

INRS- Institut Armand Frappier

Expression et caractérisation de versions tronquées de la protéine majeure glycosylée de l'enveloppe (GP₅) du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin dans des vecteurs adénovirus

par
Cynthia Guilbert

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maître ès sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Président du jury
et examinateur interne
Examineur externe

Directeur de recherche

Codirecteur de recherche

Jury d'évaluation
Peter Tijssen, Ph.D. INRS-Institut
Armand-Frappier
Lucie Lamontagne, Ph.D., MBA,
Université du Québec à Montréal,
professeur associé
Bernard Massie, Ph.D. Institut de
recherche en biotechnologie, professeur
invité
Yves St-Pierre, Ph.D. INRS-Institut
Armand-Frappier

Résumé

La maladie du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin engendre, encore aujourd'hui, des pertes économiques considérables dans les élevages de porcs au Québec et partout à travers le monde. La vaccination reste le meilleur moyen de contrôler différentes infections dans les troupeaux dont l'infection au virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin. Afin d'éliminer les problèmes tels que la réactivation virale de la souche de vaccination, les recherches s'orientent de plus en plus sur des vaccins sous-unitaires. Les travaux présentés dans ce mémoire sont les derniers travaux du laboratoire de feu Dr Serge Dea faisant partie d'un projet plus vaste de développement d'un vaccin sous-unitaire. Ce vaccin serait un adénovirus humain de type 5, répliatif mais non disséminatif, ciblant la protéine majeure glycosylée de l'enveloppe (GP₅). Des études précédentes ayant démontré que l'apoptose induite par la GP₅ compliquait la production de vecteur adénovirus qui l'exprimait, notre objectif initial fut de construire des versions tronquées de la GP₅ afin de produire des mutants immunogéniques mais non-apoptotiques. Pour faciliter cette étape, nous avons choisi de produire les mutants en fusion avec la GFP (Green Fluorescent Protein). Nous avons alors observé que la fusion de la GFP à la GP₅ (ORF5/GFPq) réduisait considérablement la caractéristique apoptotique de la protéine. Donc cette protéine de fusion fut choisie pour la construction du vecteur adénovirus répliatif. Nous avons démontré qu'il y avait une augmentation significative de l'expression du transgène avec le vecteur répliatif/non disséminatif par rapport au vecteur non répliatif dans plusieurs lignées cellulaires. Ceci nous amène à proposer que le vecteur répliatif/non disséminatif pourrait stimuler une meilleure réponse immunitaire in vivo en combinaison avec une immunisation génétique.

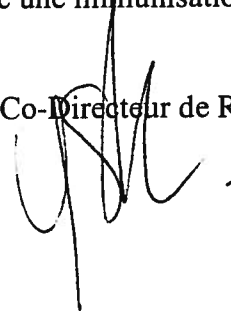
Étudiante

Cynthia Coëtaneau

Directeur de Recherche

Amad Kassir

Co-Directeur de Recherche



Remerciements

J'aimerais remercier le Dr Bernard Massie qui a cru en moi et m'a donné l'opportunité de travailler à ses côtés. Merci pour ces années passées dans son laboratoire, à travailler avec une équipe composée de gens aimables, sympathiques et compétents; merci tout particulièrement à Claire Guilbault, Lucie Bourget, Antoine Caron, mes collègues de bureau (Amélie, Nazila et Yan) et tous les autres collègues de l'Institut de Recherche en Biotechnologie et de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

J'aimerais remercier le Dr Serge Dea. Bien que je n'aie pas eu la chance de le connaître longtemps, il a été d'une grande influence dans le domaine des *Nidovirales*.

J'aimerais remercier le Dr Yves St-Pierre pour avoir assumé l'intérim du Dr Dea et m'avoir permis de poursuivre les travaux jusqu'à l'obtention du grade de M.Sc.

Un remerciement tout particulier à ma mère Carmen et à mon père Michel pour m'avoir soutenu et encouragé pendant toute la durée de mes études; même dans les moments de fatigue et de désespoir, vous n'avez jamais cessé de croire en moi. Merci à ma famille et amis pour m'avoir écouté lorsque je me plaignais des clonages qui ne fonctionnent pas ou des virus qui ne sont pas vert! J'aimerais également remercier Carl, mon chéri, autant pour son amour, sa patience, que pour son expertise dans le domaine.

En dernier lieu, j'aimerais remercier les différents organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de ce projet :

- La fondation Armand-Frappier pour une bourse de 2^e cycle, valide de Septembre 2003 à Septembre 2004, totalisant une somme de 12 000\$.
- Le CRSNG

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vi
Liste des abréviations.....	vii
1. Introduction.....	1
1.1 Le Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP).....	1
1.1.1 Histoire et importance économique	1
1.1.2 Signes cliniques et pathologie.....	1
1.2. L'agent étiologique : le Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP).....	2
1.2.1 Classification.....	2
1.2.2 Réplication et transmission	3
1.2.3 Organisation du génome	3
1.2.4 La protéine majeure glycosylée de l'enveloppe GP ₅	4
1.3 Défense de l'hôte face à un agent pathogène.....	9
1.3.1 La réponse humorale VSRRP spécifique durant l'infection.....	10
1.3.2 La réponse cellulaire durant l'infection au VSRRP.....	10
1.3.3 La GP ₅ et l'apoptose	13
1.4. La vaccination.....	20
1.4.1 Vaccination SRRP	20
1.4.2 Un hétérodimère GP ₅ -M, un avantage en vaccination chez le VSRRP?	22
1.4.3 L'utilisation d'immunostimulateur pour favoriser une meilleure réponse immunitaire.....	22
1.4.4 L'ORF5 synthétique.....	23
1.4.5 L'adénovirus dans la vaccination.....	24
1.4.6 La protéine verte fluorescente comme gène rapporteur.....	27
1.5 Objectifs.....	28
2. Matériels et méthodes	29
2.1 Constructions de plasmides.....	29
2.1.1 Le système cumate	29
2.1.2 Vecteurs de transfert servant à créer les virus de type non réplicatifs.....	31
2.1.3 Vecteurs de transfert servant à créer les virus de type réplicatifs/non disséminatifs	32
2.2 Construction des virus.....	33
2.2.1 Virus de type non réplicatifs	33
2.2.2 Virus de type réplicatif/non disséminatif.....	36
2.3 Amplification et purification des virus non réplicatifs et réplicatifs/non disséminatifs	38
2.4. Méthode de titration par TCID ₅₀ /mL.....	39
2.5. Immunobuvardage de type Western	40
2.6. Vérification de la mortalité cellulaire	41

2.7. Différence d'expression entre les virus répliatifs/non disséminatifs et les virus non répliatifs.....	42
2.8. Localisation cellulaire des différentes protéines de fusion	43
3. Résultats	45
3.1 Construction de trois différentes versions de la GP ₅ en fusion à la GFPq.....	45
3.2 Construction des vecteurs de transfert servant à créer les virus non répliatifs	46
3.3 Construction des virus non répliatifs.....	46
3.3.1 Immunobuvardage de type Western pour les différents virus non répliatifs .	46
3.3.2 Localisation cellulaire de la GP ₅ en fusion avec la GFPq	56
3.3.3 Vérification de la toxicité de la GP ₅	60
3.4 Virus répliatifs/non disséminatifs	64
3.4.1 Construction des vecteurs de transfert servant à créer les virus répliatifs/non disséminatifs	64
3.4.2 Construction des virus répliatifs/non disséminatif	64
3.4.3 Immunobuvardage de type Western pour les différents virus répliatifs/non disséminatifs	64
3.4.4 Différence d'expression entre le virus répliatifs/non disséminatifs (Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A) et le virus non répliatifs (Ad-ORF5/GFPq) dans différentes lignées cellulaires.....	67
4. Discussion	71
Références.....	80
Annexe A	99
Annexe B	100
Annexe C	101

Liste des tableaux

	PAGE	
Tableau 1 :	Amorces utilisées pour amplifier par PCR différentes sections de l'ORF5 synthétique et nom du plasmide obtenu.	31
Tableau 2 :	Conditions utilisées lors des immunobuvardages de type Western	41
Tableau 3 :	Multiplicité d'infection (MOI) utilisées pour chacun des virus pour infecter des cellules 293A, A549, PKA et PT.	43

Liste des figures

	PAGE	
Figure 1 :	Structure du virion du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.	6
Figure 2 :	Organisation du génome, stratégie de réplication et produits d'expression des différents gènes du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.	7
Figure 3 :	Schéma des différentes régions importantes du génome du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.	8
Figure 4 :	Les deux principales voies d'apoptose : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale.	15
Figure 5 :	Les deux stratégies différentes du système cumate pour contrôler l'expression d'une protéine.	30
Figure 6 :	La sélection positive par la protéase utilisée pour produire les virus de type non répliatif.	35
Figure 7 :	La production des virus répliatifs basé sur le système AdEasy™ de Qbiogene.	37
Figure 8 :	Détection de l'expression des différents virus non répliatifs par immunobuvardage de type Western sur lysat de cellules 293A.	49
Figure 9 :	Détection de l'expression des différents virus non répliatifs par immunobuvardage de type Western sur lysat de cellules MARC-145 infectées.	54
Figure 10 :	Localisation cellulaire de la GP ₅ des différentes versions tronquées par observation directe de la GFP _q dans des cellules A549 infectées.	58
Figure 11 :	Localisation cellulaire de la GP ₅ des différentes versions tronquées par observation directe de la GFP _q dans des cellules MARC-145 infectées.	59
Figure 12 :	Observation en microscopie de la toxicité cellulaire causée par une infection de cellules MARC-145 par trois virus non répliatifs.	62
Figure 13 :	Analyse du pourcentage de mortalité cellulaire et du pourcentage de cellules vertes à la suite d'une infection de cellules MARC-145 par trois virus non répliatifs.	63
Figure 14 :	Détection de l'expression des virus répliatifs/non disséminatifs par immunobuvardage de type Western sur lysat de cellules MARC-145 et 293PS-CymR infectées.	66
Figure 15 :	Niveau d'expression de l'ORF5/GFP _q , en terme d'indice de fluorescence IF, des virus Ad-ORF5/GFP _q -IRES-E1A et Ad-ORF5/GFP _q dans différentes lignées cellulaires à différentes MOI.	70

Liste des abréviations

µg : microgramme
µL : microlitre
Δ : delta, supprimé ou retiré
aa : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
AIF : une flavoprotéine
an : acide nucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATCC : «American Type Culture Collection»
BCG : Bacille Calmette-Guérin
C. elegans : Caenorhabditis elegans
CIP : phosphatase alcaline d'intestin de veau
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CsCl : chlorure de césium
cTa : transactivateur de l'opéron cumate
CymR : répresseur de l'opérateur cumate
CymR-VP16 : transactivateur de l'opérateur cumate
DMEM : Milieu Dulbecco's Modified Eagle's
E. coli : Escherichia coli
ECP : effet cytopathique
ELISA : dosage immunoenzymatique
EUR : Européen
Ex : exemple
FBS : sérum de veau fœtal
g : gramme
GFP : protéine fluorescente verte
GFPq : protéine fluorescente verte (clone provenant de la compagnie Quantum, maintenant Qbiogene, Montréal, Qc)
GP : protéine glycosylée
GST : Glutathione S-transferase
HCMV : cytomégalovirus humain
IF : indice de fluorescence
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
ITR : séquences terminales inversées
Kb : kilobases
LV : virus de Lelystad (souche de référence européenne du VSRRP)
MEM : milieu essentiel minimal
milieu LB : milieu Luria-Bertani
NA : Nord-Américain
Neu : activité neutralisante

ng : nanogrammes
nt : nucléotide
NK : «natural killer»
°C : degré Celsius
ORFs : cadre de lecture ouvert
P2 : opérateur cumate (ou CuO)
PBMC : cellules mononucléaires du sang périphérique
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PEI : polyéthylénimine
pH : potentiel Hydrogène
Pmol : picomole
PS : protéase
rBCG : Bacille Calmette-Guérin recombinant
RPM : rotation par minute
SRRP : Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin
TCID50 : dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50% des cultures infectées
TNF : facteur de nécrose tumoral
TUNEL : «Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling»
U : unité
UTR : région non traduite
VIH : virus humain de l'immunodéficience acquise
HIV-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VAE : virus de l'artérite équine
VFHS : virus de la fièvre hémorragique simienne
VHB : Virus de l'hépatite B
VLD : virus d'élévation de la lactate-déshydrogénase
VP16 : domaine transactivateur de la protéine 16 du virus de l'herpes simplex
VSRRP : virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin
VSV : virus de la stomatite vésiculeuse

1. Introduction

1.1 Le Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP)

1.1.1 Histoire et importance économique

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) découvert en 1987 (Keffaber, 1989) en Amérique et au début des années 90 en Europe (Paton *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991) est maintenant endémique dans presque tous les pays producteurs de porcs (Dea *et al.*, 2000). Il s'agit de la maladie virale la plus économiquement importante pour l'industrie porcine mondiale (Goyal, 1993). Durant la phase aiguë de la maladie, les pertes sont estimées en moyenne à 255 \$ par truie et dans le cas de porcs en engraissement, les pertes varient en moyenne entre 6,25 \$ à 15,25 \$ par porc (Jeff Zimmerman, 2003). De plus, des coûts supplémentaires sont à prévoir pour l'obtention du diagnostic de la maladie du SRRP lors de l'apparition des signes cliniques et pour l'application d'une stratégie d'intervention visant soit à stabiliser l'état de l'infection dans un troupeau de reproduction, stabiliser l'état de l'infection dans un élevage de porcs en engraissement, éliminer le SRRP dans un troupeau de reproduction ou éliminer le SRRP dans un élevage de porcs en engraissement (Jeff Zimmerman, 2003).

1.1.2 Signes cliniques et pathologie

Le SRRP est caractérisé par des problèmes reproducteurs, affectant les truies de plusieurs parités, tels que: des avortements tardifs, des augmentations du nombre de porcelets mort-nés, momifiés, petits ou nés faibles, des réductions jusqu'à 50 % du taux de conception et un lent retour en oestrus (Goyal, 1993; Dea *et al.*, 2000). Les truies peuvent également souffrir d'anorexie, de fièvre, de léthargie, d'agalactie, de décoloration rouge ou bleue des oreilles et de la vulve (Rossow, 1998). Quant aux porcs nouveau-nés qui sont infectés, les signes les plus caractéristiques sont la dyspnée ou la

tachypnée résultant en une mortalité de presque 100 % (Rossow, 1998). Les problèmes respiratoires pouvant survenir chez les porcs de tous âges incluent des pneumonies lymphomononucléaire interstitielles et des détresses respiratoires (Dea *et al.*, 2000). De plus, d'autres symptômes d'ordre plus général apparaissent tels qu'une conjonctivite, une dépression, une diarrhée, un vomissement et une plus grande sensibilité aux infections secondaires à *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumonia* et *Salmonella* (Goyal, 1993).

1.2. L'agent étiologique : le Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP)

1.2.1 Classification

L'agent étiologique du SRRP, le virus du SRRP (VSRRP) fait partie de l'ordre des *Nidovirales*, dans la famille des *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997). Les familles *Coronaviridae* et *Roniviridae* sont également incluses dans cet ordre (Mayo, 2002). À l'intérieur du genre *Arterivirus* se trouve: le virus d'élévation de la lactate déshydrogénase (VLD), le virus de l'artérite équine (VAE), le virus de la fièvre hémorragique simienne (VFHS) et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) (Dea *et al.*, 2000).

Les multiples isolats de VSRRP se divisent en deux génogroupes soit celui Nord-américain (NA) et celui européen (EUR) et il existe des différences génomiques et antigéniques entre ces groupes. Il n'y a que 63 % d'identité en nucléotides (nt), pour le génome viral entier, entre les deux génogroupes (Allende *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000). Des différences antigéniques entre les génogroupes ont été observées suite à la réactivité avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de la nucléocapside (N) (Nelson *et al.*, 1993).

1.2.2 Réplication et transmission

Le VSRRP se réplique majoritairement dans les monocytes et les macrophages. En culture cellulaire il est possible de le maintenir dans les macrophages alvéolaires porcins, et les cellules de reins de singe vert d'Afrique comme les MA-104, les MARC-145 et les CL2621 (Benfield *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993). Le VSRRP est un virus à ARN simple brin de polarité positive. La réplication de ce type de virus dépend de l'ARN polymérase ARN dépendante (Verheije *et al.*, 2002). L'ARN génomique de polarité positive sert de matrice pour la synthèse des brins d'ARN de polarité négative et ceux-ci servent de matrice pour la formation de nouveaux brins positifs (Verheije *et al.*, 2002). De plus, la synthèse des ARNm du VSRRP se fait en réseau d'ARNm sous génomiques dans un procédé de transcription discontinue d'ARNm. En 5', le VSRRP possède une région non traduite (UTR) avec une coiffe et une autre région non traduite (UTR) en 3' avec une queue de poly A. En utilisant un clone infectieux d'une souche de référence Européenne, il a été démontré qu'une région de 34 nucléotides (nt) dans l'ORF7 est nécessaire à la synthèse d'ARNm génomique et sous génomiques de polarité négative. Cette région de 34 nt, bien conservée entre les différents isolats de VSRRP, possède une structure en épingle à cheveux qui interagit avec une autre épingle à cheveux présente dans le 3' UTR. Cette interaction entre les structures secondaires est nécessaire à la réplication (Verheije *et al.*, 2002). Les connaissances sur le mécanisme de réplication du génome du VSRRP sont, encore à ce jour, très limitées. Quant à son mode de transmission, hormis le contact direct entre des animaux infectés et des animaux naïfs, les aérosols et la transmission par la semence sont également à considérer bien que rien n'ait encore été démontré (Rossow, 1998).

1.2.3 Organisation du génome

Le VSRRP est un virus enveloppé, contenant une capsidie icosaédrique et un génome de 15Kb (Dea *et al.*, 2000) (Figure 1). Ce génome encode 9 différents cadres de lectures ouverts (ORF) soit : ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORFs3-7 (Figure 2). Les ORFs 1a

et 1b représentent la majorité du génome du VSRRP soit 75 % et codent pour les protéines non structurales comme la réplicase et l'ARN polymérase ARN dépendante (Dea *et al.*, 2000). Quant aux autres protéines, certaines sont des protéines structurales mineures : GP_{2a} ou P_{2b}, GP₃, GP₄. D'autres, comme la M (ORF6) et la GP₅, sont des protéines majeures de l'enveloppe et la N (ORF7) est une protéine majeure de la nucléocapside (Dea *et al.*, 2000). Dans le virion et dans les cellules infectées, la GP₅ s'associe à la M sous forme d'hétérodimère par l'intermédiaire de pont disulfures (Mardassi *et al.*, 1996). Dans le cadre de ce projet, l'attention sera portée surtout sur la GP₅ encodée par l'ORF5.

1.2.4 La protéine majeure glycosylée de l'enveloppe GP₅

La GP₅ est la protéine majeure glycosylée de l'enveloppe et elle a une masse moléculaire entre 24.5-26 kDa (Dea *et al.*, 2000). Il n'y a que 52 % à 55 % d'identité en aa entre la GP₅ des souches NA et celle de la souche de référence EUR appelée virus de Lelystad (LV). Le nombre d'aa varie entre 200 aa pour les souches NA *versus* 201 aa chez celles EUR. La GP₅ est la protéine structurale la plus variable, ce qui explique le faible pourcentage d'identité en aa (Mardassi *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1995). Il est connu que chez les isolats NA, la région hypervariable de cette protéine se retrouve entre les aa 26-39 (figure 3) (Pirzadeh et Dea, 1998; Pirzadeh *et al.*, 1998). *In vivo*, la GP₅ induit une immunité protectrice et l'induction d'anticorps neutralisants (Pirzadeh et Dea, 1997; Plana Duran *et al.*, 1997; Pirzadeh et Dea, 1998) ce qui en fait une bonne cible pour le développement de vaccin. Par contre, *in vitro*, cette protéine est reconnue pour induire l'apoptose (Suarez *et al.*, 1996). Cette propriété sera décrite dans la section 1.3.3 du présent mémoire. Parmi les régions importantes de la GP₅ (figure 3), les aa 90-119, auraient un rôle à jouer dans l'apoptose, tel que décrit dans une étude effectuée avec un isolat EUR (Fernandez *et al.*, 2002). Quant aux régions contenant les épitopes neutralisants, il s'agit des aa 29-35 chez une sous population d'un isolat allemand (Wissink *et al.*, 2003) et 36-52 dans le cas de l'isolat NA VR-2332 (Plagemann *et al.*, 2002). Quant à l'équipe de Ostrowski *et al.*, elle a identifié deux épitopes indépendants dans l'ectodomaine de la GP₅, dont un des deux épitopes est bien conservé pour plusieurs

isolats du VSRRP (Ostrowski *et al.*, 2002). Les deux épitopes peuvent être reconnus en même temps par différentes populations d'anticorps dans le sérum sans interférence entre eux. Mais l'augmentation de la quantité d'anticorps dirigés contre l'épitope B (37-44 aa) correspond à une diminution du titre en anticorps contre l'épitope A (27-31 aa). Au niveau fonctionnel, l'épitope A est immunodominant et induit une production rapide d'anticorps suite à l'infection par le VSRRP mais ces anticorps n'ont pas d'activité neutralisante. Ainsi, les anticorps neutralisants sont ceux dirigés contre l'épitope B et ils apparaissent plus tardivement (Ostrowski *et al.*, 2002).

Figure 1 : Structure du virion du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.
(Adapté de Dea *et al.* (Dea *et al.*, 2000))

Le N représente la protéine de la nucléocapside, le M représente la protéine de la matrice et le génome est un ARN simple brin (ssRNA) de polarité positive avec une coiffe en 5' et une queue poly A (AAAA) en 3'. La plus récente des protéines du VSRRP qui a été découverte, soit la P_{2b} n'est pas représentée sur cette figure puisque son rôle et sa localisation dans le virion demeurent inconnus (Wu *et al.*, 2005).

