

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/278110270>

# Adenoviruses structure

Article in *Virologie* · July 2008

DOI: 10.1684/vir.2008.0189

CITATIONS

0

READS

977

4 authors, including:



**Sham Celine**

The Hong Kong Polytechnic University

25 PUBLICATIONS 839 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Pascal Fender**

French National Centre for Scientific Research

93 PUBLICATIONS 2,064 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Guy Schoehn**

French National Centre for Scientific Research

292 PUBLICATIONS 9,895 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Nanovirus [View project](#)



CM01 beam line [View project](#)

## Structure des adénovirus

M. El Bakkouri<sup>1</sup>

C.M. Fabry<sup>1</sup>

P. Fender<sup>2</sup>

G. Schoehn<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unit of Virus Host Cell Interactions ;  
UMR5233 UJF-EMBL-CNRS,  
6, rue Jules Horowitz, BP 181,  
38042 Grenoble cedex 9, France

<sup>2</sup> Institut de biologie structurale  
Jean-Pierre Ebel ;  
UMR5075 CNRS-UJF-CEA,  
41, rue Jules Horowitz,  
38027 Grenoble cedex 01, France  
<schoen@embl-grenoble.fr>

**Résumé.** Les adénovirus sont des virus icosaoédriques non enveloppés à ADN double brin. Ils sont très étudiés dans le but d'une application possible en thérapie génique ou en thérapie anticancer. Néanmoins, le manque de connaissances fondamentales, notamment structurales, est probablement à l'origine du faible succès rencontré lors des premiers essais cliniques effectués. Une des étapes cruciales pour l'utilisation des adénovirus à des fins thérapeutiques est la modification structurale du virion pour permettre soit le reciblage du virus vers un tissu cellulaire spécifique soit l'ablation des régions les plus immunogènes à la surface du virion afin de réduire la réponse du système immunitaire lors de l'infection. Ces modifications, qui visent essentiellement les protéines de la surface du virion, nécessitent une connaissance de la capsid à l'échelle atomique. Actuellement la structure globale des adénovirus est uniquement accessible par microscopie électronique à une résolution intermédiaire. Par contre comme les structures cristallographiques des protéines majeures sont connues, la combinaison de ces données avec les données de microscopie électronique permet l'obtention d'un modèle de cette capsid à résolution quasi atomique. Cela nous a permis d'appréhender la complexité du virus mais la connaissance de la structure atomique de l'adénovirus entier soit par cristallographie soit par microscopie électronique serait un pas décisif dans la compréhension de ce virus dans le but de mieux pouvoir l'utiliser.

**Mots clés :** microscopie électronique, adénovirus, thérapie génique, structure, cristallographie

**Abstract.** Adenoviruses are double stranded DNA non enveloped viruses. Although these viruses are widely studied for gene therapy and anticancer applications, fundamental knowledge of these viruses, especially from a structural point of view is lacking. This is probably partly responsible for the limited success of the first clinical trials. With these viruses, one of the main conditions necessary to use adenoviruses for therapeutic application is structural modification of the virus. Indeed, one has to retarget the virus to specific tissues and/or remove all the immunogenic loops present on the outside of the virus in order to limit the host immune response. To make these changes rationally, the structure of the capsid has to be known at atomic resolution. Today, electron microscopy is the only tool that enables us to have access to the structure of the entire virus, but only at intermediate resolution. Because the atomic structures of the adenovirus major capsid proteins are known, one can combine these structures with the electron microscopy based envelope to calculate a model of the capsid at quasi-atomic resolution. These kinds of models are useful to visualize and understand the complexity of the virus. Nevertheless, the structure of the entire capsid at atomic resolution will really be necessary to use the virus in a safe way.

**Key words:** electronic microscopy, adenovirus, genic therapy, structure, cristallography

**Tirés à part :** G. Schoehn

## Introduction générale

Les adénovirus (Ad) ont été identifiés en 1953 à partir de prélèvements d'amygdales et de sécrétions respiratoires d'enfants infectés et de militaires atteints d'infections respiratoires aiguës [1]. Deux ans après leur découverte, l'agent pathogène responsable de ces infections est appelé adénovirus à cause de sa présence dans les amygdales (*adeno* signifie « glande »). La découverte de Trentin et coll. [2] sur la capacité des adénovirus à induire des tumeurs chez le hamster a fortement stimulé la recherche fondamentale. Celle-ci a permis en particulier de découvrir les mécanismes de réplication de l'ADN et d'épissage de l'ARN [3]. La famille des *Adenoviridae* a été définie en 1976 [4] et ne comptait que de 2 genres distincts : les mastadénovirus (Ad infectant les mammifères) et les aviadénovirus (Ad infectant les oiseaux). Depuis cette date, les adénovirus ont été détectés chez de nombreux autres hôtes. Ils ont en particulier été retrouvés chez les mammifères, les oiseaux et chez les animaux à sang froid (constituant deux nouveaux genres : les atadénovirus ou les siadénovirus [5]). La classification la plus récente des adénovirus a été établie sur la base d'identité de séquences de certains gènes ou parties du génome et contient pour l'instant 5 genres différents.

Les Ads du genre Mastadénovirus infectent une large gamme de mammifères incluant l'homme (Human Adenovirus, HAd), le chien (Canine Adenovirus, CAV), le cheval, les ovins et les bovins. Le genre Aviadénovirus infecte uniquement des oiseaux. Suite aux travaux de Benko et coll. en 1998, la famille s'est enrichie d'un 3<sup>e</sup> genre [6]. Le fort pourcentage en bases A et T au sein de leur génome leur doit le nom d'atadénovirus. Ce genre comporte une variété assez importante d'hôtes similaires à ceux des mastadénovirus et des aviadénovirus mais se distingue par l'organisation atypique de son génome par rapport aux deux premiers genres [5]. Le 4<sup>e</sup> genre de la famille ne comporte que deux espèces, le FrAdV-1 et TAdV-3 isolés respectivement chez une espèce de grenouille et différents oiseaux [7]. Leur génome code pour une sialidase hypothétique d'où le nom de siadénovirus. Enfin, le seul adénovirus connu pour infecter un poisson est génétiquement le plus éloigné des quatre premiers genres de la famille et pourrait constituer le dernier genre connu à ce jour.

Chez l'homme, plus d'une cinquantaine de sérotypes ont été répertoriés et classés en six sous-groupes de A à F, selon des critères biochimiques, génétiques et structuraux (*tableau 1*). Les adénovirus sont responsables de maladies assez bénignes sauf chez les sujets immunodéprimés et les nouveau-nés, chez lesquels même les souches relativement inoffensives peuvent entraîner des décès [8]. Ces virus, quel que soit leur genre ou leur hôte, infectent essentiellement les cellules épithéliales des muqueuses respiratoires,

gastro-intestinales ou oculaires. Ils peuvent parfois atteindre le foie ou le rein. Chez l'homme, ils sont la cause d'infections respiratoires de type rhino-pharyngites, de gastroentérites ou d'infections oculaires (conjonctivites bénignes). Les infections respiratoires, souvent limitées aux voies respiratoires hautes sont provoquées essentiellement par trois sous-groupes : les sous-groupes B, C et E. Dans quelques cas, les groupes B et E peuvent provoquer une infection des voies respiratoires basses occasionnant des maladies respiratoires aiguës (*tableau 1*).

Les adénovirus non humains sont beaucoup moins étudiés que leurs homologues humains. Chez les bovins et les ovins, les adénovirus sont la cause de maladies respiratoires bénignes. Chez le chien, seuls deux sérotypes, le CAV1 et le CAV2 ont été découverts et caractérisés. Le 1<sup>er</sup> est responsable d'une maladie hépatique aiguë appelée « Hépatite de Rubarth » souvent associée à des symptômes respiratoires, oculaires et entériques assez graves alors que le 2<sup>e</sup> provoque une infection respiratoire bénigne. L'organisation du génome et de leur capsid ne diffère pas de celle des Adénovirus humains. Les adénovirus aviaires ont été identifiés comme agent infectieux en 1957 [9]. Des 4 sérotypes distincts qui composent le genre des avianadénovirus, le sérotype le plus étudié est le FAdV-1 également connu sous le nom de CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan). Celui-ci ne provoque pas de signes d'infection visible [10] et possède, du point de vue structural, plusieurs caractéristiques uniques : son génome ne code pas pour l'équivalent de la protéine IX et chacun des sommets de ce virus possède deux fibres qui peuvent être de taille différente (CELO) ou de taille identique (les autres aviadénovirus) (*figure 1D*).

Les sérotypes humains les plus étudiés sont l'adénovirus de sérotype 2 (HAd2) et l'adénovirus de sérotype 5 (HAd5 : utilisé en thérapie génique) appartenant tous les deux au sous-groupe C. L'adénovirus humain de sérotype 3, appartenant au sous-groupe B, est quant à lui surtout étudié en raison des propriétés particulières de ces protéines de capsid qui peuvent former des particules sous virales nommées dodécaèdres (voir plus loin). Parmi les adénovirus non-humains, l'adénovirus canin de sérotype 2 (CAV2) et l'adénovirus aviaire CELO sont les plus étudiés. A priori, ces virus n'ont pas infecté les humains et une première injection (en vue d'une application potentielle en thérapie génique) aurait lieu en l'absence de réponse immunitaire préexistante.

## Structure et organisation générale de la capsid

### Morphologie de l'adénovirus par microscopie électronique

Le caractère de virus régulier des Ads est connu depuis longtemps [11]. En effet dès 1957, des études de ces virus

**Tableau 1.** Récapitulatif des récepteurs connus pour les HAdS. Les complexes récepteur-tête de fibre dont la structure cristallographique est connue sont indiqués en rouge. Les sérotypes dont la structure cristallographique de la tête de fibre est connue sont soulignés.

