par une incubation avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy5 et dilué 1 dans 1000 et 1 dans 5000, pour le récepteur à l'IGF-I et de la bêta actine respectivement. Les bandes ont été révélées à l'aide du laser à 633 nm d'un typhoon trio+ et analysées par le logiciel ImageQuant v2.0.

à l'IGF-I. Contrairement à ce qui était attendu, le niveau dans les U87MG n'est pas très élevé. Par contre, les myoblastes de souris ont un niveau d'expression qui rend l'étude des tissus musculaires beaucoup plus intéressante. De plus, il pourrait s'avérer avantageux de cibler les H59 dans le cadre d'essai de changement de tropisme.

Les H59, une lignée cancéreuse pulmonaire murine, ont été utilisés car il s'agit d'un modèle qui génère des métastases au foie, dû à la forte expression du récepteur à l'IGF-IR. L'utilisation du changement de tropisme pourrait permettre d'accroître l'infectivité dans les nodules métastatiques. La première étape de l'évaluation du potentiel de l'IGF-E5 fut de déterminer la MOI optimale dans les H59. Pour ce faire, les cellules ont été infectées à différentes MOI avec des virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux pour déterminer le nombre de cellules qui étaient positives. La figure 44, représentant le nombre de cellules positives en fonction de la multiplicité d'infection, démontre qu'à faible MOI, le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm semble avanta-gé de façon significative, mais que cet effet disparaît avec des MOI plus élevées. En effet, le virus modifié peut infecter 3.5% et 10.3% avec des multiplicités d'infection de 3 et de 10 respectivement, tandis que le virus Ad5GFP Fibre sauvage a infecté seulement 0.6% et 1.85% des cellules. Ayant un patron différent de ce qui a été observé auparavant, il est difficile de déterminer si les niveaux d'expression du récepteur CAR ou l'état des virus sont à prendre en considération. La distribution a permis de déterminer que la multiplicité d'infection optimale pour engendrer un changement de tropisme dans les H59 serait de 30 particules infectieuses par cellules. De la même manière que pour l'EGF-E5-Coil, le ligand IGF-E5 a été évalué dans les différents modèles

cellulaires pour déterminer la possibilité d'augmenter l'infectivité dans différentes tumeurs. Les U87MG ont donc été évaluées car il a été montré qu'elles exprimaient le récepteur à l'IGF-IR à leur surface dans l'immunobuvardage de type Western (Figure 42). Par contre, ce niveau d'expression n'est pas aussi élevé comparé aux autres types de cellules dont les H59. Les U87MG ont donc été évaluées en utilisant une MOI de 10, qui est plus élevé que ce qui avait été utilisé dans le cadre des essais avec l'EGF-E5-Coil pour obtenir une meilleure infection.

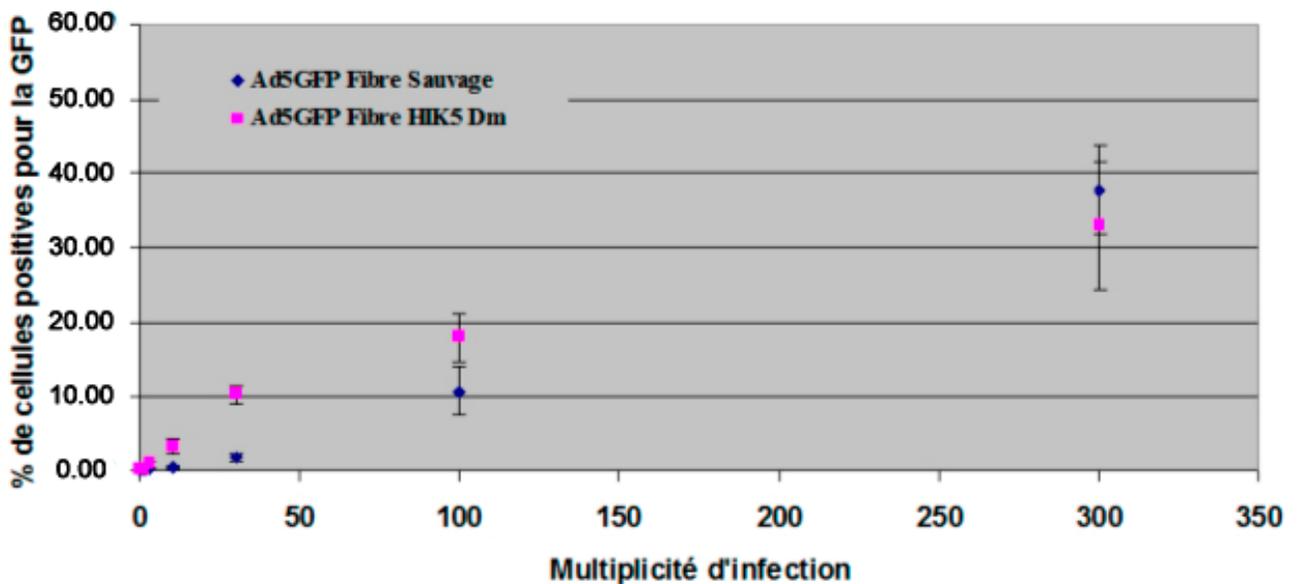


Figure 44 : Impact des modifications apportées sur les fibres au niveau de la multiplicité d'infection.

Les H59 ont été dénombrées pour diluer les particules infectieuses des virus Ad5GFP Fibre Wt (n=6) et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (n=6) avec des MOI précises de 1, 3, 10, 30, 100 et 300. Les cellules infectées ont été incubées en présence du virus pendant 96 heures avant d'être décollées, fixées avec une solution de 2% formaldéhyde et filtrées. L'expression de la GFP a été analysée dans les cellules infectées par cytométrie de flux.

À partir des MOI optimales déterminées pour les H59 et les U87MG, le potentiel de changement de tropisme a été analysé en utilisant différentes quantités de molécules d'IGF-E5. La figure 45 montre les augmentations qui ont été observées, suite à l'ajout des différentes quantités d'IGF-E5. L'analyse des valeurs obtenues dans les cellules U87MG permet de constater qu'une augmentation de 2 fois peut être obtenue lorsque 3.6×10^4 molécules d'IGF-E5 sont associées avec virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Pour ce qui est des H59, l'utilisation de seulement 3.6×10^2 molécules d'IGF-E5 est suffisante pour induire un accroissement de l'infectivité du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm par 7 fois. Les résultats obtenus à l'aide de deux lignées cellulaires exprimant des niveaux variables du récepteur montrent qu'il est possible d'induire un changement de tropisme avec le ligand dérivé de l'IGF-I. En comparant les augmentations qui ont été obtenues dans les deux lignées à quantité équivalente, on constate que les résultats corrélerent avec les niveaux d'expression du récepteur à l'IGF-IR à la surface des cellules.

L'étape subséquente dans l'analyse du ligand IGF-E5 fut de démontrer que l'IGF-E5 requiert aussi la présence du domaine K-Coil pour générer un changement de tropisme comme l'EGF-E5-Coil. La figure 46A démontre que l'Ad5GFP Fibre HIK5 Dm a subi une augmentation significative de 3.5 fois lorsqu'il était incubé en présence de 3.6×10^3 molécule d'IGF-E5, tandis que le virus avec une fibre sauvage n'a subi aucune augmentation. Les essais dans les U87MG ont aussi montré que l'ajout d'IGF-E5 permettait d'induire un changement de tropisme dans le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. L'augmentation de 2.15 fois observée dans la figure 46B est similaire à ce qui avait été constaté à la figure 45 et est équivalente à ce qui avait été obtenu dans le modèle utilisant

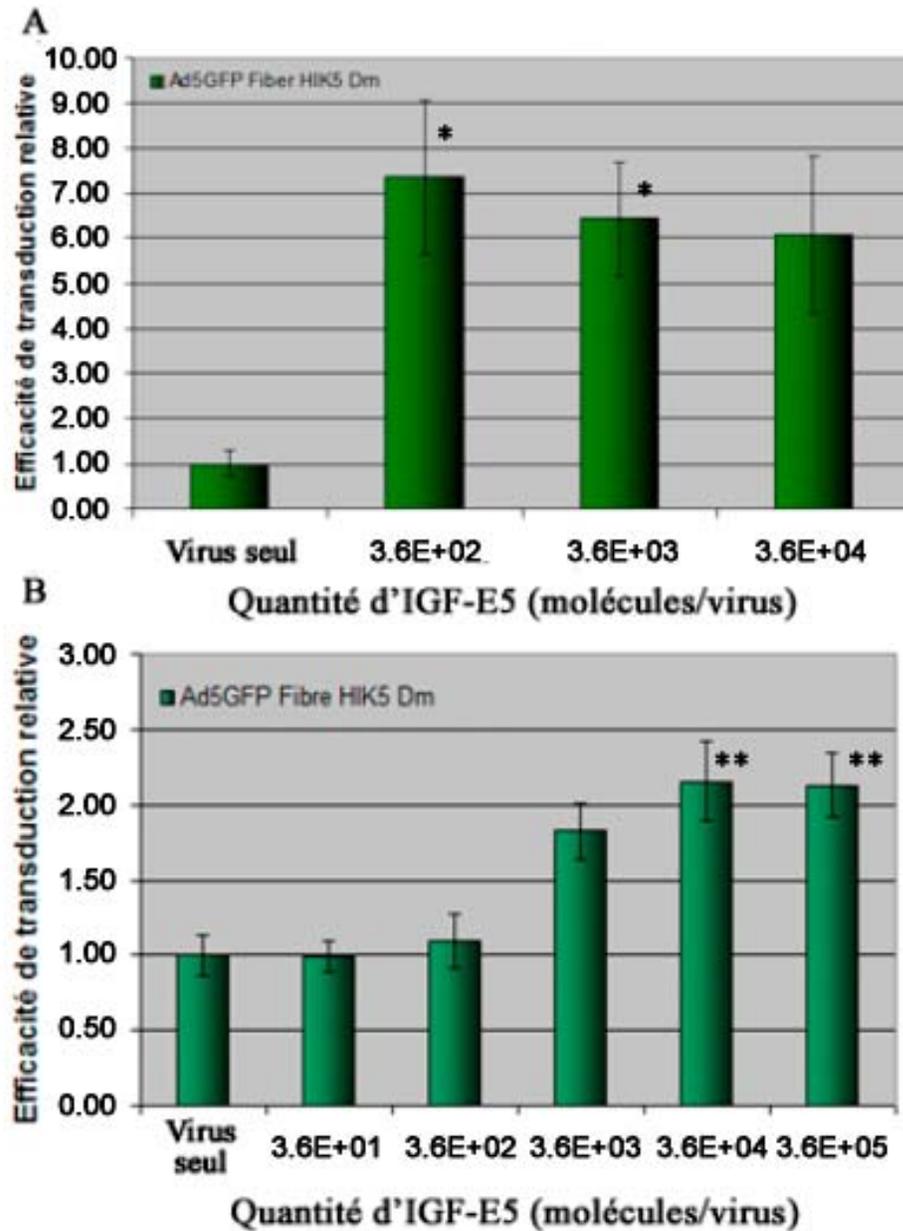


Figure 45 : Changement de tropisme à l'aide de l'IGF-E5 dans différentes lignées cellulaires.

Les H59 (n=3) ont été infectées à une MOI de 30 avec des particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (A) et les U87MG ont été infectées à une MOI de 10 avec des particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (B). Les cellules infectées ont été incubées en présence de quantité croissante d'IGF-E5. Les cellules ont été décollées, fixées avec une solution de 2% formaldéhyde, filtrées et l'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'analyse de l'efficacité de transduction relative a été calculée en utilisant l'index de fluorescence. Les différences sont statistiquement significatives suite à l'analyse des différentes valeurs par un test statistique de student * $p < 0.05$ et ** $p < 0,005$.

l'EGF-E5-Coil. Une fois de plus, l'infectivité des virus Ad5GFP Fibre sauvage n'est pas altérée par la présence des molécules d'IGF-E5. La consistance des données montre que la méthode est robuste et reproductible. Ces résultats démontrent aussi que l'IGF-E5 se comporte de la même manière que l'EGF-E5-Coil.

L'expression de l'IGF-IR peut être observée dans plusieurs autres types de cellules tumorales (Reinmuth et al., 2002; Wang et al., 2009; An et al., 2010; Spiliotaki et al., 2011). Sachant que les tumeurs ovariennes expriment peu de CAR (Morrison et al., 2008b), nous avons voulu déterminer la capacité de notre système à accroître l'efficacité de transduction à l'aide de deux lignées ovariennes accessibles dans notre laboratoire. Les OV-90 et les TOV-112D ont donc été évaluées en comparant les virus Ad5GFP Fibre sauvage avec les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Les essais ont été effectués en présence ou en absence de l'IGF-E5 mais aussi de l'EGF-E5-Coil pour analyser la possibilité d'utiliser différentes lignées cellulaires. Les résultats obtenus dans les expériences impliquant les deux ligands montrent qu'il est possible d'augmenter l'efficacité du virus modifié de manière significative dans les cellules TOV112D (Figure 47A) : de 3.46 fois avec l'IGF-E5 et de 2.96 fois pour le EGF-E5-Coil. De plus, il a été possible d'observer une augmentation plus importante de 7.82 fois avec l'IGF-E5, tandis que l'EGF-E5-Coil augmentait l'efficacité de transduction par un facteur de 3.45 dans la lignée cancéreuse ovarienne OV-90 (Figure 47B)

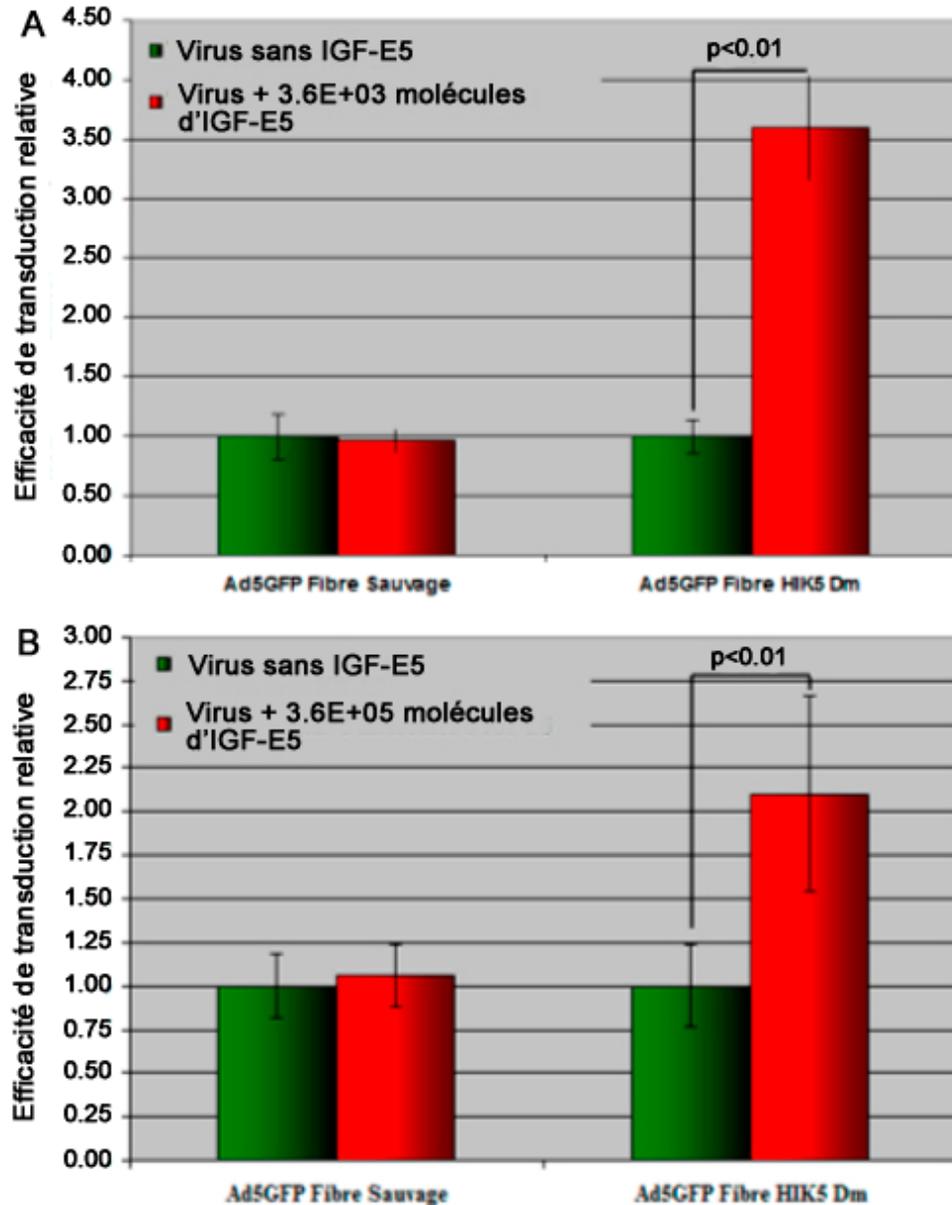


Figure 46 : Spécificité du changement de tropisme avec l'IGF-E5 dans les H59 et les U87MG.

Les particules infectieuses des virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été diluées à une MOI de 30 pour les H59 (A) et de 10 pour les U87MG (B). Les virus ont été associés avec 3.6×10^5 molécules d'IGF-E5. Après une incubation de 4 heures, les complexes ont été déposés sur les cellules, puis incubés pendant à 37°C. Après l'incubation de 96 heures, les cellules ont été décollées, fixées en présence d'une solution de 2% de formaldéhyde et filtrées. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'analyse de l'efficacité de transduction relative a été calculée en utilisant l'index de fluorescence. Les différences observées sont statistiquement significatives suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student.

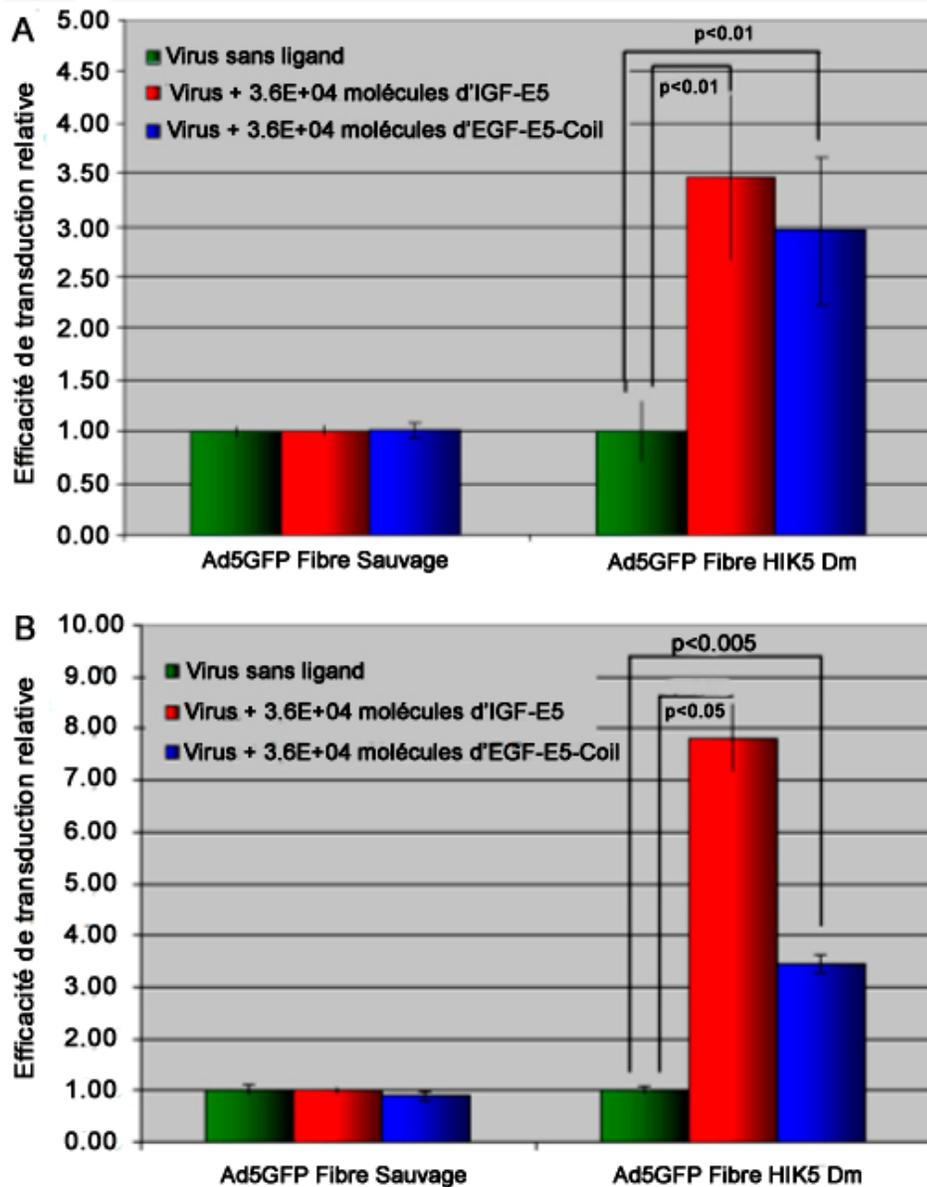


Figure 47 : Changement de tropisme dans des lignées cancéreuses de l'ovaire TOV-112D et OV-90.

Les cellules TOV-112D (A) et OV90 (B) ont été infectées avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 50. Les virus ont été associés avec 3.6E+4 molécules d'EGF-E5-Coil ou d'IGF-E5. Les complexes ont été déposés sur les cellules, puis incubés pendant 96 heures à 37°C. Les cellules ont été décollées, fixées en présence de formaldéhyde 2%, filtrées, puis l'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'analyse de l'efficacité de transduction relative a été calculée en utilisant l'index de fluorescence. Les différences observées sont statistiquement significatives suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student.

3.6 Changement de tropisme dans des cellules musculaires

3.6.1 Optimisation des conditions dans les myoblastes

Selon la littérature, les myoblastes de souris exprimeraient à leur surface le récepteur à l'IGF-I (Palmer et al., 1997). Leur expression a été confirmée à l'aide d'un immunobuvardage de type Western en même temps que les autres lignées cancéreuses (Figure 43). En outre, l'expression du récepteur est plus importante que l'expression observée dans les H59. Enfin, les résultats obtenus avec l'EGF-E5-Coil suggèrent que les niveaux d'expression d'un récepteur peuvent corrélérer avec l'efficacité du changement de tropisme. À partir de ces éléments, la possibilité d'induire un changement de tropisme dans un modèle musculaire semble plus concrète. Une telle étude devient donc d'autant plus attrayante qu'on sait que les cellules musculaires expriment des niveaux relativement faibles du récepteur primaire CAR (Nalbantoglu et al., 1999). En effet, les faibles niveaux d'expression du CAR rendent la transduction des fibres musculaires avec des vecteurs adénoviraux difficiles; il s'agit de l'un des obstacles majeurs sur lesquels se penchent plusieurs groupes de recherche.

Étant donné que le niveau d'expression du CAR est relativement faible dans les myoblastes, il a fallu déterminer la MOI optimale pour permettre d'infecter les myoblastes. Cela a été déterminé suite à l'infection des myoblastes à différentes MOI, en utilisant le virus Ad5GFP Fibre sauvage et le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (Figure 48). L'analyse

des niveaux d'expression de la GFP par cytométrie de flux a révélé des pourcentages relativement faibles. En effet, pour une MOI de 30, seulement 2.45% et 2.56% des cellules

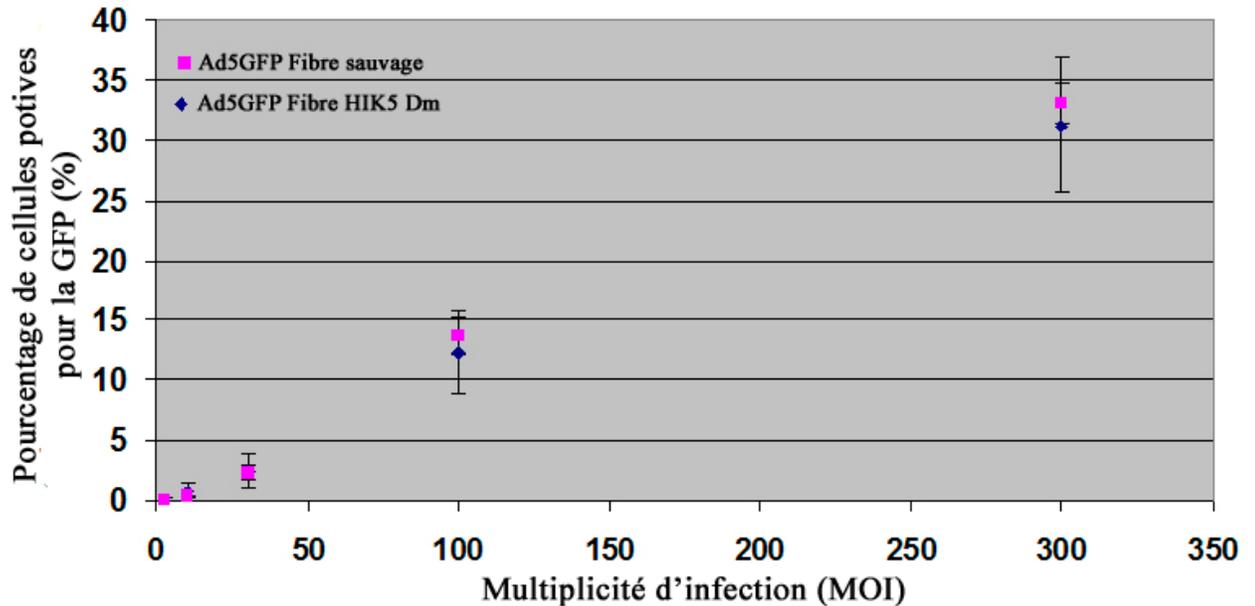


Figure 48 : Infectivité des virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à différentes MOI dans des myoblastes de souris (C2C12).

Les particules infectieuses des virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été diluées pour obtenir des MOI précises de 3, 10, 30, 100 et 300 (n=15). Les cellules infectées ont été incubées à 37°C pendant 96 heures. Les myoblastes ont été décollés, fixés dans une solution de formaldéhyde 2%, et filtrés. L'expression de la GFP a été ensuite analysée par cytométrie de flux.

ont été infectées avec les virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm respectivement. Par contre, les valeurs ont montré que les niveaux d'expression de la GFP étaient similaires, à des MOI équivalentes. Ces résultats étaient conformes aux attentes, vu le faible niveau d'expression du CAR. Les mutations dans le domaine AB n'ont eu que très peu d'impact. Donc, pour pouvoir effectuer les différents essais de changement de tropisme, une MOI de 100 particules infectieuses par cellule a été sélectionnée. Cette MOI

permettait l'obtention d'un excellent niveau de cellules transduites, sans toutefois requérir l'utilisation d'une trop grande quantité de particules virales.

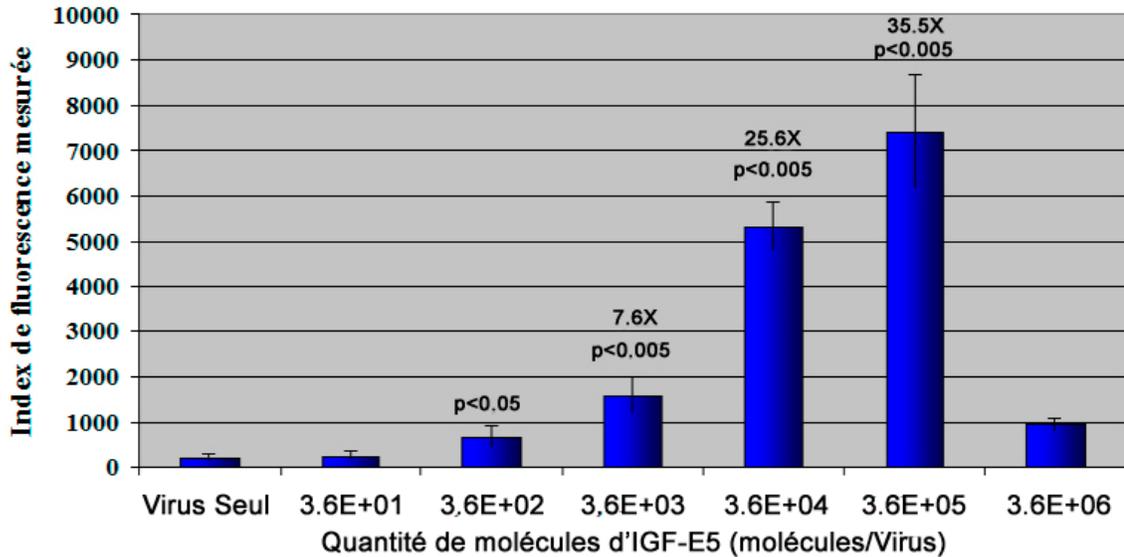


Figure 49 : Augmentation de l'efficacité de transduction à différentes concentrations d'IGF-E5 dans la lignée C2C12.