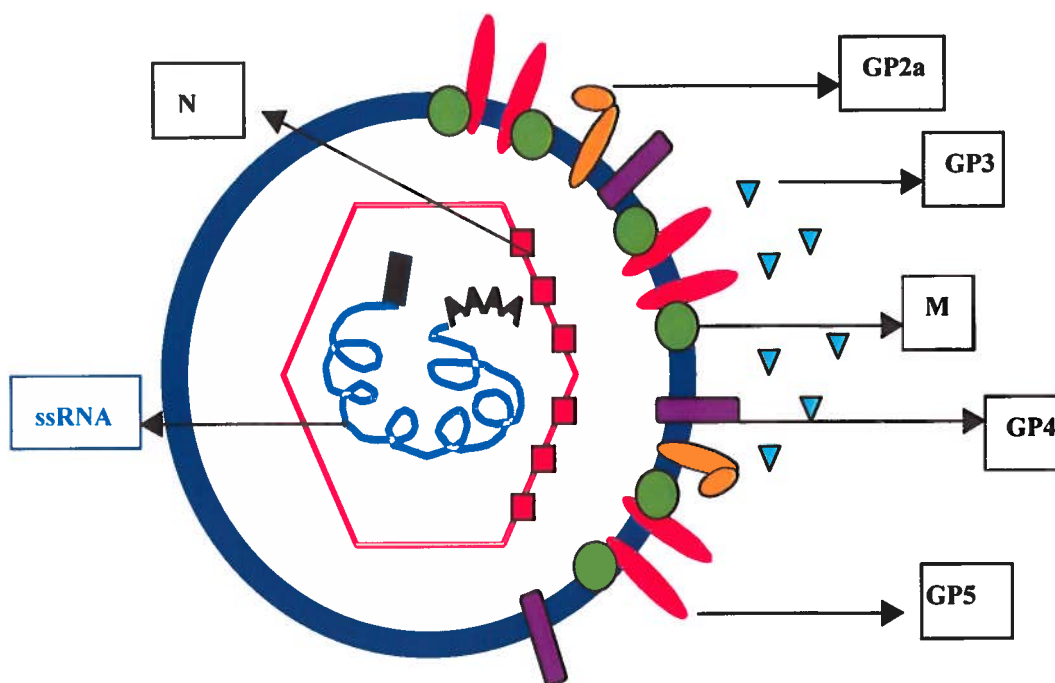


Figure 2 : Organisation du génome, stratégie de réplication et produits d'expression des différents gènes du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.
 (Adapté de Gagnon *et al.* (Gagnon, 2001))

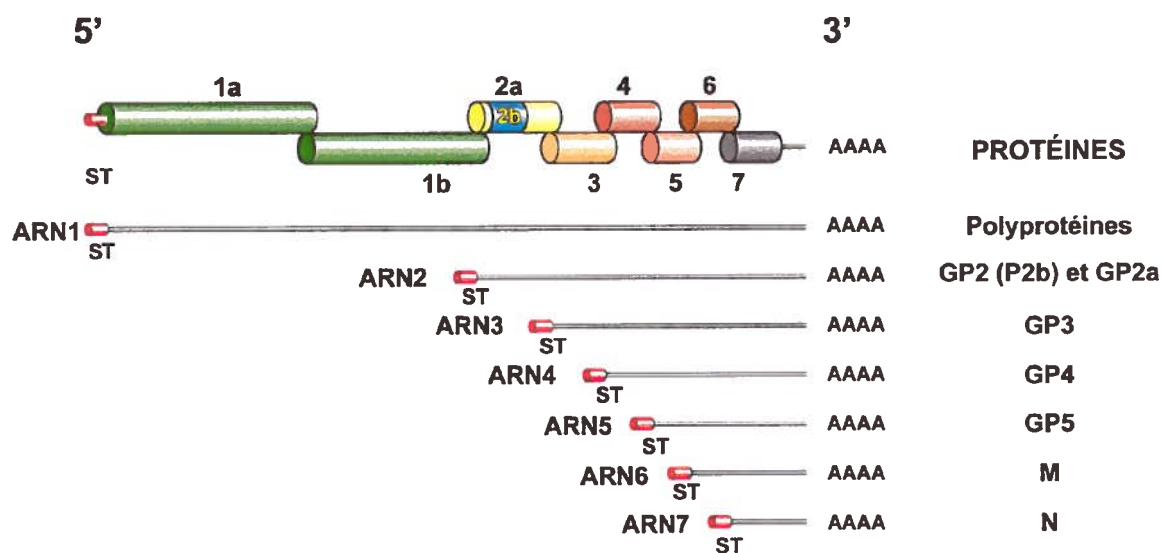
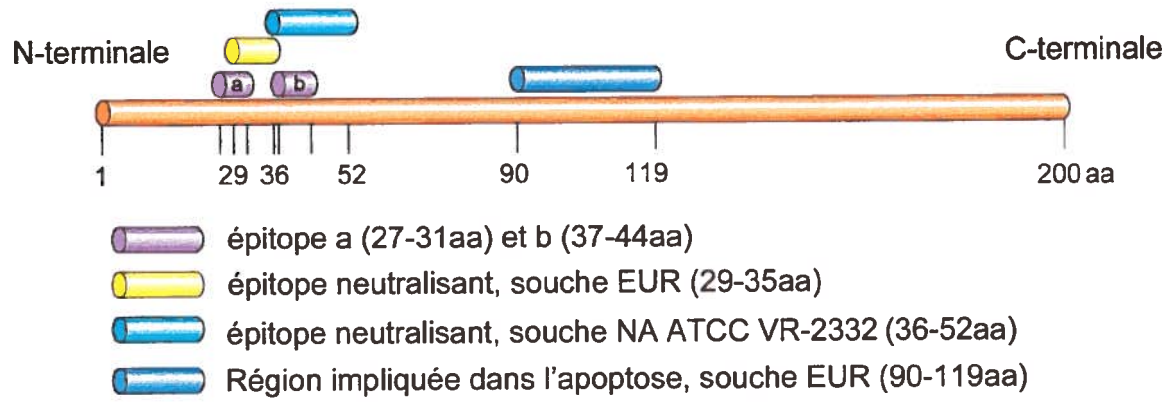


Figure 3 : Schéma des différentes régions importantes du génome du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.



1.3 Défense de l'hôte face à un agent pathogène

Le corps humain utilise plusieurs mécanismes de protection pour lutter contre divers agents étrangers (microorganismes, nourriture, agent chimiques, pollen, etc.). Ces mécanismes sont classés en deux catégories, soit l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée est constituée de toutes les défenses que l'individu possède déjà à sa naissance et qui sont disponibles en une période de temps très courte. Certains de ces composants sont une barrière physique tel que : la peau, les muqueuses et le réflexe de toux. Certains autres composants sont internes, tel que : la fièvre, les interférons, et autres substances relarguées par les leucocytes (beta-lysine, lysozyme, etc.), les cellules phagocytaires (granulocytes, macrophages) et les cellules microgliales du système nerveux central (Benjamini E, 2000). Quant à l'immunité acquise, elle nécessite un contact avec l'agent étranger et est spécifique à celui-ci. Elle stimule et active certaines cellules appelées lymphocytes. L'immunité acquise se divise en immunité humorale (lymphocytes B) et en immunité cellulaire (lymphocyte T). Lorsqu'un agent étranger pénètre dans l'organisme, les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages ou les cellules dendritiques traitent et présentent l'antigène via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux lymphocytes T. Selon le type de CMH qui est utilisé, le type de lymphocyte T varie; le CMH de classe I présente aux cellules T auxiliaires et le CMH de classe II présente aux lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes T auxiliaires ont pour rôle de relarguer des cytokines qui sont, entre autres, des signaux d'activation pour les lymphocytes B. Les lymphocytes T cytotoxiques, eux, sont capables de tuer directement leur cible au contact de celle-ci. Quant à l'immunité humorale, elle est stimulée par la présentation directe de l'antigène aux lymphocytes B (sans passer par les cellules présentatrices d'antigènes ou le CMH) et permet l'activation de ce lymphocyte pour produire et sécréter des protéines solubles appelées immunoglobulines (Ig). La liaison de l'Ig à l'antigène permettra alors soit la lyse de la cible ou la phagocytose de cette même cible par les cellules de l'immunité innée (exemple : macrophage). (Richard A. Goldsby, 2000; Charles A. Janeway, 2001)

Les connaissances disponibles sur les composants du système immunitaire qui sont effectifs dans le cas d'une infection au VSRRP sont, encore aujourd'hui, limitées.

1.3.1 La réponse humorale VSRRP spécifique durant l'infection

L'infection au VSRRP se divise en deux phases, soit la phase aiguë et la phase chronique ou persistante. Suite à l'infection de l'animal par le VSRRP, il y a apparition de signes cliniques, répllication virale dans les macrophages et présence de virémie. Beaucoup de virus se retrouvent dans les différents tissus et dans le sérum de l'animal jusqu'à un mois PI (post-infection) (Lopez et Osorio, 2004). Ensuite vient la phase persistante pendant laquelle le virus reste présent surtout dans les tissus lymphoïdes (Benfield, 1998) et continue de se répliquer mais de façon beaucoup moins importante. Il faut plus de 150 jours PI pour que l'infection soit complètement éliminée de l'organisme (Allende *et al.*, 2000). La présence d'une phase chronique indique que la réponse immunitaire protectrice n'est pas efficace dans les débuts de la phase PI malgré la présence d'Ac VSRRP spécifiques (Yoon *et al.*, 1994; Labarque *et al.*, 2000). Une réponse en anticorps anti-VSRRP peut-être détectée entre les jours 7 et 9 PI par un test ELISA (Lopez et Osorio, 2004) mais ces anticorps ne sont pas neutralisants *in vitro* (Yoon *et al.*, 1994). Les anticorps anti-VSRRP ayant une activité neutralisante (Neu) n'apparaissent qu'à partir de la quatrième semaine PI (Meier *et al.*, 2003),(Yoon *et al.*, 1994). Certains auteurs ont conclut à l'incapacité des anticorps Neu à protéger de l'infection au VSRRP puisqu'à long terme il existe une persistance virale dans les amygdales (Snijder EJ, 2001). Par contre, d'autres articles démontrent une corrélation entre l'apparition d'anticorps Neu et la diminution de la virémie (Murtaugh, 2003). De plus, l'équipe de Murtaugh en 2003 a établi un lien entre l'élimination du virus de l'organisme et l'apparition d'Ac Neu anti-GP₅ (Murtaugh, 2003). Plus de détails seront donnés sur le potentiel de l'utilisation de la GP₅ à des fins de vaccination à la section 1.4.

1.3.2 La réponse cellulaire durant l'infection au VSRRP

L'activation du NF- κ B lors d'une infection virale induit, entre autre, la transcription d'interféron de type I, et stimule d'autres molécules impliquées dans la réponse immunitaire telles que les cytokines, les chémokines, les molécules d'adhésions et les

métalloprotéinases de matrice (MMPs) (Caamano et Hunter, 2002; Santoro *et al.*, 2003). Ainsi, certains virus bloquent la voie de NF- κ B pour échapper à la réponse immunitaire, tel que le virus de la vaccine, le virus de la fièvre porcine Africaine, le virus de l'influenza A et le mengovirus (Powell *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Zoll *et al.*, 2002; Shisler et Jin, 2004). Par contre, certains autres virus (VIH, herpesvirus, virus de l'hépatite C, virus de l'encéphalomyocardite, réovirus, virus de la dengue, virus du Nil Occidental et virus de l'herpes simplex) activent délibérément la voie de NF- κ B pour aider à la réplication virale ou pour contrôler la prolifération cellulaire de l'hôte (Schwarz *et al.*, 1998; Connolly *et al.*, 2000; Jan *et al.*, 2000; Goodkin *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 2003; Waris *et al.*, 2003). En ce qui concerne le VSRRP, puisqu'il interfère directement avec l'activation transcriptionnelle de l'interféron alpha (IFN α) (Miller *et al.*, 2004), on se serait attendu à ce qu'il inhibe la voie de NF- κ B pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Or, une récente étude a démontrée que le VSRRP active cette voie dans les macrophages alvéolaires porcins (Lee et Kleiboeker, 2005). Ainsi, le VSRRP pourrait bloquer l'expression de l'IFN α à un niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel mais sans inhiber la voie de NF- κ B (Lee et Kleiboeker, 2005).

La sécrétion, par les cellules, d'IFN α , d'IFN β et le relâchement de cytokines permet d'interagir avec un type de cellules T naïves et de promouvoir leur conversion en cellules (spécifiques au virus) sécrétrices d'IFN γ (Doly *et al.*, 1998). La présence d'IFN γ a été observée dans les poumons de porcs infectés au VSRRP et cet IFN semble être un composant nécessaire de la réponse de l'hôte au pathogène (Bassaganya-Riera *et al.*, 2004) puisque le VSRRP y est susceptible (Bautista et Molitor, 1999). Par contre, ce virus a tendance à ne pas provoquer la réponse en IFN α des cellules T auxiliaires (Meier *et al.*, 2004). Il interfère directement avec l'activation transcriptionnelle de l'IFN α (Miller *et al.*, 2004). L'ARN double brin est formé durant la réplication de plusieurs virus et est important pour la synthèse d'IFN. Or, dans des cellules MARC-145 exposées simultanément à l'ARN double brin (provenant de levures) et au VSRRP, l'induction d'IFN par l'ARN double brin est inhibée de façon significative par le VSRRP (Miller *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré qu'une meilleure stimulation de l'immunité anti-VSRRP est disponible lors de l'exposition à l'IFN α (Meier *et al.*, 2004) et que la réplication du virus est inhibée (Albina *et al.*, 1998). Une autre façon de stimuler la

réponse des T auxiliaires pour contrer une infection virale est d'utiliser la voie de l'interleukine-12 (IL-12) (Cousens *et al.*, 1999), mais le VSRRP est un faible stimulateur de la production d'IL-12 (Royae *et al.*, 2004). Il a été démontré que l'ajout d'IL-12 à différents moments de la vaccination a augmenté la réponse immunitaire de l'hôte au VSRRP (Foss *et al.*, 2002). Malgré que l'utilisation d'IFN α et d'IL-12 comme adjuvant a stimulé la réponse des cellules T auxiliaires et a permis la production d'une réponse en IFN γ spécifique au VSRRP, un immunomodulateur plus fort devra être utilisé pour contrer la tendance du VSRRP à ne pas promouvoir la réponse des cellules T auxiliaires (Meier *et al.*, 2004).

En 2004, Xiao *et al.*, ont étudié la réponse à médiation cellulaire en se concentrant sur la réponse des cellules T dans les tissus lymphoïdes (Xiao *et al.*, 2004). Selon eux, l'étude de ces cellules serait plus adéquate que celle des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) car les PBMC ne contiennent que 2 % des cellules T totales du corps et ne sont ni le site de réplication virale, ni le site de présentation des antigènes (Westermann et Pabst, 1992) contrairement aux cellules T des tissus lymphoïdes. L'équipe de Xiao a essayé de faire un lien entre la réponse immunitaire des cellules T spécifiques et la charge virale dans les tissus lymphoïdes secondaires. Ils ont démontré que la réponse en cellules T spécifique à l'antigène au site de l'infection est variable, faible et indépendante de la charge virale. En effet, la charge virale est 1000 fois plus élevée dans les amygdales que dans la rate mais c'est dans la rate que la quantité de cellules T antigène spécifiques est plus élevée (1000 fois plus élevée) (Xiao *et al.*, 2004). En plus de cette absence de corrélation entre la réponse en cellules T et la charge virale, ils ont aussi observé que les proportions de cellules T CD4+, CD8+ et CD4+CD8+ ne sont pas altérées par le VSRRP dans les poumons, le sang et les tissus lymphoïdes (Xiao *et al.*, 2004). Il a aussi été rapporté que la réponse à médiation cellulaire est faible dans les premières 12 semaines de l'infection et se développe progressivement pendant plus de 20 semaines, ce qui pourrait être responsable de l'élimination de la persistance virale (Meier *et al.*, 2003). Or, Xiao a remarqué que la charge virale dans les poumons et les tissus lymphoïdes secondaires diminue de 1000 fois entre le jour 19 PI et le jour 67 PI. Donc une augmentation de cellules T qui débute après le déclin majeur de la charge virale ne peut pas être associée à la résolution de la persistance virale (Xiao *et al.*, 2004). Leur

hypothèse pour expliquer l'élimination de la persistance virale est la suivante : la grande majorité des macrophages ne seraient pas permissifs à l'infection par le VSRRP et l'élimination des quelques macrophages permissifs expliquerait le déclin de la charge virale. L'élimination complète du virus pourrait alors se faire par les anticorps neutralisants, la faible réponse en cellules T spécifiques et l'augmentation de d'autres cellules comme les NK («natural killer») (Xiao *et al.*, 2004). Cela expliquerait également le manque de réponse immunitaire observée suite à une infection défiée par une souche homologue de VSRRP car le virus introduit ne pourrait pas trouver de macrophages permissifs (Foss *et al.*, 2002).

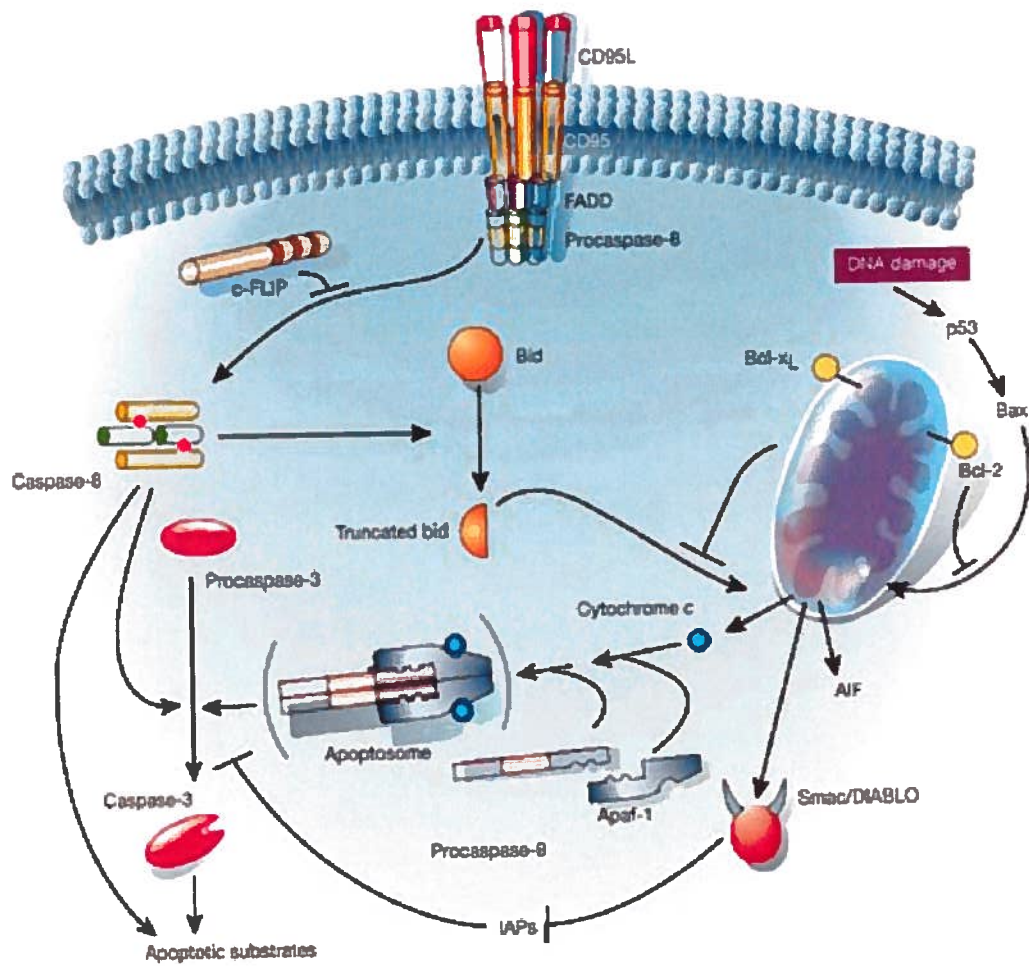
Une autre étude sur la persistance virale a montré que l'élimination rapide de particules virales infectieuses de VSRRP et d'ARN viral du sérum et de la rate est en corrélation avec l'augmentation de cellules T cytotoxiques alors que dans les amygdales et les ganglions lymphatiques médiastinaux il n'y a peu ou pas de changement dans la quantité de cellules T cytotoxiques, expliquant donc la persistance virale (Lamontagne *et al.*, 2003). De plus, les cellules des amygdales et des ganglions lymphatiques médiastinaux ne répondent pas à la stimulation mitogénique ce qui expliquerait que le virus continu à se répliquer (Lamontagne *et al.*, 2003). Lorsque les cellules T cytotoxiques sont stimulées mais que leur réactivité à la stimulation mitogénique est faible, cela peut être du à de l'anergie ou une mort de lymphocytes activés (Lamontagne *et al.*, 2003). De plus, la quantité de cellules NK n'a pas été significativement modifiée lors de l'infection au VSRRP ce qui démontre que l'immunité innée n'est pas fortement stimulée dans les organes lymphoïdes ou que ces nouvelles cellules NK sont recrutées dans les poumons (Samsom *et al.*, 2000).

1.3.3 La GP₅ et l'apoptose

Suarez et ses collaborateurs ont rapportés pour la première fois en 1996 que des cellules infectées par un vecteur vaccinia exprimant l'ORF5 du VSRRP d'une souche EUR montraient une toxicité de type apoptose (Suarez *et al.*, 1996). En effet, ils observèrent un compactage et une marginalisation de la chromatine nucléaire, une circonvolution des membranes nucléaires et cytoplasmiques, une condensation du cytoplasme et une dégradation de l'ARNr. Récemment, il a été démontré que la GP₅ d'une souche NA

pouvait aussi induire l'apoptose dans les cellules MARC-145 (Gagnon *et al.*, 2003). Tout d'abord, l'apoptose est une mort cellulaire programmée qui permet à un organisme de réguler le nombre de cellules, la taille des tissus et l'état des cellules le constituant. Ainsi, l'organisme peut se débarrasser de cellules vieilles, inutiles ou qui déséquilibrent son homéostasie (Hengartner, 2000). Les effecteurs de cette mort cellulaire programmée sont des enzymes appelées caspases qui ont la capacité de cliver des substrats générant une fragmentation de l'ADN, une condensation du noyau et un clivage de certaines protéines du cytosquelette dérangeant ainsi l'intégrité cellulaire (Hengartner, 2000). Les deux principales voies apoptotiques sont : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Figure 4) (Hengartner, 2000). Dans la voie des récepteurs de mort, le ligand CD95 se lie à son récepteur à la surface des cellules et active une cascade de caspases qui débute par l'autoclivage de la procaspase-8 en caspase-8 qui elle-même active la procaspase-3. Quant à l'apoptose mitochondriale, elle est utilisée, entre autre, lors d'un stress à l'intérieur de la cellule comme un dommage à l'ADN. Ces stress internes modifie l'équilibre entre les facteurs pro apoptotiques (ex : Bax, Bak) et anti-apoptotiques (ex : Bcl-2, Bcl-x_L). Ces différents membres de famille pro et anti-apoptotique agissent à la surface de la mitochondrie en influençant les canaux et les pores qui contrôlent l'entrée et la sortie de cytochrome C.

Figure 4 : Les deux principales voies d'apoptose : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Hengartner, 2000).



Ainsi, l'homéostasie de la mitochondrie est dérangée, le cytochrome C et d'autres protéines comme l'AIF (une flavoprotéine), Smac-DIABLO et plusieurs apoptotiques (procaspase-2, -3, et -9) sont relâchées. Le cytochrome C, la procaspase-9 et une molécule appelée Apaf-1 s'associent pour former l'apoptosome; cet apoptosome possède la capacité d'activer la procaspase-3 et de débiter la cascade apoptotique qui mènera à la destruction de la cellule. Puisque l'issue des deux cascades mène à la destruction cellulaire, il est important d'avoir des mécanismes qui permettent d'arrêter le processus en cas d'activation erronée ou prématurée de l'apoptose. La voie des récepteurs de mort possède une molécule appelée c-FLIP qui peut bloquer l'activation de la procaspase-8 et la voie mitochondriale possède des protéines IAP qui bloquent l'activation de la procaspase 3. Quant à Smac-DIABLO, relâché par la mitochondrie, ce complexe de protéines inhibe les IAP, permettant de recommencer l'activation de la procaspase-3 (Hengartner, 2000). Ainsi, la mort cellulaire programmée (apoptose) est un processus complexe qui fait appel à de nombreuses protéines pro ou anti-apoptotiques et dont le secret réside dans l'équilibre entre ces différentes protéines, leur présence ou absence et leur concentration réciproque.