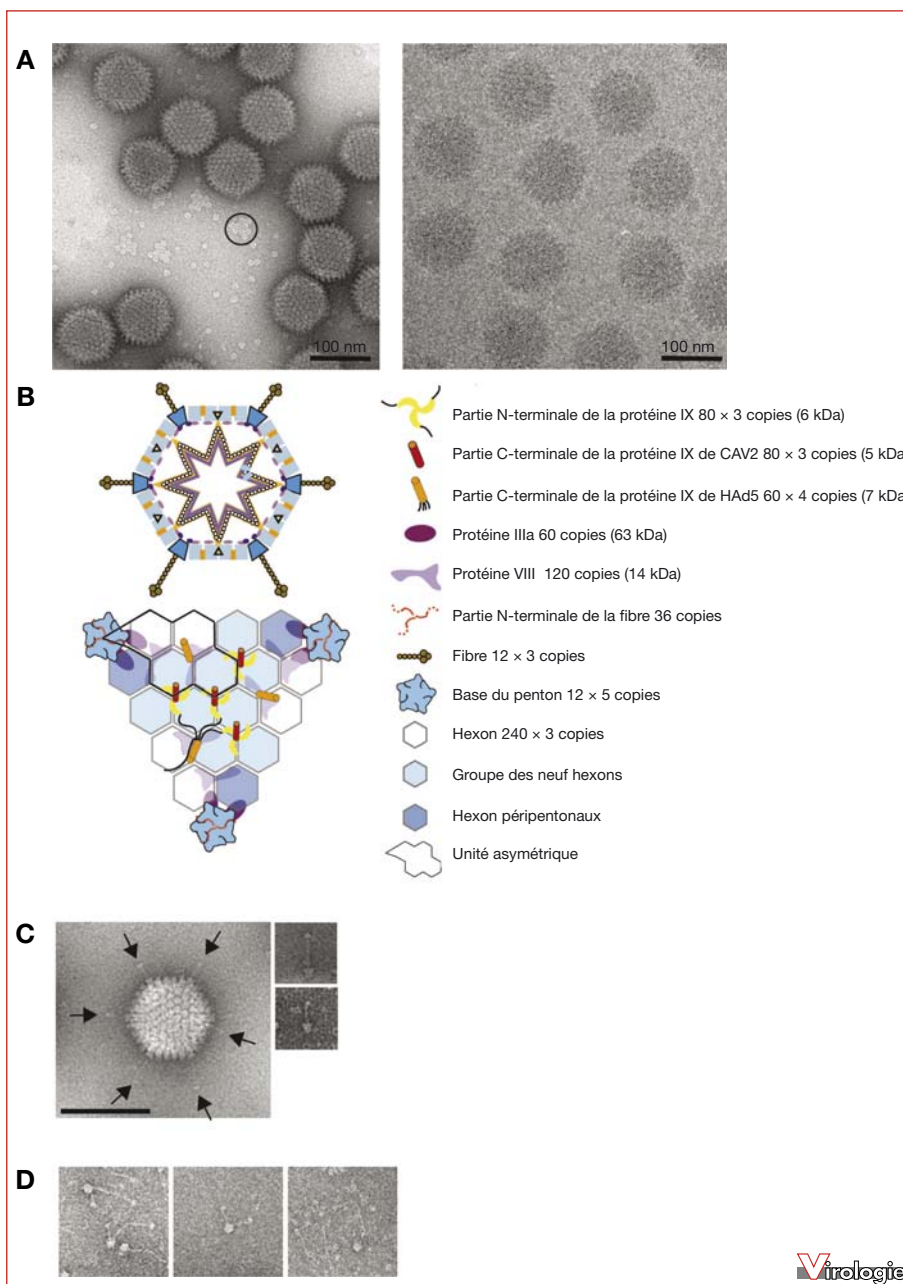
Sous-groupe	Sérotipe	Récepteur	Références	Longueur de la fibre (nm)	Tropisme
A	12 ; 31 18	CAR ?	[58]	28-31	Intestinal
B1	3 16 ; 21 ; 50 7	CD46 CD80/86 CD46/80/86 CD46 ?	[70] [76]	9-11	Respiratoire Oculaire Rénal
B2	11 ; 35	CD46	[73] [70]		
C	14 ; 34 2 ; 5	CD46/80/86 CAR, Héparane sulfate MHC-1	[54] [78, 81, 82]	23-31	Respiratoire Lymphatique
D	1 ; 6 8 ; 19a 15 ; 19p 37 9 10 13 17 20 22-30 32 33 36 38 39 42- 49 51	? Acide sialique Acide sialique CAR Acide sialique CD46 ?	[64] [64, 59]	12-13	Oculaire Intestinal
E	4	CAR		17	Respiratoire Oculaire
F	41 40	CAR (longue) ?		33 28	Intestinal

par microscopie électronique à transmission (MET) après coloration négative ont montré qu'il possédait une capsidie icosaédrique composée de 20 facettes triangulaires. Ce n'est qu'en 1991 que Stewart *et al.*, grâce à des études de cryo-MET, ont obtenu la première structure tridimensionnelle du virus. Depuis, la finesse de ces volumes n'a cessé d'augmenter et a permis de mieux comprendre ce virus.

Les Ads sont des virus non enveloppés à symétrie icosaédrique d'assez grande taille (100 nm de diamètre de sommet à sommet pour une masse d'environ 150 MDa) (*figure 1A*). La capsidie de ces virus est décorée au niveau de chacun de ses sommets par une structure filiforme de longueur variable suivant les sérotypes et qui se termine par une zone globulaire. La coque de ces virus renferme une molécule linéaire d'ADN double brin dont la taille varie suivant le sérotipe et l'hôte (de 26 à 44 kb) [12]. Cette coque régulière est construite à partir de 7 des 12 protéines présentes dans le virus. Trois de ces 7 protéines, l'hexon, la base du penton et la fibre, respectivement protéine II, III et IV sont appelées protéines majeures car elles constituent la majeure partie de la capsidie. Chacune des 20 facettes triangulaires est composée majoritairement par la protéine trimérique hexon. La base du penton (protéine pentamérique)

comble les espaces libres au niveau des sommets de l'icosaèdre. La base interagit de façon non covalente avec la fibre (protéine trimérique filiforme) pour former le penton. La capsidie virale est stabilisée et étanchéifiée par 4 protéines mineures. Ces protéines sont appelées protéines IIIa, VI, VIII et IX et se retrouvent associées à cette capsidie (soit du côté externe soit du côté interne). Aucune structure cristallographique n'est actuellement disponible pour ces protéines.

Chacune des 20 faces de l'adénovirus est constituée de 12 hexons parmi lesquels 9 forment le groupe des neuf hexons (*group of nine*, GON) (en bleu clair sur la *figure 1B*). Ces derniers restent associés entre eux lors de la dissociation de la capsidie provoquée par une simple dialyse [13]. L'observation de ces structures par MET a permis de définir la localisation et le rôle de la protéine IX comme étant le ciment maintenant ensemble les neuf hexons des GONs [14]. Les sommets du virus sont constitués par un complexe protéique, le penton, duquel se projette une fibre. Cette dernière est visible sur les clichés de microscopie électronique (*figure 1C*). La longueur, le nombre et la forme de ces fibres va varier suivant les sérotypes (*figure 1C, D* et voir plus loin).



**Figure 1.** Morphologie des adénovirus. A. Adénovirus humain de sérotype 5 observé par microscopie électronique à transmission après coloration négative (gauche) ou en cryo-microscopie (droite). Le cercle indique un groupe de neuf hexons. La barre d'échelle représente 100 nm. B. Modèle actuel de la localisation des protéines au sein de la capsid des mastadénovirus d'après les travaux de [17-19], et Fabry *et al.*, soumis. La localisation de la partie C-terminale de la protéine IX est différente entre l'HAd5 et CAV2. Le nombre de copies de chaque protéine ainsi que son degré d'oligomérisation dans la capsid sont indiqués (par exemple la fibre est présente sous forme de 12 trimères :  $12 \times 3$ ). C. L'adénovirus humain de sérotype 41. Deux fibres de longueurs différentes coexistent sur la même particule. À droite, détail de deux pentons issus de ce virus montrant les différences de longueur entre les fibres courtes et longues. La barre d'échelle représente 100 nm. D. Pentons observés en coloration négative et provenant respectivement de gauche à droite d'adénovirus aviaires (Celo ou FAd1), FAd7 et adénovirus bovin de sérotype 3. La fibre de l'adénovirus bovin est la plus longue actuellement connue (77,2 nm) et présente au moins trois coudes.

### Structure de la capside

La connaissance plus détaillée de l'organisation de la capside d'un adénovirus date de 1991. Il s'agit d'une structure tridimensionnelle de la capside de l'HA2 obtenue à partir d'images obtenues par cryo-MET [15]. Cette structure, à 35 Å de résolution, a permis de définir grossièrement l'orientation et la position des différentes unités structurales de base (ou capsomères) au sein de la capside du virus. Elle a confirmé en particulier la triangulation de la capside icosaédrique déjà pressentie d'après les études par coloration négative. Cette capside possède un nombre de triangulation de 25 (pour passer d'un sommet du virus à l'autre, il faut passer par 4 axes de symétrie locaux d'ordre 6 avant d'arriver au sommet suivant.  $T = H^2 + HK + K^2$  avec  $H = 5$  et  $K = 0$ ) (figure 1B). D'après la règle établie par Caspar et Klug concernant la quasi-équivalence, il devrait donc y avoir 25 protéines constituant l'unité asymétrique du virus. Ce nombre n'est en fait que de 13 (4 trimères d'hexons et un monomère de base du penton) car les hexons qui constituent les axes de symétrie locaux d'ordre 6 ne sont pas des protéines hexamériques mais des protéines trimériques ayant une base pseudo-hexagonale. On parle ainsi de nombre de triangulation pseudo  $T = 25$ . L'unité de base du virus pour les protéines majeures est donc constituée par 4 hexons et par un monomère de base du penton et permet de décrire le virus entier. En 1993, la structure de la capside proposée par Stewart *et al.*, obtenue à partir d'une reconstruction 3D en ME à 25 Å de résolution [16] et combinée avec la structure cristallographique de l'hexon, a permis de localiser certaines des protéines mineures au sein de la capside. Malgré l'absence de preuves biochimiques et structurales fiables, la protéine IIIa a été placée du côté externe de la capside à la jonction entre deux facettes (densités orange dans la figure 1B). La position de la protéine IX a été confirmée sous forme de 4 trimères au centre des GONs (densités jaunes dans la figure 1B). L'emplacement des autres protéines mineures n'était toujours pas défini de manière certaine. Il faut attendre 2005 pour voir évoluer la localisation et l'emplacement des protéines au sein de la capside de l'adénovirus [17-19] (figure 1B et voir plus loin).

### Cycle cellulaire de l'adénovirus

Seuls les cycles cellulaires de l'HA2 et de l'HA5 ont été étudiés intensivement. En effet, ces deux virus sont des modèles pour l'étude des adénovirus. Les études sur ces virus ont en effet été motivées par leur utilisation potentielle en thérapie génique. Ces virus sont produits assez facilement en laboratoire et de nombreux mutants ont pu être créés. Les données concernant le cycle cellulaire d'autres souches d'adénovirus notamment les souches

aviaires ou canines sont réduites, mais le processus général d'infection reste conservé à travers la famille des *Adenoviridae*.

Les adénovirus peuvent réaliser trois types différents de cycles cellulaires. Le premier type est le cycle lytique lorsque le virus infecte une cellule permissive. Il aboutit à la production de nouvelles particules virales et à la lyse de la cellule infectée. Dans un deuxième cas, lorsque le virus pénètre dans une cellule non permissive, le déroulement complet du cycle lytique ne peut pas aboutir. Aucune particule virale n'est produite : c'est le cycle abortif. Enfin un dernier type de cycle cellulaire, le cycle transformant, peut être observé lorsque le virus infecte une cellule non permissive, plus rarement une cellule permissive. Dans ce cas, le virus immortalise la cellule infectée et déclenche le développement de tumeurs cancéreuses.