Les myoblastes ont été dénombrés pour diluer les particules virales du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI précise de 100. Celles-ci ont été associées avec différentes quantités d'IGF-E5 (n=6). Les complexes ont été déposés sur les myoblastes et incubés pendant 96 heures. Les cellules ont été par la suite décollées, fixées par du formaldéhyde 2% et filtrées. Puis, l'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'analyse de l'efficacité de transduction relative a été calculée en utilisant l'index de fluorescence. Les différences observées sont statistiquement significatives suite à l'analyse des différentes valeurs par un test statistique de student.

L'ajout des différentes quantités d'IGF-E5 a permis de déterminer que l'utilisation de 3.6×10^4 molécules d'IGF-E5 était suffisante pour augmenter l'infectivité virale de 15% jusqu'à 90% des cellules infectées. En analysant les valeurs calculées pour l'index de fluorescence, on constate que l'ajout de 3.6×10^4 permet d'augmenter l'efficacité de manière significative de 25.6 fois. Par contre, cette valeur n'est pas optimale, étant donné

que l'utilisation de 10 fois plus de molécules, soit 3.6×10^5 de molécules d'IGF-E5, permet d'accroître les niveaux de transduction de 35.5 fois. Comme pour les essais utilisant l'EGF-E5-Coil, l'ajout d'une quantité trop importante d'IGF-E5 induit une perte d'efficacité. En effet, l'histogramme de la figure 49 montre que l'utilisation de 3.6×10^6 molécules amène seulement une augmentation de 4 fois. Pour obtenir un changement de tropisme optimal dans le cadre des C2C12, il faudrait plutôt utiliser 3.6×10^5 molécules d'IGF-E5 par virus.

Pour monter que l'association de l'IGF-E5 était spécifique au virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dans les C2C12, ces dernières ont été traitées avec, soit l'Ad5GFP Fibre sauvage, soit l'Ad5GFP Fibre HIK5 Dm, en présence ou en absence de 3.6×10^5 molécule d'IGF-E5 ou d'IGF-I recombinant de souris, pour confirmer l'importance du domaine d'interaction. La figure 50 permet de tirer des conclusions équivalentes à ce qui avait déjà été conclu avec l'EGF-E5-Coil. En effet, l'ajout de l'IGF-E5 permet seulement d'augmenter l'efficacité de transduction chez le virus arborant le domaine K-Coil dans sa boucle HI. Par contre, l'ajout d'une quantité optimale d'IGF-E5 n'a permis accroître l'efficacité que de 18 fois. De plus, l'utilisation de l'IGF-I recombinant de souris n'est pas suffisante pour obtenir une augmentation similaire à celle induite par l'IGF-E5. Sinon, l'IGF-I recombinant semble avoir une tendance à augmenter le nombre de cellules infectées. En effet, l'ajout de l'IGF-I permet d'obtenir une augmentation significative de 2.8 fois au niveau des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Une légère différence, non significative, peut aussi être observée lorsque l'IGF-I recombinant est ajouté avec le virus Ad5GFP Fibre Sauvage.

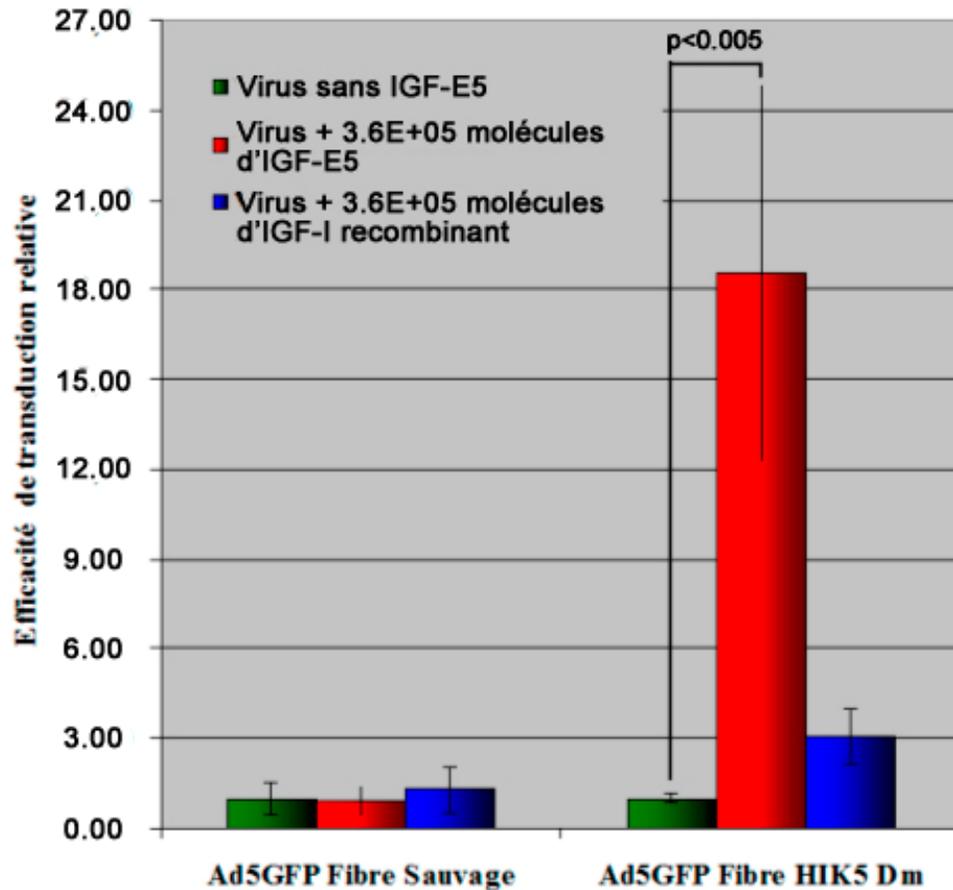


Figure 50 : Changement de tropisme induit suite à l'association avec l'IGF-E5 ou avec l'IGF-I recombinant de souris.

Les C2C12 ont été infectées avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre sauvage ou Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 100. Les particules infectieuses ont été associées avec 3.6×10^5 molécules d'IGF-E5 ou d'IGF recombinant (n=6). Les myoblastes ont été infectés pendant 96 heures à 37°C. Les myoblastes ont été décollés, fixés à l'aide de formaldéhyde 2%, filtrés, puis l'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. L'analyse de l'efficacité de transduction relative a été calculée en utilisant l'index de fluorescence. La différence observée est statistiquement significative suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student * $p < 0.005$

Pour montrer l'importance de l'association de l'IGF-E5 avec les particules Ad5GFP Fibre HIK5 Dm, le peptide K-Coil a été ajouté dans le cadre de certaines expériences. La

diminution significative de 182 à 116 de l'index de fluorescence, suite à l'ajout d'une concentration de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ligands, démontre que l'IGF-E5 a été déplacé des particules virales (Figure 51). Ce résultat confirme la possibilité d'induire un changement de tropisme en utilisant l'IGF-E5 comme ligand.

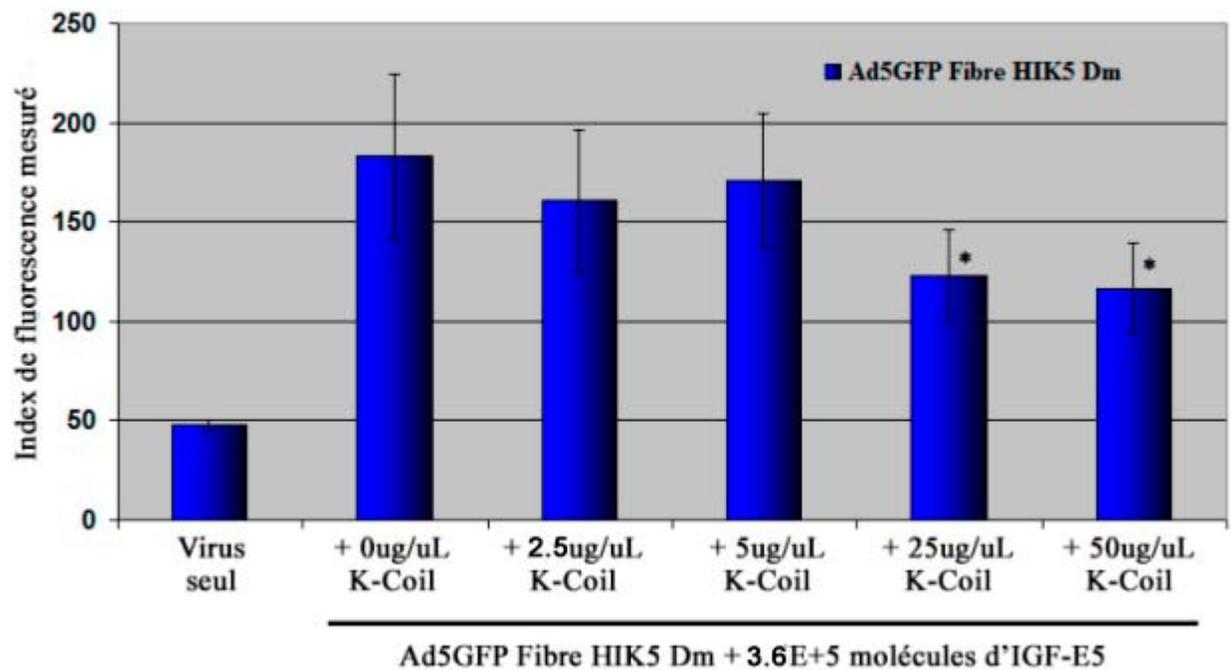


Figure 51: Importance de l'association de l'IGF-E5 avec les particules virales.

Les particules virales de l'Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été diluées à une MOI de 100. Les virus ont été associés en absence ou en présence de 3.6×10^5 molécules d'IGF-E5. Différentes concentrations de peptide K-Coil (entre 0 et 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ont été ajoutés dans le milieu de culture avant l'addition des complexes viraux ($n=6$). Les myoblastes ont été incubés à 37°C pendant 96 heures, avant d'être décollés, fixés par une solution de formaldéhyde 2%, puis filtrés. L'expression de la GFP a été analysée par cytométrie de flux. * La réduction est statistiquement significative, en comparaison avec l'absence de peptide K-Coil, suite à l'analyse des valeurs par un test statistique de student ($p < 0.05$).

3.6.2 Changement de tropisme dans les myotubes *in vitro*

Les myoblastes sont des cellules non différenciées qui représentent seulement une faible proportion des structures composant les muscles. Cette population, nommée cellules satellites, constituerait les cellules impliquées dans la régénération des tissus musculaires en fusionnant avec les fibres musculaires. Les myotubes, qui ressemblent aux fibres musculaires, sont des cellules polynucléées provenant de la fusion de plusieurs myoblastes. Les myotubes peuvent être produits en laboratoire, de manière à pouvoir valider l'efficacité du système avant de mesurer la capacité de notre système dans les modèles animaux. Les myotubes sont généralement plus difficiles à transduire à l'aide des vecteurs adénoviraux que les myoblastes, à cause des faibles niveaux d'expression du CAR et des intégrines (Nalbantoglu et al., 1999). Comme pour les myoblastes, il a été montré dans la littérature que les myotubes expriment le récepteur à l'IGF-I chez l'humain ou le rat (Beguilot et al., 1985; Palsgaard et al., 2009). L'immunobuvardage de type Western (figure 43) confirme que les myotubes, qui ont été obtenus suite à la différenciation des myoblastes de souris, expriment le récepteur, certes, mais à des niveaux plus faibles que les myoblastes non différenciés.

Les premières expériences dans les myotubes consistaient à déterminer la MOI optimale pour les essais de changement de tropisme. Pour ce faire, les myoblastes de souris ont dû être différenciés en myotubes par la privation des facteurs de croissance contenus dans le sérum généralement ajouté dans les milieux de culture. Le FBS a

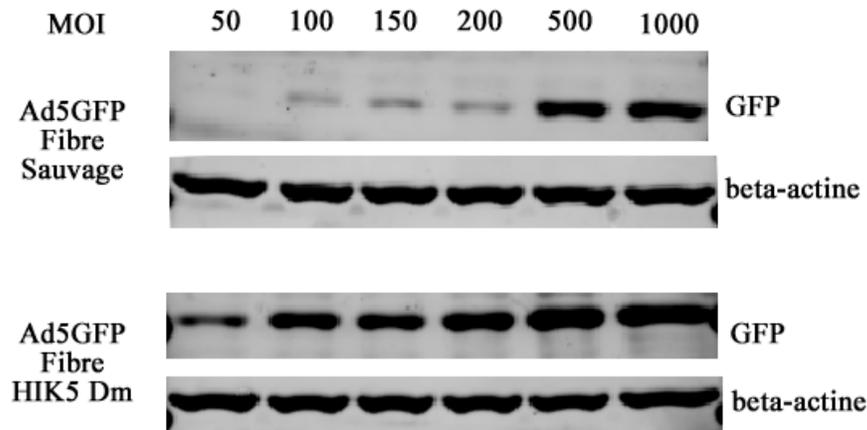


Figure 52 : Expression de la GFP suite à transduction avec différents virus dans les myotubes.

Les myotubes ont été infectés avec l'Ad5GFP Fibre sauvage ou avec l'Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à différentes MOI. Les protéines ont été extraites après 48 heures, dosées et chargées sur gel d'acrylamide avec un gradient 4% à 20%. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et la membrane a été bloquée. L'anticorps primaire contre la GFP, dilué 1 dans 250, et celui contre l'actine, dilué 1 dans 10 000, ont été utilisés. Par la suite, on a procédé à l'incubation avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy5 qui a été dilué 1 dans 1000 pour la GFP et 1 dans 3000 pour l'actine. Les bandes ont été révélées à l'aide du laser de 633nm d'un typhoon trio+ et analysées par le logiciel ImageQuant V2.0.

donc été remplacé par du sérum équin pour permettre la stimulation de la différenciation et aider à la survie cellulaire. La transduction des myotubes a été effectuée avec différentes MOI allant de 50 à 1000 pour les virus Ad5GFP Fibre sauvage et pour les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (figure 52). Étant donné la taille des myotubes, l'analyse de l'expression de la GFP a été effectuée par l'utilisation d'immunobuvardage de type Western après avoir récolté et lysé les myotubes. Suite à l'incubation des deux anticorps, les niveaux d'expression qui peuvent être observés démontrent qu'il faut utiliser une MOI au dessus de 500 pour avoir un bon niveau d'expression en transduisant les cellules avec le virus

Ad5GFP Fibre sauvage. Par contre, contrairement à ce qui avait été observé dans les myoblastes, l'utilisation de MOI relativement faible peut être suffisante pour obtenir un niveau d'expression utilisable dans le cadre des essais de changement de tropisme. De manière surprenante, le virus avec la fibre modifiée infecte plus efficacement les myotubes que le virus sauvage, ce qui n'est pas le cas dans les myoblastes.

L'étape subséquente fut de déterminer la concentration d'IGF-E5 qui induirait la plus grande augmentation dans les myotubes. Pour déterminer la quantité optimale à utiliser dans les futures expériences, $7,2 \times 10^4$, $1,8 \times 10^5$ et $3,6 \times 10^5$ molécules ont été évaluées pour leur capacité à augmenter l'infectivité du virus Ad5GFP Fibre HIK5c Dm (Figure 53). Après 48 heures d'incubation avec les virus associées à l'IGF-E5, les protéines ont été extraites puis évaluées par immunobuvardage de type Western. L'évaluation de l'intensité des bandes obtenues de la figure 53 démontre que l'ajout de $7,2 \times 10^4$ molécules d'IGF-E5 par virus est suffisant pour induire une augmentation de 4.6 fois dans les myotubes. L'accroissement de la quantité n'a pas changé l'efficacité de la transduction, étant donné qu'une augmentation de 4.3 fois et de 4.1 fois a été observé en utilisant $1,8 \times 10^5$ et $3,6 \times 10^5$ molécules d'IGF-E5 respectivement. Les résultats montrent que l'utilisation de $7,2 \times 10^4$ molécules d'IGF-E5 avec une MOI de 100 est suffisante pour obtenir une transduction optimale aux niveaux des myotubes (Figure 53

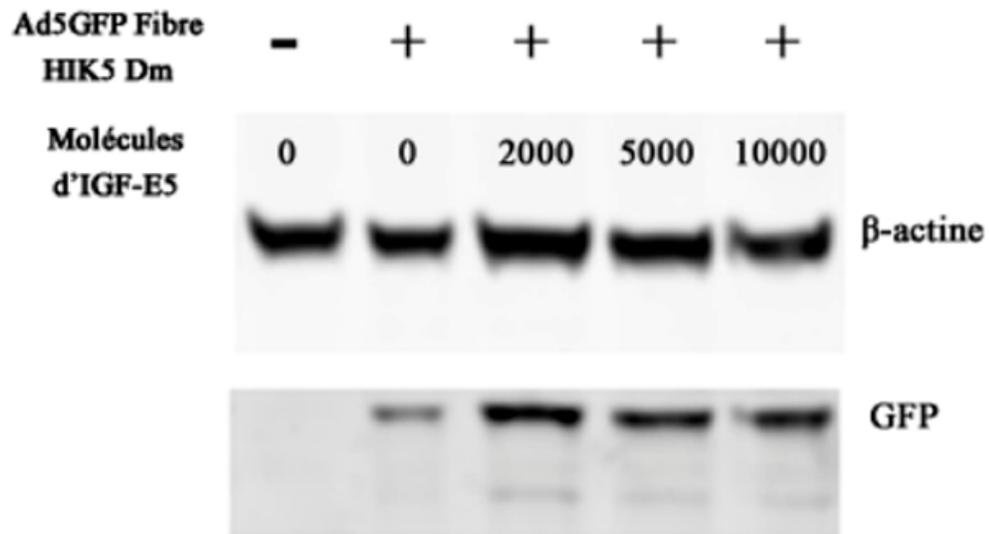


Figure 53 : Optimisation des quantités d'IGF-E5 pour le changement de tropisme dans les myotubes.

Les myotubes ont été infectés avec l'Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 100 en absence ou en présence de différentes quantités de molécules d'IGF-E5. Les protéines ont été extraites après 48 heures, dosées et chargées sur gel d'acrylamide avec un gradient 4% à 20%. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et celle-ci a été bloquée à l'aide de PBS-0.1% Tween20 contenant 5% de lait. L'anticorps primaire contre la GFP (1:250) et celui contre l'actine (1:10000) ont été dilués dans du PBS-T-Lait. Les membranes ont été incubées, puis lavées à 6 reprises avec du PBS-T. L'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy5 a été dilué 1:1000 pour la GFP et 1:3000 pour l'actine dans du PBS-T-Lait. Les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire pendant 45 minutes, puis lavées à 6 reprises avec du PBS-T. Les bandes ont été révélées à l'aide du laser de 633nm d'un typhoon trio+ et analysées par le logiciel ImageQuant V2.0.

et 54). La différence d'intensité qui peut être observée entre les figures 52 et 53 peut s'expliquer par la modification de l'intensité qui a dû être effectuée sur les deux images. En effet, pour permettre d'observer les bandes provenant de l'infection avec le virus sauvage à la figure 52, il a fallu accroître l'intensité des bandes, tandis qu'une diminution a dû être effectuée à la figure 53 pour permettre la quantification des bande et déterminer l'accroissement induit par l'ajout des différentes quantités d'IGF-E5.

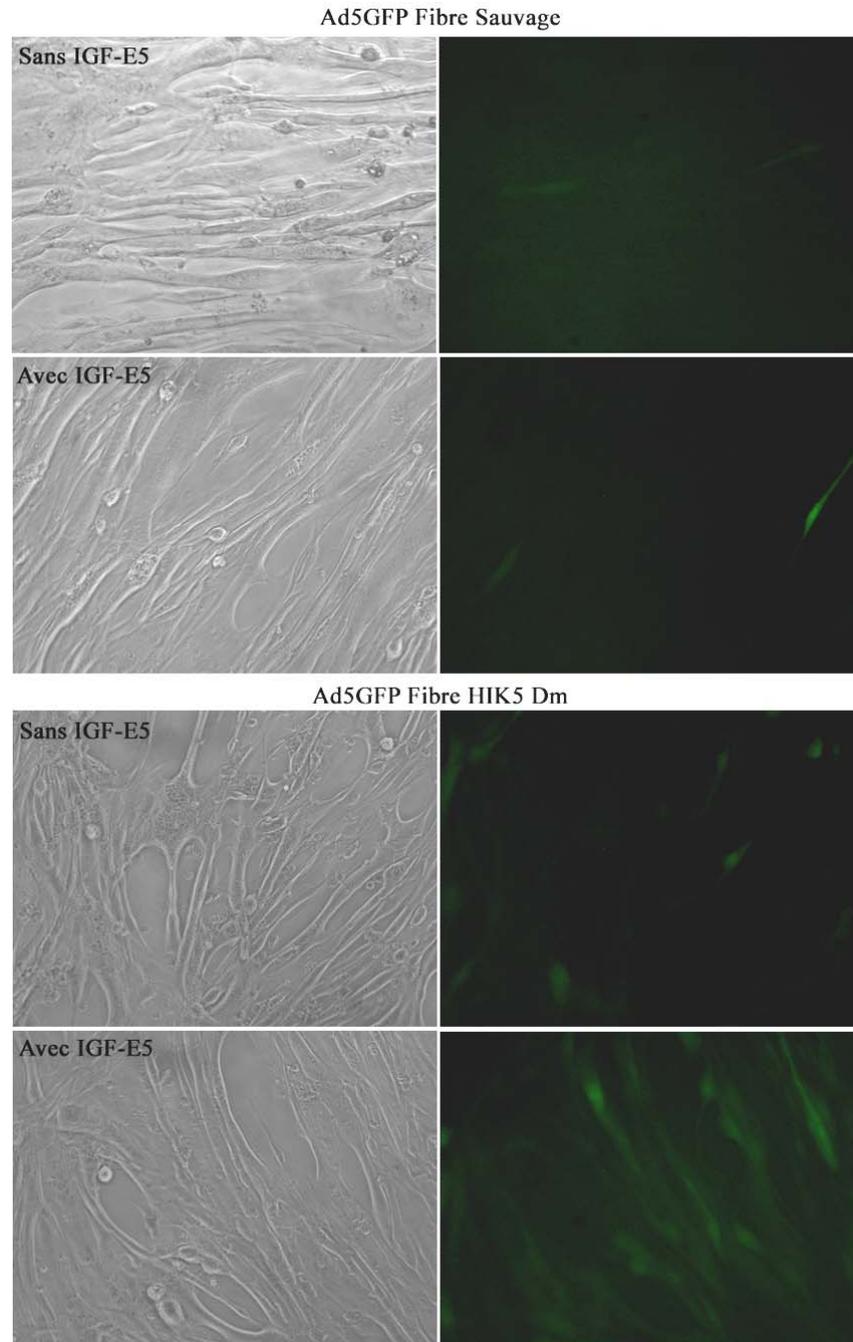


Figure 54 : Expression de la GFP suite à transduction avec différents virus en absence ou en présence d'IGF-E5.

Les myoblastes ont été ensemencés à 50 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits puis différenciés pendant 7 jours en présence de 2% de sérum équin. Une fois différenciés, les myotubes ont été infectés à une MOI de 100 avec un virus arborant une fibre sauvage ou modifiée, en absence ou en présence de 3.6×10^5 molécules d'IGF-E5. Les myotubes sont incubés pendant 48 heures avant que les photos soient prises avec un microscope muni d'une lampe UV et d'un filtre vert.

À partir des conditions expérimentales optimales, plusieurs essais ont été effectués pour valider l'efficacité du changement de tropisme dans les myotubes à l'aide du virus Ad5GFP Fibre sauvage et du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Une fois infectés dans les différentes conditions, les myotubes étaient incubés pendant 48 heures. Les niveaux d'expression de la GFP ont été analysés, premièrement, par l'acquisition de photos. La figure 54 montre qu'il y a une bonne différence d'expression au niveau des fibres qui ont été infectées avec les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm associés avec l'IGF-E5. Pour permettre la quantification de l'augmentation observée par microscopie, les protéines des fibres musculaires ont été extraites et dosées. La réalisation de plusieurs expériences d'immunobuvardage de type Western (Figure 55A) a permis de démontrer l'expression de la GFP dans les fibres musculaires. Les bandes de GFP ont été par la suite quantifiées et normalisées en fonction du contrôle interne bêta actine. L'association de l'IGF-E5 avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm augmente donc l'efficacité de transduction par un facteur de 3.2. Cette augmentation est significative ($p < 0.05$) lorsque les tests statistiques sont calculés en utilisant le logarithme de l'intensité des multiples expériences, pour trois expériences indépendantes (Figure 55B). Les GFP des deux virus ne sont pas de la même taille, étant donné que la GFP du virus Ad5GFP HIK5 Dm contient 38 acides aminés provenant de la chlororamphénicol acétyltransférase (CAT). Par contre, en regardant la figure 55A, on constate une bande à la hauteur de la GFP dans les pistes contenant la CAT-GFP. Ces bandes suggèrent que la protéine de fusion est susceptible à un clivage protéolytique.

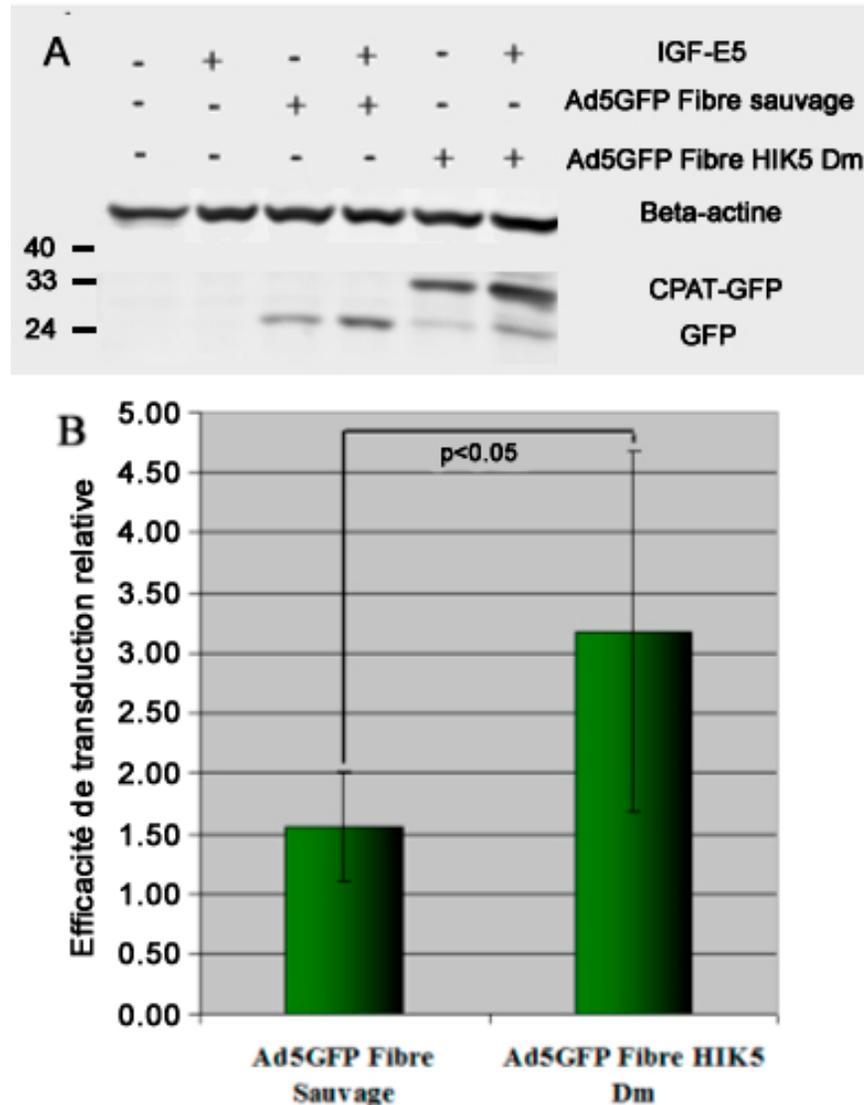


Figure 55 : Expression et quantification de la GFP dans les myotubes.

Les myotubes ont été infectés avec les particules infectieuses du virus Ad5GFP Fibre sauvage ou Ad5GFP Fibre HIK5 Dm à une MOI de 100. Les virus ont été associés en absence ou en présence de 3.6×10^5 molécules d'IGF-E5 par virus. (A) 30 μ g d'extrait protéique ont été chargés puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La GFP a été révélée avec un anticorps polyclonal contre la GFP diluée 1 dans 250; l'actine a été révélée avec un anticorps monoclonal contre la β -actine dilué 1 dans 10 000. Les anticorps secondaires couplés au fluorochrome Cy5 dilués 1 dans 1000 et 1 dans 3000 ont été utilisés pour la GFP et pour la bêta actine respectivement. Les bandes ont été révélées à l'aide du laser de 633 nm d'un typhoon trio+ et analysées par le logiciel ImageQuant V2.0. (B) L'histogramme représente l'augmentation relative des différents vecteurs en présence d'IGF-E5 pour trois expériences indépendantes (n=3). Une valeur relative de 1 a été utilisée pour les conditions effectuées en absence d'IGF-E5. P<0.05 en fonction du logarithme des trois expériences.