En ce qui concerne l'apoptose causée par la GP₅, tel que rapporté par Suarez *et al.*, elle est indépendante de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Suarez *et al.*, 1996), ce qui suggèrerait soit un mécanisme d'apoptose qui se produit en aval de Bcl-2, soit un mécanisme apoptotique autre que la cascade mitochondriale. Par contre, selon Lachapelle *et al.* (communication personnelle), les cellules infectées avec un adénovirus recombinant (recAdv) exprimant l'ORF5 du VSRRP montrent une augmentation de caspase 3, une fragmentation de l'ADN à l'intérieur des cellules, un relâchement de cytochrome C et une activation de caspase 9 sans activation de caspase 8. Ainsi, ces derniers résultats préconiseraient une apoptose de type mitochondriale dans le cas de l'ORF5 de la souche NA IAF-Klop. Bien qu'il y ait beaucoup de cellules apoptotiques dans les tissus des porcs infectés avec le VSRRP, des études ont démontré que les cellules apoptotiques ne sont pas celles qui sont infectées par le VSRRP (Sur *et al.*, 1998), (Sirinarumitr *et al.*, 1998), (Labarque *et al.*, 2003). Dans des cellules MARC-145 infectées par la VSRRP, une forme d'apoptose atypique a été rapportée et la co-

localisation d'antigènes pour le VSRRP et de fragmentation d'ADN génomique (détecté par la méthode de TUNEL) ont été observés dans ces cellules (Kim *et al.*, 2002). Par une absorption de bleu de trypan, l'équipe de Kim *et al.* montre que la majorité des cellules mortes dans leurs expériences seraient nécrotiques au lieu d'être apoptotiques. Plus récemment, l'équipe de Miller et Fox a montré que des cellules MARC-145 infectées par le VSRRP ont plus tendance à la nécrose qu'à l'apoptose (Miller et Fox, 2004). La nécrose commence par un dommage à la membrane cellulaire qui nuit dans le maintien de l'homéostasie et résulte en une entrée d'eau et d'ions Ca^{2+} extracellulaires. Les organelles (comme la mitochondrie) se gonflent et se lysent, puis leur contenu cellulaire se répand dans le milieu extracellulaire étant donné que la membrane cytoplasmique est endommagée. La nécrose, contrairement à l'apoptose peut être associée à une forte réponse inflammatoire (Schwartz *et al.*, 1993). Pour différencier entre apoptose et nécrose, les auteurs ont mesuré l'expression de gènes reliés à l'apoptose par biopuce en plus de détecter la fragmentation de l'ADN génomique. Vingt-quatre heures après l'infection, aucun changement significatif dans l'abondance des transcrits de 26 gènes reliés à l'apoptose n'a pu être observé, malgré la réplication à de bon niveau du VSRRP dans ces cellules. Une augmentation d'ATF-3 (un suppresseur de l'apoptose causée par p53) et de Hsp70 (qui nuit à la dimérisation d'APAF-1 et au relargage du cytochrome C) ont été observées ce qui pourrait signifier que le VSRRP diminue ou empêche l'apoptose cellulaire après l'infection (Miller et Fox, 2004). De plus, suite à une augmentation de l'inoculum viral, l'apoptose est demeurée stable mais la nécrose a augmentée de façon proportionnelle (Miller et Fox, 2004). Il a également été démontré par plusieurs groupes de chercheurs que la majorité des cellules qui entrent en apoptose ne sont pas les cellules infectées par le VSRRP mais bien les cellules avoisinantes d'où le qualificatif d'apoptose «bystander». Ainsi, selon Sur *et al.*, les cellules testiculaires qui meurent d'apoptose ne sont pas les mêmes cellules que celles qui sont infectées par le VSRRP après analyse TUNEL (Sur *et al.*, 1997). Le même phénomène est observé *in vivo* et *in vitro* dans les cellules des poumons et des tissus lymphoïdes (Sirinarumitr *et al.*, 1998; Sur *et al.*, 1998). Selon Sirinarumitr *et al.*, *in vivo*, certaines cellules sont simultanément positives pour l'apoptose et l'infection au VSRRP mais ce serait vraisemblablement des macrophages dans les ganglions lymphatiques qui aurait phagocyté des lymphocytes ou des cellules

plasmatiques infectés et mourants (Sirinarumitr *et al.*, 1998). Plus récemment, Labarque *et al.* a dénombré entre 9-39% des cellules des poumons et 13-30% des cellules de lavage bronchoalvéolaire qui seraient simultanément infectées par le VSRRP et apoptotiques (Labarque *et al.*, 2003). Mais la majorité des autres cellules apoptotiques restent des cellules avoisinantes, non infectées. Bien que le mécanisme d'apoptose des cellules avoisinantes demeure inconnu, plusieurs hypothèses ont été émises. Différentes molécules libérées par les macrophages pourraient induire l'apoptose des cellules avoisinantes tel que l'oxyde de nitrate, les espèces actives dérivées de l'oxygène, ou l'interleukine 1 (IL-1) (Labarque *et al.*, 2003). Il a été observé que l'augmentation d'IL-1 et d'IL-10 correspondait à l'augmentation du nombre de cellules avoisinantes apoptotiques (Labarque *et al.*, 2003). Par analogie avec ce qui se produit chez le virus de l'immunodéficience humaine et le virus de l'immunodéficience simienne, ce type d'apoptose pourrait être dû à un relargage local de cytokines apoptogéniques (tel que le TNF α) (Finkel *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995; Nagata, 1997). Peut-être y a-t-il aussi un lien entre ce type d'apoptose et celle qui est induite par le relargage de FasL des macrophages (après phagocytose) entraînant l'apoptose des leucocytes avoisinants observée par Brown *et al.* (Brown et Savill, 1999). Une autre hypothèse concerne le rôle que joue la glycoprotéine de l'enveloppe GP₅ dans l'apoptose. En effet, peut-être que l'induction de l'apoptose des cellules avoisinantes est dû à l'attachement de particules virales à la surface des cellules sans pénétration virale (Labarque *et al.*, 2003).

En ce qui concerne les cellules qui sont simultanément positives pour l'apoptose et pour la présence de VSRRP, il pourrait s'agir d'un mécanisme permettant au virus d'échapper au système immunitaire tel que décrit pour le VIH de type 1 (Spetz *et al.*, 1999), l'Herpes simplex de type 2 (Asano *et al.*, 1999) et le virus Epstein Barr (Holmgren *et al.*, 1999). Les virus contenus dans des cellules apoptotiques sont phagocytés par des macrophages et se retrouvent ainsi à l'abri du système immunitaire et des antigènes permettant de les éliminer. Ceci pourrait se produire lors de la phase persistante de l'infection.

Certains spécialistes du VSRRP doutent de la véracité de l'apoptose causée par la GP₅. Ainsi, l'équipe du Dr Dongwan Yoo en Ontario a créé une lignée stable de cellules HeLa exprimant la GP₅ du VSRRP sous le contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline. En utilisant cette lignée cellulaire stable, cette équipe n'a pas observée d'apoptose due à

la présence de la GP₅ dans les cellules HeLa en conditions induites (Lee *et al.*, 2004). Ils n'ont également pas trouvé de présence d'apoptose dans les cellules avoisinantes MARC-145 lors d'expérience de co-culture MARC-145/HeLa-GP₅ en conditions induites (Lee *et al.*, 2004). Ainsi, les auteurs émettent l'hypothèse que l'apoptose rapportée par Suarez *et al.* en 1996 (Suarez *et al.*, 1996) et par Fernandez *et al.* en 2002 (Fernandez *et al.*, 2002) serait une apoptose atypique causée par la fusion de la GP₅ de ces auteurs avec des marqueurs histidines ou des marqueurs antigéniques ou bien de l'utilisation d'un vecteur viral vaccinia pour exprimer la GP₅ dans ces mêmes études.

1.4. La vaccination

1.4.1 Vaccination SRRP

Il existe deux principaux types de vaccins communément utilisés dans les élevages pour essayer de minimiser les pertes dues à la maladie du SRRP, soit les vaccins tués et les vaccins atténués. Les vaccins tués (par exemple : CyBlue, Laboratorios Sobrino, Girona, Espagne) provoquent une stimulation de la réponse immunitaire qui est faible et peu persistante. Quant aux vaccins atténués tels que le Ingelvac PRRS ATP (Boehringer, Bracknell, Royaume-Uni), ils provoquent une meilleure stimulation de la réponse immunitaire que les vaccins tués mais comportent des désavantages non négligeables: il y a présence d'une virémie induite par le virus vaccinal, ils peuvent provoquer des avortements chez la truie gestante, il y a possibilité de réactivation du virus vaccinal causant une transmission aux autres animaux et ils ne permettent pas la distinction entre un animal vacciné ou naturellement infecté (Botner *et al.*, 1997), (Madsen *et al.*, 1998). Cette distinction entre les animaux infectés et ceux vaccinés est importante du point de vue du marché de l'exportation. De plus, une immunité préexistante de la mère peut interférer avec la vaccination traditionnelle des nouveaux-nés. Ainsi, il y a une nécessité de développer de meilleurs vaccins permettant de contrôler le VSRRP dans les élevages porcins puisque les vaccins commerciaux offrent une protection incomplète (Mengeling *et al.*, 2003).

La vaccination génétique consiste à délivrer dans les cellules à l'aide de vecteurs, les gènes codant pour les protéines contre lesquelles on veut stimuler la réponse immunitaire de l'hôte. Il peut s'agir d'ADN nu mais l'efficacité de transfection de certaines cellules reste faible. Il est souvent nécessaire d'utiliser un adjuvant et/ou de faire un rappel pour obtenir une bonne stimulation de la réponse immunitaire et cette méthode demande une grande quantité d'ADN pour vacciner des gros animaux tels que les porcs (Babiuk *et al.*, 2000). Il peut aussi s'agir de vecteurs viraux exprimant la protéine choisie. Les constructions ADN sont faciles à créer, modifier, purifier et sont extrêmement stables (Barry et Johnston, 1997), (Tobiasch *et al.*, 2001).

En ce qui concerne le VSRRP, il a été démontré que la GP₅ est une bonne candidate pour faire un vaccin recombinant qui pourrait stimuler une réponse immunitaire protectrice sans risquer des problèmes de virémie et de réactivation virale. En effet, des anticorps monoclonaux spécifiques peuvent, *in vitro*, bloquer l'infection de cellules permissives par le VSRRP (Pirzadeh et Dea, 1997). De plus, en 1998, Pirzadeh et Dea ont démontré qu'avec un plasmide recombinant exprimant l'ORF5 sous le contrôle du promoteur HCMV, ils obtenaient une bonne stimulation de la réponse immunitaire, sans virémie ni lésions. Par contre, avec un système où l'ORF5 est produite sous forme de protéine par *E. coli*, la GST-ORF5, il y a une bonne stimulation de la réponse immunitaire mais pas de protection lors d'une infection défiée; les signes et lésions observées sont même plus sévères que chez les animaux non vaccinés mais infectés (Pirzadeh et Dea, 1998).

D'autres expériences ont été tentées en utilisant la bactérie atténuée *Salmonella typhimurium aroA* comme un vecteur d'expression Barr contenant l'ORF5 du VSRRP et délivré par la bactérie sous forme de vaccin oral chez la souris (Jiang *et al.*, 2004). Les résultats ont démontré une réponse immunitaire GP₅-spécifique (Jiang *et al.*, 2004). Il reste à voir si cette réponse est protectrice lors d'une infection défiée chez le porc. Le vaccin anti-tuberculeux *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-guérin, BCG) est un des vaccins les plus utilisés dans le monde (Bloom BR, 1994). Ce système permet l'expression de gènes étrangers dans la mycobactérie. Des vaccins recombinants basés sur le BCG (rBCG) ont été efficaces pour provoquer une réponse immunitaire protectrice contre *Borrelia burgdorferie* (Langermann *et al.*, 1994), *Leishmania* (Connell *et al.*, 1993), *Streptococcus pneumonia* (Langermann *et al.*, 1994) et *Plasmodium yoelii* (Matsumoto *et al.*, 2000). Chez le porc, le rBCG exprimant une forme tronquée de la GP₅ (aa 31 à 200) et la protéine M (ORF6), provoque une réponse immunitaire spécifique contenant des anticorps neutralisants (Bastos *et al.*, 2004). Après une infection défiée, les porcs immunisés avec le rBCG exprimant la GP₅ et le rBCG exprimant la M, ont une virémie plus faible, une charge virale plus faible dans les ganglions lymphatiques bronchiaux et moins de fièvre que les porcs immunisés avec un BCG de type sauvage

(Bastos *et al.*, 2004). Ainsi certains vaccins exprimant la GP₅ sont prometteurs mais la protection contre le VSRRP n'est pas totalement efficace.

1.4.2 Un hétérodimère GP₅-M, un avantage en vaccination chez le VSRRP?

Chez le VSRRP, tout comme chez le VAE, il est reconnu que la GP₅ forme un hétérodimère avec la protéine de la matrice M (de Vries *et al.*, 1995; Mardassi *et al.*, 1996). Cette formation de l'hétérodimère GP₅-M est importante pour les modifications post-traductionnelles, la maturation des protéines et le mouvement de la GP₅ du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (de Vries *et al.*, 1995; Snijder *et al.*, 2003). L'immunisation de chevaux avec un vecteur d'expression exprimant la GP₅ et la M de façon individuelle ou en forme hétérodimère a démontré que tous les animaux inoculés produisaient des anticorps contre la GP₅ (Balasuriya et MacLachlan, 2004). Par contre, seul les animaux inoculés avec un vecteur co-exprimant la GP₅ avec la M (sous forme hétérodimère) développent des anticorps neutralisants (Balasuriya et MacLachlan, 2004). Chez le VAE, sans la présence de la M, la GP₅ forme de larges agrégats de protéines qui sont non immunogéniques. Chez le VSRRP, une expérience similaire a été effectuée avec des vecteurs adénovirus exprimant la GP₅ et la M seules ou en co-expression mais aucune formation d'hétérodimère n'a été obtenue (Gagnon *et al.*, 2003). De plus, il existe des anticorps contre la GP₅ du VSRRP qui sont neutralisants et ce sans la présence d'un hétérodimère GP₅-M (Gagnon *et al.*, 2003). Ainsi on voit que la formation d'un hétérodimère chez le VSRRP n'est pas essentielle pour l'obtention d'anticorps neutralisants mais peut-être pourrait-il favoriser une meilleure réponse immunitaire ?

1.4.3 L'utilisation d'immunostimulateur pour favoriser une meilleure réponse immunitaire.

Tel que mentionné précédemment, le VSRRP est un faible stimulateur de la réponse immunitaire et les vaccins commercialement disponibles n'offrent qu'une protection incomplète contre les souches homologues et hétérologues. Ainsi certains

immunostimulateurs ont été étudiés pour améliorer la réponse immunitaire anti-VSRRP. L'interleukine 2 (IL-2) est l'une des plus importantes cytokines responsables de la régulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez la souris (Arai *et al.*, 1990; Gaffen et Liu, 2004) et elle a été beaucoup étudiée comme adjuvant en vaccination (Mbawuiké *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). L'utilisation de l'IL-2 porcin comme adjuvant lors d'études avec un vaccin à ADN exprimant l'ORF7 du VSRRP a démontré la capacité de cette cytokine à promouvoir et stimuler une meilleure réponse immunitaire à médiation cellulaire (Rompato *et al.*, 2006). Il a été récemment démontré que l'immunité contre l'ORF7 du VSRRP confère une protection partielle contre les lésions pulmonaires et diminue le nombre de cellules infectées dans les poumons (Xue *et al.*, 2004; Rompato *et al.*, 2006). Bien que les anticorps neutralisants sont surtout dirigés contre l'ORF5 du VSRRP (Gonin *et al.*, 1999), une étude a démontrée que des anticorps neutralisants médiés par le complément sont détectable *in vitro* 11 jours après une infection défiée chez des porcs immunisés avec un vaccin à ADN exprimant l'ORF7 (Barfoed *et al.*, 2004). Ainsi l'ORF7 et l'IL-2 porcin peuvent être des atouts dans la conception d'un vaccin efficace pour contrer l'infection au VSRRP et les pertes économiques s'y rattachant.

D'autres adjuvants sont également à considérer tel que la toxine du choléra et l'IL-12 qui, lors de l'utilisation avec le vaccin commercial MLV, accélèrent la production d'anticorps neutralisants et augmente la production d'IFN γ (Foss *et al.*, 2002). Par contre, lors d'une étude plus récente, il a été démontré que ni l'utilisation d'IL-12, ni un mélange de peptides de l'ORF5, ni un adjuvant dérivé d'une endotoxine bactérienne n'augmentait de façon statistiquement significative la réponse en IFN γ au vaccin commercial MLV (Chareerntanakul *et al.*, 2006). Ainsi l'IL-2 reste à ce jour l'adjuvant ayant le plus de potentiel.

1.4.4 L'ORF5 synthétique

L'expression d'un gène introduit dans une cellule de mammifère dépend de plusieurs facteurs dont le nombre de copies du gène, les éléments de contrôle de la transcription, la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de traduction. Dans le cas du génome du VIH-1, il est

riche en AU entraînant un biais de codon. Ce biais de codon serait à l'origine d'une partie de l'instabilité de l'ARN du gène gag-pol du VIH-1. Il a été démontré que dans le cas du gag-pol du VIH-1, l'optimisation des codons augmente la stabilité de l'ARN permettant une augmentation de 10 fois la quantité de protéine produite (Kotsopoulou *et al.*, 2000). En partant de ce principe, le gène de l'ORF5 du VSRRP a été modifié pour obtenir l'ORF5 synthétique. Celui-ci possède un total de 134 nt substitués par rapport à l'ORF5 de type sauvage. Ceci amène une identité de séquence en nucléotide de 77,8 % entre l'ORF5 synthétique et l'ORF5 de type sauvage mais une identité en acides aminés de 100 %. Par analyse densitométrique de la quantité de GP₅ synthétisée par des recAdvs exprimant les deux types d'ORF5 (ORF5 synthétique et type sauvage) après infection dans des cellules 293 et MARC-145, les auteurs ont constaté une augmentation de 6 à 11 fois la quantité de protéines lorsque l'ORF5 synthétique est utilisé (Kheyar *et al.*, 2005).

1.4.5 L'adénovirus dans la vaccination

Les vaccins sous unitaires contiennent les protéines les plus immunogènes du pathogène sans toutefois contenir les autres gènes viraux qui causent des problèmes telle que la réactivation virale (Rocha *et al.*, 2004). Par contre ces vaccins administrés de façon traditionnelle produisent une réponse immunitaire faible et de courte durée (Rocha *et al.*, 2004). Les virus recombinants, quant à eux, sont une alternative intéressante puisqu'ils infectent les cellules de façon efficace, expriment les protéines les plus immunogéniques du pathogène et contiennent leurs propres gènes viraux qui peuvent même servir d'adjuvants (Rocha *et al.*, 2004).

Les adénovirus ont la capacité d'infecter autant les cellules en division que les cellules au repos (Rocha *et al.*, 2004). Ils se répliquent à des taux très élevés lorsqu'ils sont dans des conditions favorables, jusqu'à saturer les mécanismes cellulaires avec plus de 3×10^4 unités infectieuses par cellule (Oualikene *et al.*, 2000). Ils sont reconnus pour causer majoritairement des problèmes respiratoires pouvant varier du simple rhume à la pneumonie (Rocha *et al.*, 2004). Il existe 51 différents types ou sous-types d'adénovirus pouvant causer des infections chez l'humain (Barouch et Nabel, 2005) et les sérotypes 2

et 5 sont préférablement utilisés dans le développement de vaccin recombinant dû à leur faible pathogénicité (Randrianarison-Jewtougoff et Perricaudet, 1995). Pour des raisons de sécurité certains gènes viraux ont été supprimés. Dans le cas des adénovirus de première génération, ils sont rendus non répliatifs par le retrait de la région E1. Il est aussi possible d'enlever la région E3 qui permet d'échapper aux défenses de l'hôte en empêchant la cytotoxicité des cellules T et l'action du TNF (facteur de nécrose tumorale) (Randrianarison-Jewtougoff et Perricaudet, 1995),(Oualikene et Massie, 2000). Ainsi, il est possible d'insérer un transgène de 8 Kb (Oualikene et Massie, 2000). Ces adénovirus seront cultivés dans des cellules permissives comme les cellules de rein embryonnaire humain 293 qui ont la capacité de compléter les virus en exprimant les gènes E1A et E1B (Graham *et al.*, 1977). Les adénovirus de deuxième génération, quant à eux, sont $\Delta E1$, $\Delta E3$ et $\Delta E2a$ et/ou $\Delta E2bTP$, permettant une capacité de clonage allant jusqu'à 11 Kb (Oualikene et Massie, 2000). Les vecteurs de troisième génération n'exprimant plus de gènes viraux, (appelés «gutless»), permettent l'insertion d'un transgène de 38 Kb et ne contiennent que les séquences terminales inversées (ITR) et la séquence d'encapsidation. La présence d'un virus auxiliaire de première génération est nécessaire pour permettre la répliation des adénovirus «gutless» (Oualikene et Massie, 2000).

Un autre type de vecteur adénovirus a été créé en exploitant le rôle de la protéase (PS) de l'Adv. En effet, cette PS est nécessaire, entre autre, pour la formation de particules infectieuses. Ainsi, un vecteur comprenant la région E1 dans lequel on enlève la PS peut effectuer un seul cycle de répliation de son génome mais sans former de particules infectieuses (Oualikene *et al.*, 2000). Pour amplifier ce nouveau virus, il suffit d'utiliser une lignée complémentaire exprimant la PS (exemple : 293PS ou 293PS CymR).

Récemment, un dernier type de vecteur Adv a été mis au point. Ce vecteur est non disséminatif (ΔPS) et a été rendu répliatif par l'insertion du gène E1A en IRES du transgène. Les premières expériences avec des vecteurs répliatifs, effectuées vers la fin des années 90, ont démontré qu'il est possible de diminuer de 250 fois la dose de vaccin administré à des rats en utilisant un vecteur répliatif *versus* un non répliatif tout en conservant la même protection contre une infection défie (Eloit et Adam, 1995). Les

expériences les plus récentes avec le vecteur répliatif (avec la région E1A inséré en IRES du transgène) ont été effectuées avec le gène suicide CD::UPRT (cytosine déaminase uracyl phosphoribosyl transférase) qui permet de convertir un substrat en prodrogue pour détruire différentes lignées de cellules cancéreuses. Il a été démontré que le vecteur répliatif/CD::UPRT exprime 45 fois mieux son transgène qu'un vecteur de première génération (non répliatif). Quant à l'effet indirect de la présence de CD::UPRT sur les cellules avoisinantes (effet «bystander»), le vecteur répliatif/CD::UPRT est 25 fois meilleur pour tuer les cellules avoisinantes que le vecteur non répliatif/CD::UPRT. Donc, ces résultats ont permis de diminuer la MOI (multiplicité d'infection) du virus répliatif/CD::UPRT de 25 fois tout en obtenant le même effet sur les cellules que le virus non répliatif/CD::UPRT (Bourbeau *et al.*, 2004).

Les adénovirus recombinants sont utilisés depuis la fin des années 80 pour vacciner contre la rougeole, le VIH, le VHB, la rage et le VSV (Rocha *et al.*, 2004)). Malgré qu'ils soient efficaces, un des problèmes rencontrés chez l'humain est la présence d'une immunité préexistante causée par des infections naturelles chez le patient vacciné avec un recAdv humain. Ce problème ne se présente toutefois pas chez le porc si on le vaccine avec un recAdv humain de type 5.

