

Tropisme *in vivo* de l'adénovirus

Rôle inattendu de l'hexon

Daniel Henaff, Eric J. Kremer

Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM),
CNRS 5535 et Université Montpellier I et II,
1919, route de Mende, 34293 Montpellier, France.
eric.kremer@igmm.cnrs.fr

> L'équipe d'Andrew Baker a montré récemment que la transduction des cellules hépatiques par des adénovirus injectés par voie intraveineuse est due à l'interaction du facteur X de la coagulation avec les trimères d'hexons, composants de la capsid [1]. Pourquoi ces observations ont-elles autant d'intérêt? Pour y répondre, rappelons le principe de Guillaume d'Occam. Le rasoir d'Occam est un principe de raisonnement que l'on attribue au moine franciscain et philosophe Guillaume d'Occam (XIV^e siècle). Aussi appelé principe de simplicité, parcimonie ou encore économie. Ce principe est exprimé en latin comme « *lex parvimoniae: entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem* » et souvent paraphrasé comme « si toutes les hypothèses sont possibles, l'explication la plus simple est la meilleure ».

Les adénovirus, agents infectieux et vecteurs de gènes thérapeutiques

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à double brin d'ADN dont la structure présente une symétrie icosaédrique. Il en existe plus de 50 sérotypes, tous infectieux pour l'homme. La capsid externe virale est constituée majoritairement de trois protéines principales : la fibre, la base du penton et l'hexon (Figure 1). La fibre a une structure homotrimérique qui s'étend en forme de spicule à l'extérieur de la capsid. La queue de la fibre est imbriquée dans la base du penton situé sur chaque sommet de l'icosaèdre. L'hexon est la protéine majoritaire avec 240 hexons trimériques qui forment les 20 faces

triangulaires. Chez l'homme, les infections à adénovirus causent normalement des symptômes oculaires, du tractus gastro-intestinal et des voies respiratoires. Cependant, chez les patients immunodéprimés et les nouveau-nés, les infections à adénovirus peuvent être graves, voire létales.

L'âge d'or des adénovirus date des années 1970, lorsqu'ils ont été utilisés pour comprendre l'épissage de l'ARN et la réplication de l'ADN (ces deux sujets ont été récompensés par un prix Nobel de médecine). Plus récemment, l'engouement pour la thérapie génique a suscité un nouvel intérêt pour les vecteurs adénoviraux. Ces vecteurs sont actuellement les plus utilisés dans les essais cliniques. Les injections de vecteurs adénovirus dans plusieurs modèles animaux ont démontré leur potentiel dans le traitement de maladies hépatiques, musculaires, oculaires, du système nerveux central, de certaines tumeurs ; ils sont également utilisés comme vaccin ainsi que dans la compréhension de diverses questions biologiques [2]. Dans ce contexte, les études des vecteurs adénovirus ont produit des découvertes originales dans divers domaines tels que la virologie, l'immunologie, la biologie structurale et, bien sûr, le transfert de gène.

CAR : le récepteur des adénovirus de type 5

Au début des années 1990, plusieurs laboratoires ont montré qu'une injection par voie intraveineuse de vecteurs adénovirus de type 5 (HAd5) entraînait

une excellente transduction des cellules du foie et plus spécifiquement des hépatocytes. Ce fut également le cas de lignées cellulaires dérivées d'hépatocytes. En 1997, Jeff Bergelson, Lennart Philipson et leurs collègues ont identifié le récepteur principal de la plupart des adénovirus, baptisé CAR, le récepteur à coxsackievirus et adénovirus [3, 4]. CAR est exprimé par de nombreux types cellulaires et par les hépatocytes *in vivo*. Dans le modèle *in vitro* modélisant l'entrée des HAd5 dans les cellules épithéliales, CAR interagit avec le domaine globulaire terminal de la fibre (appelé tête ou *head*) [5]. L'ensemble formant une ancre sur la cellule, sans induire l'internalisation du virus. Par la suite, la liaison d'un récepteur auxiliaire (principalement une intégrine) à la base du penton induit l'internalisation. D'autres récepteurs jouant un rôle mineur dans la liaison ou l'internalisation ont également été décrits (Figure 1). Ainsi, si l'on s'appuie sur le principe d'Occam, il paraîtrait normal de déduire que les adénovirus utilisent CAR pour transduire les hépatocytes *in vivo*.