### Structure des protéines majeures de l'adénovirus

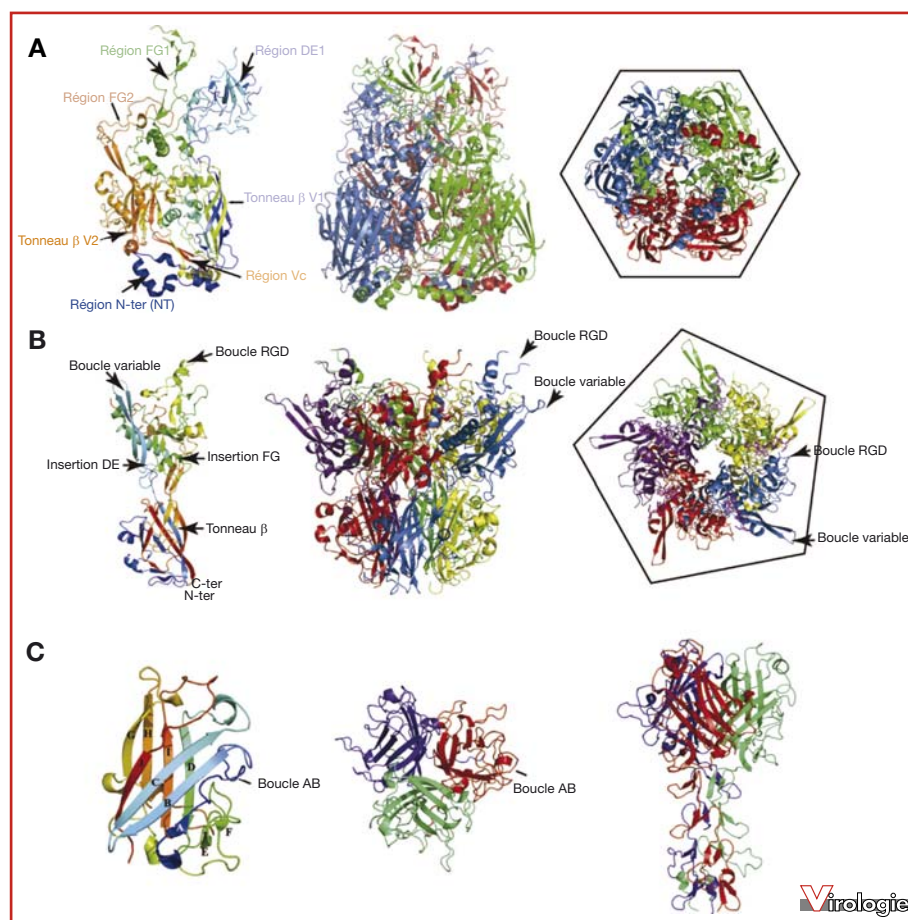
Tous les adénovirus ne possèdent pas les mêmes caractéristiques structurales en termes de composition en protéines majeures et mineures. Au sein des mastadénovirus en particulier, les adénovirus canins ne montrent pas le même nombre de protéines mineures (notamment au niveau de la protéine IX ; cf. plus loin). Le nombre des protéines majeures est par contre conservé.

#### L'hexon

Cette protéine, aussi appelée protéine II, est présente en 720 copies à la surface de la capside ce qui en fait la protéine la plus abondante des protéines structurales du virus. Pour l'adénovirus humain de sérotype 5 chaque monomère d'environ 105 kDa s'assemble en trimère pour former 240 capsomères possédant une base hexagonale et un sommet triangulaire (figures 1B, 2A). L'hexon s'oligomériserait uniquement avec l'aide de la protéine 100K [20] qui est une protéine chaperon codée par le virus et qui aide à l'assemblage de la capside lors de la phase tardive d'infection. Toutes les études structurales concernant cette protéine ont donc été effectuées en utilisant des hexons isolés et purifiés à partir de productions virales.

Cette protéine a été cristallisée et sa structure a été déterminée tout d'abord chez l'HA2 à 2,9 Å de résolution puis pour le type 5 à 2,5 Å [21-23]. Récemment, les structures atomiques des hexons des adénovirus aviaires CELO et de chimpanzé ont été déterminées à 3,5 Å de résolution [24, 25]. Chacun des monomères de l'hexon est formé de deux sandwichs (je mettrais plutôt sandwich partout et tonneau dans le trimère)  $\beta$  composé chacun de 8 brins (V1 et V2 sur la figure 2A) et de 18 hélices qui forment, dans le trimère,





**Figure 2.** Structures cristallographiques des protéines majeures de l'adénovirus. A. Structure atomique de l'hexon de l'Adénovirus humain de type 5 [23]. De gauche à droite : Les différentes régions de l'hexon indiquées sur un monomère vu de côté. Le trimère de l'hexon à résolution atomique vu de côté. Le trimère de l'hexon vu de dessus et mettant en évidence sa morphologie pseudo-hexagonale. Code PDB : 1P30. B. Structure atomique de la base du penton de l'adénovirus humain de type 2 [30]. De gauche à droite : Les différentes régions de la base du penton sont indiquées sur un monomère vu de côté. Le pentamère à résolution atomique vu de côté. Vue de dessus de la structure de la base du penton en complexe avec un peptide mimant la partie N-terminale de la fibre. Code PDB : 1X9P. C. Structure de la fibre de l'adénovirus de type 2 [39]. De gauche à droite : Structure à résolution atomique d'un monomère de la tête de la fibre de l'adénovirus humain de sérotype 2 (code PDB 1QHV). Les feuillettes constituant les tonneaux B ainsi que certaines boucles sont indiqués. Vue de dessus du trimère de la tête de la fibre de l'adénovirus humain de sérotype 2 à résolution atomique. Vue de côté de la structure cristallographique de la tête et du début de la tige (code PDB 1QIU). La boucle AB responsable de l'interaction avec le récepteur CAR est indiquée.

une zone très stable en tonneau  $\beta$  appelé « *viral jellyroll* » que l'on retrouve chez de nombreux autres virus (pour revue voir [26]). Les six sandwichs ainsi définis s'organisent pour donner naissance à la base hexagonale de l'hexon. Trois longues extensions (DE1, FG1 et FG2) émergent de ces tonneaux pour donner naissance aux trois tourelles qui caractérisent le haut des hexons. Pour les HAd2 et HAd5, les extrémités de ces zones, trop flexibles pour être résolues par cristallographie, sont composées de sept boucles hyper-variables (HRV1 à 7) [23] responsables de l'antigénicité importante de la capsid. La partie N-terminale de chaque

monomère, partiellement ordonnée en hélices  $\alpha$ , stabilise le trimère en interagissant avec les parties N-terminales des monomères voisins.

La connaissance de la structure des hexons du virus CELO et de l'adénovirus de chimpanzé nous permet de prédire que sur l'ensemble de la famille des adénovirus, l'architecture générale des hexons est conservée. La structure de l'hexon du CAV2 a pu être déterminée récemment mais uniquement par microscopie électronique (voir plus loin). La structure à basse résolution des hexons de ces adénovirus ressemble

plus à celle des adénovirus de chimpanzé et du virus CELO ; ces structures sont en effet beaucoup plus lisses que leurs équivalents humains HAd2 et 5.

### La base du penton

La base du penton (ou protéine III) est une protéine pentamérique insérée stratégiquement au niveau des douze sommets de la capsid adénovirale. Son monomère d'environ 60 kDa (571 acides aminés pour HAd2 ; 544 pour HAd3) est donc présent en 60 copies dans le virus. En plus de son rôle structural dans la capsid, la base du penton possède une propriété fondamentale : celle d'interagir avec les intégrines et de provoquer ainsi l'internalisation du virion. Une séquence RGD conservée chez tous les sérotypes humains à l'exception des adénovirus entériques HAd40 et HAd41 est responsable de l'interaction avec ce récepteur. Pendant de nombreuses années, les seules données structurales concernant la base du penton furent des clichés de microscopie électronique, la structure tridimensionnelle à moyenne résolution de la base dans le virion [16] et l'étude de l'effet de mutations dans la protéine [27, 28]. Un modèle tridimensionnel de la base du penton de l'HAd3 à plus haute résolution (20 Å) calculé à partir d'image de cryo-MET fut établi en 1996 [29], et récemment, la structure cristallographique de la base du penton de l'HAd2 a été publiée [30] (*figure 2B*). Ces avancées ont été rendues possibles grâce à une propriété intrigante des bases du penton de certains sérotypes : leur dodécamérisation, c'est-à-dire la capacité des pentons à s'auto-assembler par douze de façon symétrique. La structure de la base du penton de l'HAd2 résolue à 3,3 Å montre que les interactions hydrophobes sont essentielles pour la stabilité de la base du penton et que 26 % de la surface des monomères sont enfouis dans le pentamère. La stabilité d'un tel complexe est consolidée par seulement deux ponts salins Arg420-Glu172 et Arg197-Asp220 entre deux monomères adjacents. Deux parties distinctes sont clairement visibles dans le pentamère (*figure 2B*). Un tonneau constitué de 8 brins  $\beta$  ou *viral jellyroll* forme la partie basale compacte du pentamère alors que la partie supérieure constituée essentiellement d'hélices  $\alpha$  et de boucles (assez similaire à l'hexon) est beaucoup plus large lui donnant l'aspect d'une tulipe à cinq pétales. Il est à noter que la forme générale de cette protéine est complémentaire de celle observée dans l'hexon qui est plus large dans sa partie basale et plus étroit en son sommet (*figure 2A et B* panneau du milieu). Deux zones de la base du penton présentent une très grande variabilité entre les différents sérotypes d'adénovirus (boucle RGD et boucle variable, *figure 2B*). La boucle RGD flexible et donc partiellement désordonnée dans la structure cristallographique possède une séquence et une longueur variable entre les sérotypes. Cette boucle contient un motif RGD (arginine-acide aspartique-glycine) conservé, res-

ponsable de l'interaction du virus avec les intégrines  $\alpha_v$  ( $\alpha_v$  5 lors de son internalisation). Elle est située à la surface de la base du penton et se projette vers l'extérieur de la capsid. Une deuxième zone de longueur et de séquence variables suivant les sérotypes est présente entre deux brins  $\beta$  (*figure 2B*). Cette boucle porte tout simplement le nom de « boucle variable » et se situe au niveau des sommets du penton (*figure 2B*). Le rôle de cette région variable n'est pas connu. Les structures à moyenne résolution (10-12 Å) des bases du penton de l'HAd3 et du CAV2 sont également connues [17, 31]. Comme pour l'hexon, la base du penton de l'adénovirus canin semble représenter une forme simplifiée des formes humaines.

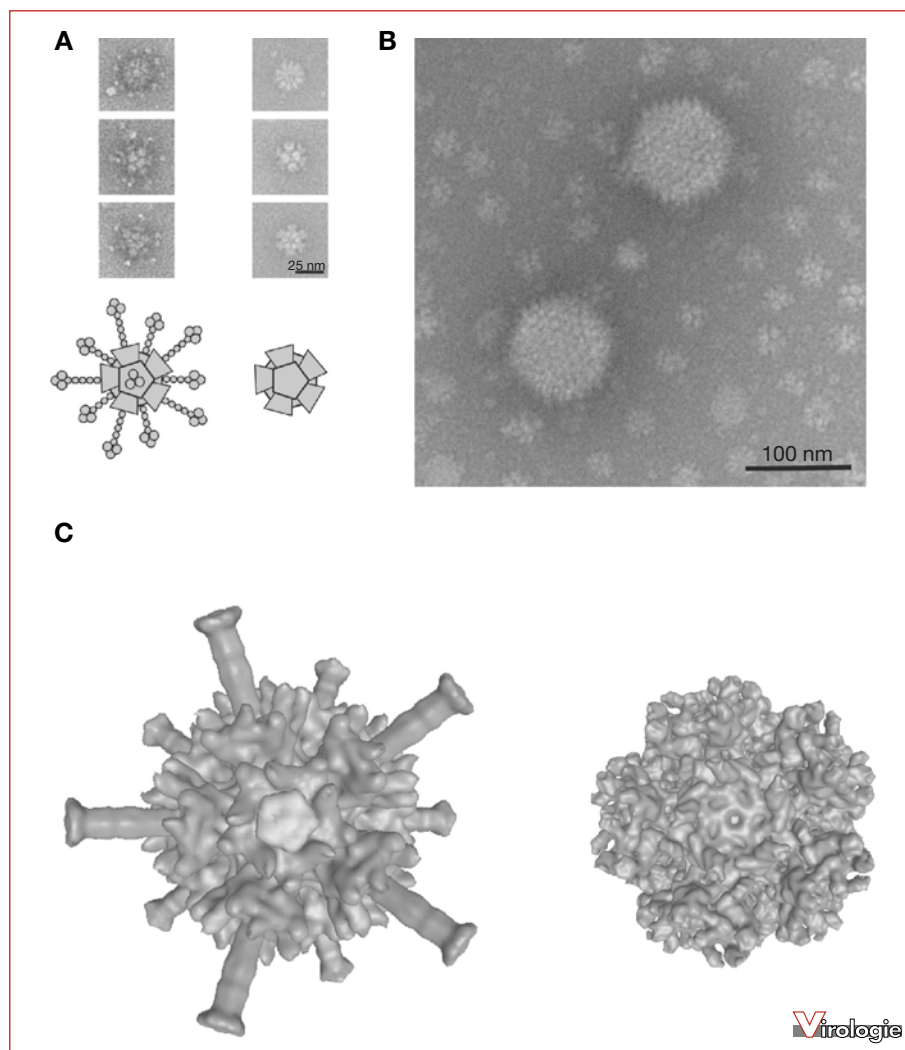
La résolution de la structure de la base du penton en présence d'un peptide mimant la partie N-terminale de la fibre a permis de situer les régions d'interaction de la base du penton avec la fibre ([30] ; *figure 2B*, panneau de droite). La fibre se fixe dans une gorge formée par deux monomères adjacents à la surface du pentamère et implique les résidus Gln482 et Ile484. Un réarrangement structural de l'hélice  $\alpha 7$  est alors observé sous l'effet de la fixation du peptide. Il est à noter que ce changement structural est de type coopératif : le changement de structure sur un monomère n'est possible pour des raisons stériques que si l'ensemble des monomères change également. Pour le virus entier, le mode de fixation de la fibre trimérique sur la base pentamérique n'est pas encore connu (seuls trois des cinq sites de fixation sont occupés).