Récemment un autre type de vecteur a été étudié pour stimuler une réponse immunitaire contre l'ORF5 du VSRRP. Il s'agit d'un vecteur basé sur le virus de la pseudorange, un virus de la famille des Herpesvirus. Ce virus dans sa forme virulente cause la maladie d'Aujesky caractérisée par des graves signes neurologiques. Mais il existe des désavantages à utiliser ce type de virus recombinant : 1) le vecteur est dérivé d'un vaccin déjà disponible sur le marché et utilisé pour contrer la maladie d'Aujesky donc les animaux peuvent avoir une immunité préexistante; 2) le virus recombinant s'est avéré efficace à stimuler une réponse immunitaire après une infection défiée mais aucun anticorps neutralisants contre le VSRRP n'a été détecté chez les porcs vaccinés (Qiu *et al.*, 2005).

1.4.6 La protéine verte fluorescente comme gène rapporteur

Le gène de la protéine verte fluorescente (GFP) de la méduse *Aequorea victoria*, cloné et séquencé pour la première fois en 1992 (Prasher *et al.*, 1992), a depuis été largement utilisé comme gène rapporteur autant dans des systèmes procaryotes comme *E. coli* (Chalfie *et al.*, 1994) que dans des systèmes eucaryotes comme *C. elegans* (Chalfie *et al.*, 1994), *Drosophila* (Yeh *et al.*, 1995), les feuilles de maïs (Chiu *et al.*, 1996) et plusieurs lignées cellulaires comme les cellules HeLa (Niswender *et al.*, 1995) et les cellules de muscles squelettiques murins (Moss *et al.*, 1996). Depuis 1995, ce gène est aussi utilisé comme gène rapporteur dans des vecteurs viraux (Baulcombe *et al.*, 1995) puisque sa protéine comporte plusieurs avantages : 1) la fluorescence de la GFP est intrinsèque donc indépendante de tous co-facteurs ou substrat (Cody *et al.*, 1993), 2) la GFP est résistante à la photo instabilité permettant une détection sur une plus longue période de temps, 3) elle semble non toxique et ne nuit pas à la croissance des cellules et leurs fonctions.

L'observation de la distribution cellulaire d'une protéine d'intérêt peut être réalisée en exprimant la GFP en fusion avec cette protéine d'intérêt tout en respectant le cadre de lecture. Un des premiers essais de fusion a été fait avec la protéine exuperantia de *Drosophila* et cette protéine de fusion exu-GFP a semblé s'exprimer selon le même patron que la protéine native (Wang et Hazelrigg, 1994).

1.5 Objectifs

Ainsi partant des principes que la GP₅ de la souche IAF-Klop est apoptotique ((Gagnon *et al.*, 2003) Lachapelle *et al.* communication personnelle) que cette protéine exprimée dans un vecteur adénovirus a déjà démontré un potentiel pour la vaccination contre le VSRRP (Gagnon *et al.*, 2003) et que la GFP en fusion peut-être utilisée comme gène rapporteur (Wang et Hazelrigg, 1994), il serait intéressant de créer une GP₅ fusion GFP dans laquelle des modifications pourraient être apportées à la GP₅ pour caractériser les régions apoptotiques de cette protéine. L'hypothèse de ce projet stipule qu'il est possible de trouver une protéine GP₅ tronquée qui ne soit pas apoptotique et qui induirait une immunité protectrice chez le porc. Plus spécifiquement, les objectifs sont :

1. Faire des constructions d'adénovirus non réplicatifs recombinants contenant différentes régions de l'ORF5 synthétique (NA) en fusion avec la GFPq.
2. Sélectionner des constructions non apoptotiques.
3. Construire un adénovirus réplicatif/non disséminatif avec la version de l'ORF5 (NA) sélectionnée.

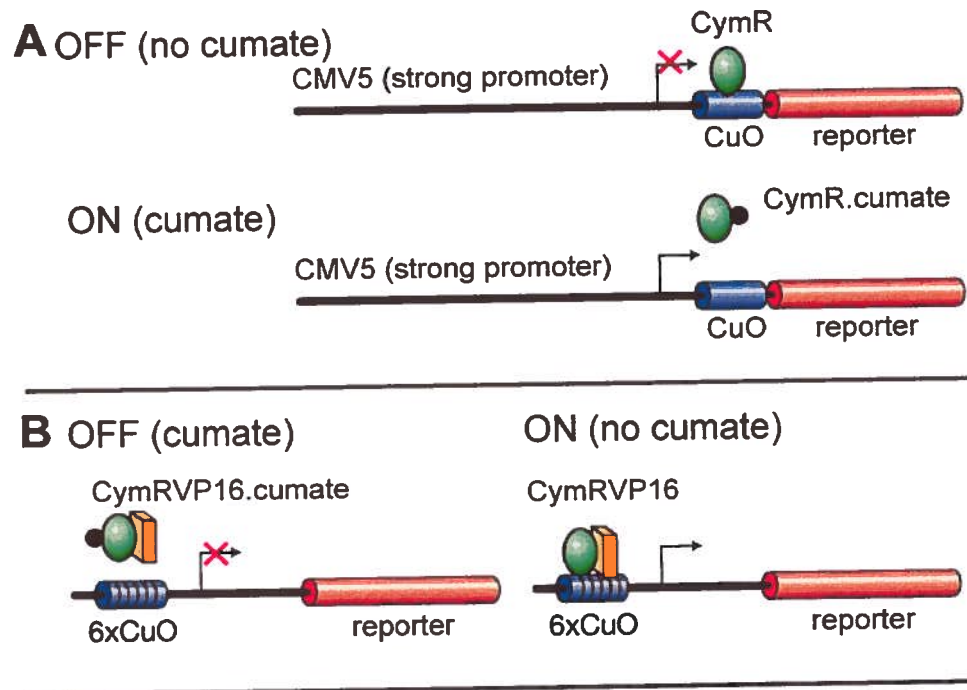
2. Matériels et méthodes

2.1 Constructions de plasmides

2.1.1 Le système cumate

Le système cumate est un système d'expression artificiel aux cellules de mammifères, qui permet de réguler le niveau d'expression d'une protéine (Mullick *et al.*, soumis). Il est dérivé de l'opéron p-Cymène de *Pseudomonas putida F1* (Eaton, 1997). L'opéron cumate est appelé P2 (ou Cuo) et sa molécule inductrice est le cumate. Le transactivateur (cTA) est une molécule hybride formée de la fusion entre le répresseur de l'opéron cumate (CymR) et le domaine transactivateur de la protéine 16 du virus de l'herpès simplex (VP16). Il existe deux stratégies différentes pour contrôler l'expression de la protéine soit, l'activation de la transcription par le transactivateur (cTA) lors de la liaison de celui-ci à l'opérateur en absence de cumate ou la répression de la transcription par le répresseur (CymR) lors de la liaison de ce dernier à l'opéron (CuO) en absence du cumate (Figure 5). En présence de cumate, le transactivateur ne peut plus se lier à l'opéron empêchant ainsi la transcription, quant au CymR, il ne peut également plus se lier à l'opérateur mais ceci a l'effet inverse en libérant la séquence opératrice et en permettant la transcription par le promoteur fort du cytomégalovirus humain (CMV) (Mullick *et al.*, soumis). Dans le cas des travaux décrits dans le présent mémoire, la configuration utilisée est celle du répresseur CymR qui se lie à l'opérateur P2 pour inhiber la transcription en absence de cumate.

Figure 5 : Les deux stratégies différentes du système cumate pour contrôler l'expression d'une protéine. (Mullick *et al.*, soumis)



2.1.2 Vecteurs de transfert servant à créer les virus de type non répliquatifs

Différentes versions de l'ORF5 synthétique ont été amplifiées par PCR pour être insérées dans le plasmide pAdCMV5-CuO-IRES-GFPq (Qbiogene, Montréal, Qc) entre les sites d'enzyme de restriction BglII et NheI (NEB : New England Biolabs Inc, Beverly, MA).

Les différentes versions sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour amplifier par PCR différentes sections de l'ORF5 synthétique et nom du plasmide obtenu.

NOM DU PLASMIDE	AMORCES	SECTION DE L'ORF5 AMPLIFIÉE
pAdCMV5-CuO-ORF5/GFPq	<u>FGP5sBglIIKoz</u> 5' gga aga tct gcc atg ctg ggc aag tgc ctg acc 3' <u>RGP5sMluIFseINheI</u> 5' ttt gct agc tgg ccg gcc acg cgt ggg gcg aca cca ctg ctc ggc 3'	ORF5 complet avec les sites BglII en 5' et MluI, FseI, NheI en 3'; le codon terminateur de l'ORF5 a été supprimé
pAdCMV5-CuO-ORF5(118-200aa)/GFPq	<u>FGP5sBglIII118</u> 5' gga aga tct atg gcc gcc ctg atc tgc 3' <u>RGP5sMluIFseINheI (ci-haut)</u>	Les aa 118-200 de l'ORF5 avec le site BglIII en 5' avec un codon initiateur (atg) puis les sites MluI, FseI, NheI en 3'; le codon terminateur de l'ORF5 a été supprimé
pAdCMV5-CuO-ORF5(1-90aa)/GFPq	<u>FGP5sBglIIKoz (ci-haut)</u> <u>RGP5s90aa</u> 5' ttt ttt gct agc ggc gtc cag gaa gtg gga 3'	Les aa 1-90 de l'ORF5 avec le site BglII en 5' avec un codon initiateur (atg) puis le site NheI en 3'; le codon terminateur de l'ORF5 a été supprimé

Les réactions de PCR ont été effectuées avec 100 pmol de chaque amorce, 400 ng d'ADN pAdCMV5-ORF5 (fournit par le Dr Dea, INRS-IAF, Laval, Qc) et 2U de l'enzyme Vent avec son tampon Thermopol (NEB) à 60°C pendant 30 cycles (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 9600, PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Les différents produits de PCR ainsi obtenus ont été traités avec 10U de T4 polynucléotide kinase (NEB) avant d'être insérés dans le plasmide pUC19 (NEB) préalablement linéarisé avec l'enzyme SmaI (1U/250 ng d'ADN), traité avec 1U/μg d'ADN de CIP (NEB) et purifié avec le Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Mississauga, Ont). La ligation entre les différents produits de PCR ainsi traités et le plasmide pUC19 a été effectuée à 16°C (pendant toute la nuit) en utilisant 50 ng de

vecteur (pUC19) et un ratio de 3 : 1 d'insert par rapport au vecteur, 400U d'enzyme T4 DNA ligase (NEB) et une concentration finale de 1X du tampon 10X T4 DNA ligase (NEB) dans un volume total de 20 µL.

Des bactéries *Escherichia coli* DH5α (fournit par le Dr Massie) ont été transformée avec la moitié du produit de ligation puis ont été mises sur glace pendant 30 minutes. Ensuite, un choc thermique de 60 secondes à 42°C a été effectué, suivit d'un retour sur glace de 3 minutes. Puis 500 µL de milieu LB (Invitrogen, Carlsbad, CA) a été ajouté. Ensuite, une heure d'incubation avec agitation à 37°C a été effectuée suivit d'un étalement sur une gélose de LB agar avec ampicilline (100 µg/µL, Sigma, Oakville, Ont). L'extraction d'ADN plasmidique des colonies a été effectuée avec le Miniprep kit (Qiagen).

Ainsi, les différents produits de PCR mis dans pUC19 ont pu être séquencés (Institut de Recherche en Biotechnologies, Montréal, Qc). Ensuite, les différentes versions de pUC19/ORF5 ont été digérées, tout comme le vecteur pAdCMV5-CuO-IRES-GFPq, avec 1U/µg d'ADN de BglII et 1U/µg d'ADN de NheI dans le tampon 2 (NEB) pour être isolés sur gel d'un pourcent d'agarose (Wisent Inc, Montréal, Qc) et extrait avec le QiaexII gel extraction kit (Qiagen). Ensuite la ligation, la transformation et l'extraction d'ADN plasmidique ont été faites tel que décrit ci haut.

2.1.3 Vecteurs de transfert servant à créer les virus de type réplicatifs/non disséminatifs

Les deux plasmides servant à créer les virus de type réplicatif/non disséminatif sont : pAdCMV5-CuO-ORF5/GFPq-IRES-E1A et pAdCMV5-CuO-ORF5-IRES-E1A. Ils sont dérivés du vecteur navette pAdenoVator-CMV5(Cuo)-IRES-GFPq (Qbiogene) dans lequel le gène de la GFPq a été remplacé par le gène E1A (Bourbeau *et al.*, 2004) et les gènes d'intérêts soit l'ORF5/GFPq ou l'ORF5 seul ont été insérés sous le contrôle de l'opéron cumate au site BglII. Les deux gènes d'intérêt ont été isolés à partir (par digestion enzymatique avec BglII, NEB) des plasmides pAdCMV5-CuO-ORF5/GFPq et pAdCMV5-ORF5 (fournis par le laboratoire du Dr Dea).

2.2 Construction des virus

2.2.1 Virus de type non répliquatifs

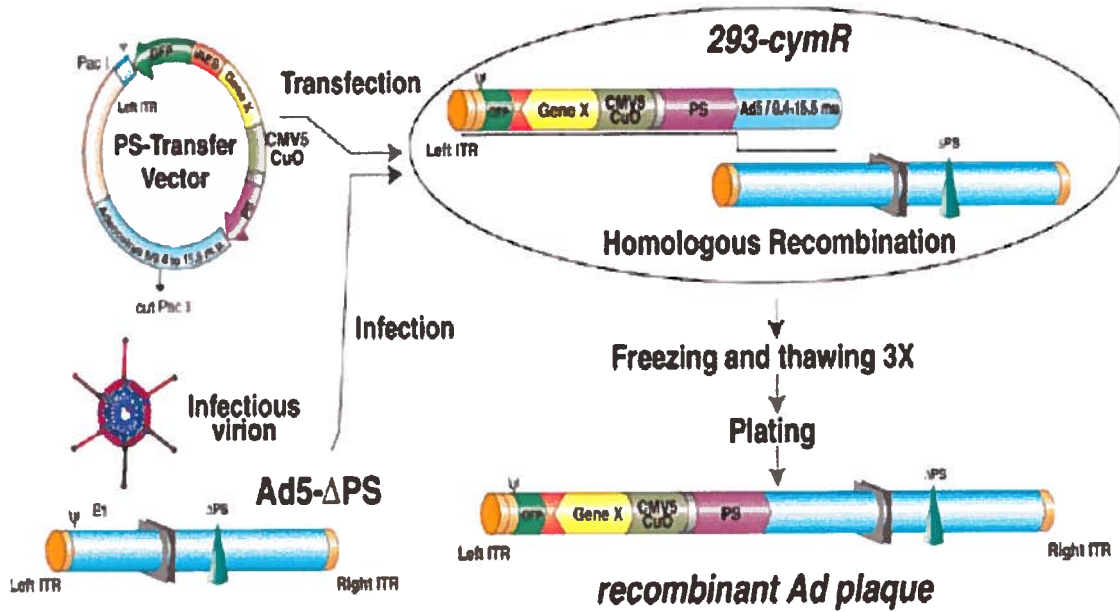
Les virus Ad-IRES-GFPq, Ad-ORF5-IRES-GFPq, Ad-ORF5/GFPq, Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq, et Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq respectivement dérivés des plasmides suivants : pAdCMV5-CuO-IRES-GFPq, pAdCMV5-CuO-ORF5-IRES-GFPq, pAdCMV5-CuO-ORF5/GFPq, pAdCMV5-CuO-ORF5(118-200aa)/GFPq et pAdCMV5-CuO-ORF5(1-90aa)/GFPq, ont été produits par sélection positive par la protéase (Figure 6) (Ogorelkova *et al.*, 2004).

La protéase de l'adénovirus est une protéine tardive et elle est, notamment, responsable du relargage des virions des cellules infectées (Oualikene *et al.*, 2000). Seul les adénovirus exprimant la PS peuvent se répliquer et infecter les cellules avoisinantes. Dans le système de sélection positive à la protéase, le plasmide (vecteur de transfert) contenant le gène d'intérêt comprend également la PS. Quant au virus avec lequel il y a recombinaison homologue, il ne contient pas la PS (Δ PS) et ne peut pas former de plages virales sans la complémentation de la PS provenant du vecteur de transfert. Ainsi, il s'agit de transfecter le vecteur de transfert dans les cellules 293CymR (CymR pour réprimer l'expression du gène d'intérêt) puis d'infecter avec le virus Δ PS pour que la recombinaison homologue s'effectue. Lorsque les virions sont formés, on les libèrent par trois cycles de gel-dégel. Ensuite, après avoir infecté de nouvelles cellules 293CymR avec le produit de la recombinaison homologue et d'avoir recouvert d'agarose Seaplaque, seuls les virions ayant obtenu la PS (et par le fait même, le gène d'intérêt) formeront les plages virales (Elahi *et al.*, 2002).

Le jour précédent la transfection, un pétri de 60 mm a étéensemencé avec 500 000 cellules 293CymR dans 3 mL de DMEM 5 % FBS (HyClone, Logan, UT), 10mM glutamine (Wisent). Le matin de la transfection, un mélange de 3 μ g d'ADN (préalablement linéarisé par digestion enzymatique avec PacI (NEB) et purifié par phénol : chloroforme), de 300 μ L de DMEM seul et de 6 μ g de PEI (1 mg/mL, Polysciences Inc, Warrington, PA) a été effectué. Après 10 minutes d'incubation à température pièce, le mélange a été déposé goutte à goutte sur les cellules. Cinq heures

après, l'infection à une MOI de 1 avec le virus Ad Δ E1, Δ E3, Δ PS a été effectuée. La récolte des cellules a été faite 3 jours plus tard, lorsque l'ECP (effet cytopathique) était complet. Ensuite, trois cycles de gel-dégel ont servis à libérer les particules virales des cellules pour procéder à trois rondes de purification par plages. En résumé, pour faire une ronde de purification, il faut de faire des dilutions d'un log, infecter un million de cellules 293CymR et mettre de l'agarose de type SeaPlaque (Cambrex, Rockland, ME) sur les cellules 5 heures après l'infection. Les plages ont pris environ deux semaines pour apparaître et permettre le repiquage.

Figure 6 : La sélection positive par la protéase utilisée pour produire les virus de type non répliquatif (Ogorelkova *et al.*, 2004).

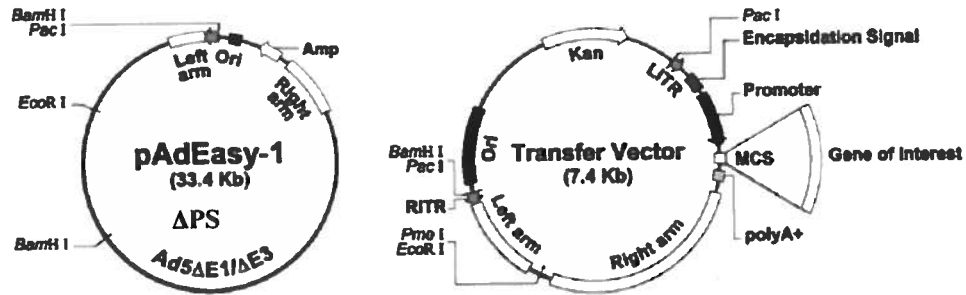


2.2.2 Virus de type répliatif/non disséminatif

Les virus Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A et Ad-ORF5-IRES-E1A ont été produits par une méthode basé sur le système AdEasy™ de Qbiogene (Figure 7). Les deux vecteurs de transfert (soit pAdCMV5-ORF5/GFPq-IRES-E1A et pAdCMV5-ORF5-IRES-E1A) ont été linéarisés avec PmeI (NEB), puis purifiés par un mélange phénol:chloroforme (l'ADN est resuspendu dans de l'eau stérile). Ensuite, une co-transformation dans des bactéries BJ5183 (Qbiogene) de 1 µg du plasmide linéarisé et de 1 µg de l'ADN viral AdEasy ΔPS (Qbiogene) a été effectuée par électroporation (BioRad, 200Ohms, 25µF, 2.5KV). Après 1 heure à 37°C dans 1 mL de milieu LB (Invitrogen), le produit a été étalé sur des géloses kanamycine (50 µg/µL, Sigma, Oakville, Ont). L'extraction d'ADN des colonies obtenues a été fait par un protocole classique (Miniprep kit, Qiagen). Après avoir obtenu quelques colonies qui semblait positives, la transformation a été effectuée dans des bactéries *E. coli* DH5α par choc thermique (protocole décrit précédemment) pour ensuite extraire l'ADN et vérifier à nouveau les colonies pour s'assurer d'en avoir une de positive. Les plasmides recombinants ne sont pas stables dans les bactéries BJ5183 (Qbiogene), c'est pourquoi il est essentiel de se hâter de les y extraire et de les mettre dans les *E. coli* DH5α pour confirmer lesquelles des colonies sont positives. Après avoir obtenu une colonie positive, l'ADN recombinant a été linéarisé par digestion enzymatique avec PacI (NEB), purifiée par phénol : chloroforme et transfectée dans 1 million de cellule 293PS-CymR avec 3 µg d'ADN linéarisé et 6 µg de PEI. Les cellules 293PS-CymR (fournies par le laboratoire du Dr Massie) expriment la PS pour compléter le virus recombinant qui est ΔPS et le CymR pour réprimer l'expression de l'ORF5. Trois jours après la transfection, les cellules ont été divisées en 2 pétris de 100mm auquel on a ajouté de l'agarose de type SeaPlaque (Cambrex) afin d'obtenir des plages isolées.

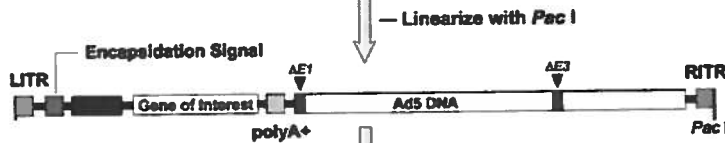
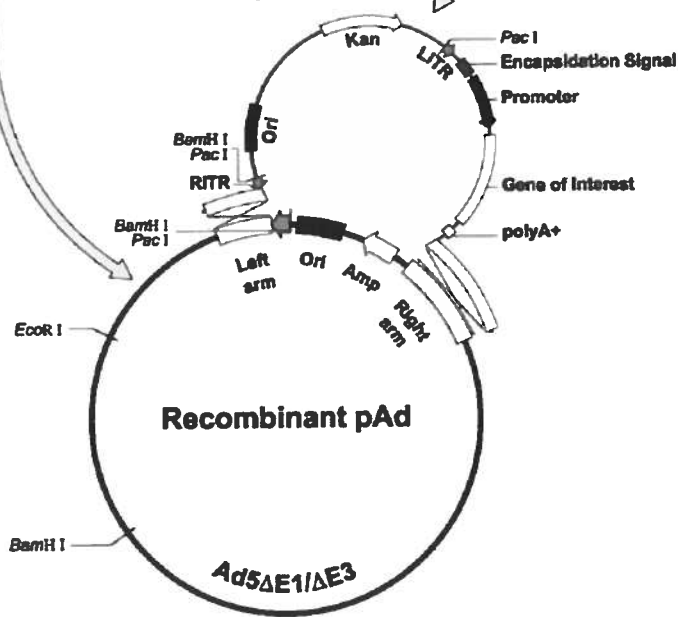
Figure 7: La production des virus réplcatifs basé sur le système AdEasy™ de Qbiogene.