3.7 Changement de tropisme dans les tissus musculaires de souris nouveau-nées MDX

Les muscles sont un modèle très intéressant car le transfert de gènes dans ceux-ci à l'aide d'un AdV n'est pas très efficace. Comme il a été mentionné auparavant, l'une des causes serait le faible niveau d'expression de la protéine CAR dans les fibres musculaires (Nalbantoglu et al., 1999). Démontrer un accroissement de l'infectivité virale dans les muscles, suite à l'altération du tropisme viral, pourrait favoriser l'utilisation des AdVs pour certaines approches thérapeutiques, dont le traitement de la DMD. Ayant déjà montré qu'il était possible d'induire un changement de tropisme dans des myotubes en culture, la possibilité d'accroître l'infectivité en ciblant directement les fibres musculaires *in vivo* était l'étape subséquente à évaluer. On a donc eu recours à des souris nouveau-nées, car il était important de pouvoir observer l'infectivité des virus Ad5GFP Fibre sauvage et Ad5GFP Fibre HIK5 Dm pour permettre de comparer l'accroissement induit par l'ajout de l'IGF-E5. Il est connu que les muscles des nouveau-nés sont plus faciles à transduire que les muscles des adultes (Cao et al., 2001). Étant donné que la DMD pourrait être étudiée subséquemment, nous avons opté pour des souris MDX qui ont une déficience du gène de la dystrophine. La première étape fut de démontrer que le récepteur à l'IGF-I pouvait être retrouvé dans les muscles de souris MDX nouveau-nées. La figure 56 montre des sections de muscles qui ont été marquées avec un anticorps primaire contre l'IGF-IR. Les images permettent d'observer la présence de plusieurs fibres musculaires qui sont positives pour le récepteur

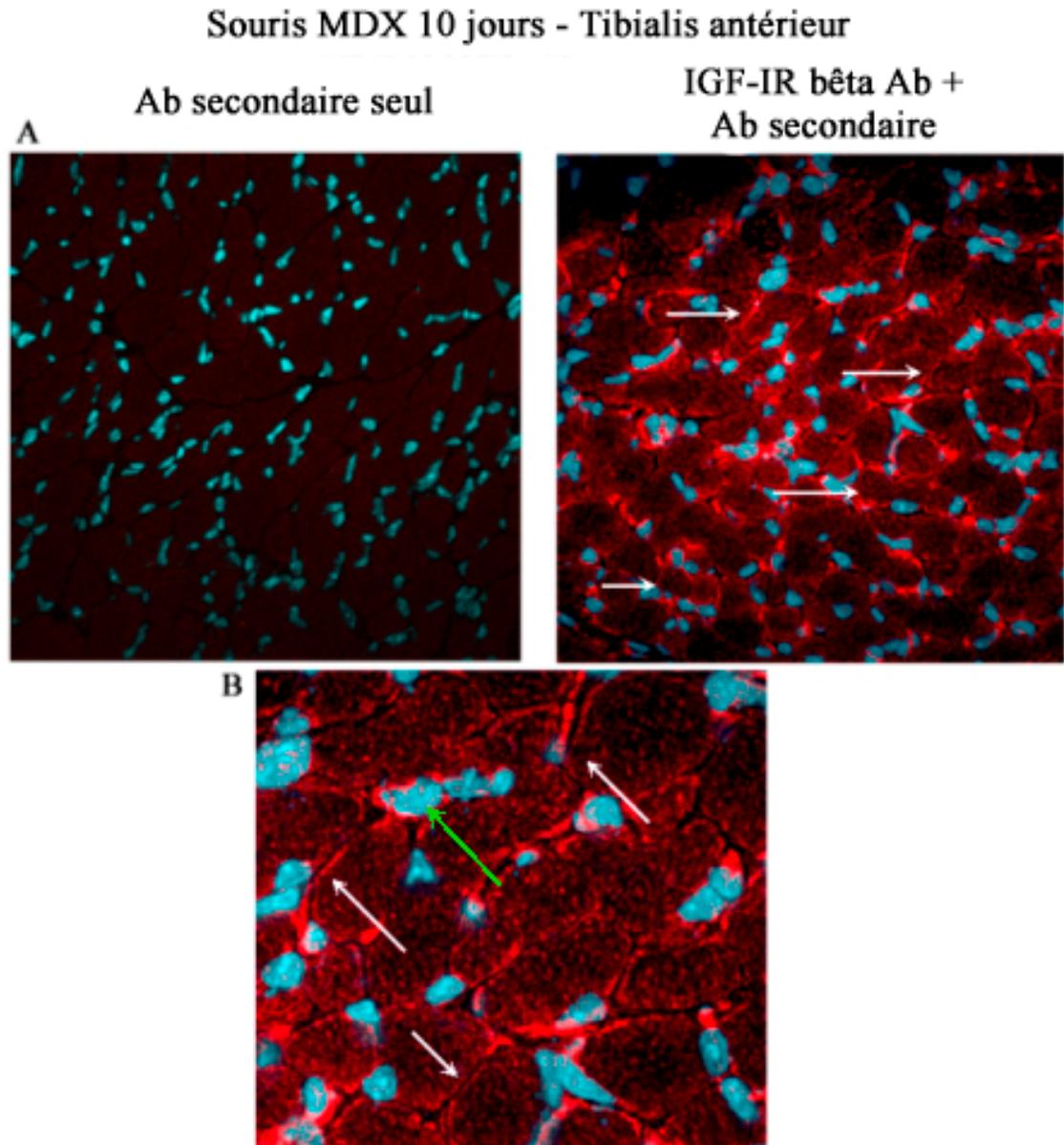


Figure 56 : Présence du récepteur à l'IGF-I dans les muscles de souris MDX nouveau-nées.

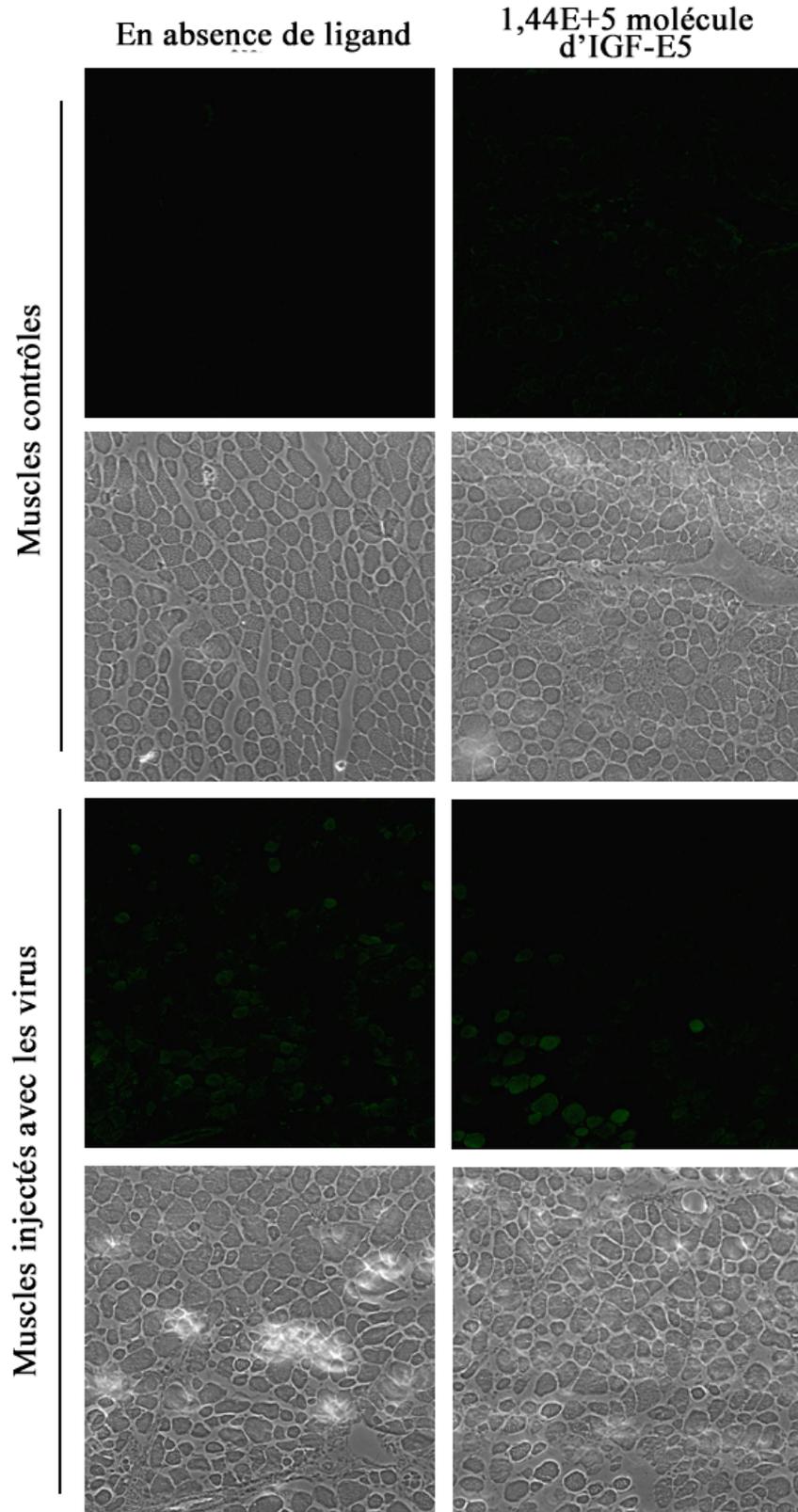
Les souris ont été sacrifiées 10 jours après leur naissance et les muscles ont été congelés. Des sections ont été placées sur une lamelle, puis fixées en présence de formaldéhyde 2%. L'anticorps primaire contre l'IGF-IR a été dilué 1 dans 5 puis incubé avec un anticorps secondaire couplé à l'ALEXA Fluor® 488 dilué 1 dans 1000 (représenté en rouge pour un meilleur contraste). Le HOESCTH33342 a été ajouté pour marquer les noyaux (en bleu). Les images ont été prises à l'aide d'un microscope confocal à 60X (A). L'image a été agrandie 3 fois pour une meilleure visualisation l'IGF-IR (B). Les flèches blanches pointent la présence de récepteur à l'IGF-I à la surface des certaines fibres musculaires. La flèche verte pointe un noyau qui ne ferait pas partie d'une fibre musculaire.

à l'IGF-I (flèches blanches). De plus, l'expression de l'IGF-IR dans certaines cellules (flèche verte) semble montrer qu'il aurait des cellules retrouvées dans l'interstice formé par plusieurs fibres musculaires. On peut déterminer qu'il s'agit de cellules à cause de la présence du marquage nucléaire effectué par l'ajout du Hoescht 33342 sur les sections musculaires. Le colorant nucléaire permet, en plus, de prouver que les structures délimitées par l'expression de l'IGF-IR sont des fibres musculaires, étant donné qu'il y a la présence de multiples noyaux et que la localisation des noyaux est périphérique.

Pour évaluer si l'utilisation d'IGF-E5 pouvait augmenter l'efficacité de transduction dans les muscles de souris, 1×10^8 particules infectieuses ont été injectées dans les tibialis antérieures de souris MDX nouveau-nées. Les virus Ad5GFP Fibre sauvage et les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm ont été incubés en présence ou en absence de $30 \mu\text{g}$ d'IGF-E5 avant d'être injectés (1.44×10^5 molécules d'IGF-E5 par virus). Comme pour toutes les expériences de changement de tropisme, les particules non infectieuses ont été prises en considération dans la quantité d'IGF-E5 qui a été utilisé. Les tibialis antérieurs (TA) gauche et droit de chaque souris ont été injectés dans des conditions expérimentales différentes. Ainsi, un muscle a été injecté avec les particules seules, tandis que l'autre a été injecté avec le même virus, mais en présence de l'IGF-E5. Suite aux différentes injections, les souris ont été gardées pendant 10 jours puis ont été sacrifiées. Les TA ont été isolés pour être gelés et sectionnés. Différentes analyses ont été entreprises pour valider que l'association de l'IGF-E5 avec les particules virales AdGFP Fibre HIK5 Dm pouvait induire un changement de tropisme.

Pour montrer l'efficacité de la transduction, les sections provenant des différents muscles ont été fixées sur des lamelles puis marquées à l'aide d'anticorps primaire ciblant la GFP. Un anticorps secondaire couplé avec l'ALEXA Fluor[®] 488 qui émet à 520 nm a été utilisé. Les coupes musculaires provenant des souris injectées avec le virus sauvage montrent une distribution uniforme dans les fibres qui ont été infectées. Visuellement, il est difficile de dénombrer les fibres musculaires qui sont réellement positives, étant donné la faiblesse du signal. Au travers des différentes coupes de muscles, il semble y avoir quelques fibres qui montrent la présence d'agrégation (figures 57 et 58). Pour ce qui des sections qui ont été injectées avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm avec ou sans la présence de l'IGF-E5, une plus grande proportion de fibres possédant une distribution sous forme d'agrégation peut être observée. Les images de la figure 58 montrent la présence d'un marquage à la périphérie de différentes fibres. Comme pour les fibres injectées avec le virus sauvage, il est très difficile de faire la distinction entre les fibres positives et le bruit de fond. L'agrégation observée dans les sections de muscles rend la tâche plus complexe. De plus, lorsque les coupes sont analysées à plus fort grossissement, il est possible d'observer des structures ressemblant à des cellules uniques qui expriment la GFP (figure 58). N'ayant pas de coloration nucléaire, on peut supposer qu'il s'agit de cellules satellites qui ont été infectées ou des cellules immunitaires provenant d'une réponse immunitaire contre les particules virales ou le transgène.

Ad5GFP Fibre sauvage



Ad5GFP Fibre HIK5 Dm

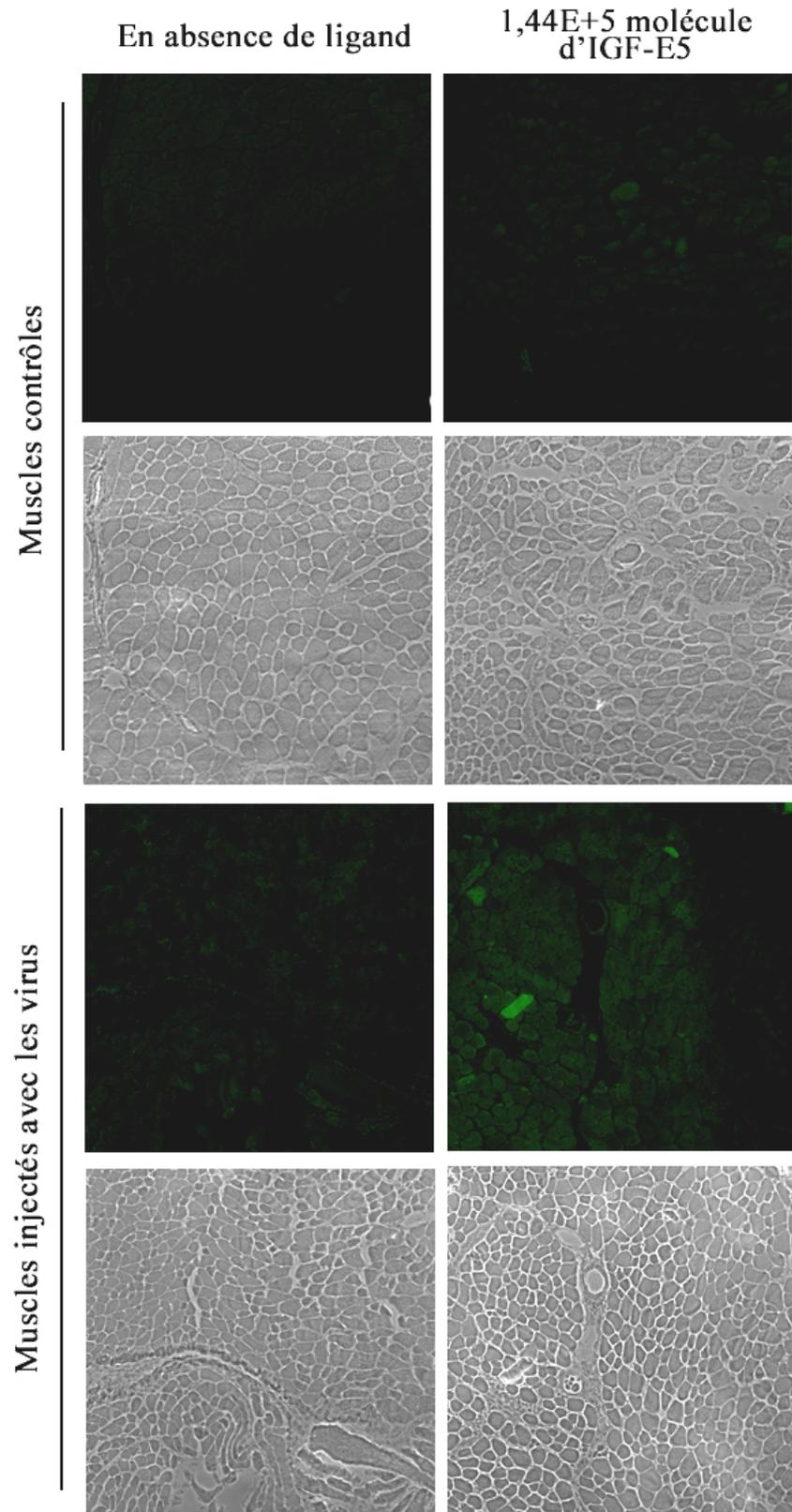


Figure 57 : Immunomarquage des sections de muscles transduites avec différents virus. 4 à 6 sections des différents muscles infectés ont été coupées puis fixées 5 minutes dans du paraformaldéhyde. Un anticorps primaire contre la GFP a été utilisé, suivi d'un anticorps secondaire couplé à l'ALEXA Fluor[®] 488. Les coupes ont été scellées avec un mélange de montage. La photo a été prise à une magnitude de 60X avec une excitation à l'aide du laser de 473 nm d'un microscope confocal FV10i.

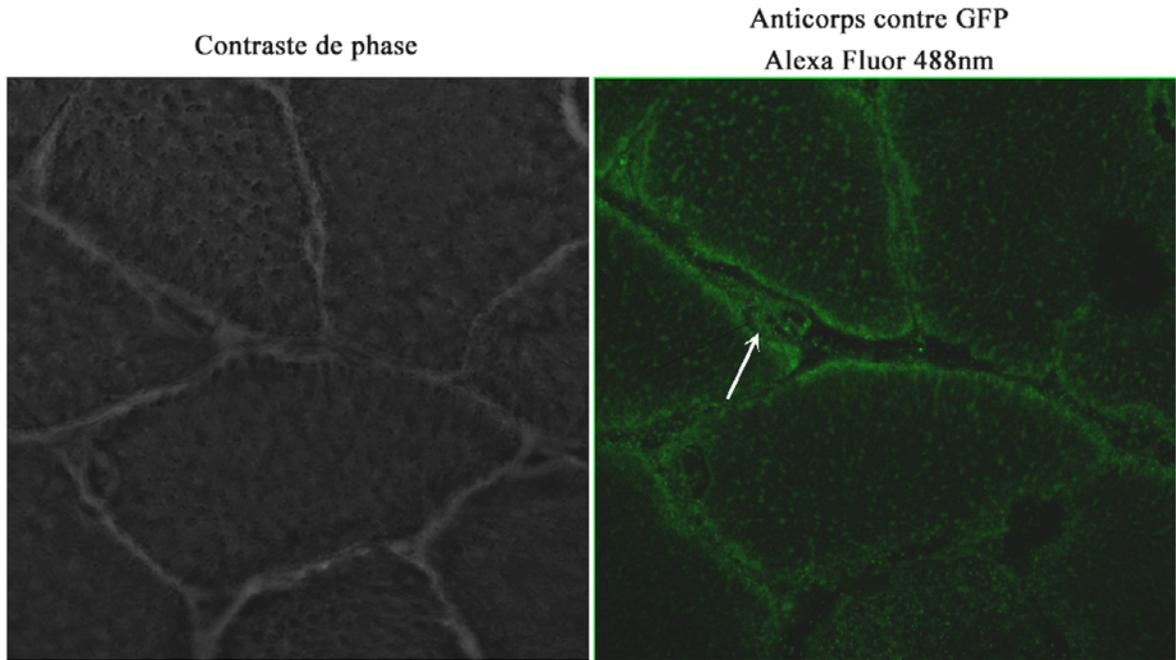


Figure 58 : Photo d'une section de muscle infecté immunomarkuée à une magnitude de 180X

Les sections proviennent du muscle gauche de la souris 3886 qui a été injectée avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm en présence de l'IGF-E5. Les sections ont été coupées, puis fixées 5 minutes dans du paraformaldéhyde. Un anticorps primaire contre la GFP a été utilisé, suivi d'un anticorps secondaire couplé à l' ALEXA Fluor[®] 488. La coupe a été scellée avec un mélange de montage. La photo a été prise à une magnitude de 180X avec une excitation à l'aide du laser de 473 nm d'un microscope confocal FV10i.

Pour montrer que le système permettait une augmentation de l'infectivité dans les muscles de souris, l'expression de la GFP n'a pas été le seul essai pour vérifier l'efficacité à transduire les muscles. L'analyse des sections servant à déterminer le contenu en ADN

viral a aussi été réalisée, pour démontrer que l'infektivité avait été augmentée. Plusieurs sections de chaque muscle ont été traitées pour extraire et isoler l'ADN viral. Des cellules en culture ont été infectées avec des virus purifiés pour générer des ADN viraux, lesquels ont été utilisés pour générer la courbe standard. L'ADN viral des quatre conditions expérimentales a donc été extrait de 30 sections de muscles et a été quantifié

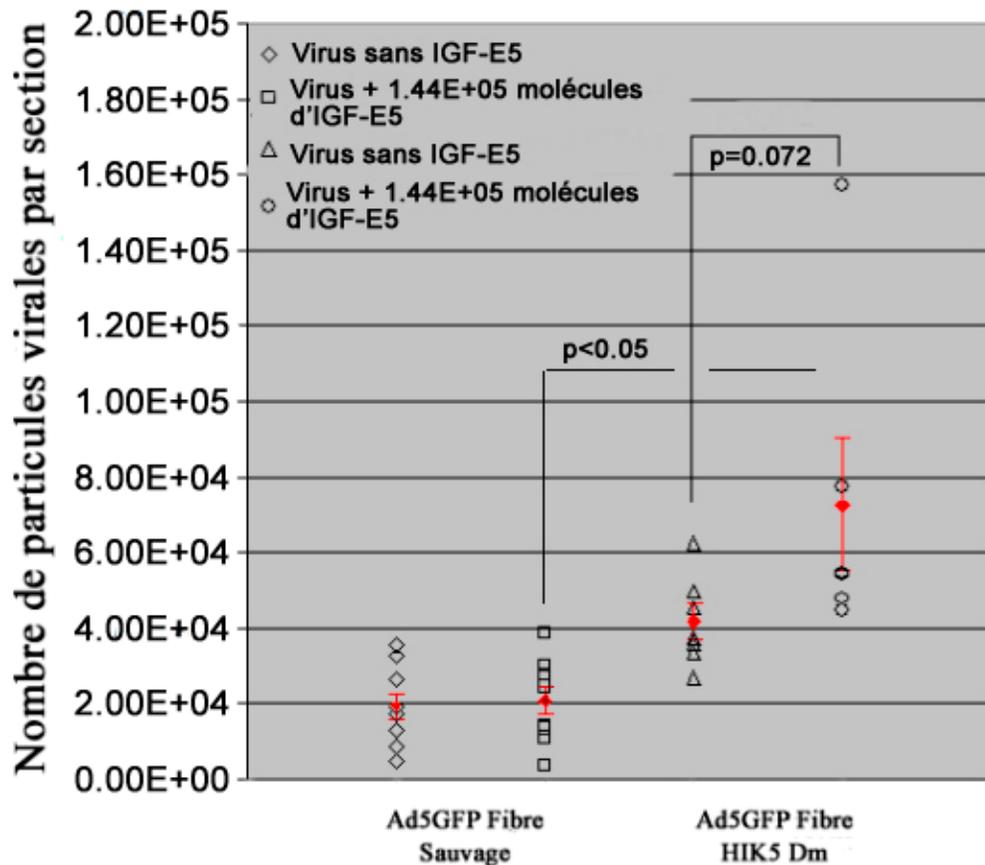


Figure 59 : Nombre de particules virales mesuré dans les différents muscles.

L'ADN viral de 30 sections des muscles infectées avec les virus Ad5GFP Fibre sauvage (n=9) et avec les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (n=6) a été extrait. 40ng d'ADN ont été utilisés dans le cadre d'un PCR en temps réel pour mesurer le nombre de copies de génomes viraux contenus dans les sections de muscle. Une courbe standard provenant d'ADN purifié a permis de déterminer le nombre de particules virales contenues dans les sections. L'utilisation d'amorces ciblant le gène de l'adipsine de souris a servi de contrôle interne, afin de comparer les échantillons.

par PCR en temps réel (Figure 59). Les résultats montrent qu'il y a une augmentation de 1.67 fois. Suite à un test de student unilatéral, on a pu démontrer que cet accroissement n'était pas statistiquement significatif (Figure 59). Par contre, si on compare les muscles infectés par le virus possédant une fibre sauvage avec ceux infectés par le virus arborant une fibre modifiée, la distribution des points suggère que l'augmentation de l'infectivité serait réelle. En fait, l'augmentation observée entre les deux conditions est statistiquement significative. De plus, certains muscles ont été transduits par des quantités élevées de particules virales.

Pour mesurer si l'augmentation au niveau de l'intensité observée dans les sections était causée par une plus grande quantité de GFP, des immunobuvardages de type Western ont été effectués sur le contenu protéique des multiples sections. Les immunobuvardages avaient pour but de déterminer si les données recueillies par PCR en temps réel étaient valides. 60 sections de muscles provenant des 5 meilleurs échantillons quantifiés par PCR en temps réel ont donc été utilisées pour former les extraits protéiques. Les bandes obtenues (Figure 60) démontrent qu'il y a eu transduction des muscles et que plusieurs bandes ont une excellente intensité dans les sections évaluées. Les variations d'intensité observées chez les différents muscles provenant d'un même animal sont généralement causées par des variations au niveau des injections. En effet, le volume injecté peut varier quelque peu, et avoir un impact important sur le nombre de particules infectieuses réellement injectées dans les muscles. De manière à pouvoir comparer les échantillons, un contrôle bêta actine a été effectué. L'intensité des bandes a été mesurée, puis normalisée en fonction de l'actine dans

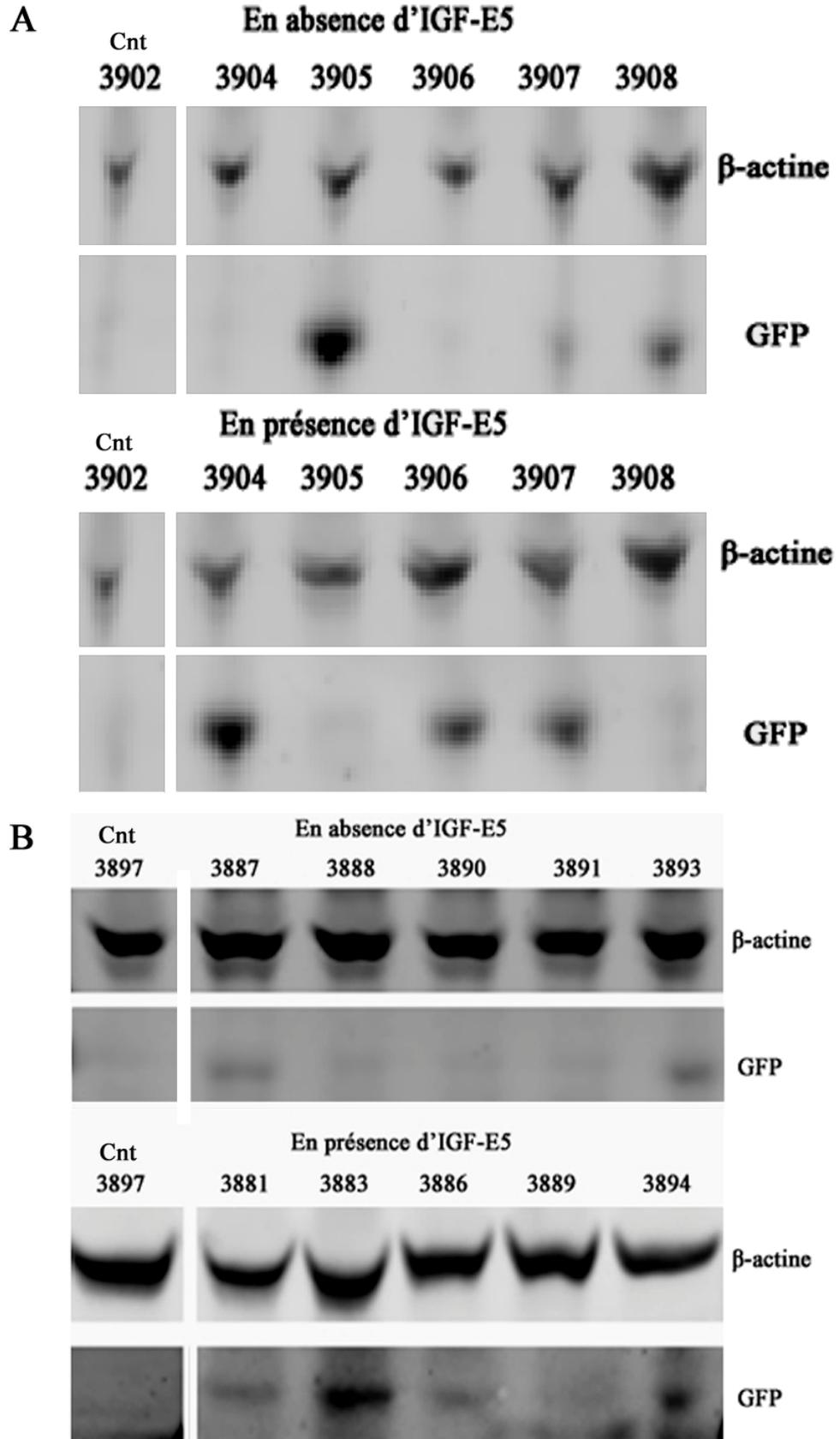


Figure 60 : Augmentation de la GFP dans différents échantillons de muscles par immunobuvardage de type Western.