### Les dodécaèdres de l'adénovirus

La première mise en évidence des dodécaèdres adénoviraux date de 1966, une époque où les structures des adénovirus et de leurs constituants étaient peu connues. En purifiant les antigènes solubles produits lors de l'infection de cellules humaines par l'HAd3, Norrby a observé des structures présentant une symétrie dodécédrique ressemblant à une étoile à cinq ou six branches : les dodécaèdres. Ces dodécaèdres étaient formés, d'après l'auteur, par des protéines ayant une structure tubulaire et autour desquelles étaient retrouvés cinq ou six points [32]. Ces structures tubulaires correspondent à ce que nous appelons aujourd'hui les bases du penton et les points correspondent aux domaines tête de la fibre. Dans ce travail, Norrby remarquait que les composants formant le dodécaèdre (les pentons) étaient normalement présents aux 12 sommets de la capsid virale. L'observation de ce matériel en microscopie électronique a permis à Norrby de définir une taille de 22,5 à 27,5 nm pour le cœur du dodécaèdre (les bases du penton) et de 40 à 50 nm entre deux « points » opposés (les domaines tête des fibres).

Depuis cette première description, d'autres travaux ont permis de mettre en évidence la présence ou l'absence de dodécaèdres dans des cellules infectées par différents séro-





**Figure 3.** Les dodécaèdres de l'adénovirus humain de sérotype 3. A. Dodécaèdres de l'HAd3 observés par MET après coloration négative. La colonne de gauche montre des dodécaèdres constitués de pentons (base plus fibre) (Dodécaèdre Fibre ; DF), alors que la colonne de droite représente des dodécaèdres constitués de bases uniquement (Dodécaèdre Base ; DB). Ces particules sont vues de haut en base respectivement selon leur axe de symétrie d'ordre 5, 2 et 3. La partie inférieure représente un modèle de l'association multimérique donnant naissance aux DF et DB (respectivement gauche et droite). B. Micrographie d'un mélange dodécaèdre – HAd3 observé par MET après coloration négative. Cette image indique la taille relative des deux objets. C. Structures tridimensionnelles des dodécaèdres fibre et base obtenues après cryo-MET et analyse d'images à respectivement 16 et 9 Å de résolution [31]. Les particules sont vues selon leur axe de symétrie d'ordre 5 (comme les modèles). Code d'accès des structures 1178 et 1179 ; <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/emsearch/>

types d'adénovirus humains. Ainsi le sérotype 4, le sérotype 7, le sérotype 11 et les sérotypes 9 et 15 sont connus pour donner des structures dodécaédriques lors de leur cycle d'infection alors que la présence de dodécaèdres n'a jamais pu être détectée pour les sérotypes 1, 2, 5 et 6, le sérotype 12 et le sérotype 16 ou pour les adénovirus entériques (HAd40 et HAd41) [33].

### Les dodécaèdres en cryomicroscopie électronique

La coexpression de la base du penton et de la fibre de l'HAd3 dans le système de baculovirus permet la production de dodécaèdres avec les fibres projetées vers l'extérieur : le dodécaèdre-fibre (DF) ([34] ; *figure 3A*, panneau

de gauche). L'expression seule de la base du penton de l'Ad3 donne naissance à une particule nommée le dodécaèdre-base (DB) (*figure 3A*, gauche). L'obtention d'une première structure des DB et des DF par cryomicroscopie à environ 20 Å de résolution [29] a permis de montrer qu'une cavité d'environ 8,7 nm de diamètre ( $350 \text{ nm}^3$ ) était présente dans les dodécaèdres. De façon très intéressante, en présence de la fibre, une boucle de la base du penton contenant la séquence RGD se déplace de 15 Å vers l'extérieur de la structure ce qui a une influence potentielle sur la reconnaissance des intégrines. Plus récemment, en comparant et en replaçant la structure cristallographique de la base HAd2 (décrite ci-dessus) dans un modèle 3D du dodécaèdre HAd3 obtenu par cryomicroscopie à 9 Å, il a été possible de mettre en évidence que la stabilité de l'architecture des dodécaèdres de l'HAd3 repose uniquement sur trois points de contact entre deux bases adjacentes [31]. Il semble également qu'une condition nécessaire à la formation des dodécaèdres soit l'absence de la partie N-terminale de la base du penton. En effet, en se basant sur la structure obtenue par recalage de la structure cristalline de la base du penton de l'HAd2 dans l'enveloppe obtenue par cryo-MET pour le dodécaèdre de l'HAd3, il semble que cette partie N-terminale se situe vers l'intérieur de la particule. De plus, si toutes ces extrémités N-terminales étaient présentes, le volume de la cavité ne serait pas suffisant pour les accueillir. Fuschiotti *et al.* (2006) ont également montré que la possibilité de formation des dodécaèdres est liée à l'absence de cette extrémité. Les dodécaèdres pourraient donc représenter une forme de stockage des pentons néosynthétisés ayant subi une autoprotéolyse dans le but de les empêcher d'être intégrés dans un virus qui ne serait pas viable.

### La fibre

La fibre, aussi appelée protéine IV, est la 3<sup>e</sup> et dernière protéine majeure des Ads. Il s'agit d'une protéine cruciale pour le virus, c'est en effet par son intermédiaire que se fait la première fixation du virus sur la cellule hôte. La capsidie contient 36 copies de cette protéine assemblées en trimères au niveau des 12 sommets de l'icosaèdre. La fibre, liée de manière non covalente avec la base du penton, se projette vers l'extérieur du virus. La forme biologique en trimère est composée de 3 domaines principaux : une queue N-terminale flexible, responsable de l'interaction avec la base du penton, une tige assez rigide de longueur variable en fonction du sérotype ainsi qu'une partie C-terminale distale et globulaire appelée tête qui permet l'interaction avec le récepteur primaire. La variation de longueur de la tige provient du nombre différent de domaines structuraux répétés la constituant [35]. Chacun de ces motifs structuraux est composé 15 acides aminés. Ainsi, la fibre de l'HAd3 contient 9 éléments répétés et présente une lon-

gueur d'environ 16 nm alors que celle de l'HAd2 qui en contient 22 atteint une longueur d'environ 37 nm [36] (*tableau 1*). La plus longue fibre est celle qui décore l'adénovirus bovin de sérotype 3 avec une longueur totale de 77,2 nm pour 46,5 répétitions [36].

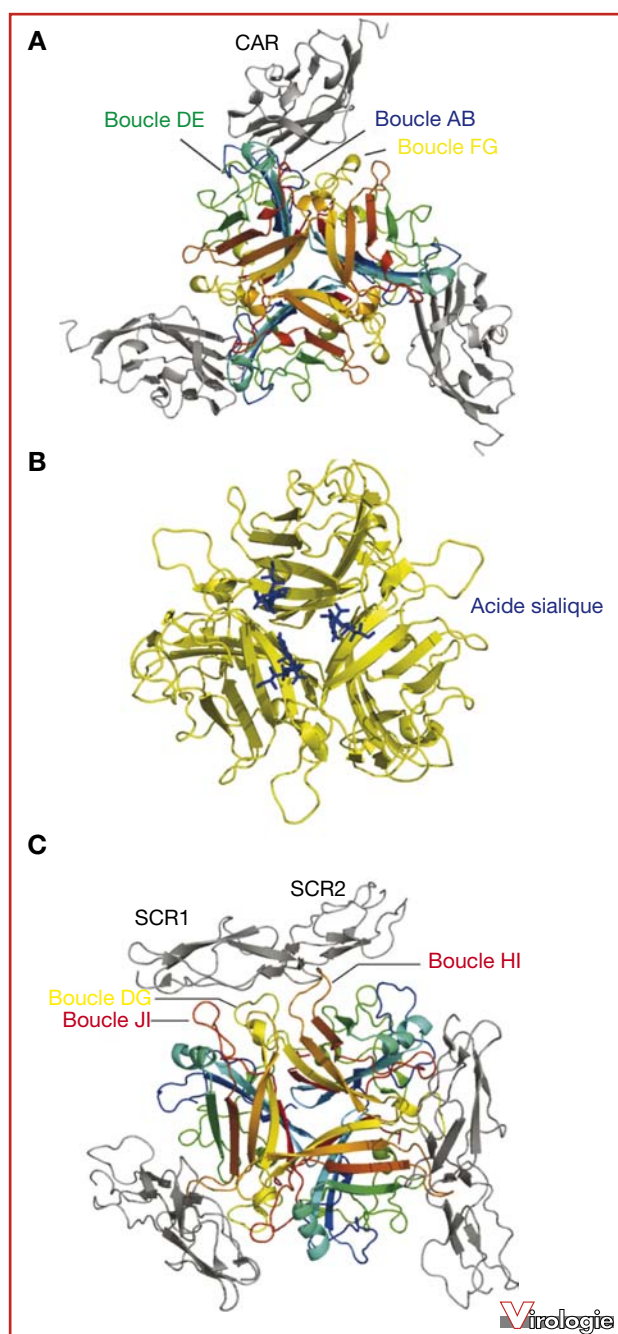
La tête de la fibre de l'HAd5 fut la première protéine issue d'une fibre d'adénovirus à avoir été cristallisée en 1994 [37]. Depuis quelques années, les structures de plusieurs têtes de fibre ont été résolues par cristallographie aux rayons X (HAd2, HAd12, HAd3, HAd37 et HAd19p, la fibre courte de l'HAd41 ainsi que HAd11 et 35 [pour revue voir 38]). Les structures atomiques de têtes de fibres adénovirus non humains comme l'adénovirus aviaire CELO ou le CAV2 ont également été résolues récemment [38]. Toutes les têtes de fibre montrent un repliement homologue. Chaque monomère est constitué d'un sandwich  $\beta$  antiparallèle formé par la juxtaposition avec un angle d'environ 45° de 2 feuillets  $\beta$  à 4 brins (*figure 2C*). Seules les boucles qui relient les différents brins  $\beta$  sont de longueurs et de structures différentes. Chez les espèces de virus qui reconnaissent CAR (Cocksackie and Adenovirus Receptor) comme récepteur primaire, une zone particulièrement conservée, appelée boucle AB, est impliquée dans la liaison avec ce récepteur (*figures 2B, 5A*).