Step 1:
cDNA cloning in transfer plasmid



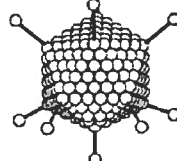
Co-Transform into bacteria
Select with Kanamycin

Step 2:
In vivo homologous
recombination
in bacteria



Step 3 :

Virus production in 293PS-CymR
cells



Ready to be amplified recombinant adenovirus

2.3 Amplification et purification des virus non répliatifs et répliatifs/non disséminatifs

Les virus non répliatifs ont été amplifiés sur des cellules 293CymR pour permettre simultanément la répression du transgène et la complémentarité en délétion de la région E1, dans du DMEM 5 % FBS contenant également de la glutamine (10 mM, Wisent Inc), des antibiotiques-antimycotiques (concentration 1X final, Wisent Inc), et de l'hépès (5mM, Sigma) pour maintenir le pH du milieu. Quarante pétris de 150mm contenant entre 15 à 20 millions de cellules 293CymR ont été infectés à une MOI de 10 pendant 70 heures avec chacun des virus non répliatifs construits dans la section 2.1 du présent mémoire. Après infection pendant 70 heures, les 40 pétris ont été récoltés, les cellules ont été culottées et concentrées dans un volume final de 10 mL. Trois cycles de gel-dégel ont été faits pour lyser les cellules et libérer les particules virales. La purification a été faite selon le protocole ci-dessous. Quant aux virus répliatifs/non disséminatifs, ils ont été amplifiés de la même manière mais sur des cellules 293PS-CymR.

Protocole de purification d'adénovirus par gradient de chlorure de césium (CsCl) :

Après décongélation du virus à purifier, les cellules ont été culottées et le surnageant viral (environ 22 mL) a été conservé pour la purification. Le premier gradient discontinu de CsCl (Qbiogene) a été fait dans un tube de 25 mm X 89 mm en mettant dans l'ordre : 8 mL de CsCl 1.4, 6 mL de CsCl 1.2 et 22 mL de surnageant viral. Après une centrifugation de 1 heure 30 minutes à 23 000 RPM (Beckman L8-M ultracentrifuge), la bande virale a été récoltée avec une aiguille de 20 G1 et une seringue de 5 mL puis diluée de moitié dans du tampon 10 mM Tris pH 7.9 afin de réduire la concentration de CsCl. Le virus ainsi récupéré a été déposé sur un gradient continu de CsCl. Le gradient continu a été fait en utilisant une pompe péristaltique et contient (dans un tube de 25 mm X 89 mm) 12 mL de CsCl 1.4, 14 mL de CsCl 1.2. Après une centrifugation de 20 heures à 23 000 RPM, la bande virale a été récoltée avec une seringue de 3 mL et une aiguille de 20 G1 dans un maximum de 2.5 mL. La prochaine étape de purification a été fait sur une colonne NAP25 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc) pour se débarrasser du CsCl.

Le virus purifié a été aliquoté et conservé à -80°C . Pour les recettes de réactifs, voir annexe A.

2.4. Méthode de titration par TCID50/mL

Tous les titres des virus qui ont été utilisés pour les expériences du présent mémoire ont été effectués par la méthode de TCID50 (dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50 % des cultures infectées) (voir Annexe B). Le jour précédent l'infection, des cellules ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits (Corning, Montréal, Qc) à raison de 5000 cellules par puit dans 100 μL de DMEM 5 % FBS. Les cellules utilisées sont les 293A dans le cas des virus non répliatifs et les 293PS dans le cas des virus répliatifs/non disséminatifs. Le jour de l'infection, des dilutions d'un log du virus à titrer ont été effectuées en huitplicata et les cellules de la plaque de 96 puits préparée le jour précédant ont été infectées. Après une incubation de 5 heures, 100 μL de nouveau milieu a été ajouté aux cellules infectées. La lecture du TCID50 a été fait au jour 10 et on a regardé dans lesquels des puits on retrouve de l'ECP puis on a appliqué la méthode de Karber pour effectuer le calcul du titre (Karber, 1931).

2.5. Immunobuvardage de type Western

Afin de vérifier que chacun des virus non répliatifs et répliatifs/non disséminatifs expriment l'ORF5 synthétique, un immunobuvardage de type Western sur un lysat de cellules infectées a été fait. Dans le cas des virus non répliatifs (Ad-IRES-GFPq, Ad-ORF5-IRES-GFPq, Ad-ORF5/GFPq, Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq, et Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq), 10 millions de cellules 293A (dans des pétris de 150 mm, Sarstedt, Montréal, Qc) ont été infectées à une MOI de 10 et récoltées 48 heures PI dans 100 µL de tampon de lyse (Laemmli 1X : Tris 1 M, SDS 20 %, glycérol 1 mL, et H₂O, volume total de 10 mL). Des cellules MARC-145 (fournies par le laboratoire du Dr Dea) ont également été infectées avec ces virus : 10 millions de cellules infectées avec une MOI de 100 et récoltées de la même façon que les 293A. En ce qui concerne les virus répliatifs/non disséminatifs (Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A et Ad-ORF5-IRES-E1A), 10 millions de cellules 293PS-CymR ont été infectées à une MOI de 10 et récoltées 48 heures PI dans 100 µL de tampon de lyse. La même infection des virus répliatifs/non disséminatifs a été effectuée sur des cellules MARC-145 mais en utilisant une MOI de 100 au lieu de 10. De plus, des cellules MARC-145 (10 millions dans un pétri de 150 mm) ont été infectées avec une MOI de 1 du VSRRP et récoltées 72 heures PI dans 100 µL de tampon de lyse afin de servir de témoin positif dans les immunobuvardages de type Western. Un autre témoin positif a été obtenu en infectant des cellules MARC-145 avec une MOI de 100 du virus AdCMV5GFPq et en récoltant à 72 heures PI de la même façon que décrit ci-haut. Des gels de SDS-Page 12 % (SoftgelTM, SERVA Electrophoresis, Scarborough, Ont) ont été utilisés, et la membrane a été révélée en utilisant le ECL (Perkin Elmer Life Sciences, Woodbridge, Ont). Le marqueur de masse moléculaire SeaBlue Plus 2 (Invitrogen) a été utilisé.

Tableau 2 : Conditions utilisées lors des immunobuvardages de type Western.

FIGURE	QUANTITÉ DE PROTÉINE	ANTICORPS	CONCENTRATION DES ANTICORPS
Figure 8A	30 µg par piste	Anti-GP ₅ ¹ Anti-lapin	1 :600 1 :10 000
Figure 8B	30 µg par piste sauf la piste 9 (5 µg)	Anti-GFP ² Anti-lapin ³	1 :5000 1 :10 000
Figure 9A	30 µg par piste	Anti-GP ₅ Anti-lapin	1 :2000 1 :10 000
Figure 9B	30 µg par piste sauf la piste 9 (5 µg)	Anti-GFP Anti-lapin	1 :5000 1 :10 000
Figure 14	30 µg par piste	Anti-GP ₅ Anti-lapin	1 :2000 1 :10 000

2.6. Vérification de la mortalité cellulaire

Le jour précédant l'infection, une plaque de 12 puits (Sarstedt) a étéensemencée à raison de 50 000 cellules MARC-145 par puit. Les cellules MARC-145 ont été cultivées dans du DMEM 10 % FBS, 10 mM glutamine. Le jour suivant, les cellules ont été infectées avec une MOI de 100 de chacun des virus suivants (conserver un témoin cellules non infectées): AdCMV5GFPq et Ad-ORF5-IRES-GFPq. Les autres puits ont été infectés avec le virus Ad-ORF5/GFPq à des MOI de 100, 200 et 400. À 72 heures PI, les cellules ont été photographiées, récoltées et une partie a été fixée à la paraformaldéhyde (concentration 2 % finale, VWR, Montréal, Qc) pour analyse en cytométrie de flux alors que l'autre partie a été colorée à l'érythrosine B (Sigma) pour faire un décompte de viabilité cellulaire. Les analyses en cytométrie de flux ont été effectuées sur un analyseur XL-MCLTM de Beckman-Coulter muni d'un laser 488 nm à l'argon de 15 milli Watts de puissance et le logiciel EXPO32 a été utilisé pour les analyses (Beckman Coulter Inc, Mississauga, Ont). La population cellulaire à analyser a été déterminée à l'aide de barrière d'analyses sur les paramètres de diffraction de la lumière à angle rapproché (Forward Scattering) mesurant la taille et de diffraction de la lumière à 90 degrés (Side Scattering) mesurant la granularité. La fluorescence provenant de la GFP a été recueillie

¹ Anticorps anti-GP₅ (α5) : anticorps monospécifique de lapin, provient du laboratoire du Dr Serge Dea, (Mardassi *et al.*, 1996)

² Anticorps anti-GFP : anticorps monospécifique de lapin provient du laboratoire du Dr Serge Dea.

³ Anticorps anti-lapin conjugué à la peroxydase provient de Boehringer-Ingelheim, Burlington, Ont.

à l'aide d'un filtre dichroïque passe-haut de 550 nm et d'un filtre bande passante de 525 nm.

2.7. Différence d'expression entre les virus répliatifs/non disséminatifs et les virus non répliatifs

Tout d'abord, il existe une distinction entre une cellule permissive et une cellule sensible à un virus. La cellule permissive permet au virus de pénétrer et d'effectuer un cycle viral complet. Mais la cellule sensible permet seulement une pénétration du virus sans réaliser un cycle complet de réplication. Les cellules 293A sont des cellules humaines d'épithélium de rein (fournies par le laboratoire du Dr Massie), contenant une partie du génome de l'adénovirus humain de type 5. Ces cellules contiennent la région E1 du génome de l'adénovirus permettant de compléter les adénovirus non répliatifs et la formation du génome viral, donc elles sont permissives. Ainsi, dans ces cellules, la différence entre un adénovirus répliatif/non disséminatif et un adénovirus non répliatif ne devrait pas être importante car les deux virus pourront répliquer leur génome. Quant aux cellules A549 (fournies par le laboratoire du Dr Massie), ce sont des cellules humaines de carcinome pulmonaire et elles sont sensibles à l'adénovirus humain de type 5. Ainsi, il est possible d'utiliser ce système *in vitro* pour voir la différence entre les virus répliatifs/non disséminatifs et non répliatifs dans une cellule qui ne complète pas la réplication du génome de l'adénovirus non répliatif. Ensuite, les cellules PKA (fournies par le laboratoire du Dr Dea) et PT (fournies par le laboratoire du Dr Dea) sont utilisées pour recréer des conditions plus près du modèle *in vivo* de porc. Les cellules PKA sont des cellules épithéliales de rein de porc et, tout comme les A549, elles sont sensibles à l'adénovirus humain de type 5. Quant aux cellules PT ce sont des fibroblastes de testicule de porc qui sont également sensibles au virus.

Le matin de l'infection, des plaques de 6 puits ont étéensemencées avec 150 000 cellules par puit. Les plaques de cellules 293A ont étéensemencées avec du DMEM 5 % FBS, 10 mM glutamine, les plaques de cellules A549 ont étéensemencées avec du DMEM 10 % FBS, 10 mM glutamine et les cellules porcines ont étéensemencées avec du MEM Earl avec 5 % de FBS (HyClone, Logan, UT), 10 mM glutamine, 0.1 mM d'acides aminés

non essentiels (Invitrogen) et 1 mM de sodium pyruvate (Sigma) dans le cas des cellules PKA et avec du DMEM 10 % de FBS, avec 10 mM glutamine, 0.1 mM d'acides aminés non essentiels et 1 mM de sodium pyruvate dans le cas des cellules PT. Après 5 heures, les cellules ont été infectées, dans un total de 1 mL de leur milieu de culture respectif, selon les MOI suivantes :

Tableau 3 : Multiplicité d'infection (MOI) utilisées pour chacun des virus pour infecter les cellules 293A, A549, PKA et PT.

	293A	A549	PKA ET PT
VIRUS	MOI	MOI	MOI
AdCMV5GFPq	10 et 50	10 et 50	100 et 500
Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A	1, 10 et 50	10 et 50	1, 10 et 25
Ad-ORF5/GFPq	1, 10 et 50	10 et 50	1, 10 et 25
Aucun	Contrôle de cellules non infectées	Contrôle de cellules non infectées	Contrôle de cellules non infectées

Après 4 heures d'infection, 2 mL, de chacun des milieux de culture respectifs, a été ajouté à chaque puit. Les cellules ont été photographiées à 48 heures PI pour suivre l'expression de la fluorescence (photographiées à 20X et voir section 2.8 pour les informations détaillées sur le microscope, le filtre à GFP et la caméra). Les cellules ont été récoltées à 48 heures PI et fixées à la paraformaldéhyde (concentration 2 % finale) pour une analyse en cytométrie de flux (pour les détails concernant les analyses et l'appareil, voir section 2.6) afin obtenir l'indice de fluorescence (voir Annexe C).

2.8. Localisation cellulaire des différentes protéines de fusion

La localisation cellulaire des protéines de fusion ORF5/GFPq, ORF5(118-200aa)/GFPq et ORF5(1-90aa)/GFPq, par observation directe de la GFPq, a été fait dans les cellules A549 et MARC-145. Le matin de l'infection, 100 000 cellules (par puit) A549 ou cellules MARC-145 ont étéensemencées, avec leurs milieux de culture respectif, dans des plaques de 6 puits. Après 5 heures, les cellules A549 ont été infectées, dans un total de 1 mL de milieu, à une MOI de 50 avec les virus suivants : Ad-IRES-GFPq, Ad-ORF5-IRES-GFPq, Ad-ORF5/GFPq, Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq, et Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq, AdCMV5GFPq et un contrôle de cellules non infectées. Quant aux cellules MARC-145, elles ont été infectées avec les mêmes virus que pour les cellules A549 mais

à une MOI de 100. Le lendemain, 2 mL de milieu de culture a été ajouté à chaque puit. La localisation cellulaire a été observée à 48 heures PI, et les photos ont été prise au microscope à 40 X (Microscope Leica DMIL et DMIRB à fluorescence, lampe au mercure, 100-watt; Filtre à GFP avec longueurs d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 510 nm; Caméra Roper Sensys et Qimaging Retiga EXil, monochromes, 12-bit de résolution et refroidies).

3. Résultats

Ce projet vise tout d'abord la construction d'adénovirus non réplicatifs contenant différentes versions, pleine longueur et tronquées, de la GP₅ en fusion à la GFPq afin de trouver une version non apoptotique de la protéine. Ensuite, un adénovirus réplicatif/non disséminatif exprimant la version choisie de la GP₅ fusion GFPq a été construit et l'expression du transgène a été comparée à celle d'un adénovirus non réplicatif exprimant la même version de la protéine. L'utilisation d'un adénovirus réplicatif/non disséminatif devrait permettre d'améliorer l'expression du transgène et pourrait avoir des répercussions importantes lors d'études *in vivo*.

3.1 Construction de trois différentes versions de la GP₅ en fusion à la GFPq

En premier lieu, les différentes versions de la GP₅ : soit l'ORF5 pleine longueur, l'ORF5(1-90aa) contenant les 90 premiers aa et l'ORF5(118-200) contenant la deuxième moitié de la protéine ont été amplifiées par PCR (voir tableau 1) et insérées dans un vecteur intermédiaire pUC19 (NEB). La présence de cet intermédiaire de clonage a permis de séquencer les différents produits de PCR obtenus, de les digérer et de les purifier afin de les insérer dans un autre vecteur, le pAdCMV5-CuO-IRES-GFPq. Les résultats de séquençage (résultats non montrés) démontrent que les trois versions de la GP₅ amplifiées par PCR ne présentent aucune erreur dans la séquence.

3.2 Construction des vecteurs de transfert servant à créer les virus non répliquatifs

Ensuite, les trois vecteurs adénovirus non répliquatifs suivants ont été construits, soit le pAdCMV5-CuO-ORF5/GFPq, le pAdCMV5-CuO-ORF5(1-90aa)/GFPq et le pAdCMV5-CuO-ORF5(118-200aa)/GFPq, par digestion enzymatique des produits intermédiaires obtenus dans pUC19 et en insérant ces produits dans le vecteur pAdCMV5 Δ PSP2DCGFPqK7PSmlp. Les trois vecteurs de transfert ainsi obtenus ne contiennent plus l'IRES et les différentes versions de la GP₅ se retrouvent fusionnées à la GFPq. Avant de poursuivre les travaux, des transfections transitoires des trois plasmides obtenus ont été effectuées (résultats non montrés). Ces transfections ont permis de constater que chaque construction exprimait la GFPq, donc que les fusions se sont effectuées correctement, dans un bon cadre de lecture ouvert. La présence de la GFPq comme gène rapporteur donne un indice de la présence probable de l'expression de la GP₅ simultanément à la GFPq puisqu'il s'agit d'une protéine de fusion.

3.3 Construction des virus non répliquatifs

Une fois que les vecteurs de transfert ont été obtenus, les différents virus non répliquatifs (Ad-ORF5/GFPq, Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq et Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq) ont été construits par la sélection positive à la protéase (Elahi *et al.*, 2002). La capacité de ces trois virus à exprimer la GP₅ et la GFPq lors d'une infection a été analysée par immunobuvardage de type Western.

3.3.1 Immunobuvardage de type Western pour les différents virus non répliquatifs

La figure 8 montre un immunobuvardage de type Western sur des lysats de cellules 293A infectées par les différents virus non répliquatifs. L'objectif de cette figure est de démontrer (dans des cellules 293A où l'expression de chaque protéine devrait être maximale) que les différentes constructions effectuées sont fonctionnelles et expriment la

GP₅. Dans la partie A de la figure, la visualisation des différentes versions tronquées de la GP₅ s'est faite en utilisant un anticorps de lapin anti-GP₅, alors que dans la partie B, les mêmes échantillons se retrouvent sur une membrane révélée avec un anticorps de lapin anti-GFP. La GFPq est une protéine de 26 kDa et la GP₅ fait entre 24,5-26 kDa selon sa glycosylation. Ainsi, la protéine de fusion ORF5/GFPq devrait se retrouver entre 50,5-52 kDa. Quant aux versions tronquées, la partie 1 à 90 aa représente 45 % de la longueur de la GP₅ totale donc, fusionnée à la GFPq (ORF5(1-90aa)/GFPq), cette protéine devrait faire entre 37 et 38 kDa. La version 118 à 200aa représente 41 % de la taille de la GP₅ totale en aa, ainsi une fois fusionnée (ORF5(118-200aa)/GFPq), elle devrait se situer entre 36 et 37 kDa. Chez la souche européenne LV, il y a deux sites de glycosylation qui se situent aux acides aminés 46 et 53 (Wissink *et al.*, 2004), donc dans la première partie de la protéine. Ainsi, si la première partie de la protéine a tendance à être plus glycosylée que la deuxième partie, la différence de masse moléculaire entre l'ORF5(1-90aa) et l'ORF5(118-200aa) risque d'être plus prononcée.

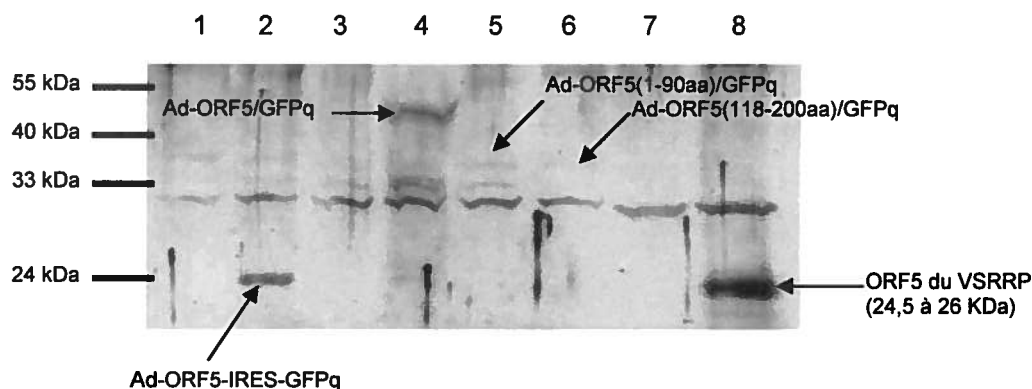
La figure 8A montre, tout d'abord, que l'ORF5-IRES-GFPq (piste 2) et l'ORF5 de type sauvage provenant d'une infection par le VSRRP (piste 8) sont à environ 24 kDa. La GP₅ exprimée dans notre système a gardée une conformation permettant sa reconnaissance par l'anticorps anti-GP₅. La légère différence de masse moléculaire entre ces deux protéines est due à la différence dans leur niveau de glycosylation. En effet, il a été démontré par Gagnon *et al.* en 2003, que l'ORF5 exprimé par un vecteur adénovirus restait bloqué au niveau du Golgi et ne subissait pas toutes les étapes de maturation d'un ORF5 provenant d'une infection par le VSRRP. Ainsi, nous pouvons penser que cette différence dans le niveau de glycosylation explique la différence dans la masse moléculaire entre la protéine de la piste 2 et celle de la piste 8. Ensuite, on voit la première des protéines de fusion à la masse attendue d'environ 50 kDa (piste 4), la ORF5/GFPq. Dans cette même piste, la protéine semble subir de la dégradation car on observe des bandes d'une masse inférieure à 50 kDa qui ne font pas partie du bruit de fond. La dégradation peut provenir soit de la qualité de l'échantillon et de sa préparation ou bien d'une dégradation intracellulaire. La dégradation intracellulaire est un mécanisme utilisé par la cellule pour se débarrasser de protéines non désirées (H. Lodish, 2000). Les deux autres protéines de fusion,

ORF5(118-200aa)/GFPq et ORF5(1-90aa)/GFPq sont également visibles à la masse moléculaire attendue d'environ 36 à 38 kDa. Par contre, leur expression est faible.

Figure 8 : Détection de l'expression des différents virus non répliquatifs par immunobuvardage de type Western sur lysat de cellules 293A (sauf pour les témoins positifs A 7 et 8 ou B 7 à 9 qui sont des lysats de cellules MARC-145). Pour la partie A : 30 µg de protéines par piste, révéler avec un premier anticorps anti-GP₅ (1 :600) et un second anticorps anti-lapin (1 :10 000) conjugué à la peroxydase). Les cellules 293 A ont été infectées avec une MOI de 10 et les cellules MARC-145 ont été infectées avec une MOI de 1 du VSRRP. Pour la partie B : 30 µg de protéines par piste sauf la piste 9 qui contient 5 µg, révéler avec un premier anticorps anti-GFP (1 :5000) et un second anticorps anti-lapin (1 :10 000 conjugué à la peroxydase). Les cellules 293 A ont été infectées à une MOI de 10, les cellules MARC-145 ont été infectées à une MOI de 1 du VSRRP et les cellules MARC-145 de la piste 9 ont été infectées à une MOI de 100 du AdCMV5GFPq.

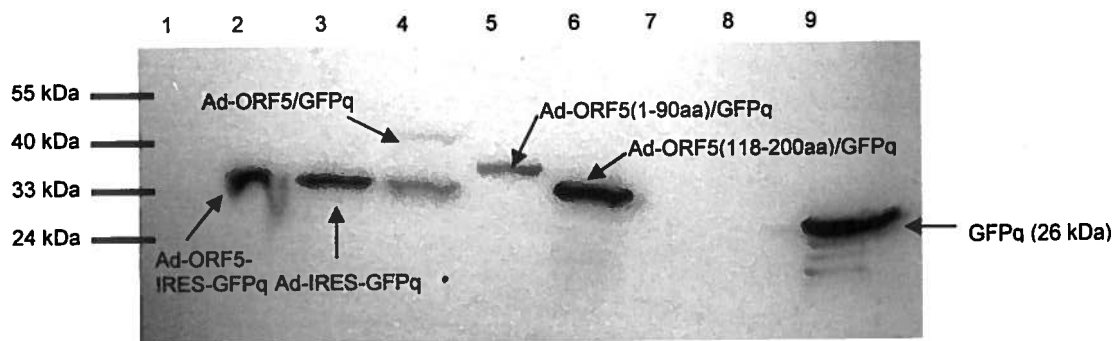
A. Immunobuvardage révélé avec un anticorps anti-GP₅

- 1- cellules 293A non infectées
- 2- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5-IRES-GFPq
- 3- cellules 293 A infectées avec le Ad-IRES-GFPq
- 4- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5/GFPq
- 5- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq
- 6- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq
- 7- cellules MARC-145 non infectées
- 8- cellules MARC-145 infectées avec le VSRRP



B. Immunobuvardage révélé avec un anticorps anti-GFP. (N.B. La migration du gel a été altérée et le côté droit est plus bas que le côté gauche du gel).