Oui, mais... CAR n'explique pas tout

L'histoire devient plus complexe quand on sait que lorsque le site de liaison à CAR est muté sur la fibre de HAd5 ce qui, au moins *in vitro*, empêche la liaison à CAR [6], le vecteur injecté par voie intraveineuse continue à transduire efficacement le foie. Andrew Baker et ses collègues ont tenté de comprendre ce phénomène pendant plusieurs années, et, en combinant de nombreux

outils : approche biochimique, génétique, microscopie électronique, utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de toxines, d'identifier le rôle des composants du sérum dans la transduction du foie par les adénovirus. Travailler avec les adénovirus est un grand plaisir, en raison de leur grande « modularité ». En effet, il est très aisé d'ajouter ou d'éliminer, ou de remplacer, une partie d'un sérotype par un autre sérotype, cette capacité de modulation leur permet d'invertir soit une partie ou fragment de la fibre, mais également d'échanger les boucles de l'hexon entre différents sérotypes (par exemple voir [7]).

La fibre et le facteur X

Fait intéressant, c'est par une expérience de protéomique effectuée par le groupe d'André Lieber que l'interaction de la fibre avec des protéines du sérum (par exemple C4BP), incluant des facteurs de coagulation (dont le Facteur IX), fut suggérée [8]. Nos connaissances du tropisme de l'adénovirus et de son récepteur suggéraient que la fibre, par son

domaine de liaison à CAR, était impliquée. Mais c'était une fausse piste. Des réductions systématiques et finalement une élimination totale de la fibre n'entraînaient toujours pas la transduction du foie après injection intraveineuse d'adénovirus. L'équipe d'Andrew Baker a alors testé la liaison des différents facteurs de coagulation avec le virus, et a trouvé que le facteur X¹ (FX), qui a une structure similaire à celle du Facteur IX, se liait fortement. De plus, la liaison du FX à HAd5 muté au niveau de la fibre (étude réalisée en utilisant une technique appelée « résonance plasmon de surface » - SPR) reste possible, démontrant ainsi l'intervention d'une autre protéine de capsid dans cette liaison. Le FX est bien impliqué, comme le démontre une augmentation de l'infection de différents types cellulaires *in vitro* par des vecteurs pré incubés avec le FX ou, à l'inverse, une réduction significative du tropisme hépa-

¹ Le facteur X, également connu sous le nom de facteur Stuart, est une sérine endopeptidase de la cascade de coagulation. Il est synthétisé par le foie en présence de vitamine K et est activé par le facteur IV et le facteur VII.

tique du vecteur HAd5 lorsque le sérum est déplété *in vivo* de FX via l'utilisation de toxines et d'extraits de plantes comme la warfarine² [9].

Pour éclaircir le mécanisme de la liaison du FX à la capsid, Baker *et al.* sont donc revenus à la technique de SPR (qui suggère l'intervention de l'hexon) puis ont utilisé la cryo-électronmicroscopie. À une résolution de 25 Å, ils ont identifié le domaine de liaison du FX à la capsid [1]. En complément, ces chercheurs ont également disséqué le FX afin de déterminer la région d'interaction avec la capsid. Le FX présente trois domaines majeurs dont deux, le domaine sérine protéase et le domaine Gla (*gamma carboxylated glutamic*), ont été impliqués dans cette interaction. La liaison du FX (une molécule de FX par trimère d'hexon - 240 trimères au total) se fait au centre des trimères d'hexon, dans une région composée des boucles hypervariables entre les différents sérotypes. Cette variation dans la boucle d'hexon a mené cette équipe à étudier la liaison du FX aux autres sérotypes. Ils ont alors tiré parti de cette facilité de moduler les boucles des sérotypes d'adénovirus en utilisant différentes boucles de différents sérotypes dans leur vecteur modèle et trouvèrent que seule une, (D), parmi six espèces (A-F) d'adénovirus humains, n'interagissait pas avec le FX.