La tête de la fibre est reliée à la tige qui représente le deuxième domaine de cette protéine par l'intermédiaire d'une région flexible de quelques acides aminés. En 1999, van Raaij et collaborateurs ont résolu la structure de la tête de la fibre de l'HAd2 avec une partie de la tige [39]. La tige des Ads est repliée en motifs répétés d'environ 15 acides aminés. Le nombre de répétitions de ce motif permet une variabilité de la longueur de la fibre suivant les sérotypes. Du point de vue structural, les trois monomères s'organisent en une triple spirale bêta caractérisée par des répétitions d'une longueur de 13 Å et une rotation d'environ 50° par rapport à l'axe de la fibre et ce pour chacun des motifs répétés. Chez tous les adénovirus, au moins une des répétitions est plus longue que les autres (généralement la troisième ou la quatrième) et induit un coude dans la structure de la fibre [17, 36]. Ce coude permet une certaine flexibilité de la tête par rapport au reste de la capsidie et semble accroître l'efficacité de liaison entre le virus et son récepteur [40].

Le dernier domaine de la fibre, située à l'extrémité N-terminale, est la queue. Celle-ci contient un motif conservé (FNPVYPY) chez la majorité des adénovirus et responsable de la liaison à la base du penton [30].

### Les protéines structurales mineures

Aucune structure atomique n'est disponible à ce jour pour les protéines mineures. Le séquençage du génome de



**Figure 5.** Structure des principaux récepteurs primaires des adénovirus en complexe avec la tête de la fibre. A. Structure du complexe tête de la fibre d'HA12 - domaine D1 du CAR. La tête de la fibre est colorée du bleu au rouge depuis la partie N-terminale jusqu'à la partie C-terminale et la protéine CAR est représentée en gris. Les différentes boucles de la tête de la fibre permettant l'interaction avec CAR sont indiquées. B. Vue de dessus de la structure du complexe tête de la fibre HA37 (en jaune) - acide sialique (en bleu). C. Vue de dessus de la structure du complexe tête de fibre d'HA11 (coloré) - CD46 (gris). Les boucles impliquées dans la liaison de la tête de la fibre aux deux modules de CD46 sont indiquées.

l'HA2 ainsi qu'une étude par marquage à la méthionine radioactive a permis de déterminer la stoechiométrie des protéines mineures de la capside [41]. Les études structurales en cryo-MET [15, 16] ont permis d'émettre les premières hypothèses concernant la localisation de certaines protéines mineures au sein du virus entier. Depuis, différents travaux de cryo-microscopie électronique combinés avec les structures cristallographiques des protéines majeures ont permis d'augmenter le niveau de précision de la cartographie de la capside des adénovirus. Certaines protéines mineures ont été soit localisées à l'intérieur de la capside (protéine VIII, [19] ; partie N-terminale de la fibre et de la base du penton, [31] ; protéine IIIa, [18]) soit à l'extérieur de celle-ci (protéine IX ; [18] ; [17]). La *figure 1B* résume la cartographie actuelle et la localisation des protéines mineures au sein de la capside des adénovirus.

### Protéine IX

Seuls les virus du genre Mastadénovirus codent pour cette protéine qui est maturée par la protéase virale à partir d'un précurseur d'environ 15 kDa. Au-delà de son rôle structural au sein de la capside, cette protéine aurait d'autres fonctions au cours du cycle viral. Elle posséderait un rôle transactivateur de la transcription des ARNm viraux [42]. D'après les alignements de séquences, les prédictions de structures secondaires et les travaux de mutagenèse dirigée, la protéine IX posséderait trois domaines structuraux distincts [17]. Le domaine N-terminal semble impliqué dans l'incorporation et le maintien de la protéine au sein de la capside. Le domaine central (présent uniquement chez les adénovirus humains) est un domaine riche en alanine et permet de faire la liaison entre les domaines N et C-terminaux. Le domaine C-terminal est prédit replié en hélices  $\alpha$  et semble responsable de son activité transcriptionnelle. Selon les études de stoechiométrie réalisées en 1985, cette protéine serait présente en 240 copies dans la capside mature (en jaune sur la *figure 1B*). Des études récentes ont montré que les zones de densités jaunes sur la *figure 1* qui étaient pour l'instant supposées être la protéine entière représentent uniquement les domaines N-terminaux de cette protéine. Les domaines C-terminaux issues de plusieurs protéines s'oligomérisent pour donner naissance à une densité cylindrique qui est placée différemment suivant qu'il s'agisse d'un adénovirus humain ou canin [17, 18]. Ces densités cylindriques peuvent en effet être situées sous forme de tétramères à l'interface entre 2 GONs de 2 facettes adjacentes dans le cas des HAd alors qu'elles se retrouvent sous formes trimériques directement placées au-dessus des triskélions représentant la partie N-terminale de la protéine IX dans les cas des CAV2 (densités respectivement orange et rouge sur la *figure 1B*). Cette différence de localisation s'explique par la longueur du domaine central de cette protéine (repliée en hélice  $\alpha$  chez les HAd

mais absente chez le CAV2). La densité représentant la partie C-terminale de la protéine IX était préalablement attribuée à la protéine IIIa.

### Protéine IIIa

Cette protéine est le produit C terminal de clivage d'un précurseur de 65 kDa par la protéase codée par le virus. La protéine maturée avoisinerait les 60 kDa mais sa taille exacte n'a pas encore été confirmée. Cette protéine est présente dans la capsid sous forme monomérique en 60 copies [41]. Récemment, en se basant sur une structure de l'adénovirus entier à haute résolution (6 Å, [18]) et sur des prédictions de structures secondaires de cette protéine, la protéine IIIa a été relocalisée en dessous de la base du penton (13 des 15 hélices  $\alpha$  prédites ont été détectées dans la structure de microscopie électronique).

### Protéine VI

La forme mature de la protéine VI est issue du clivage d'un précurseur d'environ 27 kDa au niveau de deux sites identifiés. Sa maturation libère un propeptide N-terminal de 33 acides aminés ainsi qu'un peptide C-terminal de 11 acides aminés, le pVIc cofacteur de la protéase virale. La structure cristallographique de la protéase virale en complexe avec pVIc a montré que ce peptide forme un brin  $\beta$  responsable d'une augmentation très forte de l'activité catalytique de la protéine (300 fois) [43]. Wiethoff et collaborateurs ont montré en 2005 que la partie N-terminale de la forme mature de la protéine VI est impliquée dans la sortie du virus de l'endosome lors de la phase très précoce d'infection [44]. La localisation exacte de cette protéine au sein de la capsid n'est pas encore connue avec certitude malgré plusieurs hypothèses qui la situeraient dans la cavité formée par l'hexon, à l'intérieur de la capsid [18].

### Protéine VIII

Il s'agit de la protéine mineure la moins documentée. Sa forme mature est issue du clivage protéolytique d'un précurseur de 25 kDa environ. Dès 1975 la protéine VII avait été placée sur la face interne de la capsid [45]. Sa stœchiométrie au sein de la capsid a été établie à 120 copies [41]. Le calcul d'un modèle tridimensionnel à résolution quasi atomique de l'organisation des protéines majeures de la capsid a permis la localisation de cette protéine sur la face interne de la capsid. Cette protéine interagit avec 4 hexons soit autour de l'axe d'ordre 5 soit autour de l'axe d'ordre 3 [19] et est donc présente en 2 exemplaires par unité asymétrique (*figure 1B*).

### Structure du nucléoïde

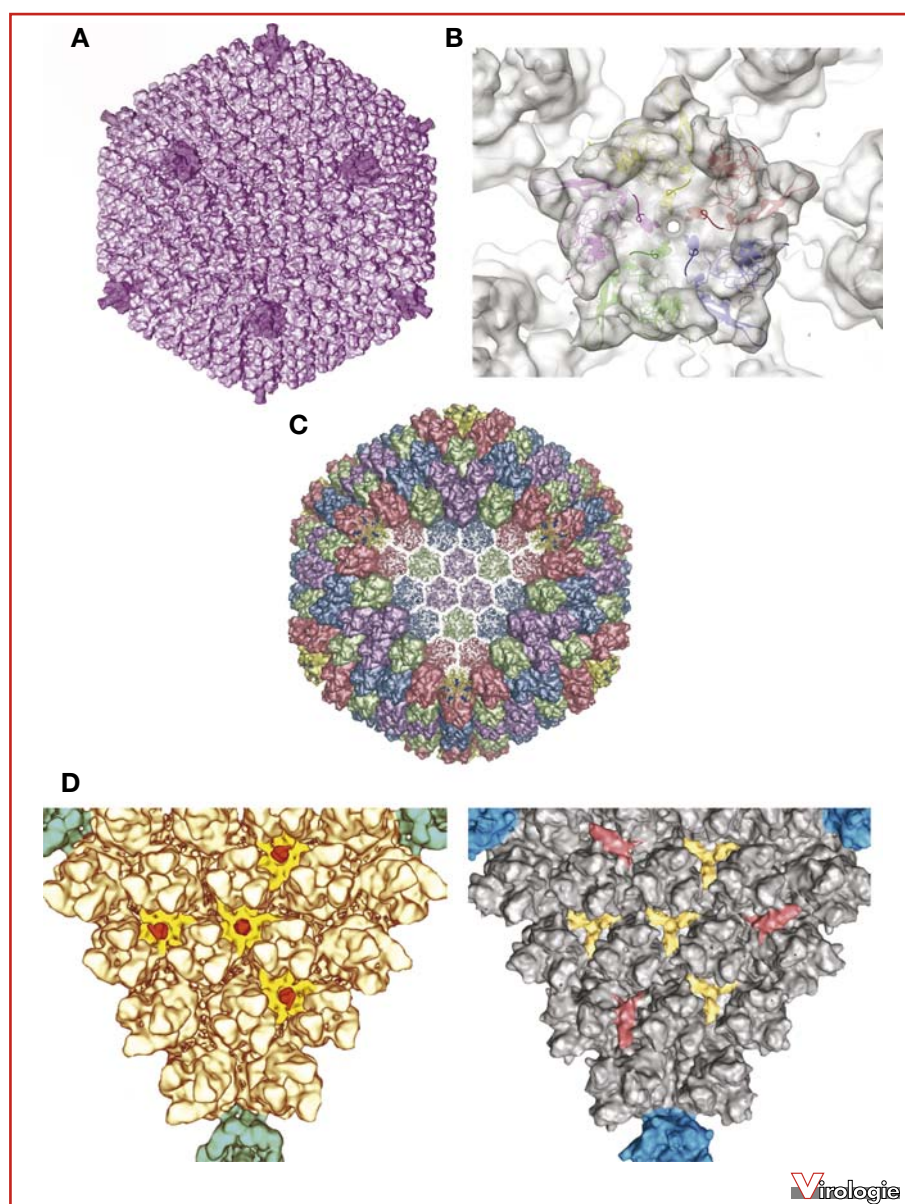
Le nucléoïde est composé de l'ADN viral en complexe avec plusieurs protéines virales : les protéines V, VII, Tp et X

(aussi appelée protéine  $\mu$ ). Les extrémités 5' du génome ne sont jamais libres. Elles sont en permanence liées de façon covalente à la protéine Tp pour « Terminal protein » [46]. Cette protéine d'environ 55 kDa est présente chez tous les Adénovirus [47]. Elle possède un rôle important de protection du génome contre la dégradation et permet sa réplication au cours du cycle viral. L'ADN viral est quant à lui entièrement recouvert par la protéine VII qui permet son compactage au sein de la capsid [41]. La structure 3D du nucléoïde n'est pas encore très bien connue mais il est clair que le génome forme des unités répétitives faisant penser au nucléosome et composées par de l'ADN viral associé à la protéine VII [48]. La plus petite des protéines appartenant au nucléoïde est la protéine X ou  $\mu$  qui semble impliquée dans le compactage du génome [49]. La dernière protéine appartenant au nucléoïde est la protéine V. Elle n'est présente que chez les mastadénovirus [50]. Cette protéine de 40 kDa environ et présente en 1 578 copies dans la capsid serait impliquée dans le maintien du nucléoïde au niveau de la capsid [45, 51].