- 1- cellules 293A non infectées
- 2- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5-IRES-GFPq
- 3- cellules 293 A infectées avec le Ad-IRES-GFPq
- 4- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5/GFPq
- 5- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq
- 6- cellules 293 A infectées avec le Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq
- 7- cellules MARC-145 non infectées
- 8- cellules MARC-145 infectées avec le VSRRP
- 9- cellules MARC-145 infectées avec le AdCMV5GFPq



À la figure 8B, le même type d'analyse est effectuée mais révélée avec un anticorps anti-GFP. La migration du gel a été altérée et le côté droit semble plus bas que le côté gauche. De plus, une différence de masse moléculaire entre la GFPq en configuration dicistronique (IRES-GFPq) (pistes 2 et 3) et la GFPq seule (piste 9) est observée. En effet, lorsque la GFPq est exprimée en configuration dicistronique elle possède une séquence ajoutée correspondant aux 38 premiers aa de la protéine chloramphénicol acétyltransférase (Mosser *et al.*, 1997) ce qui a pour conséquence d'augmenter la masse moléculaire de cette GFPq par rapport à une GFPq sans IRES. La GFPq sans IRES (piste 9) a une masse moléculaire de 26 kDa. Il y a aussi une partie de cette GFPq (piste 9) qui semble subir de la dégradation. De plus, l'expression de la GFPq seule est plus forte que celle de la GFPq en configuration dicistronique (IRES-GFPq) car seulement 5 µg de protéines totales dans la piste 9 est nécessaire pour obtenir une belle bande en comparaison avec le 30 µg de protéines totales des pistes 2 et 3. En effet, la présence d'un IRES entre le promoteur et la GFPq a tendance à diminuer l'expression de la GFPq (Mosser *et al.*, 1997). Le type de transgène présent entre le promoteur et la GFPq en configuration dicistronique (IRES-GFPq) peut aussi influencer l'expression de cette GFPq : soit en augmentant son expression, soit en la diminuant, soit en ne la changeant pas. Ici, la GP₅ comme transgène (ORF5-IRES-GFPq) ne fait pas augmenter l'expression de la GFPq dans la piste 2 par rapport à celle dans la piste 3. Dans la piste 4, la présence de la protéine de fusion est détectable à environ 50 kDa mais la forme dégradée de la protéine est plus présente que la forme fusionnée. Cette différence d'intensité entre les deux formes n'était pas présente à la figure 8A (piste 4). Ensuite, on remarque que les deux autres protéines de fusion ORF5(1-90aa)/GFPq et ORF5(118-200aa)/GFPq (pistes 5 et 6) sont présentes à des tailles de 36 à 38 kDa et que la taille plus élevée de la ORF5(1-90aa)/GFPq par rapport à la ORF5(118-200aa)/GFPq est peut-être due à une présence de glycosylation (Wissink *et al.*, 2004). Ces deux protéines sont plus visibles en utilisant un anticorps anti-GFP qu'un anticorps anti-GP₅. Ainsi, les trois versions de l'ORF5 construites s'expriment (bien qu'à des niveaux différents) et les protéines sont détectables avec un anticorps anti-GP₅ et un anticorps anti-GFP.

Quant à la figure 9, l'immunobuvardage de type Western est effectué sur des lysats de cellules MARC-145 exprimant les mêmes protéines que la figure précédente. Le but de

cette figure est de vérifier que les différentes constructions sont fonctionnelles et expriment les GP₅ (seules ou en fusion) dans des cellules permissives où les virus sont dans des conditions non répliquatives. À la figure 9, l'expression des protéines des différents virus non répliquatifs, après infection dans des cellules MARC-145, a été analysée par immunobuvardage de type Western. Dans la piste 2, plusieurs bandes correspondant à des formes différentes de ORF5-IRES-GFPq glycosylée (entre 24,5 kDa et 26 kDa) sont détectées et les bandes d'une masse inférieures correspondent à une forme dégradée de la protéine. Quant aux bandes supérieures à 24,5-26 kDa, elles peuvent résulter de l'ubiquitination de la GP₅. À la piste 4 de la figure 9A, la protéine de fusion ORF5/GFPq se retrouve à la masse attendue d'environ 50 kDa en plus des formes dégradées de la protéine. Les deux autres protéines de fusion, ORF5(1-90aa)/GFPq et ORF5(118-200)/GFPq, ne sont pas visibles avec un anticorps anti-GP₅. Ceci pourrait s'expliquer par un changement de conformation relié à la présence de la GFPq qui empêche l'anticorps de se lier et de permettre la détection de la protéine. Enfin, dans la piste 7, on voit l'ORF5 du VSRRP dont la masse est entre 24,5 kDa et 26 kDa selon le niveau de glycosylation dans lequel elle se trouve.

La figure 9B montre les mêmes échantillons que la figure 9A mais révélés par un anticorps anti-GFP. Dans les pistes 2 et 3, la GFPq en configuration dicistronique (IRES-GFPq) dont la masse est supérieure à la GFPq seule est détectée (piste 8). À la piste 8, en plus de la GFP d'environ 26 kDa, des formes dégradées de la protéine sont présentes. La piste 4 présente également de la dégradation en plus de la forme attendue de 50 kDa de la ORF5/GFPq. Quant aux pistes 5 et 6, la présence des deux autres protéines de fusion soit la ORF5(1-90aa)/GFPq et la ORF5(118-200)/GFPq est détectée. Mais la masse exacte de la ORF5(1-90aa)/GFPq est difficile à déterminer dans la piste 5 car en plus de la protéine de fusion, il y a des formes dégradées et possiblement ubiquitinées.

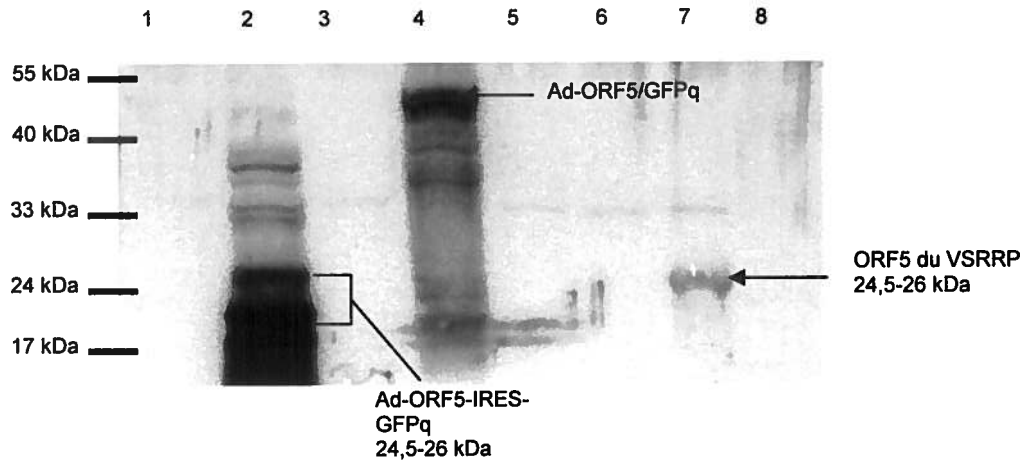
En regardant l'expression de la protéine de fusion ORF5/GFPq dans les cellules 293A et les cellules MARC-145, il est remarqué que la protéine est plus fortement exprimée dans ces dernières. En effet, dans la figure 9A, l'expression de la protéine de fusion ORF5/GFPq (piste 4) est plus forte que celle du témoin positif (ORF5 du VSRRP, piste 7) alors que dans la figure 8A, l'expression de la protéine de fusion (piste 4) est plus faible que le témoin positif (piste 8). Ce phénomène est également observé lors de la

détection des protéines avec l'anticorps de lapin anti-GFP où l'expression de la protéine ORF5/GFPq est plus forte dans les cellules MARC-145 (figure 9B, piste 4) que dans les cellules 293A (figure 8B, piste 4). Cette partie des travaux montre que les trois types de protéines de fusion s'expriment, bien que la détection de l'ORF5(1-90aa)/GFPq soit moins efficace avec un anticorps anti-GP₅. Alors il est possible de poursuivre en étudiant la localisation cellulaire de ces protéines de fusion.

Figure 9 : Détection de l'expression des différents virus non répliqués par immunobuvardage de type Western sur lysat de cellules MARC-145 infectées. Les cellules MARC-145 ont été infectées avec les différents virus à une MOI de 100 sauf pour l'infection au VSRRP qui est à une MOI de 1. Pour la partie A : 30 µg de protéines par piste, révéler avec un premier anticorps anti-GP₅ (1 :2000) et un second anticorps anti-lapin (1 :10 000) conjugué à la peroxydase. Pour la partie B : 30µg de protéines par piste sauf la piste 9 qui contient 5µg, révéler avec un premier anticorps anti-GFP (1 :5000) et un second anticorps anti-lapin (1 :10 000 conjugué à la peroxydase).

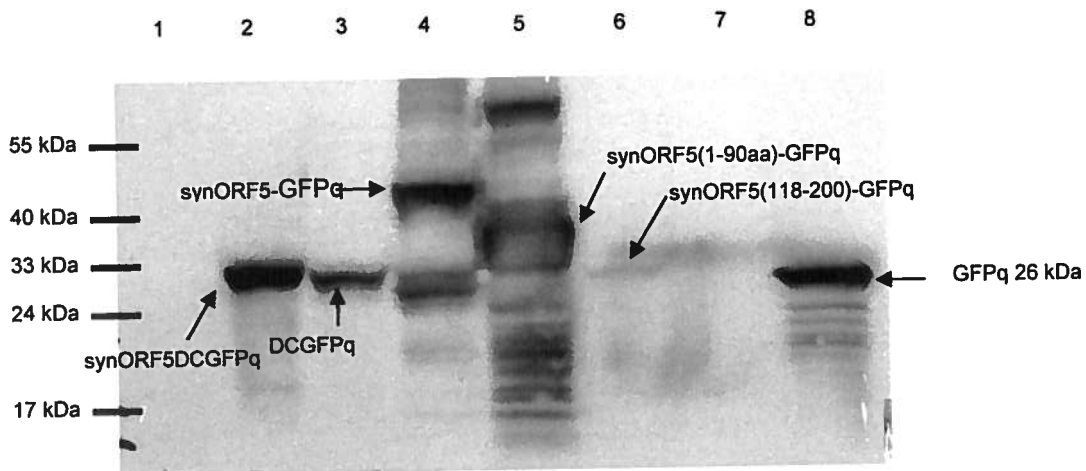
A. Immunobuvardage révélé avec un anticorps anti-GP₅

- 1- cellules MARC-145 non infectées
- 2- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5-IRES-GFPq
- 3- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-IRES-GFPq
- 4- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5/GFPq
- 5- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq
- 6- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq
- 7- cellules MARC-145 infectées avec le VSRRP
- 8- cellules MARC-145 infectées avec le AdCMV5GFPq



B. Immunobuvardage révélé avec un anticorps anti-GFP.

- 1- cellules MARC-145 non-infectées
- 2- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5-IRES-GFPq
- 3- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-IRES-GFPq
- 4- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5/GFPq
- 5- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq
- 6- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq
- 7- cellules MARC-145 infectées avec le VSRRP
- 8- cellules MARC-145 infectées avec le AdCMV5GFPq



3.3.2 Localisation cellulaire de la GP₅ en fusion avec la GFPq

La présence de la GFPq comme gène rapporteur en fusion avec les différentes versions de la GP₅ permet de visualiser directement en microscopie la localisation cellulaire des différentes versions construites. L'objectif de la figure 10 est de voir l'influence de la présence de la GFPq en fusion sur la localisation cellulaire de la protéine GP₅. Cette étude de localisation cellulaire se fait, tout d'abord, dans les cellules A549 (figure 10) où les différents virus sont non répliquatifs. En effet, si l'étude était effectuée en condition répliquative (dans des cellules 293A), l'excès de protéine produit pourrait interférer avec la visualisation de la localisation cellulaire. Ensuite, cette même expérience est reprise dans les cellules MARC-145 avec les mêmes objectifs dans une lignée cellulaire se prêtant mieux à l'expression naturelle de la GP₅. La GP₅ pleine longueur est une protéine membranaire qui passe par le réticulum endoplasmique lors de sa maturation mais qui lorsque exprimée par un adénovirus recombinant, a tendance à rester coincée dans le Golgi (Gagnon *et al.*, 2003). Quant à la GFP, on la retrouve diffuse dans toute la cellule. Autant dans la figure 10 que 11, la GFP du AdCMV5GFPq se retrouve diffuse dans toute la cellule. Par contre, il a été observé (résultats non publiés) que lorsque la GFP est en configuration dicistronique, celle-ci a tendance à se concentrer plutôt au noyau comme on voit aux figures 10 et 11 avec le Ad-IRES-GFPq. Cette concentration au noyau est moins visible aux figures 10 et 11 avec le Ad-ORF5-IRES-GFPq. Ensuite, lorsque la GFPq est fusionnée à la GP₅ pleine longueur, la protéine de fusion semble rester dans l'espace périnucléaire (voir figures 10 et 11, ORF5/GFPq). Ainsi, la présence de la GFPq n'influence pas la localisation cellulaire de la GP₅ pleine longueur. Quant à la version tronquée Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq, la figure 10 permet d'observer que les cellules exprimant le plus de GFP sont celles présentant de l'ECP et que la fluorescence semble uniforme à l'intérieur de celles-ci. Par contre, la figure 11 montre que dans les quelques cellules positives pour la GFP ne présentant pas de ECP, la GFPq semble située dans l'espace périnucléaire (voir la cellule dans l'encadré rouge). Donc cette version tronquée aurait la même localisation cellulaire que la version pleine longueur. L'intensité de fluorescence de la version Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq étant faible, il est difficile d'observer la localisation cellulaire de la protéine. Dans la figure 10, la GFP est située

uniformément dans les cellules, et dans la figure 11, la fluorescence est trop faible pour permettre une visualisation adéquate de la localisation cellulaire. Cette faible expression *in vitro* rappelle la faible expression observée en immunobuvardage à la figure 9. Ainsi, la présence de la GFP dans la version Ad-ORF5/GFPq n'influence pas la localisation cellulaire de la protéine. Quant à la version Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq, elle se situe dans l'espace périnucléaire. Pour la version Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq il est impossible de conclure sur sa localisation.

Figure 10 : Localisation cellulaire de la GP₅ des différentes versions tronquées par observation directe de la GFPq dans des cellules A549 infectées avec une MOI de 50. (Grossissement 40X).

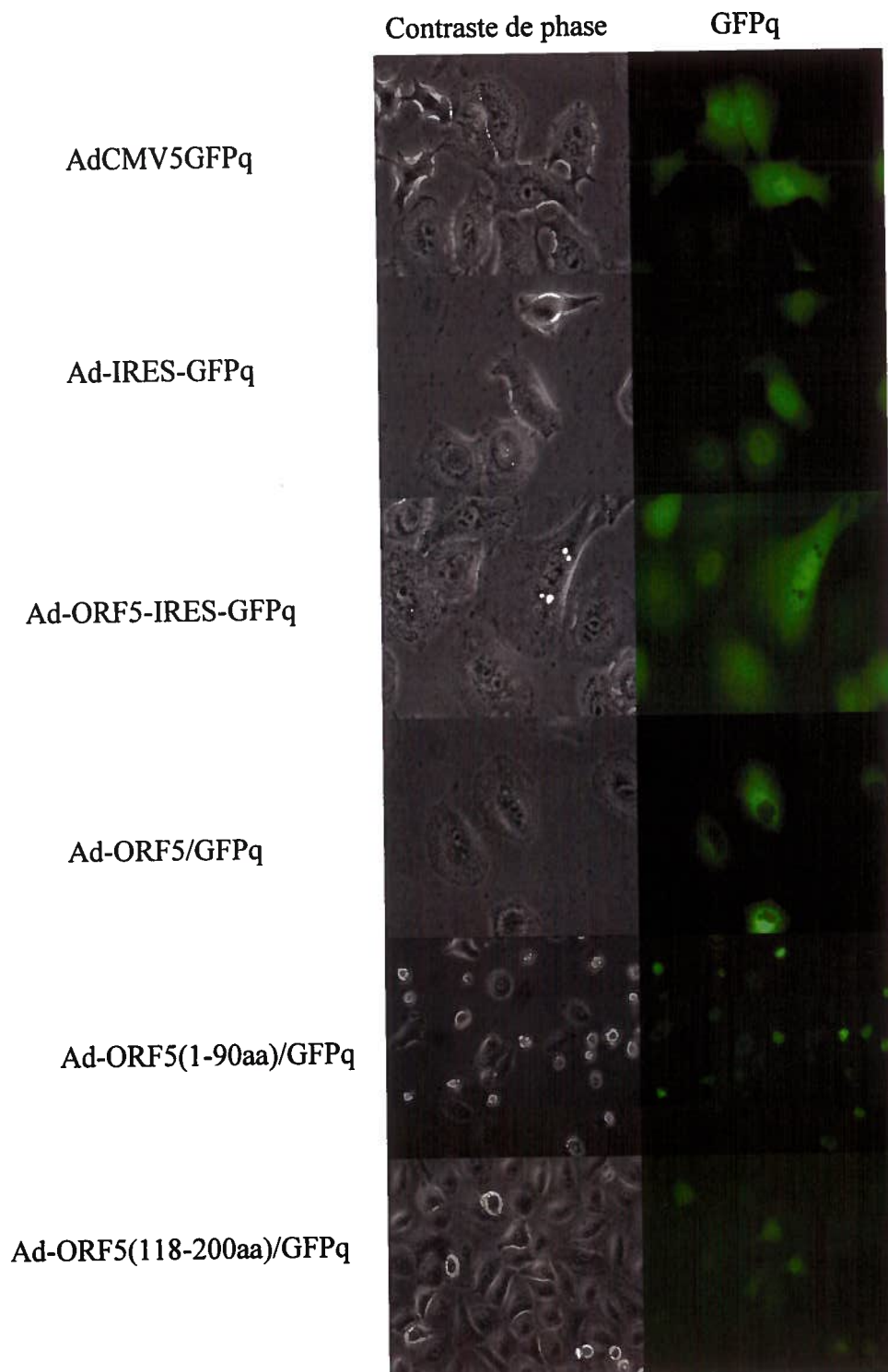
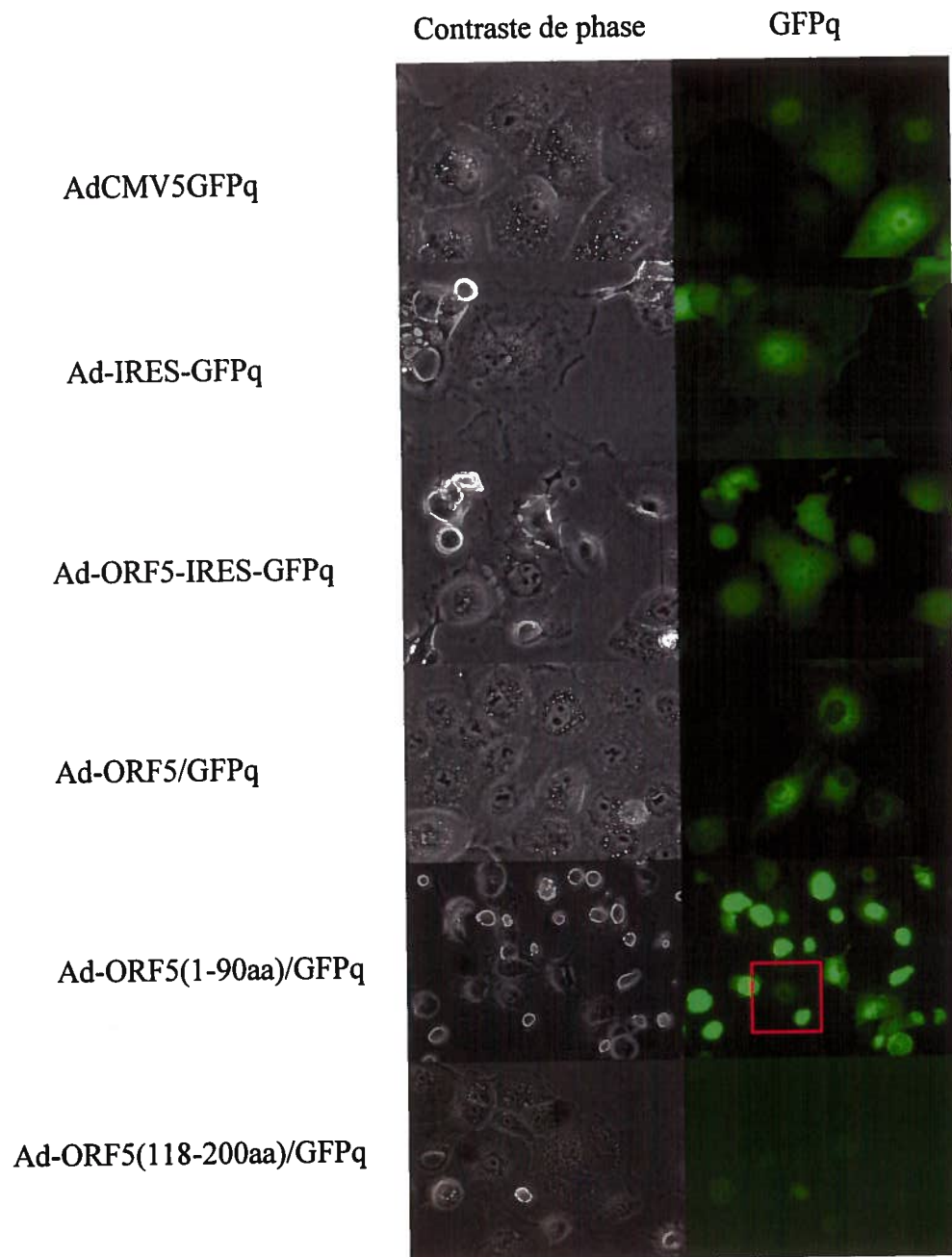


Figure 11 : Localisation cellulaire de la GP₅ des différentes versions tronquées par observation directe de la GFPq dans des cellules MARC-145 infectées avec une MOI de 100. (Grossissement 40X).