Les protéines ont été extraites de 60 sections de muscles injectés par une solution contenant un virus arborant une fibre sauvage (A) ou un virus arborant une fibre modifiée (B). 30 μ g de protéines ont été chargés sur un gel d'acrylamide de 4% à 20%. Les pistes 3902 et 3897 contiennent les extraits provenant des souris injectées avec de la saline. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose puis la membrane a été bloquée. Les membranes ont été marquées avec anticorps primaire contre la GFP (1:250) et contre l'actine (1:10000). La membrane a été lavée à 6 reprises, puis incubé 45 minutes avec un anticorps secondaire couplé au Cy5 (1:1000 pour la GFP et 1:3000 pour l'actine). Suite à 6 autres lavages, les bandes ont été révélées par l'excitation du Cy5 avec un laser de 633 nm provenant d'un typhoon Trio+ et analysé par le logiciel ImageQuant V2.0.

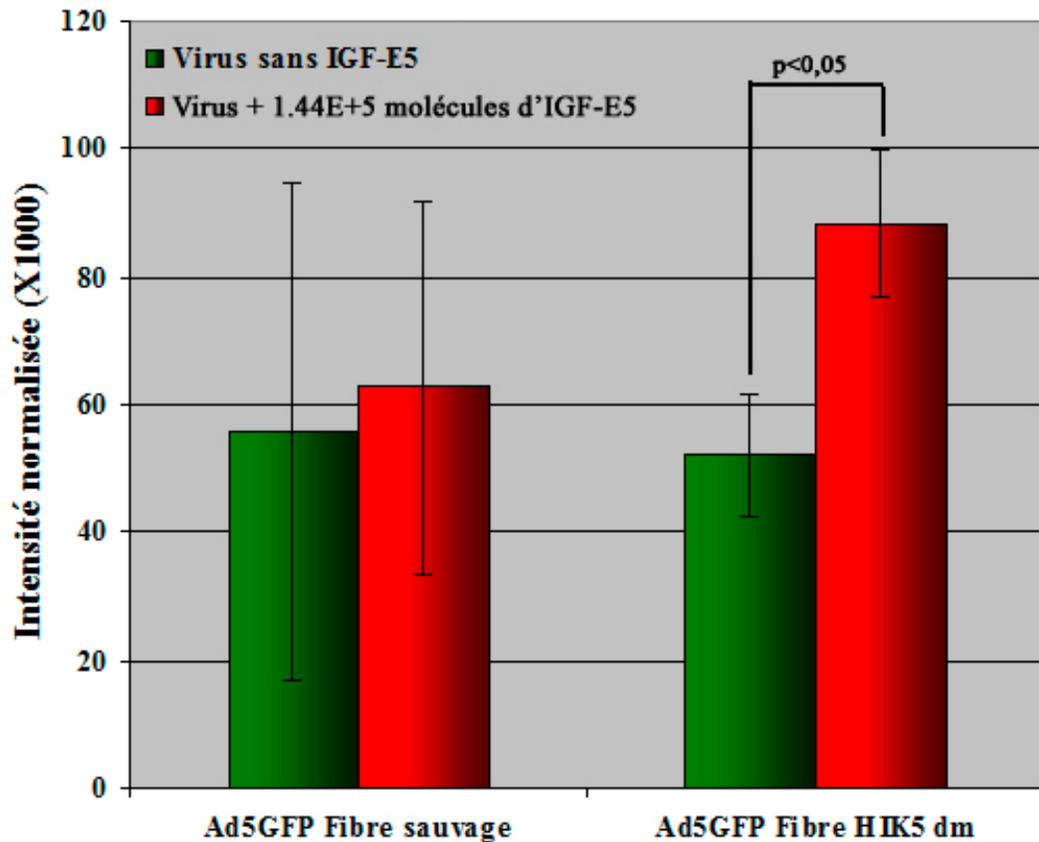


Figure 61 : Évaluation de l'intensité de la GFP obtenue par immunobuvardage.

Les bandes obtenues à la figure 60 ont été analysées par le logiciel ImageQuant V2.0. Les valeurs calculées ont été normalisées en fonction de la β -actine. 6 bandes pour chacune des conditions ont été sélectionnées pour la quantification. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur la moyenne des 6 valeurs.

chacune des conditions expérimentales. L'histogramme de la figure 61 montre que l'expression de la GFP est variable. Les valeurs nous permettent, par contre, de calculer une augmentation significative de 1.65 fois dans les échantillons provenant du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm en présence du ligand IGF-E5. Ce résultat permet d'affirmer qu'il y a eu une augmentation de la transduction dans les muscles de souris.

Section 4 :

Discussion

4 Discussion

Le projet de recherche consistait à produire des vecteurs viraux dont le tropisme pourrait être altéré en combinaison avec différents ligands bispécifiques. Nous avons donc inséré un domaine d'interaction K-Coil (KSVLSEV) dans la boucle HI du bouton de la fibre et avons démontré que le domaine K-Coil avait conservé sa capacité à interagir avec les ligands AFAI-E5-Coil, EGF-E5-Coil et l'IGF-E5. L'utilisation de ces ligands bispécifiques arborant le domaine d'interaction artificiel E5-Coil a permis l'obtention d'un changement de tropisme, en association avec le virus possédant le domaine K5-Coil dans sa boucle HI avec deux mutations dans le domaine AB (soit la sérine 408 en acide glutamique et la proline 409 en alanine). L'association des particules virales Ad5GFP Fibre HIK5 Dm avec l'IGF-E5 a pu augmenter l'infectivité des vecteurs viraux de 2 à 8 fois selon les cellules tumorales utilisées. L'accroissement d'infectivité en fonction du récepteur à l'IGF-I n'avait pas été étudié à ce jour dans les tumeurs pulmonaires ou ovariennes. Ces modèles cellulaires sont pourtant des plus intéressants, à cause du faible niveau d'expression du CAR qui réduit l'infectivité des AdVs (Morrison et al., 2008a; Zeimet et al., 2002).

Par ailleurs, l'analyse de nos résultats reliés à l'utilisation de l'AFAI a démontré qu'il était possible d'inclure un domaine d'interaction E-Coil dans un anticorps à un seul domaine et que l'utilisation de ce ligand bispécifique pouvait améliorer le potentiel d'infectivité d'un AdV arborant une fibre contenant le domaine K-Coil. Cette étape démontre que la formation de ligands bispécifiques provenant d'anticorps à un seul domaine pourrait être une alternative intéressante à considérer pour générer un changement

de tropisme contre différentes protéines membranaires. Par exemple, les anticorps à un seul domaine deviennent intéressants si le ligand d'un récepteur surexprimé dans des tumeurs n'est pas connu ou si on veut éviter l'activation du récepteur ciblé. La possibilité de cibler différents récepteurs cellulaires comme l'EGF-R et l'IGF-IR avec notre système de même que la possibilité d'utiliser des anticorps à un seul domaine pour changer le tropisme démontre la flexibilité de notre système.

Le système d'altération de tropisme a aussi montré d'excellents résultats concernant la transduction de fibres musculaires de souris. Nous avons obtenu des valeurs très similaires à celles résultant de plusieurs études qui ont été effectuées sur la possibilité de changer le tropisme dans les fibres musculaires, (Menezes et al., 2006; Ghosh and Barry, 2005). Par contre, la majorité des expériences rapportées dans la littérature utilisait différentes voies d'interaction avec les fibres autres que l'IGF-I. En fait, le groupe de Menezes avait montré que l'IGF-I n'était pas un bon ligand pour l'interaction, que ce soit avec les fibres musculaires ou avec les myoblastes (Menezes et al., 2006). Pourtant, nos résultats démontrent qu'il est possible d'accroître de manière significative l'infectivité d'un adénovirus dans les myoblastes, les myotubes, de même que dans les fibres musculaires de souris nouveaux-nées MDX.

4.1 Production des ligands bispécifiques

La production protéique dans les bactéries est une méthode qui est généralement utilisée pour la génération de plusieurs protéines recombinantes à des coûts peu élevés (Yin

et al., 2007;Gasser et al., 2008). De plus, plusieurs promoteurs sont disponibles pour permettre l'expression des protéines recombinantes dans diverses conditions (Valdez-Cruz et al., 2010). Cette méthode est rapide, car elle requiert seulement la formation des plasmides et la transformation dans les bactéries pour permettre la production, contrairement à la génération de clone stable dans des lignées de mammifères. Les productions protéiques dans les bactéries peuvent s'accumuler dans différents compartiments, entre autres au niveau de l'espace périplasmique, dans des corps d'inclusion ou dans le milieu de culture suite à la sécrétion des protéines (Valdez-Cruz et al., 2010). La production d'AFAI-E5-Coil dans les bactéries a permis de produire une grande quantité de protéines, ce qui a, à son tour, permis d'effectuer les essais *in vitro*. Par contre, vu que la protéine était accumulée dans l'espace périplasmique, plusieurs protéines contaminantes ont aussi été extraites au même moment (Figure 18). Dans des expériences *in vitro*, l'utilisation de l'échantillon partiellement purifié avec une colonne d'affinité au cobalt a été suffisante pour démontrer la possibilité d'augmenter l'infektivité dans les A549. Par contre, pour permettre l'utilisation de ces protéines dans un contexte *in vivo*, il faudrait accroître la pureté des échantillons en incluant des étapes de purification supplémentaires. Pareillement, l'accroissement de la pureté entraînerait une réduction de la quantité d'AFAI-E5-Coil disponible. De plus, de par leur nature, les bactéries sont une source importante d'endotoxines dans les échantillons. Pour que nos échantillons d'AFAI-E5-Coil puissent être utilisés dans des modèles animaux, il faudrait éliminer les endotoxines contenues dans les échantillons. Contrairement au ligand AFAI-E5-Coil, le ligand bispécifique EGF-E5-Coil s'accumule dans les corps d'inclusion bactériens lors des productions (Le et al., 2009). Plusieurs études ont montré que la concentration de protéines

produites par les bactéries de même que le repliement de certaines protéines seraient des causes entraînant l'accumulation des protéines produites dans les corps d'inclusion (Gasser et al., 2008). Toutefois, les corps d'inclusion ont comme avantage de produire des extraits protéiques partiellement purifiés de la protéine d'intérêt, ce qui a pu être observé lors de la purification du ligand EGF-E5-Coil (Figure 17). Étant donné que la protéine n'est pas repliée correctement dans les corps d'inclusion, il faut effectuer des étapes subséquentes à l'extraction pour rendre l'EGF-E5-Coil actif. Ces étapes entraînent une diminution de la quantité de protéines disponibles pour effectuer des expériences, comme nous avons pu l'observer. Des observations similaires avaient été effectuées dans des productions précédentes (Le et al., 2009).

Pour l'IGF-E5, l'option des cellules de mammifère a été sélectionnée, car dans les modèles bactériens, l'IGF-I s'accumule dans les corps d'inclusion (Upton et al., 1992). De plus, il faut effectuer une étape supplémentaire pour permettre de replier correctement l'IGF-I, affectant ainsi la quantité de ligands qui peut être purifiée. Il faut cependant souligner, bien que la formation de clones stables soit longue et laborieuse, elle permettrait à l'IGF-E5 d'adopter une conformation qui se rapproche de l'IGF-I et diminuerait ainsi le nombre d'étapes de purification. Ce processus pourrait être accéléré en intégrant la séquence d'intérêt à l'aide d'un virus intégratif, comme les lentivirus. Cette approche éliminerait les étapes de sélections nécessaires à la formation des clones stables par transfection transitoire. D'ailleurs, cette démarche a été réalisée avec succès pour différentes protéines sécrétées (Gaillet et al., 2010; Spencer et al., 2011). Les modifications apportées à l'IGF-I, dont l'élimination du domaine E et l'ajout des domaines His-Tag et E-

Coil, n'ont pas empêché la sécrétion de l'IGF-E5. Une excellente concentration de 158 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a donc pu être obtenue après avoir déterminé les meilleures conditions, et ce, avec peu de contaminants protéiques (Figure 15). En augmentant les volumes de production à 1L, nous avons pu produire une préparation de 6.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'IGF-E5 avec des niveaux d'endotoxine de 0.94 EU/mg. Cette préparation nous a donc permis d'effectuer des essais *in vivo*. Néanmoins, la quantité récupérée n'est pas très importante; l'évaluation du milieu conditionné a mené à la constatation que la production n'avait pas été aussi efficace que les conditions qui avaient été mises au point. Il est possible que l'expression de l'IGF-E5 ait été réduite par des processus cellulaires, suite à la conservation des cellules en culture. En effet, il a été montré que certains processus, tels la condensation de la chromatine ou la méthylation des promoteurs, pouvaient affecter les niveaux d'expression (Wurm, 2004). De plus, la présence de plusieurs produits de dégradation serait une cause du niveau de récupération relativement faible observé. Ceci parce que plusieurs étapes, lors des purifications, peuvent entraîner la dégradation des protéines : le temps d'exécution et la température du système en font partie (Apte and Ugwu, 2004). Ces étapes pourraient être optimisées pour accroître le niveau de récupération.

Il a été montré récemment que le EGF-E5-Coil pouvait lier le récepteur à l'EGF (Le et al., 2009). Cette interaction est essentielle pour s'assurer que le ligand puisse être utilisé pour engendrer un changement de tropisme. Précisément, l'interaction de l'IGF-E5 avec le récepteur à l'IGF-I a été démontrée par un essai de phosphorylation (Figure 16). L'évaluation de la phosphorylation du récepteur a été effectuée, suite à la révélation de la forme phosphorylée à l'aide de l'anticorps contre la forme phosphorylée de la tyrosine

1131. Les bandes observées ont permis de conclure que le domaine E-Coil n'avait pas d'impact sur la capacité de l'IGF-E5 à lier l'IGF-IR, car l'autophosphorylation a lieu seulement après la liaison entre le récepteur et l'IGF-I (Dupont and LeRoith, 2001;Lopaczynski, 1999). Les niveaux de phosphorylation moins importants, induits par l'IGF-I recombinant à des concentrations similaires, s'expliqueraient par la provenance des différents ligands. En effet, l'IGF-I recombinant qui a été utilisé avait été produit dans des cultures bactériennes, c'est-à-dire obtenues par l'accumulation de l'IGF-I dans les corps d'inclusion demandant qu'elle soit repliée correctement (Upton et al., 1992). La structure tridimensionnelle de l'IGF-I recombinant pourrait donc affecter l'association avec le récepteur à l'IGF-I, contrairement à l'IGF-E5 qui a été obtenu dans des cellules de mammifère (Gasser et al., 2008). Ensuite, il a été montré que certains ligands pouvaient induire des signaux, même lorsqu'ils étaient associés avec des particules virales (Doukas et al., 1999). Le changement de tropisme via l'utilisation de l'IGF-E5 ou de l'EGF-E5-Coil pourrait ici induire des réponses cellulaires, suite à l'association avec leur récepteur respectif. En effet, la phosphorylation de l'IGF-IR peut induire la survie cellulaire, accroître la motilité ou stimuler la division cellulaire (Dupont and LeRoith, 2001;Reinmuth et al., 2002), tandis que l'EGF-R peut induire des signaux de survie dans les cellules (Saito et al., 2004). Dans le cadre d'essais qui auraient pour but d'induire la mort de cellules cancéreuses, il serait important de considérer l'éventualité que l'utilisation de l'IGF-E5 ou de l'EGF-E5-Coil puisse activer ces différents processus cellulaires. Cette activité pourrait être problématique si les signaux de survie sont plus importants que la mort induite par la méthode sélectionnée. Dans de telles conditions, l'utilisation d'un anticorps avec un seul

domaine pourrait être avantageuse pour cibler les différents récepteurs, étant donné que plusieurs anticorps ont la capacité de lier les récepteurs sans toutefois les activer.

4.2 Impact du K-Coil sur les fibres virales

Plusieurs études ont déjà montré qu'il était possible d'ajouter des éléments dans la portion C-terminale ou dans la boucle HI de la fibre, sans affecter l'expression de la fibre ou altérer sa trimérisation (Einfeld et al., 1999; Piao et al., 2008; Krasnykh et al., 1998). L'incorporation du domaine K-Coil dans les fibres virales a pourtant eu plusieurs conséquences, tant au niveau de l'expression des fibres qu'au niveau de la production et de l'infectivité des particules virales. L'incorporation de 5 répétitions dans la boucle HI, en plus des mutations générées dans le domaine AB, n'a pas interféré avec les niveaux d'expression de la fibre. Pourtant, la fusion des 5 répétitions dans le C-Terminus a engendré une diminution d'expression dans les cellules transfectées, contrairement à l'incorporation de 4 répétitions seulement. Ces résultats montrent l'importance de la position des éléments K-Coil sur la fibre et le fait que l'ajout d'élément dans la séquence peut nuire à l'expression. En fait, l'ajout de séquence dans la fibre peut réduire l'expression de celle-ci (Glasgow et al., 2009). La perte d'expression, suite à l'ajout d'une répétition supplémentaire en C-terminal de 4 à 5 répétitions, suggère que l'ajout des répétitions forme des fibres qui ne sont pas aussi stables que la fibre sauvage. Pour ce qui est de la trimérisation des monomères provenant des différentes constructions, nous avons constaté que les fibres qui étaient exprimées pouvaient trimériser correctement (Figure 19).

L'incorporation des modifications dans la fibre virale a mené à l'observation de plusieurs altérations lors de l'amplification ou de la purification des virus modifiés. Tout d'abord, la quantité de particules infectieuses qui était produite par les cellules n'était pas aussi importante que celles obtenues en amplifiant un virus arborant une fibre sauvage. Le faible niveau observé avant la purification suggère que les modifications auraient un impact sur la formation des particules virales. À vrai dire, les modifications pourraient rendre les particules virales non infectieuses, à cause de problèmes conformationnels. Ces modifications pourraient affecter l'interaction entre les fibres virales et nuire à la formation de capsides matures. Sinon, la réduction de l'infectivité de particules virales pourrait aussi être associée avec l'altération du cycle viral, en réduisant le nombre de particules internalisées ou relâchées des endosomes. Si la réduction d'infectivité que nous avons observée est occasionnée par l'altération d'une étape du cycle viral, il est possible que l'évaluation du nombre de particules infectieuses par cytométrie soit sous-estimée. Des variations au niveau de la dynamique d'infection supportent la possibilité que l'infectivité des particules infectieuses soit altérée. En effet, au lieu d'atteindre une expression maximale du transgène en 18 heures, il faut aux virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm au dessus de 80 heures pour obtenir un niveau d'expression comparable (Figure 29). En outre, la voie d'internalisation de certains virus modifiés avait déjà été analysée. Par exemple, l'internalisation via le récepteur CD46 passe par une voie différente de celle qu'emprunte le CAR, modifiant ainsi le temps d'expression des transgènes (Shayakhmetov et al., 2003). Utiliser le récepteur FGF comme récepteur primaire pour les particules adénovirales peut aussi avoir un impact sur l'internalisation des virus (Doukas et al., 1999). Il est donc

possible que la différence que nous avons observée soit associée à l'internalisation des virus via la liaison avec d'autres récepteurs cellulaires. En effet, il est possible que le virus utilise des récepteurs différents pour reconnaître les cellules, comme le RGD de la base penton ou les héparines sulfates, à l'aide des motifs retrouvés sur la tige de la fibre. Il est aussi possible que le retard soit causé lors de la relâche des virus au niveau des endosomes tardifs. Une manière d'évaluer l'impact des mutations sur la dynamique d'infection serait de suivre les particules virales dans les cellules. À ce propos, des études ont montré la possibilité de marquer des particules virales avec des fluochromes et de déterminer la localisation des particules virales par microscopie (Zhang et al., 2003a).

L'incorporation des modifications dans la fibre a aussi engendré la formation d'agrégats lors des purifications sur gradient de CsCl. Plusieurs groupes ont observé que l'ajout de modifications n'avait pas d'impact sur la génération de particules virales modifiées (Krasnykh et al., 1998; Majhen et al., 2009). Pourtant, d'autres études ont observé une réduction des productions virales. Dans ces études, l'effet des modifications pouvait être évalué par l'accroissement des ratios de particules totales en fonction du nombre de particules infectieuses, suite à l'ajout des différentes modifications dans la boucle HI (Ghosh and Barry, 2005; Peng et al., 2006; Tanaka et al., 2006). Pour notre part, nous avons un ratio plus important avant même la purification. Par contre, nous avons tout de même observé une augmentation du ratio suite à la purification. Il a été démontré que la formation d'agrégats entraîne une réduction de l'infectivité des particules virales, ce qui pourrait expliquer la perte supplémentaire observée dans nos essais. La formation d'agrégats est généralement causée par un pH trop bas, une force ionique trop faible, ou par

une concentration en particules virales trop élevée. En effet, il a été montré que 5×10^{11} particules virales dans une solution de 0.14 M de NaCl à 30°C ne forment pas d'agrégation (Galdiero, 1979). En analysant la quantité de particules totales produites par les virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm, on peut exclure que la quantité de particules soit l'élément qui a entraîné l'agrégation. En effet, le nombre de particules virales totales qui ont été formées dans les échantillons était 10 fois moins important qu'une préparation de virus sauvage qui était homogène, démontrant que la quantité de virus n'était pas en cause. Une force ionique trop faible est généralement un paramètre qui peut entraîner l'agrégation des particules virales (Galdiero, 1979). Ayant ajouté des domaines chargés au pH utilisé pour la purification, il était possible que la force ionique générée en présence des domaines K-Coil favorisât l'agrégation des particules virales dans nos conditions expérimentales. L'utilisation de l'iodixanol avait été démontrée comme une alternative intéressante pour empêcher la formation des agrégats, car il s'agit d'un composé non ionique, comparativement au CsCl (Peng et al., 2006; Dormond et al., 2010). En fait, son utilisation a non seulement permis d'éviter la formation d'agrégat lors des purifications (Figure 24), mais a aussi permis d'accroître la concentration de nos préparations en permettant la combinaison de multiples préparations virales (Table 16). De plus, l'iodixanol est avantageux car il permet d'accroître considérablement le taux de récupération des particules infectieuses. En effet, l'utilisation de CsCl permet la récupération de 20% des particules infectieuses d'un virus arborant une fibre sauvage, tandis que seulement 5% des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm pouvaient être récupérés. Pour sa part, l'iodixanol permettait de récupérer au-dessus de 75% des particules infectieuses pour un virus arborant une fibre sauvage, en plus de récupérer 36.5% des particules virales arborant une fibre

modifiée. Par contre, nous avons constaté que l'iodixanol interférait avec le domaine K-Coil retrouvé sur les particules virales. L'élimination d'une bonne proportion de l'iodixanol a rétabli l'infectivité à des niveaux équivalant à ce qui était observé initialement, confirmant l'influence de l'iodixanol sur les domaines d'interaction.

4.3 Interaction entre les domaines K-Coil et E-Coil

L'interaction entre les composantes E-Coil et K-Coil est l'élément essentiel pour induire un changement de tropisme. Il fallait donc démontrer que le domaine E5-Coil qui avait été introduit dans l'IGF-E5, l'EGF-E5-Coil et l'AFAI-E5-Coil pouvait toujours interagir avec le partenaire retrouvé dans les fibres virales modifiées. Les essais d'ELISA modifiés nous ont amenés à valider que le domaine E5-Coil fusionné aux différents ligands permettait l'interaction avec les fibres virales, confirmant ainsi que le domaine d'interaction K-Coil contenu dans les fibres virales était aussi fonctionnel. L'avantage de l'ELISA est qu'il permet d'évaluer l'interaction entre les deux domaines d'interaction dans des conditions plus complexes où la protéine n'a pas besoin d'être purifiée, contrairement au SPR (Le et al., 2009). Par contre, les essais d'ELISA modifiés ne permettent pas d'évaluer avec précision la force d'interaction entre les deux partenaires. Tout de même, la différence qui a été observée entre les différentes fibres et les différents ligands bispécifiques (figure 21) corrélait avec les résultats qui avaient été publiés auparavant par le groupe de De Crescendo, en relation avec les forces d'interactions entre les différents complexes (De et al., 2003). La force d'interaction qui avait été calculée alors entre des paires comprenant 5 répétitions de K-Coil et de E-Coil avait une constante de dissociation de 6.5×10^{-11} M, au

lieu d'une valeur de $1.4 \times 10^{-8} \text{M}$ pour une paire K4/E5. Ces valeurs montraient qu'un nombre plus élevé de répétitions correspondait à une meilleure affinité entre les domaines (De et al., 2003). La valeur moins élevée du complexe K5/E5 était représentée dans nos essais ELISA par une intensité plus élevée, lorsque les ligands bispécifiques étaient incubés en présence de la fibre virale contenant un domaine K5-Coil. La constante de dissociation du complexe K4/E5, pour sa part, était représentée par des intensités plus faibles, suite à l'incubation des ligands bispécifiques en présence de la fibre possédant 4 répétitions. De plus, la valeur de dissociation pour le complexe K3/E5 qui est élevée ($K_{\text{dis}} = 7.0 \times 10^{-6} \text{M}$) a été reflétée par l'incapacité à observer une augmentation d'intensité lors de l'essai ELISA avec la fibre possédant trois répétitions du K-Coil. La similarité de nos résultats avec ceux qui avaient été obtenus par SPR dans la littérature permet de supposer que l'interaction observée entre les deux partenaires est associée à la présence des domaines d'interaction. Pour confirmer cet effet, l'ajout d'un peptide K-Coil avait été utilisé, soit dans les essais ELISA, soit lors d'une expérience de changement de tropisme. Cette hypothèse a été validée par l'observation d'une diminution d'intensité au niveau des ELISA (Figure 21), ou suite à une réduction de l'efficacité de transduction dans les essais de changement de tropisme (Figure 51).

Tel que suggéré par le groupe de Drier, l'association entre un ligand bispécifique et un vecteur adénoviral n'est pas toujours parfaite et est soumise aux forces d'interaction et aux conditions expérimentales (Dreier et al., 2011). En suivant cette hypothèse, la formation du complexe virus et ligands bispécifiques dépendrait de l'équilibre entre l'association et la dissociation des ligands bispécifiques et des fibres virales modifiées.

Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse des résultats de changement de tropisme obtenu entre les A459tTA infectées avec le virus Ad5Tr5GFP Fibre K4m et les A549 infectées avec le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Une élévation de 14 fois en présence d'une quantité similaire d'EGF-E5-Coil confirme l'importance de la force d'interaction dans le système. De manière à obtenir la meilleure infectivité pour chacun des modèles, nous avons donc varié les concentrations de ligands incubés avec le virus modifié dans les différents modèles, en prenant en considération le nombre de particules totales. Ces résultats ont permis de constater qu'il fallait utiliser une quantité importante de ligands bispécifiques pour obtenir une augmentation significative de la transduction. La variation dépend possiblement de l'expression des récepteurs qui sont ciblés mais, également, des niveaux des intégrines exprimées à la surface des cellules. Étant donné que nous utilisons des quantités importantes de ligands, il est possible que les ligands non associés puissent affecter l'infectivité des particules virales. En effet, nous avons montré que l'utilisation d'une quantité trop importante de ligands bispécifiques diminuait la capacité à induire un changement de tropisme. La présence de ligands bispécifiques non associés pourrait donc lier les récepteurs membranaires et nuire à l'association des virus avec les cellules. Dans le cadre d'essai *in vitro*, évaluer la meilleure concentration utilisée est probablement plus important que l'élimination des particules non associées. En effet, l'élimination des particules pourrait favoriser la dissociation des ligands bispécifiques déjà associés. Pour accroître l'efficacité de notre système, nous pourrions incorporer des cystéines dans les deux domaines d'interaction, de manière à permettre la formation de ponts disulfures. La formation d'un pont disulfure fixerait le ligand à la fibre, empêchant sa dissociation dans des conditions physiologiques. L'avantage serait que nous pourrions éliminer les ligands

non-associés sans altérer ceux qui seraient fixés aux fibres virales. On peut supposer que l'absence de ligands non-associés augmenterait le nombre de récepteurs disponibles pour lier les virus associés aux ligands bispécifiques. De plus, l'ajout de cystéines ne devrait pas être problématique pour la formation de la fibre virale, car celle-ci est produite dans le cytoplasme des cellules. En effet, le cytoplasme est un environnement peu oxydatif qui ne favorise pas la formation de ponts disulfures (Korokhov et al., 2003). Par contre, cette approche pourrait complexifier la production de certains ligands qui requiert la formation de pont disulfure en transigeant dans le réticulum endoplasmique, comme pour l'IGF-E5.

4.4 Induction d'un changement de tropisme

Plusieurs études ont montré le potentiel d'anticorps bispécifiques ou de scFv pour induire le changement de tropisme (Tanaka et al., 2006; Glasgow et al., 2009; Haisma et al., 2000; Henning et al., 2005). Une autre étude a démontré que l'utilisation de l'AFAI permet d'induire un changement de tropisme chez l'adénovirus en incluant la séquence de celui-ci dans la séquence de la protéine IX. Le groupe de Poulin a obtenu un accroissement de 2 à 4 fois dans des A549 (Poulin et al., 2010). Par contre, il a été démontré que l'AFAI était plus efficace lorsqu'il formait une structure pentamérique (Zhang et al., 2004). L'association avec la fibre pourrait donc permettre la formation d'un trimère et favoriser l'infectivité des particules virales. Nos résultats ont établi qu'il été possible de fusionner un domaine d'interaction protéique à un anticorps à un seul domaine, l'AFAI. L'utilisation de l'AFAI-E5-Coil, en association avec des virus modifiés, a permis d'accroître l'infectivité des particules de manière significative dans les A549. Par contre, même en utilisant différentes

concentrations d'AFAI-E5-Coil, une augmentation de 2 fois seulement a été obtenue. Des essais dans les U87MG ont démontré la spécificité de l'AFAI en n'induisant aucune augmentation du changement de tropisme. Toutefois, plusieurs types tumoraux auraient une surexpression du CEACAM6 (Blumenthal et al., 2007), suggérant que l'AFAI pourrait favoriser le changement de tropisme dans d'autres modèles de tumeurs.

L'ajout de ligands bispécifiques provenant de cytokines a permis d'observer une augmentation de l'efficacité dans plusieurs lignées tumorales ou dans des cellules de muscles. Nous avons démontré que l'efficacité de transduction pouvait être augmentée de 2 fois et de 3 fois, dans les U87MG et les H59 respectivement, en utilisant l'IGF-E5. L'augmentation de 2 fois observée dans les U87MG est similaire à ce qui a déjà été observé dans la littérature avec un virus chimérique Ad5/35 (Hoffmann et al., 2007). Elle est moins importante, cependant, que dans certaines études utilisant l'IL-13 comme cible (augmentation de 12 fois) (Ulasov et al., 2007) ou d'autres couvrant le virus d'un polymère pour changer la voie d'internalisation (Sims et al., 2009). L'augmentation dans les cellules cancéreuses pulmonaires de Lewis n'avait pas encore été rapportée dans la littérature. En utilisant l'EGF-E5-Coil dans les U87MG-Wt, nous avons pu observer une augmentation de la transduction virale de 15 fois. Cette augmentation était plus importante que celle obtenue en utilisant le ligand bispécifique IGF-E5. L'EGF-E5-Coil serait plus intéressant à utiliser dans les modèles des tumeurs cervicales. De plus, cette augmentation est similaire à ce qui avait été obtenu dans la littérature avec un système différent ciblant l'EGF-R (Piao et al., 2008). Au niveau des A549, une augmentation de 21 fois a été observée. L'augmentation est notable mais reste en-deçà des résultats rapportés dans la littérature, qui varient entre 40

et 100 fois (Piao et al., 2008;van Geer et al., 2009;Yao et al., 2009). Par contre, en voulant réduire le nombre d'étapes de purification, nous avons démontré que le His-Tag pouvait nuire à l'interaction entre le ligand bispécifique EGF-E5-Coil et le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm (Figure 31). Le positionnement du His-Tag à l'extrémité N-Terminale pourrait causer de l'encombrement stérique ou interférer avec les charges électrostatiques essentielles à la formation du complexe E-Coil/K-Coil. Pour cette raison, il est préférable d'éliminer le domaine His-Tag du ligand EGF-E5-Coil. Cela dit, dans l'IGF-E5 et dans l'AFAI-E5-Coil, le His-Tag se trouve entre le ligand et le domaine E-Coil en C-terminal. Comme pour l'EGF-E5-Coil, il est possible que le His-Tag puisse interférer avec le changement de tropisme et réduire son efficacité. Par contre, la manière dont les ligands ont été construits ne nous permet pas d'éliminer le domaine His-Tag. Il serait profitable de valider l'importance d'un tel domaine en fonction de notre système de changement de tropisme. Par ailleurs, le récepteur à l'EGF a déjà été évalué comme cible pour induire un changement de tropisme dans le cadre de plusieurs tumeurs, dont celles de la vessie ou de l'ovaire (Kawashima et al., 2011;Morrison et al., 2009). Dans le but de vérifier si nous pouvions obtenir des meilleurs résultats dans des lignées cellulaires différentes, nous avons testé la possibilité d'accroître l'infectivité de particules dans des lignées ovariennes en utilisant l'EGF-E5-Coil. Le potentiel de l'IGF-E5 a aussi été mesuré dans le cadre des mêmes expériences. Pour l'IGF-E5 et l'EGF-E5-Coil, nous avons pu démontrer des augmentations respectives de 3.46 et 2.96 fois dans la lignée cancéreuse ovarienne TOV-112D. Également, nous avons obtenu des augmentations respectives de 7.82 et 3.45 fois dans les OV-90. Au vu de ces augmentations satisfaisantes avec chacun des deux ligands, la combinaison de ceux-ci pourrait être une avenue envisageable. Par contre, il est fort

probable que la compétition pour le K-Coil induise une réduction de l'efficacité maximale observé pour le meilleur des deux ligands. Certes, l'augmentation observée par l'utilisation de l'EGF-E5-Coil pour cibler l'EGF-R n'est pas aussi marquée que dans certaines études qui avaient observé des augmentations de 50 fois (Morrison et al., 2008a). Toutefois, l'utilisation de l'IGF-IR comme cible n'avait pas encore été étudiée dans des cancers de l'ovaire, ce qui souligne tout l'intérêt de ces résultats. En somme, l'utilisation de l'IGF-E5 permet l'accroissement dans différents systèmes cellulaires, dont des lignées pulmonaires (H59) et ovariennes (TOV-112D et OV90). Sinon, l'interaction entre les domaines d'interaction a été confirmée en utilisant l'IGF-I recombinant de souris, ou encore de l'EGF, dans les expériences de changement de tropisme. En effet, l'ajout de l'IGF-I ou de l'EGF n'a pas augmenté de manière significative l'efficacité de transduction du virus modifié contrairement à celle de leurs ligands modifiés respectifs. De plus, l'utilisation du virus Ad5GFP Fibre sauvage n'a pas entraîné d'augmentation dans aucune expérience suite à l'ajout de ligand modifié. Ces résultats permettent de conclure que la présence du domaine d'interaction est essentielle pour altérer le tropisme des particules virales.

Des augmentations significatives ont été mesurées dans des myoblastes de souris (C2C12), de même que dans les myotubes provenant de la différenciation des C2C12. Ces résultats sont importants, car les cellules musculaires sont des cellules difficiles à transduire avec l'adénovirus, comme nous l'avons montré en mesurant l'infectivité dans les deux modèles à différentes MOI (Figures 48 et 54). La difficulté à infecter est associée généralement aux faibles niveaux d'expression du CAR (Nalbantoglu et al., 1999;Cao et al., 2001). L'augmentation d'infectivité, de 18 fois dans les myoblastes et de 3.2 fois dans

les myotubes, a montré qu'il pouvait s'agir d'une approche pertinente pour cibler les muscles. De plus, nos résultats sont équivalents à ceux de plusieurs essais rapportés dans la littérature (Menezes et al., 2006; Ghosh and Barry, 2005; Bramson et al., 2004). Étrangement, le virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm avait une meilleure capacité à infecter les myotubes contrairement à un virus Ad5GFP Fibre sauvage (Figure 53). En effet, l'utilisation d'une MOI équivalente avec les deux virus purifiés et titrés de la même manière permettait d'observer une plus grande expression de la GFP : de 4.9 fois dans le cas du virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm. Il est possible que l'association avec l'iodixanol, favorisée par le gain de stabilité au niveau des virus modifiés, permette l'interaction avec différentes composantes de la membrane cellulaire, favorisant du même coup l'interaction avec les intégrines.

Dans l'étude du changement de tropisme, l'abolition du tropisme naturel est nécessaire pour accroître la sélectivité des vecteurs. Différentes approches peuvent être utilisées pour éliminer le tropisme naturel des adénovirus. Il est possible, par exemple, d'utiliser des polymères qui pourront réduire l'interaction non seulement avec le CAR mais aussi avec les intégrines ou avec certaines composantes sanguines, dont le facteur sanguin X. En outre, plusieurs approches utilisent des anticorps bispécifiques pour permettre de reconnaître le bouton de la fibre, puis le récepteur ciblé. Cela inhibe l'interaction via l'encombrement stérique causé par le positionnement de l'anticorps sur le bouton. Ces méthodes sont efficaces mais la taille finale des particules virales qui sont formées peut devenir problématique au point de vue de la biodistribution dans des modèles de tumeurs. Effectivement, à cause de la petite taille des ligands choisis (en dessous de 20 kDa), il est

possible que ceux-ci n'induisent pas un encombrement stérique suffisant pour réduire l'interaction avec le CAR. Pour réduire l'interaction avec le CAR chez nos virus, nous nous sommes plutôt dirigés vers une approche qui consiste à effectuer des mutations sur des acides aminés précis dans le domaine AB essentiel à l'interaction avec le CAR (Kirby et al., 2000). Les mutations sélectionnées ont comme effet de réduire la force d'interaction en altérant les charges électrostatiques présentes. Comme pour l'introduction de certains domaines K-Coil dans la fibre virale, l'ajout des mutations n'a pas eu d'impact sur l'expression des fibres ou sur la capacité à trimériser. Dans nos expériences, nous avons montré que l'abolition du domaine AB diminuait l'efficacité d'infection en réduisant le nombre de cellules infectées. Nous avons pu observer dans les A549 que, suite à la diminution induite par les mutations, il était possible de dépasser le niveau d'expression du virus arborant une fibre sauvage.

4.5 Analyse des infections dans les muscles de souris nouveau-nées MDX

Ayant montré que les C2C12 pouvaient être transduites plus efficacement en utilisant l'IGF-E5, il devenait intéressant de déterminer si les fibres musculaires pouvaient être transduites *in vivo*. En plus, les images d'immunofluorescence indirecte sur lame confirmaient que le récepteur à l'IGF-I était exprimé dans plusieurs fibres au travers des muscles d'une souris nouveau-née (Figure 56). Ces observations sont d'ailleurs supportées par l'immunobuvardage de type Western contre la portion β du récepteur. Nos résultats sont donc similaires à ce qui avait été rapporté dans la littérature, en relation avec l'expression du récepteur à l'IGF-I dans les fibres musculaires (Rauch and Loughna, 2005).

L'analyse des résultats d'immunobuvardage obtenus après l'injection des tibialis antérieurs de souris MDX de 10 jours permettait de conclure que l'IGF-E5 pouvait induire une élévation significative des niveaux de transduction de 1.69 fois. La confirmation du nombre de particules virales dans chacun des muscles va dans la même direction que les immunobuvardages; la tendance des valeurs suggère une augmentation de l'efficacité de transduction. Par contre, ces résultats sont plus faibles que l'augmentation de 3.2 qui avait été produite auparavant dans le cadre des essais *in vitro* dans les myotubes provenant de C2C12. Il n'y a là rien de surprenant, puisqu'une réduction de l'infectivité est généralement observé dans la littérature entre les essais *in vitro* et ceux produits *in vivo* (Menezes et al., 2006). Cette variation pourrait être attribuée à une perte d'efficacité du ligand IGF-E5, car certaines protéines requièrent des conditions particulières d'entreposage (Bhatnagar et al., 2007; Meyer et al., 2002). Étant donné que l'impact de notre tampon n'a pas été évalué sur la stabilité de l'IGF-E5, on peut suggérer que l'IGF-E5 a perdu sa capacité à lier correctement le récepteur à l'IGF-I. La perte d'activité de l'IGF-E5 pourrait expliquer l'importance des variations dans les essais de changement de tropisme effectués dans les myotubes de souris. De plus, il est possible que la quantité de virus injectée ait été trop faible. L'infection à l'aide de virus dans un modèle animal requiert une concentration minimale, sinon les virus sont éliminés, soit par le système immunitaire de l'animal, soit suite à l'infection d'autres types cellulaires (Bristol et al., 2000). Mais encore, les muscles expriment certains membres de la famille des IGFBP, dont l'IGFBP5, qui peuvent interagir avec l'IGF-I et réduire la différenciation des muscles (Mukherjee et al., 2008). En fait, la présence de cette protéine pourrait avoir un impact sur l'efficacité de transduction, car la force d'interaction entre l'IGF et les IGFBP est équivalente à celle entre l'IGF-I et son

récepteur (Dupont and LeRoith, 2001). Par contre, l'IGF-I a été associé avec la régénération des muscles, suite à des exercices ou à certains stress (Philippou et al., 2007). L'utilisation de l'IGF-E5 pourrait favoriser la fusion des cellules satellites avec les fibres musculaires après leur transduction. En effet, les images d'immunofluorescence suggèrent qu'il y aurait des cellules dont les niveaux d'expression du récepteur à l'IGF-I seraient significatifs entre les différentes fibres musculaires. Sans la présence de marqueurs spécifiques, il est impossible de déterminer avec précision la nature de ces cellules. On peut alors supposer que ces cellules sont des cellules satellites, les précurseurs des fibres musculaires (Fukada et al., 2007). Toutefois, il est aussi possible que ces cellules soient des macrophages ou des lymphocytes, car il a été montré que ces cellules sont retrouvées en plus grand nombre dans les muscles des souris MDX (Hartigan-O'Connor et al., 2001; Eghtesad et al., 2011). Quoiqu'il en soit, il serait envisageable de cibler spécifiquement les cellules satellites, permettant ainsi aux gènes d'être transférés dans les fibres musculaires, suite à la différenciation des cellules satellites. Cette hypothèse peut être supportée, non seulement par l'importance de l'expression du récepteur à l'IGF-I dans la différenciation des myoblastes (Kim et al., 2005), mais aussi en fonction des niveaux d'expression mesurés dans les myoblastes en culture (figure 43). Il est tout de même possible que les niveaux du récepteur à l'IGF-I dans les cellules satellites ne soient pas élevés, étant donné qu'il n'y a pas eu d'observation faite à cet égard à ce jour.

Section 5 :
Conclusions

5 Conclusions

L'utilisation des vecteurs adénoviraux a été amplement étudiée, avec pour perspective de permettre le transfert de gènes dans le cadre de différentes maladies. Les limitations physiques, dont la distribution des particules virales dans les tissus injectés ou les faibles niveaux d'infectivité à cause de l'absence du CAR, ont mené plusieurs groupes à chercher des alternatives pour améliorer l'efficacité des adénovirus. L'étude dont cette thèse a fait l'objet a permis de démontrer que l'incorporation du domaine d'interaction protéique K-Coil au niveau de la fibre virale pouvait altérer le tropisme des particules Ad5GFP Fibre HIK5 Dm, suite à l'association avec un peptide contenant l'E-Coil. L'infectivité de l'Ad5GFP Fibre HIK5 Dm a donc pu être augmentée avec différents ligands et ce, dans différents modèles tumoraux, démontrant à la fois la flexibilité, la reproductibilité et la robustesse de notre système. La modification dans le domaine AB a, de plus, permis de réduire l'infectivité dans des cellules qui exprimaient le CAR, permettant ainsi d'accroître la spécificité de notre système. Enfin, l'obtention d'une infectivité plus importante que celle observée avec un virus arborant une fibre sauvage rend le système davantage pertinent. Toutefois, le changement de tropisme doit encore être évalué, dans le cadre d'essais *in vivo*, dans des masses tumorales produites suite à l'implantation de cellules tumorales dans des souris immunosupprimées SCID. L'étape subséquente, si le système permet d'infecter un plus grand nombre de cellules tumorales *in vivo*, sera alors d'inclure la fibre modifiée dans un virus encodant un gène suicide.

Bien sûr, plusieurs autres approches peuvent être envisagées pour accroître l'infectivité des particules virales. L'incorporation de cystéines dans le domaine K-Coil et dans l'E-Coil, notamment, pourrait inhiber la dissociation entre le virus et le ligand bispécifique par la formation de ponts disulfures. Cela permettrait l'élimination des particules non associées qui peuvent avoir un impact sur le changement de tropisme. L'utilisation de l'AFAI-E5-Coil, également, a permis de déterminer que la fusion avec le E5-Coil était possible et que ce ligand bispécifique permettait d'accroître l'infectivité des virus modifiés. Nous pourrions donc utiliser d'autres anticorps à un seul domaine contre d'autres récepteurs, dont l'IGF-IR ou l'EGF-R.

L'association de l'IGF-E5 a aussi permis d'augmenter l'infectivité des virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dans les fibres musculaires chez des souris MDX nouveau-nées. L'augmentation de 1,69 fois démontre la possibilité de changer le tropisme de notre virus Ad5GFP Fibre HIK5 Dm dans un contexte *in vivo*. Pour améliorer ce résultat, l'infection des muscles avec un plus grand nombre de particules infectieuses aiderait à l'évaluation des niveaux d'infectivité, en augmentant le nombre et l'intensité de fibres positives pour la GFP. En outre, modifier la cassette d'expression de sorte qu'elle encode la β -galactosidase serait une autre alternative : cette procédure favoriserait la validation du changement de tropisme dans les muscles de souris MDX, car cette enzyme est plus facile à mesurer *in vivo* que la GFP. Finalement, étant donné qu'il est relativement facile d'infecter des fibres musculaires chez les souris nouveau-nées, on pourrait procéder à l'évaluation de l'efficacité dans des muscles de souris adultes. Ceci étant dit, l'augmentation de 18 fois dans les myoblastes soulève l'éventualité de pouvoir cibler les cellules satellites. Pour vérifier cette

hypothèse, il faudrait analyser les muscles infectés avec les différents vecteurs viraux en utilisant des marqueurs spécifiques pour les cellules satellites, comme la MyoD ou le Myf5, afin de discerner les cellules satellites des fibres musculaires. Les marqueurs spécifiques nous permettraient de dénombrer le nombre de cellules satellites infectées dans les sections de muscles. Pour ce faire, il faudrait prendre en considération les cellules positives pour les marqueurs et qui expriment le transgène provenant des virus utilisés.

La production des particules n'a pas été aussi simple que ce qui avait été planifié initialement. Il avait été montré que l'ajout des modifications dans la boucle HI ou dans la portion C-terminale pouvait permettre la formation de particules virales à des niveaux équivalents à ceux d'un virus avec une fibre sauvage. Pourtant, les modifications que nous avons effectuées dans la fibre virale ont entraîné une perte d'expression de différentes fibres, induit une réduction de l'infectivité, ou occasionné la formation d'agrégats lors des purifications. Néanmoins, l'accroissement de l'infectivité virale observée en utilisant notre système pourrait aisément compenser la perte de production, en requérant moins de particules infectieuses pour obtenir un nombre de cellules infectées similaires. Ainsi, l'utilisation de l'iodixanol, un composé non ionique, a permis de réduire l'impact des modifications induites sur les particules virales et a permis d'augmenter le nombre de particules infectieuses. La résolution de ce problème a donc permis la production de préparations virales concentrées. Par contre, la présence de l'iodixanol dans les solutions virales interférait avec le changement de tropisme en empêchant l'interaction entre les ligands bispécifiques et les virus modifiés. La dialyse des préparations virales a permis d'éliminer la présence de l'iodixanol et de restaurer l'efficacité du système de changement

de tropisme. En dernier lieu, donc, l'internalisation des particules virales pourrait être étudiée pour mieux comprendre l'impact des mutations sur la fibre et des voies utilisées lors de l'induction d'un changement de tropisme.

En résumé, notre approche permet de changer le tropisme de l'adénovirus vers différents récepteurs tout en réduisant l'infectivité dans des cellules exprimant le CAR. Le système de changement de tropisme utilisant les domaines d'interaction synthétique K-Coil/E-Coil est fonctionnel *in vivo*. L'incorporation des fibres modifiées avec le domaine K-Coil pourrait certainement augmenter le potentiel thérapeutique d'une approche utilisant les gènes suicides, ou encore améliorer le transfert de gène dans les muscles.

Section 6 :

Bibliographie

References

1. Al-Allaf, F.A., C.Coutelle, S.N.Waddington, A.L.David, R.Harbottle, and M.Themis. 2010. LDLR-Gene therapy for familial hypercholesterolaemia: problems, progress, and perspectives. *Int. Arch. Med.* 3:36.
2. Alba, R., A.Bosch, and M.Chillon. 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-S27.
3. Alba, R., A.C.Bradshaw, L.Coughlan, L.Denby, R.A.McDonald, S.N.Waddington, S.M.Buckley, J.A.Greig, A.L.Parker, A.M.Miller, H.Wang, A.Lieber, R.N.van, J.H.McVey, S.A.Nicklin, and A.H.Baker. 2010. Biodistribution and retargeting of FX-binding ablated adenovirus serotype 5 vectors. *Blood.*
4. Alba, R., A.C.Bradshaw, A.L.Parker, D.Bhella, S.N.Waddington, S.A.Nicklin, R.N.van, J.Custers, J.Goudsmit, D.H.Barouch, J.H.McVey, and A.H.Baker. 2009. Identification of coagulation factor (F)X binding sites on the adenovirus serotype 5 hexon: effect of mutagenesis on FX interactions and gene transfer. *Blood* 114:965-971.
5. Amalfitano, A., M.A.Hauser, H.Hu, D.Serra, C.R.Begy, and J.S.Chamberlain. 1998. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.* 72:926-933.

6. Amstutz, B., M.Gastaldelli, S.Kalin, N.Imelli, K.Boucke, E.Wandeler, J.Mercer, S.Hemmi, and U.F.Greber. 2008. Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* 27:956-969.
7. An, Y., Y.Cai, Y.Guan, L.Cai, Y.Yang, X.Feng, and J.Zheng. 2010. Inhibitory effect of small interfering RNA targeting insulin-like growth factor-I receptor in ovarian cancer OVCAR3 cells. *Cancer Biother. Radiopharm.* 25:545-552.
8. Apte, S.P. and S.O.Ugwu. 2004. A simple method for determination of surface volume mean diameters of oil in water submicron emulsions. *Pharmazie* 59:530-533.
9. Armentano, D., J.Zabner, C.Sacks, C.C.Sookdeo, M.P.Smith, J.A.St George, S.C.Wadsworth, A.E.Smith, and R.J.Gregory. 1997. Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J. Virol.* 71:2408-2416.
10. Arnberg, N., A.H.Kidd, K.Edlund, J.Nilsson, P.Pring-Akerblom, and G.Wadell. 2002. Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. *Virology* 302:33-43.
11. Baker, A.H., A.Kritz, L.M.Work, and S.A.Nicklin. 2005. Cell-selective viral gene delivery vectors for the vasculature. *Exp. Physiol* 90:27-31.

12. Baserga, R. 2000. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* 19:5574-5581.
13. Beguinot, F., C.R.Kahn, A.C.Moses, and R.J.Smith. 1985. Distinct biologically active receptors for insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II in cultured skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 260:15892-15898.
14. Bennett, E.M., J.R.Bennink, J.W.Yewdell, and F.M.Brodsky. 1999. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J. Immunol.* 162:5049-5052.
15. Berk, A.J. 1986. Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Annu. Rev. Genet.* 20:45-79.
16. Bernt, K.M., S.Ni, A.T.Tieu, and A.Lieber. 2005. Assessment of a combined, adenovirus-mediated oncolytic and immunostimulatory tumor therapy. *Cancer Res.* 65:4343-4352.
17. Bharara, S., E.J.Sorscher, G.Y.Gillespie, J.R.Lindsey, J.S.Hong, K.V.Curlee, P.W.Allan, V.K.Gadi, S.A.Alexander, J.A.Secrist, III, W.B.Parker, and W.R.Waud. 2005. Antibiotic-mediated chemoprotection enhances adaptation of E. coli PNP for herpes simplex virus-based glioma therapy. *Hum. Gene Ther.* 16:339-347.

18. Bhatnagar, B.S., R.H.Bogner, and M.J.Pikal. 2007. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* 12:505-523.
19. Biasco, L., C.Baricordi, and A.Aiuti. 2012. Retroviral integrations in gene therapy trials. *Mol. Ther.* 20:709-716.
20. Bilbao, G., J.L.Contreras, I.Dmitriev, C.A.Smyth, S.Jenkins, D.Eckhoff, F.Thomas, J.Thomas, and D.T.Curiel. 2002. Genetically modified adenovirus vector containing an RGD peptide in the HI loop of the fiber knob improves gene transfer to nonhuman primate isolated pancreatic islets. *Am. J. Transplant.* 2:237-243.
21. Bilslund, A.E., A.Merron, G.Vassaux, and W.N.Keith. 2007. Modulation of telomerase promoter tumor selectivity in the context of oncolytic adenoviruses. *Cancer Res.* 67:1299-1307.
22. Bischoff, J.R., D.H.Kirn, A.Williams, C.Heise, S.Horn, M.Muna, L.Ng, J.A.Nye, A.Sampson-Johannes, A.Fattaey, and F.McCormick. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274:373-376.
23. Blackwell, J.L., C.R.Miller, J.T.Douglas, H.Li, P.N.Reynolds, W.R.Carroll, G.E.Peters, T.V.Strong, and D.T.Curiel. 1999. Retargeting to EGFR enhances adenovirus infection efficiency of squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 125:856-863.

24. Blumenthal, R.D., E.Leon, H.J.Hansen, and D.M.Goldenberg. 2007. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. *BMC Cancer* 7:2.
25. Bodey, B., S.E.Siegel, and H.E.Kaiser. 2006. Up-regulation of VEGF expression and related neo-angiogenesis in childhood high-grade gliomas: implications for anti-angiogenic anti-neoplastic therapy. *In Vivo* 20:511-518.
26. Bodles-Brakhop, A.M. and R.Draghia-Akli. 2008. DNA vaccination and gene therapy: optimization and delivery for cancer therapy. *Expert. Rev. Vaccines*. 7:1085-1101.
27. Borovjagin, A.V., A.Krendelchtchikov, N.Ramesh, D.C.Yu, J.T.Douglas, and D.T.Curiel. 2005. Complex mosaicism is a novel approach to infectivity enhancement of adenovirus type 5-based vectors. *Cancer Gene Ther.* 12:475-486.
28. Bouard, D., D.azard-Dany, and F.L.Cosset. 2009. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* 157:153-165.
29. Boucher, C., G.St-Laurent, M.Jolicoeur, G.D.Crescenzo, and Y.Durocher. 2010. Protein detection by Western blot via coiled-coil interactions. *Anal. Biochem.* 399:138-140.

30. Braithwaite, A.W. and I.A.Russell. 2001. Induction of cell death by adenoviruses. *Apoptosis*. 6:359-370.
31. Bramson, J.L., N.Grinshtein, R.A.Meulenbroek, J.Lunde, D.Kottachchi, I.A.Lorimer, B.J.Jasmin, and R.J.Parks. 2004. Helper-dependent adenoviral vectors containing modified fiber for improved transduction of developing and mature muscle cells. *Hum. Gene Ther.* 15:179-188.
32. Bremner, K.H., J.Scherer, J.Yi, M.Vershinin, S.P.Gross, and R.B.Vallee. 2009. Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host. Microbe* 6:523-535.
33. Bristol, J.A., P.Shirley, N.Idamakanti, M.Kaleko, and S.Connelly. 2000. In vivo dose threshold effect of adenovirus-mediated factor VIII gene therapy in hemophiliac mice. *Mol. Ther.* 2:223-232.
34. Bruning, A. and I.B.Runnebaum. 2003. CAR is a cell-cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta. *Gene Ther.* 10:198-205.
35. Cai, X., J.Zhou, Y.Chang, X.Sun, P.Li, and J.Lin. 2008. Targeting gene therapy for hepatocarcinoma cells with the E. coli purine nucleoside phosphorylase suicide gene system directed by a chimeric alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Lett.* 264:71-82.