## Structure du virus entier

Les adénovirus ont une taille tellement importante qu'actuellement la seule méthode permettant d'obtenir une vue d'ensemble du virus est la microscopie électronique. Seule la fibre flexible échappe à cette investigation par MET. La finesse de ces études n'a fait que progresser pour arriver aujourd'hui à une structure tridimensionnelle du virus à 6 Å de résolution [18]. La connaissance des structures cristallographiques des capsomères composant le virus a également permis de combiner ces données avec celles issues de la microscopie électronique (*figure 4B*). Nous avons donc accès aujourd'hui à des structures de la capsid de l'adénovirus à résolution pseudo-atomique [18, 19] (*figure 4A et C*). Cela a permis, par différence d'images, de localiser les protéines mineures dans cette capsid mais également de modéliser les parties manquantes dans la structure atomique des protéines (*figure 4B*). À la résolution quasi atomique atteinte, les contacts entre capsomères sont résolus à l'échelle de quelques acides aminés (*figure 4C*). L'intérêt porté à ces virus pour leur utilisation potentielle en thérapie génique a fortement stimulé les recherches en biologie structurale ne serait-ce qu'en facilitant l'accès à des échantillons purs et concentrés. Ces études ne s'arrêtent plus aux sérotypes humains mais concernent également des virus infectant d'autres hôtes. Nous pouvons citer en particulier les structures de l'adénovirus canin CAV2 et d'un atadénovirus (adénovirus ovin de sérotype 7, OAd7) résolues par cryo-MET [17, 52]. Ces deux virus montrent des différences importantes au niveau de leurs protéines mineures par rapport aux adénovirus humains. La protéine IX du CAV2 est plus courte que son équivalente humaine, ce qui empêche





**Figure 4.** Cryo MET du virus entier. A. Reconstruction tridimensionnelle de l'HA5 à 10 Å de résolution [19] Code d'accès EBI 1113. Les sommets du virus sont représentés plus foncés. B. Combinaison des données cristallographiques et de MET appliquée à la base du penton de l'HA3. La flèche montre l'absence de structure cristallographique dans la boucle RGD dont la densité est présente en microscopie. C. Modèle quasi atomique de la capsid de l'HA5 calculée à partir de la structure représentée en A. Les capsomères d'une facette sont représentés sous forme de « ribbons ». D. Comparaison d'une facette de CAV2 et de HA5 montrant que la partie C-terminale de la protéine IX (en rouge) occupe une place différente suivant le virus [17].

che sa partie C-terminale d'occuper la même position que chez les adénovirus humains (voir partie protéine IX et *figure 4D*). Les protéines majeures de la capsid (hexon et base du penton) possèdent des séquences plus courtes et apparaissent plus « lisses » dans le cas du CAV2 (*figure 4D*). Ce virus semble être une version simplifiée de son homologue humain. Chez l'adénovirus ovin OAd7, la

protéine IX est absente mais remplacée par une autre protéine de taille plus importante. Cette dernière forme des structures en « champignon » à la surface des virus (*figure 1A* de [52]). Tous ces résultats n'étaient pas prévisibles avant d'avoir obtenu la structure de ces virus. D'autres modulations doivent exister au sein de la famille des adénovirus.



Pour ce qui est des structures cristallographiques, les structures des deux têtes de fibres des adénovirus aviaires viennent d'être résolues [38].

## Les récepteurs primaires des adénovirus

La première étape de l'infection adénovirale est la reconnaissance d'une cellule par le virus. Il s'agit d'une liaison de haute affinité entre la tête de la fibre et son récepteur primaire présent à la surface de la cellule. Plusieurs récepteurs primaires ont été identifiés. La nature de ce récepteur change suivant le sous-groupe auquel appartient le virus et certains de ces sous-groupes peuvent en reconnaître plusieurs différents. Seuls les récepteurs dont la structure a été résolue seul ou en complexe avec la tête de fibre correspondante seront évoqués ici.

### Le CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*)

Il est connu depuis 1976 que les adénovirus humains du sous-groupe C et les coxsackievirus du groupe B ont un récepteur en commun [53]. En 1997, la nature de ce récepteur a été déterminée pour l'HAd2 et l'HAd5 et appelé CAR [54]. Plus tard, il a été montré que des sérotypes appartenant à cinq des six sous-groupes (A, C, D, E, F) sont capables de se lier au CAR et l'utilisent comme récepteur fonctionnel à la surface de la cellule [55]. Cela n'empêche pas plusieurs sérotypes appartenant en particulier au sous-groupe D d'interagir avec d'autres récepteurs comme le résume le *tableau 1*.

La protéine CAR est une protéine transmembranaire de type 1 appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig). Cette protéine de 46 kDa est ubiquitaire à la surface des tissus cellulaires humains. La protéine CAR est constituée d'un domaine intracellulaire et d'un domaine extracellulaire séparés par un domaine transmembranaire. Les domaines transmembranaire et cytoplasmique ne sont pas nécessaires pour l'infection, ils constituent simplement le point d'ancrage de CAR dans les cellules [56]. Le domaine extracellulaire est formé par deux domaines Ig, D1 et D2 [57], D1 étant le domaine de liaison à l'adénovirus *via* la tête de la fibre. Dans les cellules, la protéine CAR joue un rôle très important en assurant les jonctions intercellulaires au niveau du pôle basolatéral des cellules épithéliales. Cette fonction d'adhésion est accomplie par une dimérisation entre deux molécules situées entre deux cellules voisines.

La structure atomique du domaine D1 de CAR a été déterminée par cristallographie et RMN, seule ou en complexe avec les têtes de fibre de l'HAd12 [58], de l'HAd37 et enfin de l'adénovirus canin de sérotype 2 (CAV2) [59]. Ces structures cristallographiques montrent que trois monomères D1 interagissent avec une tête de fibre trimérique. Le

site d'interaction de la tête des fibres avec le CAR est toujours localisé dans la même zone malgré le faible taux de conservation de la séquence. Chaque monomère de la protéine CAR interagit principalement avec les boucles AB, DE et le feuillet  $\beta$  F d'un monomère de la tête de la fibre et la boucle FG du monomère adjacent (*figure 5A*). L'analyse de mutants de la tête de fibre d'HAd5 a montré le rôle majeur des boucles AB et DE dans la liaison avec la protéine CAR [60].

Le rôle de la protéine CAR dans le cycle de vie de l'Ad est encore sujet à caution. En effet, il semblerait que CAR ne soit pas uniquement un récepteur cellulaire pour ce virus. Des études de cristallographie et de biochimie suggèrent que la tête de la fibre des Ads, qui possède une forte affinité pour la protéine CAR, empêche la dimérisation de celui-ci en s'y liant [58, 61]. La tête de la fibre de l'adénovirus peut donc perturber les interactions CAR-CAR ce qui a pour effet d'augmenter la perméabilité de l'épithélium [62]. La tête de la fibre de l'adénovirus joue probablement en plus de son rôle de reconnaissance cellulaire un rôle dans le passage des virus au travers des barrières physiques existantes dans les tissus [62]. Cette hypothèse est confirmée pour l'HAd37. Ce virus n'utilise pas la protéine CAR comme récepteur, mais la tête de la fibre s'y attache tout de même avec une grande affinité, probablement pour permettre aux virus néosynthétisés de franchir la barrière épithéliale pour infecter d'autres cellules [59].

### L'acide sialique

Plusieurs sérotypes d'Ads appartenant au sous-groupe D utilisent l'acide sialique plutôt que la protéine CAR comme récepteur (HAd8, HAd19a et HAd37). Tous ces virus sont associés avec des kératoconjonctivites épidémiques. Du point de vue structural et biophysique, leurs têtes de fibres sont caractérisées par des points isoélectriques élevés ( $pI = 9,1$ ) [63]. Le point isoélectrique de l'acide sialique étant bas ( $pI = 2,3$ ), l'interaction qui existe entre les deux est très probablement charge dépendante. Les structures cristallographiques des têtes de fibre des HAd37 et HAd19p en complexe avec l'acide sialique (*figure 5B*) ont confirmé que le site d'interaction de l'acide sialique avec la tête de la fibre est effectivement chargé positivement [64] et stabilisé par des liaisons hydrogènes mettant en jeu des résidus conservés chez les HAds du sous-groupe D.

### Le CD46

Les adénovirus du sous-groupe B n'ont pas le même récepteur que les autres Ads : ces virus ne rentrent en effet pas en compétition avec les Ads du sous-groupe C lors de l'attachement aux cellules [65]. En 2003, le CD46 a été identifié comme récepteur cellulaire pour l'HAd11 (sous-groupe B) [66]. Depuis, il a été montré que plusieurs sérotypes du

sous-groupe B cités dans le *tableau 1* se lient ou utilisent la protéine CD46 comme récepteur pour se fixer à la cellule hôte [67-69].

La protéine CD46 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée dans la majorité des tissus cellulaires humains. Sa partie extracellulaire (N-terminale) est constituée par 4 répétitions du domaine SCRs (SCR1-SCR4 ; *Short Consensus Repeats*). Les domaines SCR1 et SCR2 sont nécessaires et suffisants pour une liaison optimale des HAd3, 7, 11 et 35 à la surface de la cellule [70, 71].

La structure cristallographique des domaines SCR1 et SCR2 du CD46 a été déterminée seule [72] et en complexe avec la tête de la fibre d'HAd11 [73]. Le nombre de contacts et la surface impliquée dans cette interaction indique une forte affinité ( $K_d = 2 \text{ nM}$ ) [73]. Dans la structure du complexe (*figure 5C*), les deux domaines de CD46 adoptent une conformation linéaire en se liant sur le côté de la tête de la fibre « à cheval » sur deux des trois monomères. La partie SCR1 et l'interface SCR1-SCR2 interagissent avec un monomère de la fibre, alors que le domaine SCR2 va interagir avec le monomère adjacent. Les interactions entre les deux constituants du complexe font intervenir des liaisons de type *Van Der Waals* (pour SCR1) et des liaisons hydrogènes (pour SCR2). L'interaction entre la fibre et l'interface SCR1-SCR2 impliquant les boucles HI et DG de la fibre semble très importante : une mutation ponctuelle au niveau de la tête de la fibre (Arg279Gln) inhibe totalement l'interaction fibre-CD46 [74]. Il a également été montré que la liaison de CD46 à la tête de la fibre d'HAd11 induisait des changements conformationnels importants sur les domaines SCR1 et SCR2 du CD46.