3.3.3 Vérification de la toxicité de la GP₅

Après la construction des versions tronquées de la GP₅ fusionnée GFPq, il a été nécessaire de voir si la fusion de la GP₅ à la GFPq influençait la caractéristique apoptotique de la protéine. La figure 12 montre l'effet des différentes versions de la GP₅ sur l'état du tapis cellulaire par rapport à l'effet d'un adénovirus AdCMV5GFPq. Les cellules utilisées sont les MARC-145 car ce sont des cellules sensibles à l'apoptose par la GP₅ (Gagnon *et al.*, 2003). La toxicité peut provenir de la présence du virus et/ou de l'expression de la GFPq par ce virus. Donc la quantité de virus présent (MOI) peut influencer l'étendue de la toxicité. La figure 12 montre en microscopie, l'état de la destruction du tapis cellulaire à 72 heures PI, soit avant la récolte des échantillons pour analyse en cytofluorométrie et avant le décompte de mortalité cellulaire. En contraste de phase, les cellules MARC-145 non infectées présentent un beau tapis cellulaire confluent et sain. Les cellules infectées avec un AdCMV5GFPq présentent également un beau tapis cellulaire mais contenant tout de même quelques cellules arrondies suggérant une certaine toxicité du virus. En effet, le pourcentage de mortalité cellulaire (figure 13) est un peu plus élevé dans les cellules infectées avec le AdCMV5GFPq que dans les cellules non-infectées. Quant aux cellules infectées avec le Ad-ORF5-IRES-GFPq, plusieurs cellules sont rondes et détachées, présentant de l'effet cytopathique (ECP). En ce qui concerne les cellules infectées avec le Ad-ORF5/GFPq, elles présentent peu de cellules rondes et détachées et ce même à une MOI plus forte. La figure 13 montre le pourcentage de mortalité cellulaire et le pourcentage de cellules vertes (positives pour la GFP) pour les différents virus utilisés. Le pourcentage de cellules vertes sert à vérifier l'efficacité de l'infection. Cette figure montre la mortalité causée par les différents virus lorsque leurs pourcentages de cellules vertes (donc l'efficacité de l'infection) sont semblables. La GP₅ seule cause une mortalité de 33 %. La mortalité des cellules infectées avec le AdCMV5GFPq n'est que de 6,5 %. Quant à la mortalité causée par la protéine de fusion, elle varie selon la MOI utilisée : pour une MOI de 100, il y a 2,6 %, pour une MOI de 200, on retrouve 5,9 % et la dernière MOI, celle de 400, présente une mortalité de 12 %. En comparant la mortalité entre les différents virus à la MOI de 100, il est observé que la protéine de fusion n'est plus toxique en comparaison avec la GP₅ seule, même que sa toxicité est inférieure à celle des cellules infectées avec un AdCMV5GFPq. Même en

augmentant les MOI de la protéine de fusion à 200 et 400, la toxicité reste inférieure à celle d'une GP₅ seule. Le pourcentage de cellules vertes quant à lui, est une indication de l'efficacité de l'infection. En effet, même si à la figure 12 il est plus difficile de juger de l'uniformité de l'infection en regardant le nombre de cellules positives pour la GFP, l'analyse en cytofluorométrie (figure 13) détecte autant les cellules qui expriment fortement que celles qui expriment plus faiblement la GFPq. Même si le nombre de cellules exprimant le gène rapporteur en fusion avec la GP₅ est plus élevé lorsque la MOI augmente, soit 91 % de cellules positives pour la GFP à une MOI de 200 et 98 % de cellules positives pour la GFP à une MOI de 400, la toxicité demeure faible.

À la suite de cette partie des travaux effectués avec les virus non répliquatifs, il est possible de déduire que : 1) la localisation cellulaire de deux des trois protéines de fusion (l'expression de l'ORF5(118-200aa)/GFPq étant trop faible pour conclure) demeure l'espace périnucléaire tout comme la GP₅ seule; 2) l'expression en immunobuvardage de type Western démontre que les trois versions de la GP₅ fusion GFPq sont fonctionnelles; 3) la présence de la GFP en fusion avec la GP₅ pleine longueur (ORF5/GFPq) rend cette GP₅ non toxique en comparaison avec la GP₅ seule. Ainsi, cette absence de toxicité de la protéine de fusion par rapport à la protéine seule empêche d'étudier davantage l'effet des versions tronquées sur la toxicité de la protéine. Par contre, l'ORF5/GFPq semble être un bon candidat pour remplir l'objectif fixé de trouver une protéine non apoptotique. Son immunogénicité reste à démontrer. Ainsi cette version sera utilisée dans la suite des travaux pour générer des virus répliquatifs/non disséminatifs.

Figure 12 : Observation en microscopie de la toxicité cellulaire (destruction du tapis cellulaire) causée par une infection de cellules MARC-145 par trois virus non répliquatifs à différentes MOI. (Grossissement 20X).

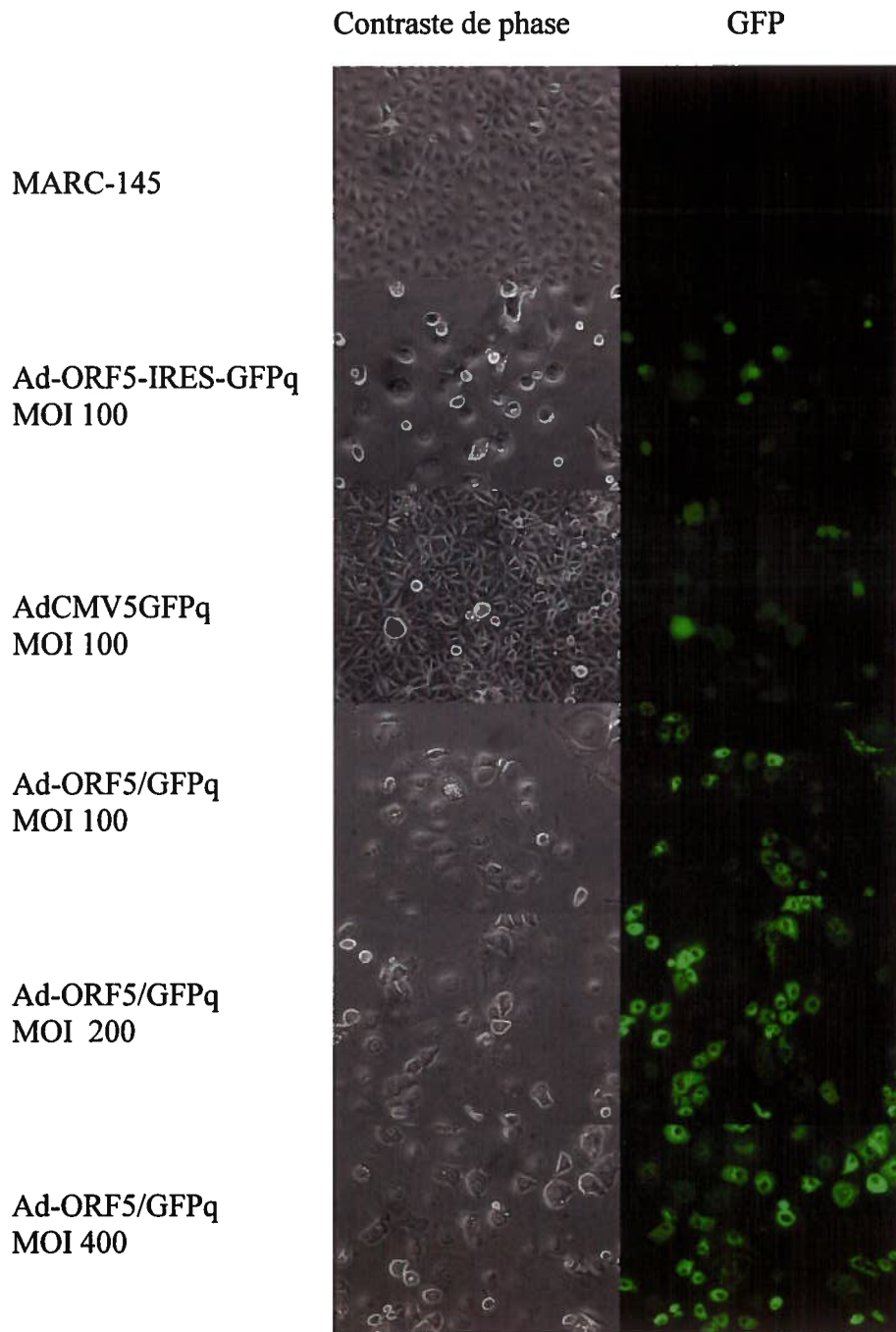
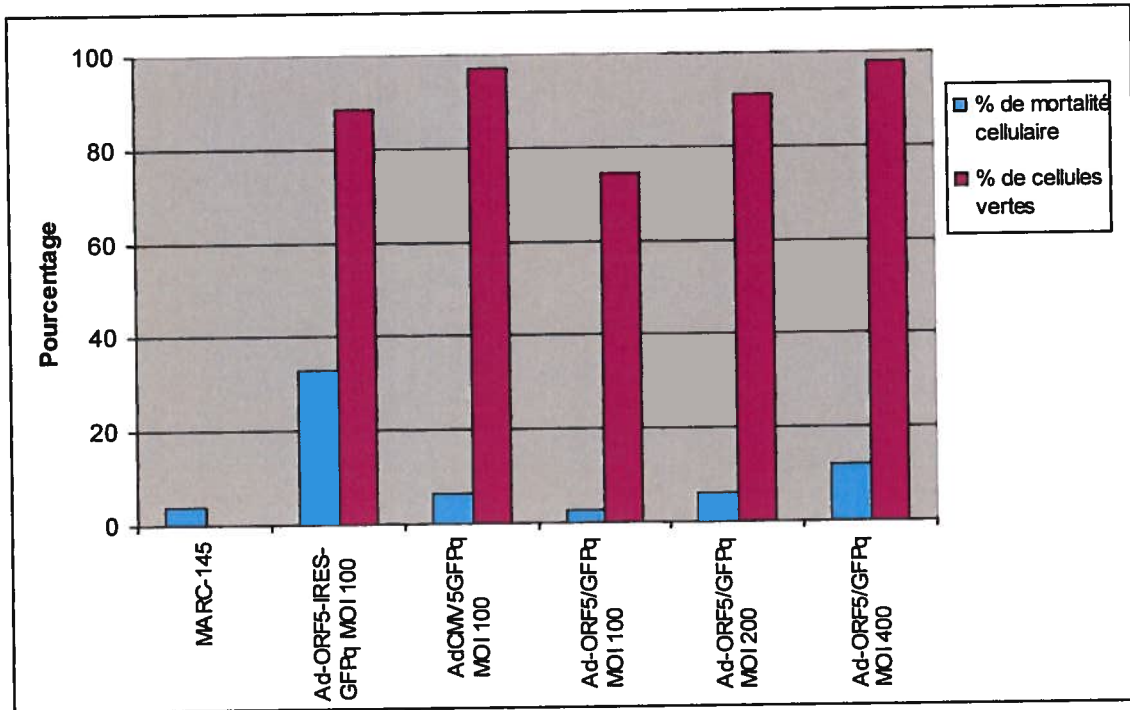


Figure 13 : Analyse du pourcentage de mortalité cellulaire et du pourcentage de cellules vertes à la suite d'une infection de cellules MARC-145 par trois virus non répliquatifs à différentes MOI.



3.4 Virus répliatifs/non disséminatifs

Puisqu'il a été démontré que la protéine de fusion ORF5/GFPq est la protéine qui s'exprime le mieux parmi les trois protéines de fusion et que cette protéine ne cause pas de mortalité cellulaire, elle a été choisie pour la suite des travaux. Ainsi cette version a été insérée dans un virus répliatif/non disséminatif qui a été utilisé pour améliorer l'expression de la GP₅ *in vitro*. Éventuellement, ce virus pourrait même servir *in vivo* à stimuler une meilleure réponse immunitaire qu'un virus non répliatif.

3.4.1 Construction des vecteurs de transfert servant à créer les virus répliatifs/non disséminatifs

Les plasmides ont été construits tel que décrit dans la section 2.1.3 du présent mémoire. Puisque les deux gènes d'intérêt, soit l'ORF5/GFPq et l'ORF5 seul, proviennent de digestion enzymatique et non pas d'une amplification par PCR, le séquençage des gènes n'a pas été effectué.

3.4.2 Construction des virus répliatifs/non disséminatif

Une fois que les vecteurs de transfert ont été obtenus, la prochaine étape était de construire les virus par une méthode basée sur le système AdEasyTM tel que décrit précédemment à la section 2.2.2 du matériels et méthodes, afin d'obtenir des virus qui contiennent la région E1A mais non la protéase. L'expression de l'ORF5 et de l'ORF5-GFPq de ces virus a été déterminée par immunobuvardage de type Western.

3.4.3 Immunobuvardage de type Western pour les différents virus répliatifs/non disséminatifs

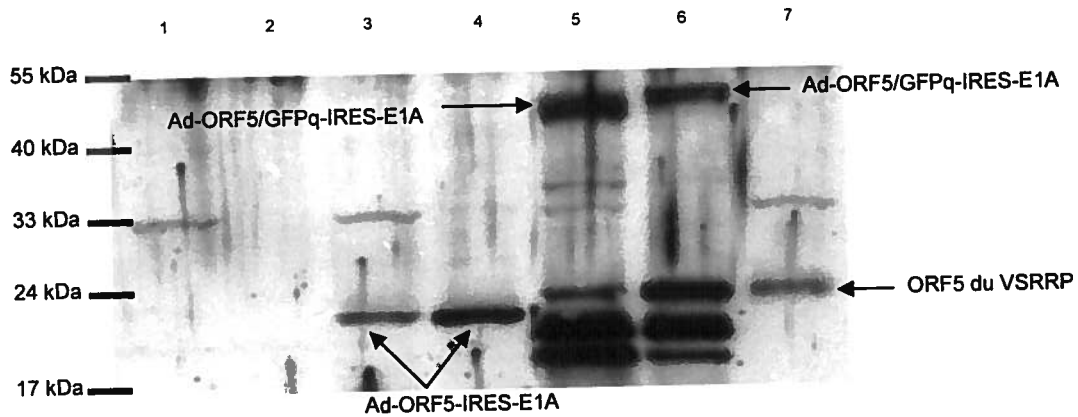
Dans la figure 14, l'expression de la GP₅ des deux virus répliatifs/non disséminatifs dans les cellules 293PS-CymR est analysée par immunobuvardage de type Western. L'ORF5 seul s'exprime autant dans les cellules 293PS-CymR que dans les cellules MARC-145. La masse moléculaire de la GP₅ des pistes 3 et 4 est d'environ 24,5 kDa alors que celle de la GP₅ provenant du VSRRP (piste 7) est un peu supérieure. Cette différence est probablement due à l'état de glycosylation de la GP₅ qui fait varier sa masse entre 24,5 et

26 kDa. Quant à la protéine de fusion ORF5/GFPq, on la voit autant dans les cellules 293PS-CymR que dans les MARC-145 à une masse d'environ 50 kDa. Les bandes d'une masse plus faible que 50 kDa sont des formes de dégradation tout comme celles observées dans les cas des virus non répliatifs.

Ainsi, comme la protéine de fusion ORF5/GFPq s'exprime bien, il sera possible de continuer les études en comparant l'expression du virus répliatif/non disséminatif au non répliatif (par mesure du niveau d'expression de la GFPq) dans plusieurs lignées cellulaires différentes. La suite des expériences a été effectuée avec cette version car elle n'a pas de toxicité cellulaire ce qui est souhaitable pour la production à grande échelle d'un adénovirus pour des fins de vaccination.

Figure 14 : Détection de l'expression des virus répliatifs/non disséminatifs par immunobuvardage de type Western sur lysat de cellules MARC-145 et 293PS-CymR infectées. Il y a 30 µg de protéines par piste et la révélation a été effectuée avec un premier anticorps anti-GP₅ (1 :2000) et un second anticorps anti-lapin (1 :10 000) conjugué à la peroxydase). Les cellules MARC-145 sont infectées avec une MOI de 100, sauf le VSRRP qui est infecté à MOI de 1 et les 293 CB6 sont infectées à une MOI de 10.

- 1- cellules MARC-145 non-infectées
- 2- cellules 293PS-CymR non-infectées
- 3- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5-IRES-E1A
- 4- cellules 293PS-CymR infectées avec le Ad-ORF5-IRES-E1A
- 5- cellules MARC-145 infectées avec le Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A
- 6- cellules 293PS-CymR infectées avec le Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A
- 7- cellules MARC-145 infectées avec le VSRRP



3.4.4 Différence d'expression entre le virus répliquatifs/non disséminatifs (Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A) et le virus non répliquatifs (Ad-ORF5/GFPq) dans différentes lignées cellulaires

Les deux types de virus ont été analysés dans les lignées cellulaires suivantes : 1) les 293A qui contiennent une partie du génome viral de l'adénovirus et dans lesquelles les virus des deux types peuvent répliquer leur génome; donc la différence d'expression entre les deux types de virus devrait être minimisée. 2) les A549 qui sont des cellules sensibles aux adénovirus car elles ne complètent pas la délétion des virus non répliquatifs; donc la différence d'expression entre le virus répliquatif/non disséminatif et le virus non répliquatif devrait se voir facilement. 3) deux lignées cellulaires porcines, les cellules PT et les PKA, qui sont aussi des cellules sensibles à l'adénovirus; donc il devrait y avoir une différence d'expression entre les deux virus. De plus, dans ces cellules, la différence d'expression entre les deux virus devrait se rapprocher des conditions présentes dans le modèle *in vivo*. L'expression du transgène par ces virus dans les différentes lignées cellulaires peut être influencée par trois facteurs qui ne sont pas mutuellement exclusifs soit : l'infectabilité relative des différentes cellules (donc l'abondance relative des récepteurs pour l'adénovirus), la force relative du promoteur CMV5 dans les différentes lignées et l'absence de la région E1B de l'adénovirus dans le vecteur répliquatif/non disséminatif.

La figure 15 montre la différence d'expression entre le Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A et le Ad-ORF5/GFPq dans plusieurs lignées cellulaires afin de voir si le virus répliquatif/non disséminatif exprime plus fortement la protéine de fusion pour permettre : 1) de stimuler une meilleure réponse immunitaire *in vivo*, et 2) de diminuer la MOI utilisée par rapport à la MOI du virus non répliquatif, tout en conservant le même niveau d'expression. La figure 15 montre que ce sont dans les cellules 293A que les indices de fluorescence (IF) sont les plus élevés. Le niveau d'expression de la GFP présent dans la protéine de fusion ORF5/GFPq a été mesuré par analyse en cytométrie de flux et un exemple du calcul d'indice de fluorescence IF se retrouve à l'Annexe C. Les cellules 293A étant très permissives à l'adénovirus, l'infection se fait de façon efficace bien qu'il faut une MOI supérieure à pour obtenir une majorité de cellules infectées (résultat non montré) et un indice de fluorescence (IF) élevé. De plus, l'expression du promoteur CMV5 est

favorisée dans ces cellules, ce qui contribue à l'obtention de IF élevés. Le rapport entre le niveau d'expression du virus répliquatif/non disséminatif et le virus non répliquatif est faible, et ce à toutes les MOI. Étant donné que le virus non répliquatif a la capacité de répliquer son génome dans les cellules 293A, son IF est élevé à toutes les MOI, ce qui explique le faible rapport entre les niveaux d'expression des deux types de virus.

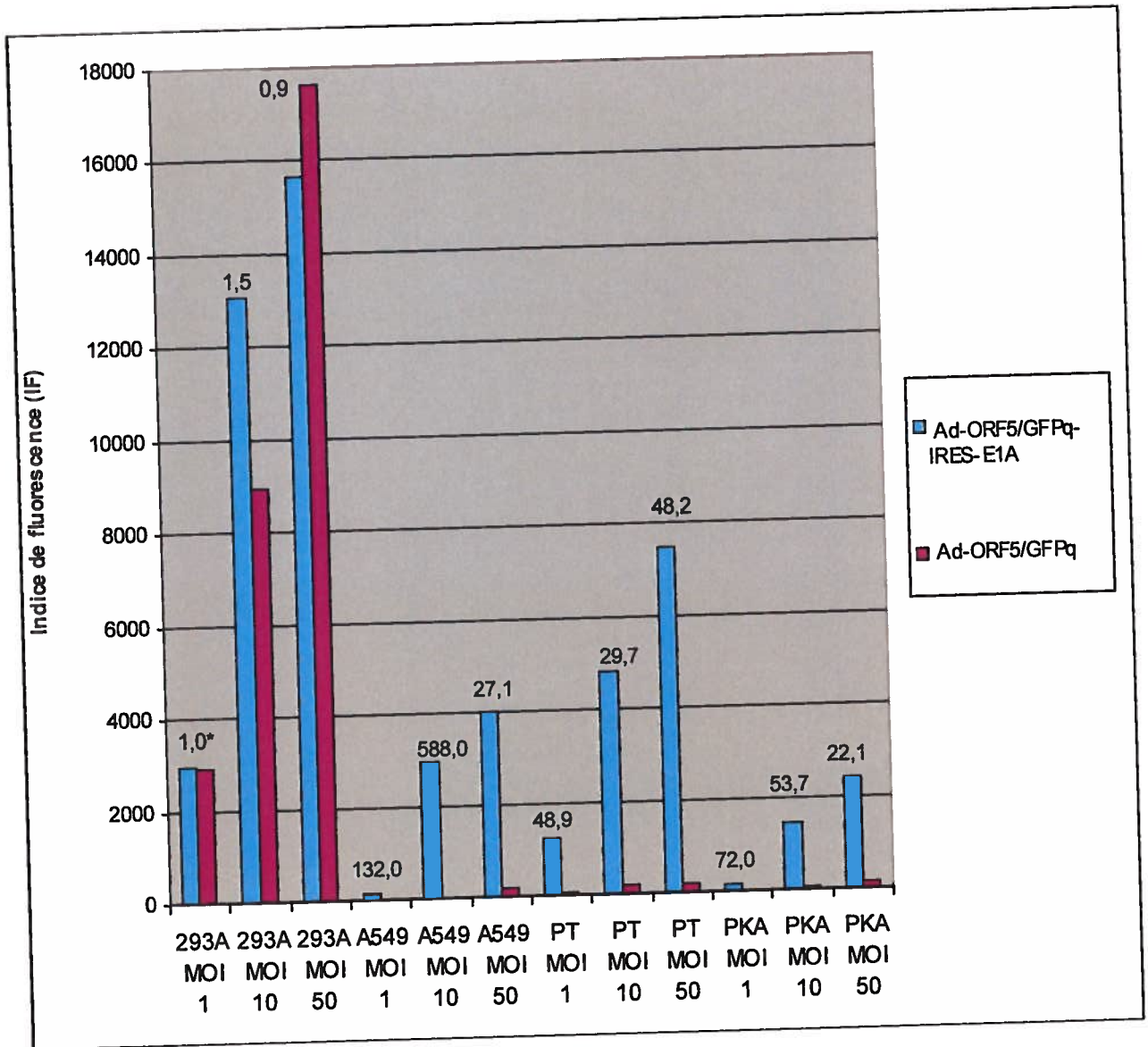
Dans les cellules A549, les IF du virus répliquatif/non disséminatif sont élevés (puisque les cellules sont sensibles à l'adénovirus) mais pas autant que dans les cellules 293A. En effet, le IF le plus élevé est de 4006, pour une MOI de 50 alors que dans les 293A, le IF le plus élevé pour le virus répliquatif (MOI de 50) est de 15 639. La différence est possiblement due à l'expression du promoteur CMV5 qui n'est pas aussi favorisé dans les A549 que dans les 293A. Quant au ratio entre le niveau d'expression des deux types de virus, il est beaucoup plus élevé que dans les cellules 293A étant donné qu'il n'y a pas de complémentation permettant au virus non répliquatif de répliquer son génome. Ainsi, à une MOI de 1, le virus répliquatif/non disséminatif s'exprime 132 fois mieux que le non répliquatif alors qu'à une MOI de 10, ce ratio augmente à 588 fois. Par contre, à plus forte MOI (MOI de 50), une chute dans le ratio est observée; il est de seulement 27,1. Le IF du virus répliquatif/non disséminatif passe de 2940 pour une MOI de 10 à 4006 pour une MOI de 50 ce qui démontre tout de même une augmentation, mais cette augmentation n'est pas suffisante pour contrer la chute du ratio observée à la MOI de 50. Le virus répliquatif/non disséminatif comprend la région E1A de l'adénovirus mais pas la région E1B, pour des raisons de simplification lors de la construction virale. Or, il est connu que dans les adénovirus de type sauvage, la région E1A est toxique et cette toxicité est compensée par la présence de la région E1B. Contrairement aux cellules 293A, les cellules A549 n'expriment pas la région E1B et la toxicité de la région E1A présente chez le virus répliquatif/non disséminatif peut expliquer que le IF de ce virus n'a pas augmenté à plus de 4006 causant ainsi une diminution dans le ratio à une MOI de 50. À plus faible MOI, soit MOI de 1 et de 10, cette toxicité de la région E1A ne semble pas affecter les IF ou les ratios.