36. Campos, S.K., M.B.Parrott, and M.A.Barry. 2004. Avidin-based targeting and purification of a protein IX-modified, metabolically biotinylated adenoviral vector. *Mol. Ther.* 9:942-954.
37. Cao, B., R.Pruchnic, M.Ikezawa, X.Xiao, J.Li, T.J.Wickham, I.Kovesdi, W.A.Rudert, and J.Huard. 2001. The role of receptors in the maturation-dependent adenoviral transduction of myofibers. *Gene Ther.* 8:627-637.
38. Caron, A.W., C.Nicolas, B.Gaillet, I.Ba, M.Pinard, A.Garnier, B.Massie, and R.Gilbert. 2009. Fluorescent labeling in semi-solid medium for selection of mammalian cells secreting high-levels of recombinant proteins. *BMC. Biotechnol.* 9:42.
39. Carrio, M.M. and A.Villaverde. 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* 96:3-12.
40. Cavazzana-Calvo, M., S.Hacein-Bey, B.G.de Saint, F.Gross, E.Yvon, P.Nusbaum, F.Selz, C.Hue, S.Certain, J.L.Casanova, P.Bousso, F.L.Deist, and A.Fischer. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
41. Chao, H., D.L.Bautista, J.Litowski, R.T.Irvin, and R.S.Hodges. 1998. Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 715:307-329.

42. Chen, J., T.Willingham, M.Shuford, D.Bruce, E.Rushing, Y.Smith, and P.D.Nisen. 1996. Effects of ectopic overexpression of p21(WAF1/CIP1) on aneuploidy and the malignant phenotype of human brain tumor cells. *Oncogene* 13:1395-1403.
43. Chen, M.J., P.P.Chiou, B.Y.Yang, H.C.Lo, J.K.Son, J.Hendricks, G.Bailey, and T.T.Chen. 2004. Development of rainbow trout hepatoma cell lines: effect of pro-IGF-I Ea4-peptide on morphological changes and anchorage-independent growth. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 40:118-128.
44. Cheng, J., H.Sauthoff, Y.Huang, D.I.Kutler, S.Bajwa, W.N.Rom, and J.G.Hay. 2007. Human matrix metalloproteinase-8 gene delivery increases the oncolytic activity of a replicating adenovirus. *Mol. Ther.* 15:1982-1990.
45. Chintala, S.K., J.Fueyo, C.Gomez-Manzano, B.Venkaiah, R.Bjerkvig, W.K.Yung, R.Sawaya, A.P.Kyritsis, and J.S.Rao. 1997. Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer suppresses glioma invasion in vitro. *Oncogene* 15:2049-2057.
46. Chisholm, J.W., A.K.Gebre, and J.S.Parks. 1999. Characterization of C-terminal histidine-tagged human recombinant lecithin:cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* 40:1512-1519.
47. Choe, G., J.K.Park, L.Jouben-Steele, T.J.Kremen, L.M.Liau, H.V.Vinters, T.F.Cloughesy, and P.S.Mischel. 2002. Active matrix metalloproteinase 9

expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clin. Cancer Res.* 8:2894-2901.

48. Cideciyan, A.V. 2010. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog. Retin. Eye Res.* 29:398-427.
49. Coffey, M.C., J.E.Strong, P.A.Forsyth, and P.W.Lee. 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282:1332-1334.
50. Colby, W.W. and T.Shenk. 1981. Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. *J. Virol.* 39:977-980.
51. Cote, J., L.Bourget, A.Garnier, and A.Kamen. 1997. Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring. *Biotechnol. Prog.* 13:709-714.
52. Coughlan, L., S.Vallath, A.Saha, M.Flak, I.A.McNeish, G.Vassaux, J.F.Marshall, I.R.Hart, and G.J.Thomas. 2009. In vivo retargeting of adenovirus type 5 to alphavbeta6 integrin results in reduced hepatotoxicity and improved tumor uptake following systemic delivery. *J. Virol.* 83:6416-6428.
53. Croyle, M.A., N.Chirmule, Y.Zhang, and J.M.Wilson. 2001. "Stealth" adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune responses against the virus and allow for

significant gene expression upon readministration in the lung. *J. Virol.* 75:4792-4801.

54. Danthinne, X. and M.J.Imperiale. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7:1707-1714.
55. De, C.G., J.R.Litowski, R.S.Hodges, and M.D.O'Connor-McCourt. 2003. Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry* 42:1754-1763.
56. Dehecchi, M.C., P.Melotti, A.Bonizzato, M.Santacatterina, M.Chilosi, and G.Cabrini. 2001. Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J. Virol.* 75:8772-8780.
57. Deol, J.R., G.Danialou, N.Larochelle, M.Bourget, J.S.Moon, A.B.Liu, R.Gilbert, B.J.Petrof, J.Nalbantoglu, and G.Karpati. 2007. Successful compensation for dystrophin deficiency by a helper-dependent adenovirus expressing full-length utrophin. *Mol. Ther.* 15:1767-1774.
58. Deyle, D.R. and D.W.Russell. 2009. Adeno-associated virus vector integration. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11:442-447.

59. Diaconu, I., L.Denby, S.Pesonen, V.Cerullo, G.J.Bauerschmitz, K.Guse, M.Rajecki, J.D.Dias, K.Taari, A.Kanerva, A.H.Baker, and A.Hemminki. 2009. Serotype chimeric and fiber-mutated adenovirus Ad5/19p-HIT for targeting renal cancer and untargeting the liver. *Hum. Gene Ther.* 20:611-620.
60. Dmitriev, I.P., E.A.Kashentseva, and D.T.Curiel. 2002. Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J. Virol.* 76:6893-6899.
61. Dobbstein, M., J.Roth, W.T.Kimberly, A.J.Levine, and T.Shenk. 1997. Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* 16:4276-4284.
62. Dobner, T., N.Horikoshi, S.Rubenwolf, and T.Shenk. 1996. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 272:1470-1473.
63. Dormond, E., P.Chahal, A.Bernier, R.Tran, M.Perrier, and A.Kamen. 2010. An efficient process for the purification of helper-dependent adenoviral vector and removal of helper virus by iodixanol ultracentrifugation. *J. Virol. Methods* 165:83-89.

64. Doronin, K., K.Toth, M.Kuppuswamy, P.Krajcsi, A.E.Tollefson, and W.S.Wold. 2003. Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus. *Virology* 305:378-387.
65. Doukas, J., D.K.Hoganson, M.Ong, W.Ying, D.L.Lacey, A.Baird, G.F.Pierce, and B.A.Sosnowski. 1999. Retargeted delivery of adenoviral vectors through fibroblast growth factor receptors involves unique cellular pathways. *FASEB J.* 13:1459-1466.
66. Dreier, B., G.Mikheeva, N.Belousova, P.Parizek, E.Boczek, I.Jelesarov, P.Forrer, A.Pluckthun, and V.Krasnykh. 2011. Her2-specific multivalent adapters confer designed tropism to adenovirus for gene targeting. *J. Mol. Biol.* 405:410-426.
67. Duan, C. 2002. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J. Endocrinol.* 175:41-54.
68. Duan, D., P.Sharma, J.Yang, Y.Yue, L.Dudus, Y.Zhang, K.J.Fisher, and J.F.Engelhardt. 1998. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* 72:8568-8577.
69. Duan, Z., E.Choy, D.Harmon, C.Yang, K.Ryu, J.Schwab, H.Mankin, and F.J.Hornicek. 2009. Insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase inhibitor cyclolignan picropodophyllin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 8:2122-2130.

70. Dunn, S.E., M.Ehrlich, N.J.Sharp, K.Reiss, G.Solomon, R.Hawkins, R.Baserga, and J.C.Barrett. 1998. A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res.* 58:3353-3361.
71. Dupont, J. and D.LeRoith. 2001. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm. Res.* 55 Suppl 2:22-26.
72. Durocher, Y., S.Perret, and A.Kamen. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 30:E9.
73. Eghtesad, S., S.Jhunjunwala, S.R.Little, and P.R.Clemens. 2011. Rapamycin ameliorates dystrophic phenotype in mdx mouse skeletal muscle. *Mol. Med.*
74. Einfeld, D.A., D.E.Brough, P.W.Roelvink, I.Kovesdi, and T.J.Wickham. 1999. Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base. *J. Virol.* 73:9130-9136.
75. Elsabahy, M., A.Nazarali, and M.Foldvari. 2011. Non-viral nucleic acid delivery: key challenges and future directions. *Curr. Drug Deliv.* 8:235-244.
76. Emdad, L., I.V.Lebedeva, Z.Z.Su, P.Gupta, D.Sarkar, J.Settleman, and P.B.Fisher. 2007. Combinatorial treatment of non-small-cell lung cancers with gefitinib and

Ad.mda-7 enhances apoptosis-induction and reverses resistance to a single therapy.
J. Cell Physiol 210:549-559.

77. Eto, Y., Y.Yoshioka, Y.Mukai, N.Okada, and S.Nakagawa. 2008. Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. *Int. J. Pharm.* 354:3-8.
78. Everts, B. and H.G.van der Poel. 2005. Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther.* 12:141-161.
79. Fabry, C.M., M.Rosa-Calatrava, C.Moriscot, R.W.Ruigrok, P.Boulangier, and G.Schoehn. 2009. The C-terminal domains of adenovirus serotype 5 protein IX assemble into an antiparallel structure on the facets of the capsid. *J. Virol.* 83:1135-1139.
80. Fallaux, F.J., A.Bout, d.V.van, I, D.J.van den Wollenberg, K.M.Hehir, J.Keegan, C.Auger, S.J.Cramer, O.H.Van, A.J.Van Der Eb, D.Valerio, and R.C.Hoeben. 1998. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9:1909-1917.
81. Fallaux, F.J., O.Kranenburg, S.J.Cramer, A.Houweling, O.H.Van, R.C.Hoeben, and A.J.Van Der Eb. 1996. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 7:215-222.

82. Farmer, C., P.E.Morton, M.Snippe, G.Santis, and M.Parsons. 2009. Cocksackie adenovirus receptor (CAR) regulates integrin function through activation of p44/42 MAPK. *Exp. Cell Res.* 315:2637-2647.
83. Favelyukis, S., J.H.Till, S.R.Hubbard, and W.T.Miller. 2001. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat. Struct. Biol.* 8:1058-1063.
84. Feng, X., B.Zhang, J.Wang, X.Xu, N.Lin, and H.Liu. 2011. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against basic fibroblast growth factor mRNA enhances the sensitivity of glioblastoma cells to chemotherapy. *Med. Oncol.* 28:24-30.
85. Fink, A.L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 79:425-449.
86. Fisher, K.D. and L.W.Seymour. 2010. HEMA copolymers for masking and retargeting of therapeutic viruses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62:240-245.
87. Fox, S.R., U.A.Patel, M.G.Yap, and D.I.Wang. 2004. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 85:177-184.
88. Franqueville, L., P.Henning, M.Magnusson, E.Vigne, G.Schoehn, M.E.Blair-Zajdel, N.Habib, L.Lindholm, G.E.Blair, S.S.Hong, and P.Boulanger. 2008. Protein crystals

in Adenovirus type 5-infected cells: requirements for intranuclear crystallogenesis, structural and functional analysis. *PLoS. One.* 3:e2894.

89. Friedman, J.M. and M.S.Horwitz. 2002. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation by the adenovirus E3-10.4/14.5K complex. *J. Virol.* 76:5515-5521.
90. Fueyo, J., C.Gomez-Manzano, R.Aleman, P.S.Lee, T.J.McDonnell, P.Mitlianga, Y.X.Shi, V.A.Levin, W.K.Yung, and A.P.Kyritsis. 2000. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19:2-12.
91. Fujiuchi, S., Y.Ohsaki, and K.Kikuchi. 1997. Suramin inhibits the growth of non-small-cell lung cancer cells that express the epidermal growth factor receptor. *Oncology* 54:134-140.
92. Fukada, S., A.Uezumi, M.Ikemoto, S.Masuda, M.Segawa, N.Tanimura, H.Yamamoto, Y.Miyagoe-Suzuki, and S.Takeda. 2007. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells* 25:2448-2459.
93. Gabelloni, P., P.E.Da, S.Bandinelli, B.Costa, E.Nuti, F.Casalini, E.Orlandini, S.F.Da, A.Rossello, and C.Martini. 2010. Inhibition of metalloproteinases derived from tumours: new insights in the treatment of human glioblastoma. *Neuroscience* 168:514-522.

94. Gaden, F., L.Franqueville, M.K.Magnusson, S.S.Hong, M.D.Merten, L.Lindholm, and P.Boulangier. 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.
95. Gadji, M., A.M.Crous, D.Fortin, J.Krcek, M.Torchia, S.Mai, R.Drouin, and T.Klonisch. 2009. EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts. *Eur. J. Pharmacol.* 625:23-30.
96. Gaillet, B., R.Gilbert, S.Broussau, A.Pilotte, F.Malenfant, A.Mullick, A.Garnier, and B.Massie. 2010. High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnol. Bioeng.* 106:203-215.
97. Galdiero, F. 1979. Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment. *Arch. Virol.* 59:99-105.
98. Gammeltoft, S., R.Ballotti, A.Kowalski, B.Westermark, and O.E.Van. 1988. Expression of two types of receptor for insulin-like growth factors in human malignant glioma. *Cancer Res.* 48:1233-1237.
99. Gao, J.Q., Y.Eto, Y.Yoshioka, F.Sekiguchi, S.Kurachi, T.Morishige, X.Yao, H.Watanabe, R.Asavatanabodee, F.Sakurai, H.Mizuguchi, Y.Okada, Y.Mukai, Y.Tsutsumi, T.Mayumi, N.Okada, and S.Nakagawa. 2007. Effective tumor targeted

gene transfer using PEGylated adenovirus vector via systemic administration. *J. Control Release* 122:102-110.

100. Gasser, B., M.Saloheimo, U.Rinas, M.Dragosits, E.Rodriguez-Carmona, K.Baumann, M.Giuliani, E.Parrilli, P.Branduardi, C.Lang, D.Porro, P.Ferrer, M.L.Tutino, D.Mattanovich, and A.Villaverde. 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb. Cell Fact.* 7:11.
101. Germain-Lee, E.L., M.Janicot, R.Lammers, A.Ullrich, and S.J.Casella. 1992. Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem. J.* 281 (Pt 2):413-417.
102. Germano, I.M., J.Fable, S.H.Gultekin, and A.Silvers. 2003. Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas. *J. Neurooncol.* 65:279-289.
103. Ghaneh, P., W.Greenhalf, M.Humphreys, D.Wilson, L.Zumstein, N.R.Lemoine, and J.P.Neoptolemos. 2001. Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16(INK4a) results in pancreatic cancer regression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 8:199-208.
104. Ghosh, D. and M.A.Barry. 2005. Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting. *J. Virol.* 79:13667-13672.

105. Giard, D.J., S.A.Aaronson, G.J.Todaro, P.Arnstein, J.H.Kersey, H.Dosik, and W.P.Parks. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:1417-1423.
106. Gilbert, R., R.W.Dudley, A.B.Liu, B.J.Petrof, J.Nalbantoglu, and G.Karpati. 2003. Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (guttled) adenovirus-encoding murine dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* 12:1287-1299.
107. Ginn, S.L., S.H.Liao, A.P.Dane, M.Hu, J.Hyman, J.W.Finnie, M.Zheng, M.Cavazzana-Calvo, S.I.Alexander, A.J.Thrasher, and I.E.Alexander. 2010. Lymphomagenesis in SCID-X1 mice following lentivirus-mediated phenotype correction independent of insertional mutagenesis and gammac overexpression. *Mol. Ther.* 18:965-976.
108. Glasgow, J.N., G.Mikheeva, V.Krasnykh, and D.T.Curiel. 2009. A strategy for adenovirus vector targeting with a secreted single chain antibody. *PLoS. One.* 4:e8355.
109. Gomez-Manzano, C., J.Holash, J.Fueyo, J.Xu, C.A.Conrad, K.D.Aldape, J.F.de Groot, B.N.Bekele, and W.K.Yung. 2008. VEGF Trap induces antiglioma effect at different stages of disease. *Neuro. Oncol.* 10:940-945.

110. Gonzalez, R., R.Vereecque, T.J.Wickham, T.Facon, D.Hetuin, I.Kovesdi, F.Bauters, P.Fenaux, and B.Quesnel. 1999. Transduction of bone marrow cells by the AdZ.F(pK7) modified adenovirus demonstrates preferential gene transfer in myeloma cells. *Hum. Gene Ther.* 10:2709-2717.
111. Goyenvalle, A. and K.E.Davies. 2011. Engineering exon-skipping vectors expressing U7 snRNA constructs for Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Methods Mol. Biol.* 709:179-196.
112. Goyenvalle, A., J.T.Seto, K.E.Davies, and J.Chamberlain. 2011. Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 20:R69-R78.
113. Graham, F.L., J.Smiley, W.C.Russell, and R.Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59-74.
114. Grandi, P., J.Fernandez, O.Szentirmai, R.Carter, D.Gianni, M.Sena-Esteves, and X.O.Breakefield. 2010. Targeting HSV-1 virions for specific binding to epidermal growth factor receptor-vIII-bearing tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 17:655-663.
115. Greber, U.F., M.Suomalainen, R.P.Stidwill, K.Boucke, M.W.Ebersold, and A.Helenius. 1997. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* 16:5998-6007.

116. Greber, U.F., P.Webster, J.Weber, and A.Helenius. 1996. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* 15:1766-1777.
117. Greco, O. and G.U.Dachs. 2001. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J. Cell Physiol* 187:22-36.
118. Gualco, E., J.Y.Wang, V.L.Del, K.Urbanska, F.Peruzzi, K.Khalili, S.Amini, and K.Reiss. 2009. IGF-IR in neuroprotection and brain tumors. *Front Biosci.* 14:352-375.
119. Guoan, X., W.Hanning, C.Kaiyun, and L.Hao. 2010. Adenovirus-mediated siRNA targeting Mcl-1 gene increases radiosensitivity of pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo. *Surgery* 147:553-561.
120. Gupta, P., S.Y.Han, M.Holgado-Madruga, S.S.Mitra, G.Li, R.T.Nitta, and A.J.Wong. 2010. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. *BMC. Biotechnol.* 10:72.
121. Gustafsson, D.J., A.Segerman, K.Lindman, Y.F.Mei, and G.Wadell. 2006. The Arg279Gln [corrected] substitution in the adenovirus type 11p (Ad11p) fiber knob abolishes EDTA-resistant binding to A549 and CHO-CD46 cells, converting the phenotype to that of Ad7p. *J. Virol.* 80:1897-1905.

122. Hacein-Bey-Abina, S., K.C.Von, M.Schmidt, M.P.McCormack, N.Wulffraat, P.Leboulch, A.Lim, C.S.Osborne, R.Pawliuk, E.Morillon, R.Sorensen, A.Forster, P.Fraser, J.I.Cohen, B.G.de Saint, I.Alexander, U.Wintergerst, T.Frebourg, A.Aurias, D.Stoppa-Lyonnet, S.Romana, I.Radford-Weiss, F.Gross, F.Valensi, E.Delabesse, E.Macintyre, F.Sigaux, J.Soulier, L.E.Leiva, M.Wissler, C.Prinz, T.H.Rabbitts, D.F.Le, A.Fischer, and M.Cavazzana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
123. Haisma, H.J., J.Grill, D.T.Curiel, S.Hoogeland, B.van, V, H.M.Pinedo, and W.R.Gerritsen. 2000. Targeting of adenoviral vectors through a bispecific single-chain antibody. *Cancer Gene Ther.* 7:901-904.
124. Hardy, K.M., B.W.Booth, M.J.Hendrix, D.S.Salomon, and L.Strizzi. 2010. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 15:191-199.
125. Hartigan-O'Connor, D., C.J.Kirk, R.Crawford, J.J.Mule, and J.S.Chamberlain. 2001. Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol. Ther.* 4:525-533.
126. Harui, A., S.Suzuki, S.Kochanek, and K.Mitani. 1999. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J. Virol.* 73:6141-6146.

127. Harvey, T.J., D.Burdon, L.Steele, N.Ingram, G.D.Hall, P.J.Selby, R.G.Vile, P.A.Cooper, S.D.Shnyder, and J.D.Chester. 2010. Retargeted adenoviral cancer gene therapy for tumour cells overexpressing epidermal growth factor receptor or urokinase-type plasminogen activator receptor. *Gene Ther.* 17:1000-1010.
128. He, A.R., A.P.Lindenberg, and J.L.Marshall. 2008. Biologic therapies for advanced pancreatic cancer. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 8:1331-1338.
129. He, T.C., S.Zhou, L.T.da Costa, J.Yu, K.W.Kinzler, and B.Vogelstein. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:2509-2514.
130. He, X., J.Liu, C.Yang, C.Su, C.Zhou, Q.Zhang, L.Li, H.Wu, X.Liu, M.Wu, and Q.Qian. 2011. 5/35 fiber-modified conditionally replicative adenovirus armed with p53 shows increased tumor-suppressing capacity to breast cancer cells. *Hum. Gene Ther.* 22:283-292.
131. Hedley, S.J., M.A.van der, S.Hohn, D.Escher, A.Barberis, J.N.Glasgow, J.T.Douglas, N.Korokhov, and D.T.Curiel. 2006. An adenovirus vector with a chimeric fiber incorporating stabilized single chain antibody achieves targeted gene delivery. *Gene Ther.* 13:88-94.

132. Heise, C., T.Hermiston, L.Johnson, G.Brooks, A.Sampson-Johannes, A.Williams, L.Hawkins, and D.Kirn. 2000. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat. Med.* 6:1134-1139.
133. Heist, R.S. and D.Christiani. 2009. EGFR-targeted therapies in lung cancer: predictors of response and toxicity. *Pharmacogenomics.* 10:59-68.
134. Henning, P., K.M.Andersson, K.Frykholm, A.Ali, M.K.Magnusson, P.A.Nygren, O.Granio, S.S.Hong, P.Boulanger, and L.Lindholm. 2005. Tumor cell targeted gene delivery by adenovirus 5 vectors carrying knobless fibers with antibody-binding domains. *Gene Ther.* 12:211-224.
135. Henning, P., E.Lundgren, M.Carlsson, K.Frykholm, J.Johannisson, M.K.Magnusson, E.Tang, L.Franqueville, S.S.Hong, L.Lindholm, and P.Boulanger. 2006. Adenovirus type 5 fiber knob domain has a critical role in fiber protein synthesis and encapsidation. *J. Gen. Virol.* 87:3151-3160.
136. Hida, K., S.K.Lai, J.S.Suk, S.Y.Won, M.P.Boyle, and J.Hanes. 2011. Common gene therapy viral vectors do not efficiently penetrate sputum from cystic fibrosis patients. *PLoS. One.* 6:e19919.
137. Hirasawa, K., S.G.Nishikawa, K.L.Norman, M.C.Coffey, B.G.Thompson, C.S.Yoon, D.M.Waisman, and P.W.Lee. 2003. Systemic reovirus therapy of metastatic cancer in immune-competent mice. *Cancer Res.* 63:348-353.

138. Hoffmann, D., B.Meyer, and O.Wildner. 2007. Improved glioblastoma treatment with Ad5/35 fiber chimeric conditionally replicating adenoviruses. *J. Gene Med.* 9:764-778.
139. Hong, C.S., W.Fellows, A.Niranjan, S.Alber, S.Watkins, J.B.Cohen, J.C.Glorioso, and P.Grandi. 2010. Ectopic matrix metalloproteinase-9 expression in human brain tumor cells enhances oncolytic HSV vector infection. *Gene Ther.* 17:1200-1205.
140. Hong, J.S. and J.A.Engler. 1996. Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers. *J. Virol.* 70:7071-7078.
141. Horwitz, M.S. 2004. Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J. Gene Med.* 6 Suppl 1:S172-S183.
142. Huang, H.S., M.Nagane, C.K.Klingbeil, H.Lin, R.Nishikawa, X.D.Ji, C.M.Huang, G.N.Gill, H.S.Wiley, and W.K.Cavenee. 1997. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* 272:2927-2935.
143. Huang, M.M. and P.Hearing. 1989. The adenovirus early region 4 open reading frame 6/7 protein regulates the DNA binding activity of the cellular transcription factor, E2F, through a direct complex. *Genes Dev.* 3:1699-1710.

144. Humbel, R.E. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.* 190:445-462.
145. Huyghe, B.G., X.Liu, S.Sutjipto, B.J.Sugarman, M.T.Horn, H.M.Shepard, C.J.Scandella, and P.Shabram. 1995. Purification of a type 5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography. *Hum. Gene Ther.* 6:1403-1416.
146. Imler, J.L., C.Chartier, D.Dreyer, A.Dieterle, M.Sainte-Marie, T.Faure, A.Pavirani, and M.Mehtali. 1996. Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther.* 3:75-84.
147. Immonen, A., M.Vapalahti, K.Tyynela, H.Hurskainen, A.Sandmair, R.Vanninen, G.Langford, N.Murray, and S.Yla-Herttuala. 2004. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol. Ther.* 10:967-972.
148. Jenkins, N. and A.Hovey. 1993. Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese hamster ovary cells synthesizing a recombinant protein. *Biotechnol. Bioeng.* 42:1029-1036.
149. Jensen, O.N. 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:33-41.

150. Ji, X., J.Zhang, L.Cheng, F.Weil, H.Li, X.Liu, X.Chen, C.Li, Y.Wang, and Q.Huang. 2009. Oncolytic adenovirus delivering herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene reduces the growth of human retinoblastoma in an in vivo mouse model. *Exp. Eye Res.* 89:193-199.
151. Jimenez, C., R.A.Portela, M.Mellado, J.M.Rodriguez-Frade, J.Collard, A.Serrano, A.Martinez, J.Avila, and A.C.Carrera. 2000. Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J. Cell Biol.* 151:249-262.
152. Jones, H.W., Jr., V.A.McKusick, P.S.Harper, and K.D.Wuu. 1971. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet. Gynecol.* 38:945-949.
153. Joung, I., G.Harber, K.M.Gerecke, S.L.Carroll, J.F.Collawn, and J.A.Engler. 2005. Improved gene delivery into neuroglial cells using a fiber-modified adenovirus vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328:1182-1187.
154. Jungbluth, A.A., E.Stockert, H.J.Huang, V.P.Collins, K.Coplan, K.Iversen, D.Kolb, T.J.Johns, A.M.Scott, W.J.Gullick, G.Ritter, L.Cohen, M.J.Scanlan, W.K.Cavenee, and L.J.Old. 2003. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:639-644.

155. Kallergi, G., S.Agelaki, H.Markomanolaki, V.Georgoulas, and C.Stournaras. 2007. Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cell Physiol Biochem.* 20:977-986.
156. Kammerer, R. and W.Zimmermann. 2010. Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC. Biol.* 8:12.
157. Kargiotis, O., C.Chetty, C.S.Gondi, A.J.Tsung, D.H.Dinh, M.Gujrati, S.S.Lakka, A.P.Kyritsis, and J.S.Rao. 2008. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene* 27:4830-4840.
158. Kato, H., T.N.Faria, B.Stannard, C.T.Roberts, Jr., and D.Leroith. 1993. Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J. Biol. Chem.* 268:2655-2661.
159. Kaur, T., R.A.Slavcev, and S.D.Wettig. 2009. Addressing the challenge: current and future directions in ovarian cancer therapy. *Curr. Gene Ther.* 9:434-458.
160. Kawakami, Y., H.Li, J.T.Lam, V.Krasnykh, D.T.Curiel, and J.L.Blackwell. 2003. Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res.* 63:1262-1269.

161. Kawashima, R., M.Abei, K.Fukuda, K.Nakamura, T.Murata, M.Wakayama, E.Seo, N.Hasegawa, H.Mizuguchi, Y.Obata, I.Hyodo, H.Hamada, and K.K.Yokoyama. 2011. EpCAM- and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber-modified adenovirus. *Int. J. Cancer* 129:1244-1253.
162. Kim, H., E.Barton, N.Muja, S.Yakar, P.Pennisi, and D.LeRoith. 2005. Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo. *Endocrinology* 146:1772-1779.
163. Kim, P.H., J.H.Sohn, J.W.Choi, Y.Jung, S.W.Kim, S.Haam, and C.O.Yun. 2011. Active targeting and safety profile of PEG-modified adenovirus conjugated with herceptin. *Biomaterials* 32:2314-2326.
164. Kimura, E., Y.Maeda, T.Arima, Y.Nishida, S.Yamashita, A.Hara, E.Uyama, S.Mita, and M.Uchino. 2001. Efficient repetitive gene delivery to skeletal muscle using recombinant adenovirus vector containing the Coxsackievirus and adenovirus receptor cDNA. *Gene Ther.* 8:20-27.
165. Kirby, I., E.Davison, A.J.Beavil, C.P.Soh, T.J.Wickham, P.W.Roelvink, I.Kovesdi, B.J.Sutton, and G.Santis. 2000. Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J. Virol.* 74:2804-2813.