### Les CD80 et CD86

Les protéines CD80 et CD86 appartiennent à la superfamille des Igs. Elles sont connues pour leur fonction d'activation des lymphocytes T [75]. Des travaux récents ont montré que l'HAd3 interagissait avec les protéines CD80 et CD86 [76] mais pas avec la protéine CD46 alors que ces virus appartiennent au sous-groupe B. Les auteurs suggèrent qu'il existe probablement un autre récepteur pour l'HAd3, au moins dans les cellules HeLa, car une neutralisation de CD80 et CD86 par des anticorps ne réduit l'infection que de 50 %. D'autres études généralisent les protéines CD80 et CD86 comme étant des récepteurs pour les adénovirus appartenant au sous-groupe B [77] mais le sujet reste encore controversé.

### Les autres récepteurs primaires des adénovirus

Plusieurs autres récepteurs primaires des adénovirus ont été découverts ces dernières années. Ces derniers peuvent être reconnus par les virus mais on ne sait pas exactement s'il s'agit vraiment de récepteurs fonctionnels ou de récepteurs accessoires. La quasi-totalité de ces récepteurs a été décou-

verte pour les adénovirus humains de sérotype 2 et 5 car ce sont les plus étudiés.

Le domaine C-terminal  $\alpha 2$  du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I MHC-1 est reconnu par les HAd2 et HAd5 et sert de récepteur dans les cellules Hela et Daudi exprimant cette protéine [78]. Ces données n'ont pas été confirmées *in vivo* [79].

La protéine *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), une immunoglobuline également connue sous le nom de CD106 peut être reconnue par l'HAd5 [80] mais là encore ces données n'ont pas été confirmées.

L'HAd2 et l'HAd5 (sous-groupe C) interagissent avec les héparanes sulfates (HS) [81, 82]. Dans un premier temps, une séquence basique KKTK dans la tige de la fibre était supposée être responsable de cette interaction. Depuis l'ores, il a été montré que c'est le facteur IX de coagulation qui interagit avec la tête de la fibre et qui permet de faire un pont avec les HS [83]. Récemment, il a été montré que l'hexon qui n'avait jamais été impliqué dans le tropisme de l'Ad, jouait un rôle important. En accommodant le facteur X de coagulation, le virion se retrouve décoré par ce facteur qui par l'intermédiaire des HS dicte un fort tropisme hépatique [84-86].

La diversité des récepteurs utilisés par les Ads pour se fixer aux cellules, permet l'infection de plusieurs types de tissus cellulaires et fait la force de ces virus. Le travail d'identification de ces récepteurs n'est pas encore terminé, d'autres récepteurs d'adénovirus restent probablement à identifier.

## Les récepteurs secondaires des adénovirus

L'attachement de l'Ad à la surface de la cellule via la tête de la fibre est suivi par une interaction entre les intégrines cellulaires et la base du penton [87, 88]. La majorité des bases de penton des adénovirus interagissent avec les intégrines via leur motif RGD. Parmi ces intégrines nous retrouvons  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$  [87],  $\alpha v \beta 1$  [89],  $\alpha 5 \beta 1$  [90],  $\alpha M \beta 2$  et  $\alpha L \beta 1$  [91]. L'interaction base du penton – intégrine active de nombreuses voies de signalisation cellulaire qui vont faciliter l'endocytose [57, 92]. Certaines espèces d'Ads (HAdV40-41 et tous les Ads animaux en général) ne possèdent pas de séquence RGD au niveau des bases du penton. Le mode d'internalisation de ces virus reste encore obscur.

## Apport de la structure pour les applications biotechnologiques

Du fait de leur facilité de production à haut titre et de leur grande efficacité de pénétration dans les cellules, les adénovirus sont des vecteurs de choix pour l'apport d'ADN à

des fins biotechnologiques ou thérapeutiques. Différentes générations d'adénovirus ont été créées (pour revue : [93]). Brièvement, les vecteurs adénoviraux sont délétés de différentes régions pour permettre l'incorporation du transgène. Les dernières générations d'adénovirus dites « *gutless* » conservant uniquement les séquences ITR et la séquence d'encapsulation et ne possédant aucune séquence codante du virus sont apparues. Ces virus moins immunogènes permettent en théorie l'apport de transgène d'environ 30 kpb au lieu de 7 kpb pour les générations précédentes. Quelle que soit la génération utilisée, le ciblage des vecteurs est un point important. Comme nous l'avons vu, l'HA5 qui est le sérotype couramment utilisé pour la thérapie génique reconnaît le récepteur CAR [54], les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) [81] et les intégrines [87]. Il est possible de modifier le tropisme des vecteurs en l'augmentant pour reconnaître des cellules normalement peu permissives ou au contraire en abolissant le tropisme naturel afin de cibler spécifiquement un type cellulaire. Pour cela, une bonne connaissance structurale est primordiale.

#### **Augmentation du tropisme de la fibre**

La fibre de l'HA5 possède naturellement un domaine basique (KKTK, 91-94) qui a longtemps été supposé être responsable de l'interaction avec les HS [94]. Cependant pour augmenter le tropisme pour les HSPG, une séquence polylysine (AdpK7) a pu être ajoutée à la fibre soit du côté C-terminal soit au niveau d'une boucle HI de la tête de la fibre [95, 96].

Malgré tout, quelle que soit la méthode utilisée pour apporter cette séquence de fixation aux HS, les résultats obtenus furent comparables, à savoir, une augmentation du tropisme des adénovirus essentiellement sur des cellules présentant peu de récepteurs CAR. Ainsi l'augmentation du tropisme du virus pour des cellules de glioblastome (70 fois) peut présenter un intérêt dans les stratégies antitumorales basées sur l'utilisation d'adénovirus recombinants.

En dehors du cas de l'augmentation du tropisme pour les HSPG, de nombreux essais d'augmentation du tropisme pour les intégrines en ajoutant une séquence RGD dans la boucle HI, seule, ou en conjonction avec des séquences polylysines sont répertoriés. Des travaux plus spécifiques encore ont étudié l'effet de l'ajout de séquences peptidiques permettant de cibler le récepteur EGF dans le cas des gliomes, l'ajout de peptides issus d'étude en « *phage display* » pour atteindre les cellules endothéliales ou encore de cibler le récepteur CD21 exprimé dans les lymphocytes B naturellement peu permissifs à l'infection adénovirale [97]. En dehors de la boucle HI, d'autres boucles de la tête peuvent être utiles pour apporter des ligands. C'est ainsi qu'un groupe a utilisé la tête de la fibre courte de l'HA41 dont aucun récepteur n'est connu, comme plateforme d'apport de ligands. Dans ce travail, les auteurs ont montré que

la boucle latérale EG et la boucle sommitale IJ étaient également utilisables pour l'insertion de ligands [98].

#### **Réduction du tropisme de la fibre**

Au cours des essais précliniques de thérapie génique utilisant des adénovirus comme vecteurs, une distribution essentiellement hépatique a été observée, rendant indispensable la création de vecteurs perdant leur tropisme naturel. Réduire le tropisme de la fibre revient à travailler sur deux points importants : l'interaction avec les HSPG au niveau de la séquence KKTK située dans la tige et le tropisme pour CAR au niveau de la tête.

Des mutations combinées sur la fibre de l'HA5 (empêchant sa fixation au récepteur CAR) et sur la base du penton (empêchant la reconnaissance des intégrines) n'ont cependant montré aucun effet sur le fort tropisme hépatique des adénovirus recombinants lors de tests *in vivo* sur la souris [99]. Un travail récent montrant une interaction de l'hexon avec les facteurs sanguins et dictant un fort tropisme hépatique *via* les héparanes sulfates se révèle être primordial dans le développement des nouveaux vecteurs adénoviraux [84].

#### **Changement de tropisme indépendant de la fibre**

Nous venons de voir l'importance de la fibre dans le ciblage des vecteurs adénoviraux. Il est toutefois à noter que d'autres protéines de la capsid ont fait l'objet d'étude pour rediriger les vecteurs. Ainsi, nous pouvons citer qu'une séquence RGD a pu être insérée dans la région hypervariable de l'hexon (HVR : hexon variable region) pour donner un tropisme indépendant de la fibre [99]. À l'inverse, la boucle RGD de la base du penton a pu être modifiée afin de changer le couple d'intégrines reconnu. Ainsi le changement de la séquence haiRGDtf par la séquence eiLDVpst a permis la reconnaissance de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  exprimée fortement sur les lymphocytes et monocytes et pas sur les cellules endothéliales et épithéliales [100].

De façon plus surprenante, la protéine mineure pIX qui stabilise les hexons entre eux a également fait l'objet d'étude [101]. La partie C-terminale de cette protéine tolère l'insertion de large peptide comme la GFP. Afin de permettre au ligand d'émerger à la surface du virus, une hélice alpha « espaceur » peut être ajoutée. Une telle stratégie a permis d'ajouter des ligands RGD à la surface des facettes virales mais toutefois avec une efficacité de reconnaissance moindre que lorsque cette séquence est insérée dans la boucle HI de la tête [102].

### **Perspectives**

Le développement de virus mutants pour modifier le ciblage et le tropisme du virus semble donc prometteur mais la mise au point d'un vecteur ne passera pas sans la connais-

sance approfondie de la structure de la capsid ainsi que du rôle des protéines qui la compose. La connaissance de la structure atomique de l'adénovirus entier soit par cristallographie soit par microscopie électronique serait en pas décisif dans la compréhension de ce virus dans le but de mieux pouvoir l'utiliser.

**Remerciements.** Les auteurs remercient le Pr Rob Ruigrok (UVHCI Grenoble) pour les photos des pentons des adénovirus aviaires FAd7 et bovin BAD3 (*figure 1D*) et le Dr Christine Moriscot pour la relecture du manuscrit. GS est soutenu par l'ANR (ANR06JCJC0126) ; les thèses de CMSF et MEB ont été respectivement financées par des bourses MENRT et de la région Rhône-Alpes.