Conclusion

Ces résultats nous permettront maintenant de modifier plus intelligemment le tropisme *in vivo* des vecteurs adénoviraux et, à terme, de cibler d'autres organes ou cellules. Que faire à partir de maintenant ? Ces études ont été menées chez le rongeur et de ce fait, l'éternelle problématique de la comparaison souris *versus* homme persiste. Le rôle du FX est-

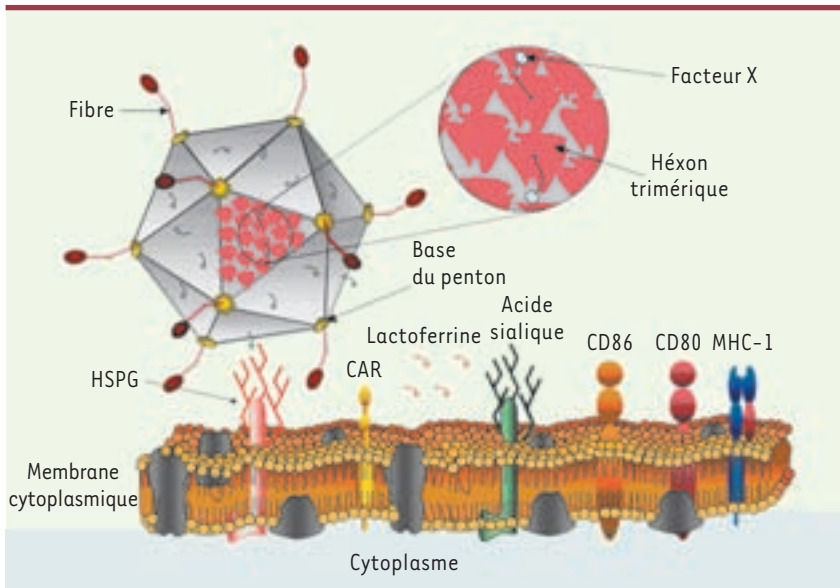


Figure 1. Récepteurs jouant un rôle mineur dans la liaison ou l'internalisation. L'adénovirus utilise différents récepteurs tels que CAR, l'acide sialique, le CD86, le CD80, le CMH de classe I ainsi que le récepteur *heparan sulfate glycoproteins* (HSPG), ce dernier étant le récepteur principal de l'adénovirus après injection par voie intraveineuse en utilisant le facteur X comme pont entre le virus et le récepteur. Les lactoferrines agissent à l'instar du FX pour certains sérotypes sur des tissus spécifiques.

² La warfarine est un dérivé synthétique de la coumarine, une substance naturellement présente chez de nombreuses plantes. La warfarine diminue la coagulation du sang en inhibant la vitamine K époxyde réductase, une enzyme qui recycle la vitamine K oxydée en sa forme réduite après qu'elle a participé à la carboxylation de plusieurs protéines de coagulation du sang. La warfarine est efficace dans la prévention de la thrombose et d'embolie.

il identique chez le primate ? Comment devons-nous utiliser ces données pour améliorer les vecteurs de thérapie génique ? Clairement le laboratoire de Baker doit travailler à identifier les acides aminés essentiels de la région hyper variable et essayer de les modifier pour prévenir la liaison du FX dans le but d'éviter la capture rapide par le foie et ainsi pouvoir cibler d'autres organes. Finalement, une chose est sûre, Guillaume d'Occam n'a jamais vraiment travaillé sur le tropisme *in vivo* de l'adénovirus. ♦

Adenovirus hexon mediate liver gene transfer

RÉFÉRENCES

1. Waddington SN, McVey JH, Bhella D, *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon mediate liver gene transfer. *Cell* 2008 ; 132 : 397-409.
2. Keriél A, Billet O, Kremer EJ. L'adénovirus canin : meilleur ami de l'homme ? *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 1048-9.
3. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997 ; 275 : 1320-3.
4. Tomko R, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 3352-6.
5. Wu E, Nemerow GR. Virus yoga: the role of flexibility in virus host cell recognition. *Trends Microbiol* 2004 ; 12 : 162-9.
6. Baker AH, McVey JH, Waddington SN, *et al.* The Influence of blood on *in vivo* adenovirus bio-distribution and transduction. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 1410-6.
7. Hong SS, Magnusson MK, Henning P, *et al.* Adenovirus stripping: a versatile method to generate adenovirus vectors with new cell target specificity. *Mol Ther* 2003 ; 7 : 692-9.
8. Shayakhmetov DM, Gaggari A, Ni S, *et al.* Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol* 2005 ; 79 : 7478-91.
9. Le Bonniec B. La cible de la warfarine identifiée. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 512-4.