166. Kleeff, J., K.Fukahi, M.E.Lopez, H.Friess, M.W.Buchler, B.A.Sosnowski, and M.Korc. 2002. Targeting of suicide gene delivery in pancreatic cancer cells via FGF receptors. *Cancer Gene Ther.* 9:522-532.
167. Klyushnichenko, V., A.Bernier, A.Kamen, and E.Harmsen. 2001. Improved high-performance liquid chromatographic method in the analysis of adenovirus particles. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 755:27-36.
168. Koizumi, N., H.Mizuguchi, F.Sakurai, T.Yamaguchi, Y.Watanabe, and T.Hayakawa. 2003a. Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J. Virol.* 77:13062-13072.
169. Koizumi, N., H.Mizuguchi, N.Utoguchi, Y.Watanabe, and T.Hayakawa. 2003b. Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J. Gene Med.* 5:267-276.
170. Korokhov, N., G.Mikheeva, A.Krendelshchikov, N.Belousova, V.Simonenko, V.Krendelshchikova, A.Pereboev, A.Kotov, O.Kotova, P.L.Triozi, W.A.Aldrich, J.T.Douglas, K.M.Lo, P.T.Banerjee, S.D.Gillies, D.T.Curiel, and V.Krasnykh. 2003. Targeting of adenovirus via genetic modification of the viral capsid combined with a protein bridge. *J. Virol.* 77:12931-12940.

171. Krasnykh, V., I.Dmitriev, G.Mikheeva, C.R.Miller, N.Belousova, and D.T.Curiel. 1998. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* 72:1844-1852.
172. Kritz, A.B., C.G.Nicol, K.L.Dishart, R.Nelson, S.Holbeck, D.J.Von Seggern, L.M.Work, J.H.McVey, S.A.Nicklin, and A.H.Baker. 2007. Adenovirus 5 fibers mutated at the putative HSPG-binding site show restricted retargeting with targeting peptides in the HI loop. *Mol. Ther.* 15:741-749.
173. Kuhlmann, K.F., D.J.Gouma, and J.G.Wesseling. 2008. Adenoviral gene therapy for pancreatic cancer: where do we stand? *Dig. Surg.* 25:278-292.
174. Kuhlmann, K.F., M.A.van Geer, C.T.Bakker, J.E.Dekker, M.J.Havenga, R.P.Elferink, D.J.Gouma, P.J.Bosma, and J.G.Wesseling. 2009. Fiber-chimeric adenoviruses expressing fibers from serotype 16 and 50 improve gene transfer to human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Gene Ther.* 16:585-597.
175. Kuppen, P.J., M.M.van der Eb, L.E.Jonges, M.Hagenaars, M.E.Hokland, U.Nannmark, R.H.Goldfarb, P.H.Basse, G.J.Fleuren, R.C.Hoeben, and d.van, V. 2001. Tumor structure and extracellular matrix as a possible barrier for therapeutic approaches using immune cells or adenoviruses in colorectal cancer. *Histochem. Cell Biol.* 115:67-72.

176. Kurachi, S., N.Koizumi, F.Sakurai, K.Kawabata, H.Sakurai, S.Nakagawa, T.Hayakawa, and H.Mizuguchi. 2007. Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther.* 14:266-274.
177. Kuroki, M., K.Hachimine, J.Huang, H.Shibaguchi, T.Kinugasa, S.Maekawa, and M.Kuroki. 2005. Re-targeting of cytotoxic T lymphocytes and/or natural killer cells to CEA-expressing tumor cells with anti-CEA antibody activity. *Anticancer Res.* 25:3725-3732.
178. Lakka, S.S., M.Rajan, C.Gondi, N.Yanamandra, N.Chandrasekar, S.L.Jasti, Y.Adachi, K.Siddique, M.Gujrati, W.Olivero, D.H.Dinh, G.Kouraklis, A.P.Kyritsis, and J.S.Rao. 2002. Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion. *Oncogene* 21:8011-8019.
179. Lambright, E.S., K.Amin, R.Wiewrodt, S.D.Force, M.Lanuti, K.J.Propert, L.Litzky, L.R.Kaiser, and S.M.Albelda. 2001. Inclusion of the herpes simplex thymidine kinase gene in a replicating adenovirus does not augment antitumor efficacy. *Gene Ther.* 8:946-953.
180. Lanciotti, J., A.Song, J.Doukas, B.Sosnowski, G.Pierce, R.Gregory, S.Wadsworth, and C.O'Riordan. 2003. Targeting adenoviral vectors using heterofunctional polyethylene glycol FGF2 conjugates. *Mol. Ther.* 8:99-107.

181. Landazuri, N. and J.M.Le Doux. 2004. Complexation of retroviruses with charged polymers enhances gene transfer by increasing the rate that viruses are delivered to cells. *J. Gene Med.* 6:1304-1319.
182. Law, L.K. and B.L.Davidson. 2005. What does it take to bind CAR? *Mol. Ther.* 12:599-609.
183. Le, P.U., A.E.Lenferink, M.Pinard, J.Baardsnes, B.Massie, and M.D.O'Connor-McCourt. 2009. Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications. *Protein Expr. Purif.* 64:108-117.
184. Lechner, R.L. and T.J.Kelly, Jr. 1977. The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *Cell* 12:1007-1020.
185. Legrand, V., D.Spehner, Y.Schlesinger, N.Settelen, A.Pavirani, and M.Mehtali. 1999. Fiberless recombinant adenoviruses: virus maturation and infectivity in the absence of fiber. *J. Virol.* 73:907-919.
186. Lewis-Wambi, J.S., H.E.Cunliffe, H.R.Kim, A.L.Willis, and V.C.Jordan. 2008. Overexpression of CEACAM6 promotes migration and invasion of oestrogen-deprived breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* 44:1770-1779.

187. Li, H.J., M.Everts, L.Pereboeva, S.Komarova, A.Idan, D.T.Curiel, and H.R.Herschman. 2007. Adenovirus tumor targeting and hepatic untargeting by a coxsackie/adenovirus receptor ectodomain anti-carcinoembryonic antigen bispecific adapter. *Cancer Res.* 67:5354-5361.
188. Li, J., S.Lad, G.Yang, Y.Luo, M.Iacobelli-Martinez, F.J.Primus, R.A.Reisfeld, and E.Li. 2006. Adenovirus fiber shaft contains a trimerization element that supports peptide fusion for targeted gene delivery. *J. Virol.* 80:12324-12331.
189. Li, N., Y.Chu, L.Yao, X.Ying, H.Jiang, M.Zhou, and C.Xu. 2011. A monoclonal antibody targeted against epidermal growth factor receptor variant III enhances cisplatin efficiency. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137:1455-1461.
190. Li, Y., R.C.Pong, J.M.Bergelson, M.C.Hall, A.I.Sagalowsky, C.P.Tseng, Z.Wang, and J.T.Hsieh. 1999. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res.* 59:325-330.
191. Liberelle, B., L.Bartholin, C.Boucher, F.Murschel, M.Jolicoeur, Y.Durocher, A.Merzouki, and C.G.De. 2010. New ELISA approach based on coiled-coil interactions. *J. Immunol. Methods* 362:161-167.

192. Lichtenstein, D.L., K.Toth, K.Doronin, A.E.Tollefson, and W.S.Wold. 2004. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol.* 23:75-111.
193. Lindert, S., M.Silvestry, T.M.Mullen, G.R.Nemerow, and P.L.Stewart. 2009. Cryo-electron microscopy structure of an adenovirus-integrin complex indicates conformational changes in both penton base and integrin. *J. Virol.* 83:11491-11501.
194. Litowski, J.R. and R.S.Hodges. 2002. Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and alpha-helical propensity on protein folding, stability, and specificity. *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279.
195. Liu, J.P., J.Baker, A.S.Perkins, E.J.Robertson, and A.Efstratiadis. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
196. Liu, Q., A.K.Zaiss, P.Colarusso, K.Patel, G.Haljan, T.J.Wickham, and D.A.Muruve. 2003. The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 14:627-643.
197. Liu, X., Q.Qian, P.Xu, F.Wolf, J.Zhang, D.Zhang, C.Li, and Q.Huang. 2011. A Novel Conditionally Replicating "Armed" Adenovirus Selectively Targeting Gastrointestinal Tumors with Aberrant wnt Signaling. *Hum. Gene Ther.*

198. Liu, X., T.Turbyville, A.Fritz, and L.Whitesell. 1998. Inhibition of insulin-like growth factor I receptor expression in neuroblastoma cells induces the regression of established tumors in mice. *Cancer Res.* 58:5432-5438.
199. Lochmuller, H., A.Jani, J.Huard, S.Prescott, M.Simoneau, B.Massie, G.Karpati, and G.Acsadi. 1994. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* 5:1485-1491.
200. Loetscher, P., L.Mottlau, and E.Hochuli. 1992. Immobilization of monoclonal antibodies for affinity chromatography using a chelating peptide. *J. Chromatogr.* 595:113-119.
201. Lopaczynski, W. 1999. Differential regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I. *Acta Biochim. Pol.* 46:51-60.
202. Lowenadler, B., B.Nilsson, L.Abrahmsen, T.Moks, L.Ljungqvist, E.Holmgren, S.Paleus, S.Josephson, L.Philipson, and M.Uhlen. 1986. Production of specific antibodies against protein A fusion proteins. *EMBO J.* 5:2393-2398.
203. Lu, H., M.D.Reach, E.Minaya, and C.S.Young. 1997. The initiator element of the adenovirus major late promoter has an important role in transcription initiation in vivo. *J. Virol.* 71:102-109.

204. Lu, Q.L., T.Yokota, S.Takeda, L.Garcia, F.Muntoni, and T.Partridge. 2011. The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 19:9-15.
205. Magnusson, M.K., S.S.Hong, P.Boulanger, and L.Lindholm. 2001. Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fiber. *J. Virol.* 75:7280-7289.
206. Majhen, D., J.Gabrilovac, M.Eloit, J.Richardson, and A.mbrivovic-Ristov. 2006. Disulfide bond formation in NGR fiber-modified adenovirus is essential for retargeting to aminopeptidase N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348:278-287.
207. Majhen, D., J.Nemet, J.Richardson, J.Gabrilovac, M.Hajsig, M.Osmak, M.Eloit, and A.mbrivovic-Ristov. 2009. Differential role of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in internalization and transduction efficacies of wild type and RGD4C fiber-modified adenoviruses. *Virus Res.* 139:64-73.
208. Mandell, K.J., G.P.Holley, C.A.Parkos, and H.F.Edelhauser. 2006. Antibody blockade of junctional adhesion molecule-A in rabbit corneal endothelial tight junctions produces corneal swelling. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 47:2408-2416.
209. Mangel, W.F., D.L.Toledo, M.T.Brown, J.H.Martin, and W.J.McGrath. 1996. Characterization of three components of human adenovirus proteinase activity in vitro. *J. Biol. Chem.* 271:536-543.

210. Martiniello-Wilks, R., T.Tsatralis, P.Russell, D.E.Brookes, D.Zandvliet, L.J.Lockett, G.W.Both, P.L.Molloy, and P.J.Russell. 2002. Transcription-targeted gene therapy for androgen-independent prostate cancer. *Cancer Gene Ther.* 9:443-452.
211. Massie, B., F.Couture, L.Lamoureux, D.D.Mosser, C.Guilbault, P.Jolicoeur, F.Belanger, and Y.Langelier. 1998b. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J. Virol.* 72:2289-2296.
212. Massie, B., F.Couture, L.Lamoureux, D.D.Mosser, C.Guilbault, P.Jolicoeur, F.Belanger, and Y.Langelier. 1998a. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J. Virol.* 72:2289-2296.
213. Mays, L.E. and J.M.Wilson. 2011. The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. *Mol. Ther.* 19:16-27.
214. McConnell, M.J., X.Danthinne, and M.J.Imperiale. 2006. Characterization of a permissive epitope insertion site in adenovirus hexon. *J. Virol.* 80:5361-5370.
215. Mei, Y.F., J.Skog, K.Lindman, and G.Wadell. 2003. Comparative analysis of the genome organization of human adenovirus 11, a member of the human adenovirus

species B, and the commonly used human adenovirus 5 vector, a member of species C. *J. Gen. Virol.* 84:2061-2071.

216. Meier, O., K.Boucke, S.V.Hammer, S.Keller, R.P.Stidwill, S.Hemmi, and U.F.Greber. 2002. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J. Cell Biol.* 158:1119-1131.
217. Mendell, J.R., L.R.Rodino-Klapac, X.Rosales-Quintero, J.Kota, B.D.Coley, G.Galloway, J.M.Craenen, S.Lewis, V.Malik, C.Shilling, B.J.Byrne, T.Conlon, K.J.Campbell, W.G.Bremer, L.Viollet, C.M.Walker, Z.Sahenk, and K.R.Clark. 2009. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann. Neurol.* 66:290-297.
218. Menezes, K.M., H.S.Mok, and M.A.Barry. 2006. Increased transduction of skeletal muscle cells by fibroblast growth factor-modified adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 17:314-320.
219. Mercille, S., P.Jolicoeur, C.Gervais, D.Paquette, D.D.Mosser, and B.Massie. 1999. Dose-dependent reduction of apoptosis in nutrient-limited cultures of NS/0 myeloma cells transfected with the E1B-19K adenoviral gene. *Biotechnol. Bioeng.* 63:516-528.

220. Mesnil, M. and H.Yamasaki. 2000. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res.* 60:3989-3999.
221. Meyer, J.D., B.Ho, and M.C.Manning. 2002. Effects of conformation on the chemical stability of pharmaceutically relevant polypeptides. *Pharm. Biotechnol.* 13:85-107.
222. Michael, S.I., J.S.Hong, D.T.Curiel, and J.A.Engler. 1995. Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther.* 2:660-668.
223. Miller, C.R., D.J.Buchsbaum, P.N.Reynolds, J.T.Douglas, G.Y.Gillespie, M.S.Mayo, D.Raben, and D.T.Curiel. 1998. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res.* 58:5738-5748.
224. Mimeault, M. and S.K.Batra. 2011. Complex oncogenic signaling networks regulate brain tumor-initiating cells and their progenies: pivotal roles of wild-type EGFR, EGFRvIII mutant and hedgehog cascades and novel multitargeted therapies. *Brain Pathol.* 21:479-500.
225. Mingozzi, F. and K.A.High. 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12:341-355.

226. Mittereder, N., K.L.March, and B.C.Trapnell. 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* 70:7498-7509.
227. Molin, M., L.Bouakaz, S.Berenjian, and G.Akusjarvi. 2002. Unscheduled expression of capsid protein IIIa results in defects in adenovirus major late mRNA and protein expression. *Virus Res.* 83:197-206.
228. Morrison, J., S.S.Briggs, N.Green, K.Fisher, V.Subr, K.Ulbrich, S.Kehoe, and L.W.Seymour. 2008a. Virotherapy of ovarian cancer with polymer-cloaked adenovirus retargeted to the epidermal growth factor receptor. *Mol. Ther.* 16:244-251.
229. Morrison, J., S.S.Briggs, N.K.Green, C.Thoma, K.Fisher, S.T.Kehoe, and L.W.Seymour. 2008b. Cetuximab retargeting of adenovirus via the epidermal growth factor receptor for treatment of intraperitoneal ovarian cancer. *Hum. Gene Ther.*
230. Morrison, J., S.S.Briggs, N.K.Green, C.Thoma, K.D.Fisher, S.Kehoe, and L.W.Seymour. 2009. Cetuximab retargeting of adenovirus via the epidermal growth factor receptor for treatment of intraperitoneal ovarian cancer. *Hum. Gene Ther.* 20:239-251.

231. Mukherjee, A., E.M.Wilson, and P.Rotwein. 2008. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 blocks skeletal muscle differentiation by inhibiting IGF actions. *Mol. Endocrinol.* 22:206-215.
232. Muzyczka, N. and K.H.Warrington, Jr. 2005. Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism. *Hum. Gene Ther.* 16:408-416.
233. Nakai, H., S.R.Yant, T.A.Storm, S.Fuess, L.Meuse, and M.A.Kay. 2001. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J. Virol.* 75:6969-6976.
234. Nakano, M.Y., K.Boucke, M.Suomalainen, R.P.Stidwill, and U.F.Greber. 2000. The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J. Virol.* 74:7085-7095.
235. Nakaya, H., A.Ishizu, H.Ikeda, M.Tahara, J.Shindo, R.Itoh, T.Takahashi, M.Asaka, H.Ishikura, and T.Yoshiki. 2003. In vitro model of suicide gene therapy for alpha-fetoprotein-producing gastric cancer. *Anticancer Res.* 23:3795-3800.
236. Nalabothula, N., S.S.Lakka, D.H.Dinh, M.Gujrati, W.C.Olivero, and J.S.Rao. 2007. Sense p16 and antisense uPAR bicistronic construct inhibits angiogenesis and induces glioma cell death. *Int. J. Oncol.* 30:669-678.

237. Nalbantoglu, J., G.Pari, G.Karpati, and P.C.Holland. 1999. Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum. Gene Ther.* 10:1009-1019.
238. Natsume, A. and J.Yoshida. 2008. Gene therapy for high-grade glioma: current approaches and future directions. *Cell Adh. Migr.* 2:186-191.
239. Nemerow, G.R., L.Pache, V.Reddy, and P.L.Stewart. 2009. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* 384:380-388.
240. Nemunaitis, J., F.Khuri, I.Ganly, J.Arseneau, M.Posner, E.Vokes, J.Kuhn, T.McCarty, S.Landers, A.Blackburn, L.Romel, B.Randlev, S.Kaye, and D.Kirn. 2001. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 19:289-298.
241. Nemunaitis, J., A.W.Tong, M.Nemunaitis, N.Senzer, A.P.Phadke, C.Bedell, N.Adams, Y.A.Zhang, P.B.Maples, S.Chen, B.Pappen, J.Burke, D.Ichimar, Y.Urata, and T.Fujiwara. 2010. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol. Ther.* 18:429-434.

242. Nettelbeck, D.M., D.W.Miller, V.Jerome, M.Zuzarte, S.J.Watkins, R.E.Hawkins, R.Muller, and R.E.Kontermann. 2001. Targeting of adenovirus to endothelial cells by a bispecific single-chain diabody directed against the adenovirus fiber knob domain and human endoglin (CD105). *Mol. Ther.* 3:882-891.
243. Nicholas, M.K., R.V.Lukas, N.F.Jafri, L.Faoro, and R.Salgia. 2006. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin. Cancer Res.* 12:7261-7270.
244. Nicklin, S.A., D.J.Von Seggern, L.M.Work, D.C.Pek, A.F.Dominiczak, G.R.Nemerow, and A.H.Baker. 2001. Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol. Ther.* 4:534-542.
245. Nicklin, S.A., E.Wu, G.R.Nemerow, and A.H.Baker. 2005. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Mol. Ther.* 12:384-393.
246. Nilsson, M., J.Ljungberg, J.Richter, T.Kiefer, M.Magnusson, A.Lieber, B.Widegren, S.Karlsson, and X.Fan. 2004. Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells. *J. Gene Med.* 6:631-641.

247. Noutsias, M., H.Fechner, J.H.de, X.Wang, D.Dekkers, A.B.Houtsmuller, M.Pauschinger, J.Bergelson, R.Warraich, M.Yacoub, R.Hetzer, J.Lamers, H.P.Schultheiss, and W.Poller. 2001. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 104:275-280.
248. O'Connor, R., A.Kauffmann-Zeh, Y.Liu, S.Lehar, G.I.Evan, R.Baserga, and W.A.Blattler. 1997. Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 17:427-435.
249. Ohgaki, H. and P.Kleihues. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170:1445-1453.
250. Okada, Y., N.Okada, H.Mizuguchi, T.Hayakawa, S.Nakagawa, and T.Mayumi. 2005. Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma. *Cancer Gene Ther.* 12:608-616.
251. Onimaru, M., K.Ohuchida, K.Mizumoto, E.Nagai, L.Cui, H.Toma, K.Takayama, K.Matsumoto, M.Hashizume, and M.Tanaka. 2010. hTERT-promoter-dependent oncolytic adenovirus enhances the transduction and therapeutic efficacy of replication-defective adenovirus vectors in pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* 101:735-742.

252. Oosterhoff, D., H.M.Pinedo, M.A.Witlox, J.E.Carette, W.R.Gerritsen, and B.Van, V. 2005. Gene-directed enzyme prodrug therapy with carboxylesterase enhances the anticancer efficacy of the conditionally replicating adenovirus AdDelta24. *Gene Ther.* 12:1011-1018.
253. Opyrchal, M., I.Aderca, and E.Galanis. 2009. Phase I clinical trial of locoregional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in combination with mitomycin-C, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy in patients with advanced sarcomas. *Methods Mol. Biol.* 542:705-717.
254. Ostapchuk, P. and P.Hearing. 2005. Control of adenovirus packaging. *J. Cell Biochem.* 96:25-35.
255. Palmer, R.M., M.G.Thompson, R.M.Knott, G.P.Campbell, A.Thom, and K.S.Morrison. 1997. Insulin and insulin-like growth factor-I responsiveness and signalling mechanisms in C2C12 satellite cells: effect of differentiation and fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1355:167-176.
256. Palsgaard, J., A.E.Brown, M.Jensen, R.Borup, M.Walker, and M.P.De. 2009. Insulin-like growth factor I (IGF-I) is a more potent regulator of gene expression than insulin in primary human myoblasts and myotubes. *Growth Horm. IGF. Res.* 19:168-178.

257. Pardo-Mateos, A. and C.S.Young. 2004. Adenovirus IVa2 protein plays an important role in transcription from the major late promoter in vivo. *Virology* 327:50-59.
258. Park, K.S. and D.Oh. 2010. Gene therapy for muscular dystrophies: progress and challenges. *J. Clin. Neurol.* 6:111-116.
259. Parker, W.B., P.W.Allan, S.C.Shaddix, L.M.Rose, H.F.Speegle, G.Y.Gillespie, and L.L.Bennett, Jr. 1998. Metabolism and metabolic actions of 6-methylpurine and 2-fluoroadenine in human cells. *Biochem. Pharmacol.* 55:1673-1681.
260. Peng, H.H., S.Wu, J.J.Davis, L.Wang, J.A.Roth, F.C.Marini, III, and B.Fang. 2006. A rapid and efficient method for purification of recombinant adenovirus with arginine-glycine-aspartic acid-modified fibers. *Anal. Biochem.* 354:140-147.
261. Pereboeva, L., S.Komarova, J.Roth, S.Ponnazhagan, and D.T.Curiel. 2007. Targeting EGFR with metabolically biotinylated fiber-mosaic adenovirus. *Gene Ther.* 14:627-637.
262. Perez-Berna, A.J., R.Marabini, S.H.Scheres, R.Menendez-Conejero, I.P.Dmitriev, D.T.Curiel, W.F.Mangel, S.J.Flint, and M.C.San. 2009. Structure and uncoating of immature adenovirus. *J. Mol. Biol.* 392:547-557.

263. Philippou, A., A.Halapas, M.Maridaki, and M.Koutsilieris. 2007. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 7:208-218.
264. Piao, Y., H.Jiang, R.Aleman, V.Krasnykh, F.C.Marini, J.Xu, M.M.Alonso, C.A.Conrad, K.D.Aldape, C.Gomez-Manzano, and J.Fueyo. 2008. Oncolytic adenovirus retargeted to Delta-EGFR induces selective antiglioma activity. *Cancer Gene Ther.*
265. Ponten, J. and E.H.Macintyre. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 74:465-486.
266. Portsmouth, D., J.Hlavaty, and M.Renner. 2007. Suicide genes for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* 28:4-41.
267. Post, D.E., N.S.Devi, Z.Li, D.J.Brat, B.Kaur, A.Nicholson, J.J.Olson, Z.Zhang, and E.G.Van Meir. 2004. Cancer therapy with a replicating oncolytic adenovirus targeting the hypoxic microenvironment of tumors. *Clin. Cancer Res.* 10:8603-8612.
268. Poulin, K.L., R.M.Lanthier, A.C.Smith, C.Christou, Q.M.Risco, K.L.Powell, R.W.O'Meara, R.Kothary, I.A.Lorimer, and R.J.Parks. 2010. Retargeting of adenovirus vectors through genetic fusion of a single-chain or single-domain antibody to capsid protein IX. *J. Virol.* 84:10074-10086.

269. Prager, D., H.L.Li, H.Yamasaki, and S.Melmed. 1994. Human insulin-like growth factor I receptor internalization. Role of the juxtamembrane domain. *J. Biol. Chem.* 269:11934-11937.
270. Provencher, D.M., H.Lounis, L.Champoux, M.Tetrault, E.N.Manderson, J.C.Wang, P.Eydoux, R.Savoie, P.N.Tonin, and A.M.Mes-Masson. 2000. Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 36:357-361.
271. Puntener, D., M.F.Engelke, Z.Ruzsics, S.Strunze, C.Wilhelm, and U.F.Greber. 2011. Stepwise loss of fluorescent core protein V from human adenovirus during entry into cells. *J. Virol.* 85:481-496.
272. Rachwal, W.J., P.F.Bongiorno, M.B.Orringer, R.I.Whyte, S.P.Ethier, and D.G.Beer. 1995. Expression and activation of erbB-2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* 72:56-64.
273. Raki, M., A.Kanerva, A.Ristimaki, R.A.Desmond, D.T.Chen, T.Ranki, M.Sarkioja, L.Kangasniemi, and A.Hemminki. 2005. Combination of gemcitabine and Ad5/3-Delta24, a tropism modified conditionally replicating adenovirus, for the treatment of ovarian cancer. *Gene Ther.* 12:1198-1205.
274. Ramnarain, D.B., S.Park, D.Y.Lee, K.J.Hatanpaa, S.O.Scoggin, H.Otu, T.A.Libermann, J.M.Raisanen, R.Ashfaq, E.T.Wong, J.Wu, R.Elliott, and

- A.A.Habib. 2006. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res.* 66:867-874.
275. Ranki, T., A.Kanerva, A.Ristimaki, T.Hakkarainen, M.Sarkioja, L.Kangasniemi, M.Raki, P.Laakkonen, S.Goodison, and A.Hemminki. 2007. A heparan sulfate-targeted conditionally replicative adenovirus, Ad5.pk7-Delta24, for the treatment of advanced breast cancer. *Gene Ther.* 14:58-67.
276. Rauch, C. and P.Loughna. 2005. C2C12 skeletal muscle cells exposure to phosphatidylcholine triggers IGF-1 like-responses. *Cell Physiol Biochem.* 15:211-224.
277. Reichel, R., S.D.Neill, I.Kovesdi, M.C.Simon, P.Raychaudhuri, and J.R.Nevins. 1989. The adenovirus E4 gene, in addition to the E1A gene, is important for trans-activation of E2 transcription and for E2F activation. *J. Virol.* 63:3643-3650.
278. Reid, T., E.Galanis, J.Abbuzzese, D.Sze, L.M.Wein, J.Andrews, B.Randlev, C.Heise, M.Uprichard, M.Hatfield, L.Rome, J.Rubin, and D.Kirn. 2002. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res.* 62:6070-6079.

279. Rein, D.T., M.Breidenbach, H.Wu, T.Han, Y.S.Haviv, M.Wang, T.O.Kirby, Y.Kawakami, P.Dall, R.D.Alvarez, and D.T.Curiel. 2004. Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses. *Int. J. Cancer* 111:698-704.
280. Reinmuth, N., F.Fan, W.Liu, A.A.Parikh, O.Stoeltzing, Y.D.Jung, C.D.Bucana, R.Radinsky, G.E.Gallick, and L.M.Ellis. 2002. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest* 82:1377-1389.
281. Reiss, K., B.Valentinis, X.Tu, S.Q.Xu, and R.Baserga. 1998. Molecular markers of IGF-I-mediated mitogenesis. *Exp. Cell Res.* 242:361-372.
282. Rexroad, J., R.K.Evans, and C.R.Middaugh. 2006. Effect of pH and ionic strength on the physical stability of adenovirus type 5. *J. Pharm. Sci.* 95:237-247.
283. Rexroad, J., C.M.Wiethoff, A.P.Green, T.D.Kierstead, M.O.Scott, and C.R.Middaugh. 2003. Structural stability of adenovirus type 5. *J. Pharm. Sci.* 92:665-678.
284. Richard, C., W.Duivenvoorden, D.Bourbeau, B.Massie, W.Roa, J.Yau, and J.Th'ng. 2007. Sensitivity of 5-fluorouracil-resistant cancer cells to adenovirus suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 14:57-65.