## Références

- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, *et al.* Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953 ; 84 : 570-3.
- Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G. The quest for human cancer viruses. *Science* 1962 ; 137 : 835-41.
- Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 ; 74 : 3171-5.
- Norby E, Bartha A, Boulanger P, *et al.* Adenoviridae. *Intervirology* 1976 ; 7 : 117-25.
- Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 2003 ; 84 : 2895-908.
- Benko M, Harrach B. A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch Virol* 1998 ; 143 : 829-37.
- Davison AJ, Harrach B. Siadenovirus. « Adenoviridae ». In : Tidon CA, Darai G, eds. *The Springer Index of Viruses*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag, 2002 : 29-33.
- Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 2003 ; 13 : 155-71.
- Yates VJ, Fry DE. Observations on a chicken embryo lethal orphan (CELO) virus. *Am J Vet Res* 1957 ; 18 : 657-60.
- Cowen B, Calnek BW, Menendez NA, *et al.* Avian adenoviruses : effect on egg production, shell quality, and feed consumption. *Avian Dis* 1978 ; 22 : 459-70.
- Valentine RC, Hopper PK. Polyhedral shape of adenovirus particles as shown by electron microscopy. *Nature* 1957 ; 180 : 928.
- Horwitz M. « Adenoviruses ». In : Fields B, Knipe D, eds. *Virology*, vol. 2. Philadelphia : Raven Press, 2001 : 2149-71.
- Pereira HG, Wrigley NG. (1974). In vitro reconstitution, hexon bonding and handedness of incomplete adenovirus capsid. *J Mol Biol* 1974 ; 85 : 617-30.
- Furciniti PS, van Oostrum J, Burnett RM. Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *Embo J* 1989 ; 8 : 3563-70.
- Stewart PL, Burnett RM, Cyrklaff M, *et al.* Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* 1991 ; 67 : 145-54.
- Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM. Difference imaging of adenovirus : bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J* 1993 ; 12 : 2589-99.
- Schoehn G, El Bakkouri M, Fabry CM, *et al.* 3D structure of canine adenovirus serotype 2 capsid. *J Virol* 2008 ; 82 : 3192-203.
- Saban SD, Silvestry M, Nemerow GR, *et al.* Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. *J Virol* 2006 ; 80 : 12049-59.
- Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, *et al.* A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *Embo J* 2005 ; 24 : 1645-54.
- Hong SS, Szolajski E, Schoehn G, *et al.* The 100K-chaperone protein from adenovirus serotype 2 (Subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses. *J Mol Biol* 2005 ; 352 : 125-38.
- Burnett RM. The structure of the adenovirus capsid. II. The packing symmetry of hexon and its implications for viral architecture. *J Mol Biol* 1985 ; 185 : 125-43.
- Roberts MM, White JL, Grutter MG, *et al.* Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science* 1986 ; 232 : 1148-51.
- Rux JJ, Burnett RM. Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon. *Mol Ther* 2000 ; 1 : 18-30.
- Xu L, Benson SD, Burnett RM. Nanoporous crystals of chicken embryo lethal orphan (CELO) adenovirus major coat protein, hexon. *J Struct Biol* 2007 ; 157 : 424-31.
- Pichla-Gollon SL, Drinker M, Zhou X, *et al.* Structure-based identification of a major neutralizing site in an adenovirus hexon. *J Virol* 2007 ; 81 : 1680-9.
- Cusack S. Adenovirus complex structures. *Curr Opin Struct Biol* 2005 ; 15(2) : 237-43 ; (Review).
- Karayan L, Gay B, Gerfaux J, *et al.* Oligomerization of recombinant penton base of adenovirus type 2 and its assembly with fiber in baculovirus-infected cells. *Virology* 1994 ; 202 : 782-95.
- Karayan L, Hong SS, Gay B, *et al.* Structural and functional determinants in adenovirus type 2 penton base recombinant protein. *J Virol* 1997 ; 71 : 8678-89.
- Schoehn G, Fender P, Chroboczek J, *et al.* Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding. *Embo J* 1996 ; 15 : 6841-6.
- Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, *et al.* The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell* 2005 ; 17 : 121-35.
- Fuschiotti P, Schoehn G, Fender P, *et al.* Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol* 2006 ; 356 : 510-20.
- Norby E. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. II. Identification and characterization of an incomplete hemagglutinin. *Virology* 1966 ; 30 : 608-17.
- Wadell G, Norby E. The soluble hemagglutinins of adenoviruses belonging to Rosen's subgroup 3. II. The slowly sedimenting hemagglutinin. *Arch Gesamte Virusforsch* 1969 ; 26 : 53-62.
- Fender P, Ruigrok RW, Gout E, *et al.* Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* 1997 ; 15 : 52-6.
- Green NM, Wrigley NG, Russell WC, *et al.* Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre. *Embo J* 1983 ; 2 : 1357-65.
- Ruigrok RW, Barge A, Albiges-Rizo C, *et al.* Structure of adenovirus fibre. II. Morphology of single fibres. *J Mol Biol* 1990 ; 215 : 589-96.
- Xia D, Henry LJ, Gerard RD, *et al.* Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure* 1994 ; 2 : 1259-70.
- El Bakkouri M, Seiradake E, Cusack S, *et al.* Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 short fibre. *Virology* 2008 ; 378 : 169-76.
- Van Raaij MJ, Mitraki A, Lavigne G, *et al.* A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature* 1999 ; 401 : 935-8.
- Wu E, Pache L, Von Seggern DJ, *et al.* Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol* 2003 ; 77 : 7225-35.



41. Van Oostrum J, Burnett RM. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol* 1985 ; 56 : 439-48.
42. Rosa-Calatrava M, Grave L, Puvion-Dutilleul F, *et al.* Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization. *J Virol* 2001 ; 75 : 7131-41.
43. Ding J, McGrath WJ, Sweet RM, *et al.* Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *Embo J* 1996 ; 15 : 1778-83.
44. Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, *et al.* Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol* 2005 ; 79 : 1992-2000.
45. Everitt E, Lutter L, Philipson L. Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Virology* 1975 ; 67 : 197-208.
46. Rekosh DM, Russell WC, Bellet AJ, *et al.* Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 1977 ; 11 : 283-95.
47. Mysiak ME, Holthuizen PE, van der Vliet PC. The adenovirus priming protein pTP contributes to the kinetics of initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res* 2004 ; 32 : 3913-20.
48. Shenk T. Adenoviridae : The viruses and their replication. In : Fields B, Knipe D, eds. *Fields Virology, third Edition*. Philadelphia, PA : Raven Press, 1996 : 2111-48.
49. Anderson CW, Young ME, Flint SJ. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology* 1989 ; 172 : 506-12.
50. Benko M, Harrach B. Molecular evolution of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003 ; 272 : 3-35.
51. Chatterjee PK, Yayda ME, Flint SJ. Interactions among the three adenovirus core proteins. *J Virol* 1985 ; 55 : 379-86.
52. Pantelic RS, Lockett LJ, Rothnagel R, *et al.* Cryoelectron microscopy map of Adenovirus reveals cross-genus structural differences from human adenovirus. *J Virol* 2008 ; 82 : 7346-56.
53. Lonberg-Holm K, Crowell RL, Philipson L. Unrelated animal viruses share receptors. *Nature* 1976 ; 259 : 679-81.
54. 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.
55. Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, *et al.* The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 1998 ; 72 : 7909-15.
56. Wang X, Bergelson JM. Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol* 1999 ; 73 : 2559-62.
57. Meier O, Greber UF. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 6 Suppl 2004(1) : S152-S163.
58. Bewley MC, Springer K, Zhang YB, *et al.* Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 1999 ; 286 : 1579-83.
59. Seiradake E, Lortat-Jacob H, Billet O, *et al.* Structural and mutational analysis of human Ad37 and canine adenovirus 2 fiber heads in complex with the D1 domain of coxsackie and adenovirus receptor. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 33704-16.
60. Kirby I, Davison E, Beavil AJ, *et al.* Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein. *J Virol* 2000 ; 74 : 2804-13.
61. Van Raaij MJ, Chouin E, van der Zandt H, *et al.* Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure Fold Des* 2000 ; 8 : 1147-55.
62. Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, *et al.* Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 2002 ; 110 : 789-99.
63. Arnberg N, Mei Y, Wadell G. Fiber genes of adenoviruses with tropism for the eye and the genital tract. *Virology* 1997 ; 227 : 239-44.
64. Burmeister WP, Guilligay D, Cusack S, *et al.* Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. *J Virol* 2004 ; 78 : 7727-36.
65. Stevenson SC, Rollence M, White B, *et al.* Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain. *J Virol* 1995 ; 69 : 2850-7.
66. Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, *et al.* Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 2003 ; 77 : 9183-91.
67. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1408-12.
68. Marttila M, Persson D, Gustafsson D, *et al.* CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* 2005 ; 79 : 14429-36.
69. Sirena D, Lilienfeld B, Eisenhut M, *et al.* The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol* 2004 ; 78 : 4454-62.
70. Fleischli C, Sirena D, Lesage G, *et al.* Species B adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 35 share similar binding sites on the membrane cofactor protein CD46 receptor. *J Gen Virol* 2007 ; 88 : 2925-34.
71. Fleischli C, Verhaagh S, Havenga M, *et al.* The distal short consensus repeats 1 and 2 of the membrane cofactor protein CD46 and their distance from the cell membrane determine productive entry of species B adenovirus serotype 35. *J Virol* 2005 ; 79 : 10013-22.
72. Casasnovas JM, Larvie M, Stehle T. Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *Embo J* 1999 ; 18 : 2911-22.
73. Persson BD, Reiter DM, Marttila M, *et al.* Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Biol* 2007 ; 14 : 164-6.
74. Gustafsson DJ, Segerman A, Lindman K, *et al.* 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* 2006 ; 80 : 1897-905.
75. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005 ; 23 : 515-48.
76. Short JJ, Pereboev AV, Kawakami Y, *et al.* Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* 2004 ; 322 : 349-59.
77. Short JJ, Vasu C, Holterman MJ, *et al.* Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Res* 2006 ; 122 : 144-53.
78. Hong SS, Karayan L, Tournier J, *et al.* Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J* 1997 ; 16 : 2294-306.
79. Davison E, Kirby I, Elliott T, *et al.* The human HLA-A\*0201 allele, expressed in hamster cells, is not a high-affinity receptor for adenovirus type 5 fiber. *J Virol* 1999 ; 73 : 4513-7.
80. Chu Y, Heistad D, Cybulsky MI, *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 augments adenovirus-mediated gene transfer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 : 238-42.
81. Dehecchi MC, Melotti P, Bonizzato A, *et al.* Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol* 2001 ; 75 : 8772-80.
82. Dehecchi MC, Tamanini A, Bonizzato A, *et al.* Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* 2000 ; 268 : 382-90.
83. Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, *et al.* Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol* 2005 ; 79 : 7478-91.
84. Waddington SN, McVey JH, Bhella D, *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 2008 ; 132 : 397-409.
85. Vigant F, Descamps D, Jullienne B, *et al.* Substitution of hexon hypervariable region 5 of adenovirus serotype 5 abrogates blood factor binding and limits gene transfer to liver. *Mol Ther* 2008 ; 16 : 1474-80.



86. Kalyuzhnyi O, Di Paolo NC, Silvestry M, *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 5483-8.
87. Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, *et al.* Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993 ; 73 : 309-19.
88. Mathias P, Wickham T, Moore M, *et al.* Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol* 1994 ; 68 : 6811-4.
89. Li E, Brown SL, Stupack DG, *et al.* Integrin alpha (v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J Virol* 2001 ; 75 : 5405-9.
90. Davison E, Diaz RM, Hart IR, *et al.* Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *J Virol* 1997 ; 71 : 6204-7.
91. Huang S, Kamata T, Takada Y, *et al.* Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol* 1996 ; 70 : 4502-8.
92. Li E, Stupack D, Bokoch GM, *et al.* Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol* 1998 ; 72 : 8806-12.
93. Fender P. adenoviruses and adenovirus penton vectors : from DNA transfer to direct protein delivery into cell. *Gene Ther Mol Biol* 2004 ; 8 : 85-90.
94. Smith TA, Idamakanti N, Rollence ML, *et al.* Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum Gene Ther* 2003 ; 14 : 777-87.
95. Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, *et al.* Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 2003 ; 5 : 267-76.
96. Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, *et al.* Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol* 1998 ; 72 : 1844-52.
97. Mailly L, Renaut L, Rogee S, *et al.* Improved gene delivery to B lymphocytes using a modified adenovirus vector targeting CD21. *Mol Ther* 2006 ; 14 : 293-304.
98. Hesse A, Kosmides D, Kontermann RE, *et al.* Tropism modification of adenovirus vectors by peptide ligand insertion into various positions of the adenovirus serotype 41 short-fiber knob domain. *J Virol* 2007 ; 81 : 2688-99.
99. Martin K, Brie A, Saulnier P, *et al.* Simultaneous CAR- and alpha V integrin-binding ablation fails to reduce Ad5 liver tropism. *Mol Ther* 2003 ; 8 : 485-94.
100. Wickham TJ, Carrion ME, Kovesdi I. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther* 1995 ; 2 : 750-6.
101. Dmitriev IP, Kashentseva EA, Curiel DT. Engineering of adenovirus vectors containing heterologous peptide sequences in the C terminus of capsid protein IX. *J Virol* 2002 ; 76 : 6893-9.
102. Vellinga J, Rabelink MJ, Cramer SJ, *et al.* Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX. *J Virol* 2004 ; 78 : 3470-9.