285. Rivella, S., J.A.Callegari, C.May, C.W.Tan, and M.Sadelain. 2000. The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J. Virol.* 74:4679-4687.
286. Rocconi, R.P., Z.B.Zhu, M.Stoff-Khalili, A.A.Rivera, B.Lu, M.Wang, R.D.Alvarez, D.T.Curiel, and S.K.Makhija. 2007. Treatment of ovarian cancer with a novel dual targeted conditionally replicative adenovirus (CRAd). *Gynecol. Oncol.* 105:113-121.
287. Rodriguez, R., E.R.Schuur, H.Y.Lim, G.A.Henderson, J.W.Simons, and D.R.Henderson. 1997. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* 57:2559-2563.
288. Rogulski, K.R., M.S.Wing, D.L.Paielli, J.D.Gilbert, J.H.Kim, and S.O.Freytag. 2000. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization. *Hum. Gene Ther.* 11:67-76.
289. ROWE, W.P., R.J.HUEBNER, L.K.GILMORE, R.H.PARROTT, and T.G.WARD. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84:570-573.

290. Rux, J.J. and R.M.Burnett. 2004. Adenovirus structure. *Hum. Gene Ther.* 15:1167-1176.
291. Saito, T., S.Okada, K.Ohshima, E.Yamada, M.Sato, Y.Uehara, H.Shimizu, J.E.Pessin, and M.Mori. 2004. Differential activation of epidermal growth factor (EGF) receptor downstream signaling pathways by betacellulin and EGF. *Endocrinology* 145:4232-4243.
292. Samani, A.A., E.Chevet, L.Fallavollita, J.Galipeau, and P.Brodt. 2004. Loss of tumorigenicity and metastatic potential in carcinoma cells expressing the extracellular domain of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res.* 64:3380-3385.
293. Samani, A.A., L.Fallavollita, D.E.Jaalouk, J.Galipeau, and P.Brodt. 2001. Inhibition of carcinoma cell growth and metastasis by a vesicular stomatitis virus G-pseudotyped retrovector expressing type I insulin-like growth factor receptor antisense. *Hum. Gene Ther.* 12:1969-1977.
294. Sandovici, M., L.E.Deelman, O.A.Smit-van, G.H.van, M.G.Rots, Z.D.de, and R.H.Henning. 2006. Enhanced transduction of fibroblasts in transplanted kidney with an adenovirus having an RGD motif in the HI loop. *Kidney Int.* 69:45-52.
295. Sarnow, P., P.Hearing, C.W.Anderson, D.N.Halbert, T.Shenk, and A.J.Levine. 1984. Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically

- associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* 49:692-700.
296. Saydam, O., D.L.Glauser, I.Heid, G.Turkeri, M.Hilbe, A.H.Jacobs, M.Ackermann, and C.Fraefel. 2005. Herpes simplex virus 1 amplicon vector-mediated siRNA targeting epidermal growth factor receptor inhibits growth of human glioma cells in vivo. *Mol. Ther.* 12:803-812.
297. Schaack, J., W.Y.Ho, P.Freimuth, and T.Shenk. 1990. Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev.* 4:1197-1208.
298. Schagen, F.H., F.M.Wensveen, J.E.Carette, T.S.Dermody, W.R.Gerritsen, and B.Van, V. 2006. Genetic targeting of adenovirus vectors using a reovirus sigma1-based attachment protein. *Mol. Ther.* 13:997-1005.
299. Schalk, J.A., C.G.de Vries, T.J.Orzechowski, and M.G.Rots. 2007. A rapid and sensitive assay for detection of replication-competent adenoviruses by a combination of microcarrier cell culture and quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 145:89-95.
300. Schatz, S.M., R.J.Kerschbaumer, G.Gerstenbauer, M.Kral, F.Dorner, and F.Scheiflinger. 2003. Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnol. Bioeng.* 84:433-438.

301. Schepelmann, S. and C.J.Springer. 2006. Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Curr. Gene Ther.* 6:647-670.
302. Schmidt, T.G. and A.Skerra. 1993. The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng* 6:109-122.
303. Schmitz, M., C.Graf, T.Gut, D.Sirena, I.Peter, R.Dummer, U.F.Greber, and S.Hemmi. 2006. Melanoma cultures show different susceptibility towards E1A-, E1B-19 kDa- and fiber-modified replication-competent adenoviruses. *Gene Ther.* 13:893-905.
304. Schreiber, M., W.J.Muller, G.Singh, and F.L.Graham. 1999. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21(WAF1/CIP1) and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* 18:1663-1676.
305. Schumacher, R., L.Mosthaf, J.Schlessinger, D.Brandenburg, and A.Ullrich. 1991. Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J. Biol. Chem.* 266:19288-19295.
306. Segerman, A., J.P.Atkinson, M.Marttila, V.Dennerquist, G.Wadell, and N.Arnberg. 2003. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* 77:9183-9191.

307. Shah, S. and B.Chen. 2011. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Patholog. Res. Int.* 2011:903202.
308. Shaw, C.A., P.C.Holland, M.Sinnreich, C.Allen, K.Sollerbrant, G.Karpati, and J.Nalbantoglu. 2004. Isoform-specific expression of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in neuromuscular junction and cardiac intercalated discs. *BMC. Cell Biol.* 5:42.
309. Shayakhmetov, D.M., A.M.Eberly, Z.Y.Li, and A.Lieber. 2005. Deletion of penton RGD motifs affects the efficiency of both the internalization and the endosome escape of viral particles containing adenovirus serotype 5 or 35 fiber knobs. *J. Virol.* 79:1053-1061.
310. Shayakhmetov, D.M., Z.Y.Li, V.Ternovoi, A.Gaggar, H.Gharwan, and A.Lieber. 2003. The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses. *J. Virol.* 77:3712-3723.
311. Shen, B.H. and T.W.Hermiston. 2005. Effect of hypoxia on Ad5 infection, transgene expression and replication. *Gene Ther.* 12:902-910.
312. Shen, Y. and J.Nemunaitis. 2006. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther.* 13:975-992.

313. Shi, J. and D.Zheng. 2009. An update on gene therapy in China. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 11:547-553.
314. Shiina, M., M.D.Lacher, C.Christian, and W.M.Korn. 2009. RNA interference-mediated knockdown of p21(WAF1) enhances anti-tumor cell activity of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther.* 16:810-819.
315. Short, J.J., C.Vasu, M.J.Holterman, D.T.Curiel, and A.Pereboev. 2006. Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res.* 122:144-153.
316. Sims, K., Z.Ahmed, M.L.Read, L.Cooper-Charles, A.M.Gonzalez, K.D.Fisher, M.Berry, L.W.Seymour, and A.Logan. 2009. In vitro evaluation of a 'stealth' adenoviral vector for targeted gene delivery to adult mammalian neurones. *J. Gene Med.* 11:335-344.
317. Singleton, D.C., D.Li, S.Y.Bai, S.P.Syddall, J.B.Smaill, Y.Shen, W.A.Denny, W.R.Wilson, and A.V.Patterson. 2007. The nitroreductase prodrug SN 28343 enhances the potency of systemically administered armed oncolytic adenovirus ONYX-411(NTR). *Cancer Gene Ther.* 14:953-967.
318. Sinnreich, M., C.A.Shaw, G.Pari, J.Nalbantoglu, P.C.Holland, and G.Karpati. 2005. Localization of coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) in normal and regenerating human muscle. *Neuromuscul. Disord.* 15:541-548.

319. Spencer, H.T., G.Denning, R.E.Gautney, B.Dropulic, A.J.Roy, L.Baranyi, B.Gangadharan, E.T.Parker, P.Lollar, and C.B.Doering. 2011. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. *Mol. Ther.* 19:302-309.
320. Spiliotaki, M., H.Markomanolaki, M.Mela, D.Mavroudis, V.Georgoulas, and S.Agelaki. 2011. Targeting the insulin-like growth factor I receptor inhibits proliferation and VEGF production of non-small cell lung cancer cells and enhances paclitaxel-mediated anti-tumor effect. *Lung Cancer* 73:158-165.
321. Staba, M.J., T.J.Wickham, I.Kovesdi, and D.E.Hallahan. 2000. Modifications of the fiber in adenovirus vectors increase tropism for malignant glioma models. *Cancer Gene Ther.* 7:13-19.
322. Stannard, B., V.Blakesley, H.Kato, C.T.Roberts, Jr., and D.Leroith. 1995. Single tyrosine substitution in the insulin-like growth factor I receptor inhibits ligand-induced receptor autophosphorylation and internalization, but not mitogenesis. *Endocrinology* 136:4918-4924.
323. Steegenga, W.T., N.Riteco, A.G.Jochimsen, F.J.Fallaux, and J.L.Bos. 1998. The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* 16:349-357.

324. Stoff-Khalili, M.A., A.A.Rivera, A.Stoff, M.J.Michael, R.P.Rocconi, Q.L.Matthews, M.T.Numnum, I.Herrmann, P.Dall, D.E.Eckhoff, J.T.Douglas, G.P.Siegal, Z.B.Zhu, and D.T.Curiel. 2007. Combining high selectivity of replication via CXCR4 promoter with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis in breast cancer. *Int. J. Cancer* 120:935-941.
325. Stone, D., S.Ni, Z.Y.Li, A.Gaggar, N.DiPaolo, Q.Feng, V.Sandig, and A.Lieber. 2005. Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector. *J. Virol.* 79:5090-5104.
326. Strunze, S., L.C.Trotman, K.Boucke, and U.F.Greber. 2005. Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol. Biol. Cell* 16:2999-3009.
327. Tanaka, T., J.Huang, S.Hirai, M.Kuroki, M.Kuroki, N.Watanabe, K.Tomihara, K.Kato, and H.Hamada. 2006. Carcinoembryonic antigen-targeted selective gene therapy for gastric cancer through FZ33 fiber-modified adenovirus vectors. *Clin. Cancer Res.* 12:3803-3813.
328. Tang, Y., L.P.Le, Q.L.Matthews, T.Han, H.Wu, and D.T.Curiel. 2008. Derivation of a triple mosaic adenovirus based on modification of the minor capsid protein IX. *Virology* 377:391-400.

329. Tanha, J., A.Muruganandam, and D.Stanimirovic. 2003. Phage display technology for identifying specific antigens on brain endothelial cells. *Methods Mol. Med.* 89:435-449.
330. Tanno, B., C.Mancini, R.Vitali, M.Mancuso, H.P.McDowell, C.Dominici, and G.Raschella. 2006. Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 12:6772-6780.
331. Toh, M.L., S.S.Hong, L.F.van de, L.Franqueville, L.Lindholm, B.W.van den, P.Boulanger, and P.Miossec. 2005. Enhancement of adenovirus-mediated gene delivery to rheumatoid arthritis synoviocytes and synovium by fiber modifications: role of arginine-glycine-aspartic acid (RGD)- and non-RGD-binding integrins. *J. Immunol.* 175:7687-7698.
332. Tollefson, A.E., T.W.Hermiston, D.L.Lichtenstein, C.F.Colle, R.A.Tripp, T.Dimitrov, K.Toth, C.E.Wells, P.C.Doherty, and W.S.Wold. 1998. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* 392:726-730.
333. Tollefson, A.E., J.S.Ryerse, A.Scaria, T.W.Hermiston, and W.S.Wold. 1996. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220:152-162.

334. Tollefson, A.E., A.Scaria, S.K.Saha, and W.S.Wold. 1992. The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection. *J. Virol.* 66:3633-3642.
335. Tong, L. 2002. Viral proteases. *Chem. Rev.* 102:4609-4626.
336. Tripet, B., L.Yu, D.L.Bautista, W.Y.Wong, R.T.Irvin, and R.S.Hodges. 1996. Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain off the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. *Protein Eng* 9:1029-1042.
337. Tsukita, S., Y.Yamazaki, T.Katsuno, A.Tamura, and S.Tsukita. 2008. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27:6930-6938.
338. Ulasov, I.V., M.A.Tyler, Y.Han, J.N.Glasgow, and M.S.Lesniak. 2007. Novel recombinant adenoviral vector that targets the interleukin-13 receptor alpha2 chain permits effective gene transfer to malignant glioma. *Hum. Gene Ther.* 18:118-129.
339. Ulasov, I.V., M.A.Tyler, A.A.Rivera, D.M.Nettlebeck, J.T.Douglas, and M.S.Lesniak. 2008. Evaluation of E1A double mutant oncolytic adenovectors in anti-glioma gene therapy. *J. Med. Virol.* 80:1595-1603.

340. Upton, F.Z., G.L.Francis, M.Ross, J.C.Wallace, and F.J.Ballard. 1992. Production and characterization of recombinant chicken insulin-like growth factor-I from *Escherichia coli*. *J. Mol. Endocrinol.* 9:83-92.
341. Vachani, A., E.Moon, E.Wakeam, and S.M.Albelda. 2010. Gene therapy for mesothelioma and lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42:385-393.
342. Valdez-Cruz, N.A., L.Caspeta, N.O.Perez, O.T.Ramirez, and M.A.Trujillo-Roldan. 2010. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb. Cell Fact.* 9:18.
343. van der Linden, R.R., B.L.Haagmans, P.Mongiat-Artus, G.J.van Doornum, R.Kraaij, D.Kadmon, E.guilar-Cordova, A.D.Osterhaus, T.H.van der Kwast, and C.H.Bangma. 2005. Virus specific immune responses after human neoadjuvant adenovirus-mediated suicide gene therapy for prostate cancer. *Eur. Urol.* 48:153-161.
344. van Geer, M.A., C.T.Bakker, N.Koizumi, H.Mizuguchi, J.G.Wesseling, R.P.Oude Elferink, and P.J.Bosma. 2009. Ephrin A2 receptor targeting does not increase adenoviral pancreatic cancer transduction in vivo. *World J. Gastroenterol.* 15:2754-2762.

345. Van, B., V, D.C.Mastenbroek, P.B.van den Doel, M.L.Lamfers, J.Grill, T.Wurdinger, H.J.Haisma, H.M.Pinedo, and W.R.Gerritsen. 2003. Conditionally replicative adenovirus expressing a targeting adapter molecule exhibits enhanced oncolytic potency on CAR-deficient tumors. *Gene Ther.* 10:1982-1991.
346. Van, B., V, A.L.van Rijswijk, H.H.van Es, H.J.Haisma, H.M.Pinedo, and W.R.Gerritsen. 2000. Recombinant adenovirus vectors with knobless fibers for targeted gene transfer. *Gene Ther.* 7:1940-1946.
347. van, O.J. and R.M.Burnett. 1985. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J. Virol.* 56:439-448.
348. Vigne, E., I.Mahfouz, J.F.Dedieu, A.Brie, M.Perricaudet, and P.Yeh. 1999. RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection. *J. Virol.* 73:5156-5161.
349. Volpers, C., C.Thirion, V.Biermann, S.Hussmann, H.Kewes, P.Dunant, M.H.von der, A.Herrmann, S.Kochanek, and H.Lochmuller. 2003. Antibody-mediated targeting of an adenovirus vector modified to contain a synthetic immunoglobulin g-binding domain in the capsid. *J. Virol.* 77:2093-2104.
350. Wang, N., L.Fallavollita, L.Nguyen, J.Burnier, M.Rafei, J.Galipeau, S.Yakar, and P.Brodt. 2009. Autologous bone marrow stromal cells genetically engineered to

secrete an igf-I receptor decoy prevent the growth of liver metastases. *Mol. Ther.* 17:1241-1249.

351. Wang, Z.X., B.B.Lu, J.S.Yang, K.M.Wang, and W.De. 2010. Adenovirus-Mediated SiRNA Targeting c-Met Inhibits Proliferation and Invasion of Small-Cell Lung Cancer (SCLC) Cells. *J. Surg. Res.*
352. Weiss, R.S., S.S.Lee, B.V.Prasad, and R.T.Javier. 1997. Human adenovirus early region 4 open reading frame 1 genes encode growth-transforming proteins that may be distantly related to dUTP pyrophosphatase enzymes. *J. Virol.* 71:1857-1870.
353. Werner, H. and I.Bruchim. 2009. The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene. *Arch. Physiol Biochem.* 115:58-71.
354. Whittington, H.A., L.J.Ashworth, and R.E.Hawkins. 1998. Recombinant adenoviral delivery for in vivo expression of scFv antibody fusion proteins. *Gene Ther.* 5:770-777.
355. Wick, W., A.Wick, M.Weiler, and M.Weller. 2011. Patterns of Progression in Malignant Glioma Following Anti-VEGF Therapy: Perceptions and Evidence. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*

356. Wickham, T.J., D.M.Segal, P.W.Roelvink, M.E.Carrion, A.Lizonova, G.M.Lee, and I.Kovesdi. 1996. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J. Virol.* 70:6831-6838.
357. Wiethoff, C.M., H.Wodrich, L.Gerace, and G.R.Nemerow. 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* 79:1992-2000.
358. Wilson, K.J., J.L.Gilmore, J.Foley, M.A.Lemmon, and D.J.Riese. 2009. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol. Ther.* 122:1-8.
359. Witlox, M.A., M.L.Lamfers, P.I.Wuisman, D.T.Curiel, and G.P.Siegal. 2007. Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: review. *Bone* 40:797-812.
360. Wodrich, H., T.Guan, G.Cingolani, S.D.Von, G.Nemerow, and L.Gerace. 2003. Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *EMBO J.* 22:6245-6255.
361. Wodrich, H., D.Henaff, B.Jammart, C.Segura-Morales, S.Seelmeir, O.Coux, Z.Ruzsics, C.M.Wiethoff, and E.J.Kremer. 2010. A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry. *PLoS. Pathog.* 6:e1000808.

362. Work, L.M., S.A.Nicklin, N.J.Brain, K.L.Dishart, D.J.Von Seggern, M.Hallek, H.Buning, and A.H.Baker. 2004. Development of efficient viral vectors selective for vascular smooth muscle cells. *Mol. Ther.* 9:198-208.
363. Wu, H., T.Han, N.Belousova, V.Krasnykh, E.Kashentseva, I.Dmitriev, M.Kataram, P.J.Mahasreshti, and D.T.Curiel. 2005. Identification of sites in adenovirus hexon for foreign peptide incorporation. *J. Virol.* 79:3382-3390.
364. Wu, H., T.Seki, I.Dmitriev, T.Uil, E.Kashentseva, T.Han, and D.T.Curiel. 2002. Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum. Gene Ther.* 13:1647-1653.
365. Wurm, F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 22:1393-1398.
366. Xia, D., L.J.Henry, R.D.Gerard, and J.Deisenhofer. 1994. Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure.* 2:1259-1270.
367. Xia, H., B.Anderson, Q.Mao, and B.L.Davidson. 2000. Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium. *J. Virol.* 74:11359-11366.

368. Yaffe, D. and O.Saxel. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270:725-727.
369. Yagi, H., T.Ogura, H.Mizukami, M.Urabe, H.Hamada, H.Yoshikawa, K.Ozawa, and A.Kume. 2011. Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J. Gene Med.* 13:114-122.
370. Yamamoto, T. 1967. The effect of ion concentration and pH on the thermal stability of a canine adenovirus. *Can. J. Microbiol.* 13:1139-1149.
371. Yao, X., Y.Yoshioka, T.Morishige, Y.Eto, H.Watanabe, Y.Okada, H.Mizuguchi, Y.Mukai, N.Okada, and S.Nakagawa. 2009. Systemic administration of a PEGylated adenovirus vector with a cancer-specific promoter is effective in a mouse model of metastasis. *Gene Ther.* 16:1395-1404.
372. Yatherajam, G., W.Huang, and S.J.Flint. 2011. Export of adenoviral late mRNA from the nucleus requires the Nxf1/Tap export receptor. *J. Virol.* 85:1429-1438.
373. Yavari, K., M.Taghikhani, M.M.Ghannadi, S.A.Mesbah-Namin, and M.H.Babaei. 2010. Downregulation of IGF-IR expression by RNAi inhibits proliferation and enhances chemosensitization of human colon cancer cells. *Int. J. Colorectal Dis.* 25:9-16.

374. Yi, Y., M.J.Noh, and K.H.Lee. 2011. Current advances in retroviral gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 11:218-228.
375. Yin, J., G.Li, X.Ren, and G.Herrler. 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* 127:335-347.
376. Yin, K., Q.Liu, S.Zhu, and G.Yan. 2008. Adenovirus-mediated siRNA inhibited survivin gene expression induces tumor cell apoptosis in nude mice. *Biosci. Trends* 2:231-234.
377. Yoon, S.K., L.Mohr, C.R.O'Riordan, A.Lachapelle, D.Armentano, and J.R.Wands. 2000. Targeting a recombinant adenovirus vector to HCC cells using a bifunctional Fab-antibody conjugate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:497-504.
378. Yoshiko, Y., K.Hirao, and N.Maeda. 2002. Differentiation in C(2)C(12) myoblasts depends on the expression of endogenous IGFs and not serum depletion. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283:C1278-C1286.
379. Yu, B., Y.Zhang, Y.Zhan, X.Zha, Y.Wu, X.Zhang, Q.Dong, W.Kong, and X.Yu. 2011. Co-expression of herpes simplex virus thymidine kinase and Escherichia coli nitroreductase by an hTERT-driven adenovirus vector in breast cancer cells results in additive anti-tumor effects. *Oncol. Rep.* 26:255-264.

380. Yu, S.F., R.T.von, P.W.Kantoff, C.Garber, M.Seiberg, U.Ruther, W.F.Anderson, E.F.Wagner, and E.Gilboa. 1986. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:3194-3198.
381. Yun, C.O., E.Kim, T.Koo, H.Kim, Y.S.Lee, and J.H.Kim. 2005. ADP-overexpressing adenovirus elicits enhanced cytopathic effect by induction of apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 12:61-71.
382. Zeimet, A.G., E.Muller-Holzner, A.Schuler, G.Hartung, J.Berger, M.Hermann, M.Widschwendter, J.M.Bergelson, and C.Marth. 2002. Determination of molecules regulating gene delivery using adenoviral vectors in ovarian carcinomas. *Gene Ther.* 9:1093-1100.
383. Zeng, Y., M.Pinard, J.Jaime, L.Bourget, L.P.Uyen, M.D.O'Connor-McCourt, R.Gilbert, and B.Massie. 2008. A ligand-pseudoreceptor system based on de novo designed peptides for the generation of adenoviral vectors with altered tropism. *J. Gene Med.* 10:355-367.
384. Zhang, J., Q.Li, T.D.Nguyen, T.L.Tremblay, E.Stone, R.To, J.Kelly, and M.C.Roger. 2004. A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents. *J. Mol. Biol.* 341:161-169.

385. Zhang, M., S.Li, J.Li, W.D.Ensminger, and T.S.Lawrence. 2003a. Ionizing radiation increases adenovirus uptake and improves transgene expression in intrahepatic colon cancer xenografts. *Mol. Ther.* 8:21-28.
386. Zhang, R., T.L.Tremblay, A.McDermid, P.Thibault, and D.Stanimirovic. 2003b. Identification of differentially expressed proteins in human glioblastoma cell lines and tumors. *Glia* 42:194-208.
387. Zhang, W. and M.J.Imperiale. 2003. Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. *J. Virol.* 77:3586-3594.
388. Zhang, Y. and J.M.Bergelson. 2005. Adenovirus receptors. *J. Virol.* 79:12125-12131.
389. Zhu, Z.B., S.K.Makhija, B.Lu, M.Wang, S.Wang, K.Takayama, G.P.Siegal, P.N.Reynolds, and D.T.Curiel. 2006. Targeting mesothelioma using an infectivity enhanced survivin-conditionally replicative adenoviruses. *J. Thorac. Oncol.* 1:701-711.
390. Zhu, Z.B., J.M.Mathis, S.K.Makhija, B.Lu, M.Wang, S.Ji, A.A.Rivera, E.L.Rosenthal, G.P.Siegal, and D.T.Curiel. 2007a. Targeting of a conditionally replicative adenovirus agent to human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int. J. Oncol.* 31:1213-1222.

391. Zhu, Z.B., A.A.Rivera, S.K.Makhija, B.Lu, M.Wang, M.Izumi, R.J.Cerfolio, M.A.Stoff-Khalili, F.Zhou, K.Takayama, G.P.Siegal, and D.T.Curiel. 2007b. Targeting lung cancer using an infectivity enhanced CXCR4-CRAAd. *Lung Cancer* 55:145-156.
392. Zubieta, C., G.Schoehn, J.Chroboczek, and S.Cusack. 2005. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol. Cell* 17:121-135.

ANNEXE I : Plasmides, virus et lignées cellulaires utilisés

dans cette thèse

Plasmides	Provenance
<p>pCDNA3-K5-Coil</p> <p>pCMV-FB-GFPq</p> <p>pCMV-FB4</p> <p>pCMV-FBK4m</p> <p>pCMV-FB5</p> <p>pE4-FK4m</p> <p>pE4-HIK5</p> <p>pCMV-FBTGFα</p> <p>pCMV-FBHIK5</p> <p>pE4-HIK5Dm</p> <p>pAdeasy-1</p> <p>pAdeasy ΔFibre</p> <p>pAdenovator-CMVGFP</p> <p>pAdeasy-ΔFibre-CMVGFP</p> <p>pAdeasy-HIK5Dm-CMVGFP</p> <p>pSPORT6.0</p> <p>pMPGB43k</p> <p>pMPG-IGF-I</p> <p>pMPG-IGF-E5</p> <p>pEZZ18-EGF</p> <p>pcDNA3-E5-Coil</p> <p>pGEMT-EGF</p> <p>pGEMT-E5-Coil</p> <p>pET32c</p> <p>pET32c-E5-Coil-EGF</p> <p>pSJF2</p> <p>pSJF2-AFAI-E5-Coil</p>	<p>Fourni par le groupe du Dr O'Connor (Institut de recherche en biotechnologie, Montréal)</p> <p>Produit dans le laboratoire (Zeng et al., 2008)</p> <p>Fait dans le cadre de cette thèse</p> <p>Produit dans le laboratoire (non publié)</p> <p>Fait dans le cadre de cette thèse</p> <p>Fait dans le cadre de cette thèse</p> <p>Acheter de qbiogene</p> <p>Produit dans le laboratoire (non publié)</p> <p>Produit dans le laboratoire (non publié)</p> <p>Produit dans le laboratoire (non publié)</p> <p>Fait dans le cadre de cette thèse</p> <p>Obtenu de l'ATCC (GenBank ID : BC012409)</p> <p>Produit dans le laboratoire (Mercille et al., 1999)</p> <p>Fait dans le cadre de cette thèse (Caron et al., 2009)</p> <p>Fait dans le cadre de cette thèse (Caron et al., 2009)</p> <p>Obtenu du groupe du Dr E.J.J. van Zoelen (Université de Nijmegen, Nouvelle Zélande)</p> <p>Produit dans le laboratoire du Dr O'Connor (Le et al., 2009)</p> <p>Produit dans le laboratoire du Dr O'Connor (Le et al., 2009)</p> <p>Produit dans le laboratoire du Dr O'Connor (Le et al., 2009)</p> <p>Produit dans le laboratoire du Dr O'Connor (Le et al., 2009)</p> <p>Produit dans le laboratoire du Dr O'Connor (Le et al., 2009)</p> <p>Produit dans le laboratoire du Dr MacKenzie (Tanha et al., 2003)</p> <p>Produit dans le laboratoire du Dr MacKenzie (non publié)</p>

Virus	Provenance
Ad5CBLacZ Fibre sauvage Ad5GFP Fibre sauvage Ad5Tr5GFP Fibre k4m Ad5GFP Fibre HIK5 Wt Ad5GFP Fibre HIK5 Dm	Disponible dans le laboratoire Disponible dans le laboratoire Disponible dans le laboratoire (Zeng et al., 2008) Fait dans le cadre de cette thèse Fait dans le cadre de cette thèse

Lignées cellulaires	Provenance
293A 293E 293F CHO-IGF-E5 Clone 4B4 CHO-IGF-E5 Clone L A549 A549tTA U87MG U87MG-Wt HeLa H59 TOV-112D OV-90 C2C12	Disponible dans le laboratoire (Graham et al., 1977) Produit dans le laboratoire (Zeng et al., 2008) Disponible dans le laboratoire (Invitrogen, Carlsbad, CA) Fait dans le cadre de la thèse (Caron et al., 2009) Fait dans le cadre de la thèse (Caron et al., 2009) Disponible dans le laboratoire (Giard et al., 1973) Produit dans le laboratoire (Massie et al., 1998a) Fourni par le groupe du Dr Moreno (Institut des sciences biologique, Ottawa) Fourni par le groupe du Dr O'Connor (Institut de recherche en biotechnologie, Montréal) Disponible dans le laboratoire (Jones, Jr. et al., 1971) Fourni par le groupe du Dr Brodt (Université McGill Montréal) Disponible dans le laboratoire (Provencher et al., 2000) Disponible dans le laboratoire (Provencher et al., 2000) Disponible dans le laboratoire (Yaffe and Saxel, 1977)