Quant aux cellules PT, le virus répliquatif/non disséminatif a de bons IF, aux différentes MOI. Ces IF sont meilleurs que ceux du virus répliquatif/non disséminatif dans les cellules A549, à toutes les MOI, ce qui signifie que le promoteur CMV5 est favorisé dans

les cellules PT mais pas autant que dans les cellules 293A. Peu importe la MOI utilisé, les ratios sont assez constants, soit 48,9 pour une MOI de 1, puis 29,7 pour une MOI de 10 et 48,2 pour une MOI de 50. Ceci signifie que le IF du virus répliatif/non disséminatif et le IF du virus non répliatif augmentent de façon proportionnelle l'un par rapport à l'autre gardant le ratio constant. Même à une forte MOI (MOI de 50) le ratio reste constant, donc les cellules PT ne sont pas aussi affectées que les autres types de cellules pas la toxicité reliée à la présence de la région E1A qui fait diminuer les ratios dans les cellules A549 et PKA. Par contre, les IF des deux types de virus dans les cellules PKA, aux différentes MOI, sont les plus faibles parmi les IF dans toutes les lignées cellulaires (293A, A549 et PT). Ainsi, le promoteur CMV5 est moins fort dans cette lignée que dans les autres, mais l'infectabilité est assez comparable (résultats non montrés). Bien que le IF du virus répliatif/non disséminatif, dans les cellules PKA, augmente en fonction de la MOI, cette augmentation n'est pas linéaire amenant les ratios à diminuer. Cette augmentation qui n'est pas linéaire est probablement due, tout comme dans les cellules A549, à la toxicité de la région E1A à plus forte MOI.

À la lumière de ces résultats, dans les lignées cellulaires porcines (PT et PKA) à plusieurs MOI, les ratios variant de 22,1 à 72 démontrent que le virus répliatif/non disséminatif est plus efficace que le non répliatif pour exprimer le transgène. C'est à la MOI la plus faible, MOI de 1, que les ratios sont les plus forts, soit de 72 pour les cellules PKA et 48,9 pour les cellules PT.

Figure 15 : Niveau d'expression de l'ORF5/GFPq, en terme d'indice de fluorescence IF, des virus Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A et Ad-ORF5/GFPq dans différentes lignées cellulaires à différentes MOI. Les cellules 293A, A549, PT et PKA ont été infectées avec des MOI de 1, 10 et 50 du virus répliquatif/non disséminatif (Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A) et du virus non répliquatif (Ad-ORF5/GFPq).



4. Discussion

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de fabriquer différentes versions tronquées de la GP₅ du VSRRP (en fusion avec la GFPq) afin de trouver une version qui serait non apoptotique mais qui demeurerait immunogénique. Ensuite, la meilleure version devait être clonée dans un adénovirus répliquatif/non disséminatif et pourrait être ultérieurement utilisée dans des études *in vivo* afin d'évaluer son potentiel protecteur contre l'infection au VSRRP.

Trois versions ont été construites et exprimées dans des virus non répliquatifs, soit l'ORF5/GFPq, l'ORF5(1-90aa)/GFPq et l'ORF5(118-200aa)/GFPq. La capacité de ces virus à exprimer la GP₅ a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. Puisque les cellules 293A complètent les délétions d'un virus non répliquatif et permettent sa répliquaison, tous les transgènes contenus dans nos différents virus devaient bien s'exprimer. Or, il a été observé que la protéine de fusion l'ORF5/GFPq s'exprimait mieux dans les cellules MARC-145 que dans les cellules 293A. Néanmoins la comparaison entre l'efficacité d'expression de la GP₅ dans ces deux types cellulaires est hasardeuse étant donné que les conditions expérimentales utilisées entre les deux infections (figure 8 par rapport à la figure 9) sont différentes. En effet, la MOI utilisée pour infecter les cellules MARC-145 est plus élevée que celle utilisée dans les cellules 293A. Cette différence au niveau du dosage génique a certainement favorisé une meilleure expression dans les cellules MARC-145. La réalisation de nouvelles expériences utilisant plusieurs MOI permettrait de déterminer le type cellulaire favorisant le meilleur niveau d'expression de la GP₅. Ensuite, à la figure 8A, les deux versions tronquées, ORF5(1-90aa)/GFPq et ORF5(118-200aa)/GFPq, ne sont peu ou pas du tout détectées par un anticorps anti-GP₅ alors qu'elles sont visibles en utilisant un anticorps anti-GFP. L'immunobuvardage de type Western révélé avec un anticorps anti-GFP prouve que ces deux versions tronquées sont exprimées par les virus puisque dans le cas d'une protéine de fusion, l'expression du gène rapporteur est liée à l'expression du transgène. Ainsi, si ces deux versions ne sont pas ou peu détectées, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses : 1) peut-être que l'anticorps anti-GP₅ n'était pas utilisé dans des conditions optimales ce qui expliquerait que la détection des protéines se fasse

moins bien avec un anticorps anti-GP₅ qu'avec un anticorps anti-GFP; 2) c'est peut être parce que quelque chose nuit physiquement à la détection, comme un changement conformationnel, ou bien que les épitopes ne sont pas présents. Selon les études effectuées avec des isolats du VSRRP autre que celui de la souche IAF-Klop, les différentes régions contenant les déterminants antigéniques majeurs se situent entre les acides aminés 27 et 52 (voir figure 3) ce qui pourrait expliquer que la version tronquée ORF5(118-200aa)/GFPq ne soit pas reconnue par l'anticorps anti-GP₅ étant donnée qu'elle ne contient pas cette région des épitopes. Par contre, cela ne permet pas d'expliquer pourquoi la version ORF5(1-90aa)/GFPq est peu détectée puisqu'elle possède la région des épitopes. Alors, une autre hypothèse pour expliquer le problème de détection par l'anticorps anti-GP₅ concerne la fusion des versions tronquées à la GFP. Il a été démontré que le fait de fusionner la GFP à une protéine peut changer sa localisation ou sa fonction (McCann *et al.*, 2005) donc, peut être que cela peut également changer la conformation de la GP₅ interférant avec la liaison de l'anticorps et réduisant la capacité de détection en immunobuvardage de type Western.

Dans la piste 2 de la figure 9, les bandes de masse moléculaire supérieures à 24,5KDa peuvent résulter de l'ubiquitination de la GP₅. L'ubiquitine est une protéine de 76aa qui peut former une variété de complexes polypeptiques. Avec l'enzyme E1 (activatrice répliquative), la E2 (enzyme de conjugation de l'ubiquitine) et la E3 (ligase d'ubiquitine), une molécule de monoubiquitine peut être ajoutée à un ou plusieurs sites sur une protéine ou il peut y avoir l'ajout d'une chaîne de polyubiquitine (Horak, 2004). Cet ajout d'ubiquitine attire la protéine vers un complexe appelé protéasome où la protéine sera dégradée. La dégradation par l'ubiquitine permet d'éliminer des formes altérées d'une protéine, des formes dénaturées, des protéines normales dont la concentration est trop élevée ou des protéines étrangères à la cellule (H. Lodish, 2000). Par exemple, les cellules infectées par un adénovirus subissent une stabilisation et une accumulation de la protéine p53 causée par l'action de la protéine virale E1A. Cette présence de p53 amène à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. Puisque cet arrêt du cycle cellulaire peut nuire à la réplication virale, l'adénovirus a trouvé une façon de diminuer la quantité de p53. En effet, la E1B 55K et la E4orf6 de l'adénovirus favorisent l'ubiquitination de la p53 et la dégradation par le protéasome. En immunobuvardage de type Western, il a été

démontré que l'ubiquitination de la p53 cause une augmentation de la masse moléculaire de la protéine (Querido et al., 2001; Harada et al., 2002). Donc en se basant sur ces études traitant de l'ubiquitination de la p53, il est suggéré que les bandes de masse moléculaire plus élevées que celles attendues (figure 9A piste 2, figure 9B piste 5) soit des formes ubiquitinées de l'ORF5.

Lors des études de toxicité cellulaire, il a été démontré que la fusion de la GFPq à la GP₅ interfère avec la caractéristique apoptotique de la protéine (voir section 3.3.3). De plus, il a été démontré que l'infection est uniforme par comparaison entre le pourcentage de cellules positives pour la GFP lors des infections avec chacune des différentes constructions. Donc, l'absence de toxicité de la GP₅ en fusion avec la GFPq n'est pas due à son absence dans les cellules puisque le nombre de cellules exprimant le gène rapporteur est comparable au nombre de cellules exprimant la GP₅ en configuration dicistronique avec la GFPq. Cette diminution de la toxicité cellulaire vient renforcer l'hypothèse du changement conformationnel causé par la présence de la GFPq qui expliquerait la diminution de la toxicité cellulaire de l'ORF5/GFPq et la diminution de la capacité de détection en immunobuvardage des deux versions tronquées. Il a également clairement été démontré que lorsque la GP₅ est seule, elle est toxique pour les cellules (Gagnon *et al.*, 2003). Ces études amènent à conclure que la caractéristique apoptotique des deux versions tronquées ne pourra pas être étudiée puisque la comparaison avec la version pleine longueur ORF5/GFPq est impossible étant donné que celle-ci n'est plus toxique. Tel que décrit précédemment à la section 1.3.3, la caractéristique apoptotique de la GP₅ est encore à ce jour, un phénomène controversé. Certains auteurs n'ont pas réussi à démontrer la présence d'apoptose (Lee *et al.*, 2004; Miller et Fox, 2004), certains autres l'ont démontrés mais n'ont pas démontré clairement la voie apoptotique empruntée par la GP₅ (Suarez *et al.*, 1996; Gagnon *et al.*, 2003) et d'autres émettent même des affirmations traitant de nécrose ou d'apoptose de cellules avoisinantes (Sur *et al.*, 1997). Regardons à nouveau l'étude de Suarez *et al.* (Suarez *et al.*, 1996) qui démontre que la GP₅ d'une souche Européenne du VSRRP cause une apoptose qui ne serait pas mitochondriale car elle est indépendante de l'influence de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Le problème de cette étude est qu'il n'est pas possible de savoir si le niveau de Bcl-2 exprimé par la lignée cellulaire utilisée est suffisant pour contrer le caractère apoptotique de la GP₅.

Donc, est-ce que l'apoptose causée par la GP₅ est véritablement indépendante de la voie mitochondriale? En ce qui concerne l'ORF5 synthétique de la souche IAF-Klop utilisé pour les travaux du présent mémoire, il a déjà été démontré par le Dr Gagnon (Gagnon *et al.*, 2003) qu'elle induit une toxicité de type apoptose par des analyses TUNEL et d'activation de procaspase 3. De plus, des études complémentaires effectuées par Lachapelle *et al.* (communication personnelle) avec l'ORF5 de type sauvage de la souche IAF-Klop ont démontré qu'il y a détection de l'activation de la procaspase 9 et le relargage de cytochrome C, suggérant qu'il y a formation de l'apoptosome dans des cellules MARC-145 infectées avec un adénovirus exprimant cette GP₅. Ensuite, il y a activation de la procaspase 3 qui est impliquée dans l'apoptose intrinsèque (voie mitochondriale) sans avoir activation de la procaspase 8. Cette dernière est impliquée dans la voie extrinsèque des récepteurs de mort. Par contre, dans cette même étude (Lachapelle *et al.* communication personnelle) il a été observé que dans le cas de l'apoptose induite par une infection avec le VSRRP, il y a activation de la cascade mitochondriale (procaspase 9, cytochrome C, procaspase 3 et procaspase 2) et aussi de la procaspase 8, ce qui suggère que les deux voies apoptotiques seraient activées. Ainsi, il y aurait peut-être une autre protéine du VSRRP qui induirait la deuxième voie apoptotique. Selon Gagnon *et al.* (2003), la protéine de la nucléocapside N serait peut-être impliquée dans cette deuxième voie apoptotique puisqu'il a été impossible de construire un adénovirus exprimant constitutivement cette protéine.

Par contre, Miller *et al.* (Miller et Fox, 2004) et de Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2004) ne montrent pas de présence d'apoptose. Deux explications sont possibles pour cette contradiction. Premièrement, dans l'étude de Miller (Miller et Fox, 2004), il s'agit de la détection par biopuce de l'absence d'augmentation de la synthèse de gènes ayant un rôle à jouer dans l'apoptose, ce qui a amené les auteurs à conclure qu'il n'y avait pas de mort cellulaire programmée. Par contre, si l'apoptose observée *in vitro* est causée par l'activation de procaspases, il est possible de ne pas voir d'augmentation de synthèse des gènes des caspases puisque ces protéines sont sécrétées constitutivement dans les cellules. Ainsi, il pourrait peut-être y avoir activation de procaspases sans que Miller détecte un changement dans la synthèse de gènes proapoptotiques (Iordanov *et al.*, 2005; Peluffo *et al.*, 2005). Ensuite, en ce qui concerne les résultats de Lee *et al.* (2003), il y a

toutefois un problème avec les expériences. Le promoteur inductible à la tétracycline ne permet pas d'éteindre complètement l'expression d'une protéine sous son contrôle, il y a toujours une fuite dont la conséquence dépend de la protéine exprimée par le promoteur. Ainsi, lorsque la lignée HeLa-GP₅ a été créée, la faible expression de GP₅ qui est peut-être due à la fuite du promoteur tétracycline a appliqué une pression sélective sur les clones cellulaires en croissance. La majorité des clones seraient éliminés soit par la présence d'un antibiotique de sélection soit par l'induction de l'apoptose par la GP₅. Les clones restants seraient ceux ayant survécus à l'antibiotique de résistance (donc exprimant une GP₅) et à l'induction de l'apoptose. La lignée cellulaire ainsi développée ne serait pas sensible à l'apoptose induite par la GP₅ d'où les résultats obtenus par l'équipe du Dr Yoo. Pour aborder ce problème il faudrait créer une lignée cellulaire avec une GP₅ sous le contrôle d'un promoteur inductible plus efficace ou bien utiliser une double régulation de la GP₅ pour être certain d'éteindre complètement son expression.

Lors de l'analyse en immunobuvardage de type Western des deux virus répliatifs/non disséminatifs à la figure 14, les infections ont été effectuées dans les cellules 293PS-CymR donc dans des conditions où l'expression des protéines GP₅ et GP₅/GFPq était partiellement réprimée. En effet, au moment où les virus répliatifs/non disséminatifs ont été construits, il n'était pas connu que la fusion de la GFPq à la GP₅ altérerait la caractéristique apoptotique de la protéine donc, il a été choisi de réprimer l'expression des deux types de protéines par l'utilisation du CymR. Si cette expression n'avait pas été partiellement réprimée, il aurait été possible d'observer à la figure 14 une production de protéine plus élevée dans les cellules 293PS (sans répression) que dans les cellules MARC-145. Ces résultats coïncideraient avec ceux de la figure 15 où il est démontré que, dans des conditions non répressives, les niveaux d'expression en terme d'indice de fluorescence les plus élevés sont dans les 293A.

L'adénovirus Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A contient la région E1A qui lui permet de répliquer son génome mais le gène de la protéase est supprimé empêchant ainsi la formation de particules virales infectieuses. De plus, il ne contient pas la région E1B qui sert, entre autre, à réguler la toxicité de la région E1A. Tel que décrit précédemment (section 1.4.5), en utilisant le gène suicide CD::UPRT, le virus répliatif/non disséminatif exprime beaucoup mieux que le virus non répliatif. L'utilisation d'un adénovirus

réplicatif/non disséminatif, augmentera le nombre de copies du transgène ce qui pourrait permettre de stimuler une meilleure réponse immunitaire lors de la vaccination.

La section 3.4.4 du présent mémoire montre les résultats concernant la différence d'expression entre les virus réplicatifs/non disséminatifs Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A et non réplicatifs Ad-ORF5/GFPq dans différentes lignées cellulaires. Rappelons que les cellules 293A sont des cellules humaines d'épithélium de rein qui contiennent une partie du génome de l'adénovirus humain de type 5 permettant de compléter la délétion présente chez les virus non réplicatifs et que ce sont des cellules permissives lors de l'infection avec plusieurs types d'adénovirus. Quant aux cellules A549, qui sont des cellules humaines de cancer de poumon, elles sont sensibles à la pénétration du virus mais elles ne supportent pas la réplication des virus délétés dans la région E1. Quant aux cellules porcines, les PKA sont des cellules épithéliales de reins de porc et les cellules PT sont des fibroblastes de testicule de porc qui sont des cellules sensibles à l'adénovirus. Les meilleurs IF sont ceux retrouvés lors de l'infection des cellules 293A ce qui démontre que ces cellules sont très permissives aux adénovirus et que l'expression du promoteur CMV5 dans ces cellules est favorisée. Par contre, les rapports sont faibles étant donné que la présence de E1A permet au virus non réplicatif de répliquer son génome. Dans les cellules A549 et les cellules PT, de bons IF et de bons rapports sont observés conformément à ce à quoi on s'attendait. Dans les cellules porcines, de bons IF ont été obtenus bien que les IF mesurés dans les cellules PKA soient inférieurs. Donc l'expression du transgène par le CMV5 est moins efficace dans les cellules PKA malgré une bonne infectabilité (résultats non montrés). En ce qui concerne les rapports entre l'expression du virus réplicatif/non disséminatif et le virus non réplicatif dans les cellules porcines, ils varient entre 22,1 et 72,0 fois plus élevés permettant d'affirmer que lors d'une expérimentation chez l'animal, l'utilisation de virus réplicatifs/non disséminatifs devrait permettre de diminuer la dose d'adénovirus injecté par animal en comparaison avec la dose normalement utilisée de virus non réplicatif. Ceci diminuerait le coût du vaccin recombinant. De plus, on observe que les meilleurs rapports sont à la MOI la plus basse, MOI de 1, ce qui permettra de diminuer davantage les coûts du vaccin. Ajoutons à cela l'utilisation d'une version non apoptotique soit l'ORF5/GFPq dans le réplicatif/non

disséminatif et il serait peut être possible de diminuer non seulement le coût du vaccin mais également le coût de production de ce même vaccin.

Considérant que Kheyar *et al.* (Kheyar *et al.*, 2005) a démontré qu'il y a une meilleure réponse immunitaire chez l'animal lorsque la quantité de protéine GP₅ est plus élevée (dans leur cas par l'utilisation de l'ORF5 synthétique par rapport à l'ORF5 de type sauvage), une même dose d'adénovirus répliquatif/non disséminatif par rapport à la dose de non répliquatif utilisée au préalable dans ces expériences devrait être plus efficace à stimuler la réponse immunitaire. De plus, la présence de la région E1A dans le virus répliquatif/non disséminatif devrait stimuler davantage la réponse immunitaire de type inflammatoire par rapport à un adénovirus de première génération ne comprenant pas cette région. En effet, la présence de la région E1A de l'adénovirus permet de constater une augmentation de la production d'IL-8 (Keicho *et al.*, 1997a; Keicho *et al.*, 1997b; Higashimoto *et al.*, 2002), une augmentation de la quantité intracellulaire de la molécule d'adhésion ICAM-1 (Keicho *et al.*, 1997b) et une corrélation avec l'augmentation de l'activité de NF- κ B (Keicho *et al.*, 1999). De plus, la région 13S de E1A transactive le gène du TNF dans des cellules inflammatoires (Metcalf, 1996).

L'utilisation d'une protéine de fusion ORF5/GFPq permettrait d'obtenir la production d'anticorps contre la GP₅ du VSRRP mais également contre la GFPq et contre le vecteur adénovirus. Les anticorps obtenus contre la GFPq peuvent devenir avantageux lorsqu'il s'agit de distinguer entre un animal vacciné et un animal naturellement infecté.

Il existe une problématique concernant l'utilisation des adénovirus dans la vaccination chez l'humain qui concerne la présence d'une immunité préexistante, plus forte dans certains endroits du monde, contre l'adénovirus de type 5 (Barouch et Nabel, 2005). Cette immunité préexistante nuirait à la stimulation d'une bonne réponse immunitaire lors de la vaccination mais ceci ne devrait pas s'appliquer dans le cas de l'utilisation d'un adénovirus humain de type 5 chez le porc. La forte réponse immunitaire contre le transgène, qui devient un désavantage dans le cas de l'utilisation d'adénovirus recombinants pour la thérapie génique, devient souhaitable dans un cas de vaccination (Barouch et Nabel, 2005). Ainsi, des études ont été effectuées afin de minimiser la réponse immunitaire contre le vecteur et favoriser celle contre le transgène. Selon des études effectuées avec un adénovirus encodant la protéine Gag du virus de

l'immunodéficience simienne, l'adénovirus s'est avéré plus efficace à stimuler la réponse immunitaire que le vaccin à ADN et le poxvirus recombinant lors d'une étude *in vivo* chez le singe rhesus (Shiver *et al.*, 2002; Shiver et Emini, 2004). En plus, ils ont démontré qu'une première stimulation par un vaccin à ADN suivie par une restimulation avec l'adénovirus recombinant exprimant le même antigène permet de centraliser la réponse immunitaire sur cet antigène et d'avoir une bonne réponse immunitaire spécifique (Shiver *et al.*, 2002). Selon Barouch *et al.*, l'une des façons de contrer les effets négatifs de la réponse immunitaire contre le vecteur serait d'augmenter la dose mais cela entraînerait une augmentation de la toxicité (Barouch et Nabel, 2005). Or par l'utilisation d'un adénovirus répliquatif/non disséminatif, il est possible d'augmenter l'expression du transgène sans augmenter la dose.

En conclusion, les différents objectifs fixés pour ce projet de maîtrise ont été rencontrés. En effet, différents adénovirus non répliquatifs contenant plusieurs versions de la GP₅ en fusion avec la GFPq (premier objectif) ont été construits et ont permis de trouver une version non apoptotique de la GP₅ (deuxième objectif) soit l'ORF5/GFPq. Étant donné la toxicité de la GP₅ pleine longueur, une version non apoptotique de cette protéine permettra de faciliter la production à grande échelle d'adénovirus recombinants. Ensuite, avec la construction de virus répliquatifs/non disséminatifs (troisième objectif) et les études de différence d'expression entre les virus non répliquatifs et répliquatifs/non disséminatifs, il a été démontré que ces derniers expriment plus efficacement le transgène dans les A549, les cellules PKA et les PT. De plus puisque le virus répliquatif/non disséminatif exprime une protéine de fusion GFPq (ORF5/GFPq), la présence de la GFPq aurait un avantage, celui de distinguer entre un animal naturellement infecté par le VSRRP et un animal vacciné par un adénovirus recombinant en faisant la détection de la présence d'anticorps anti-GFP dans le sérum des porcs. Cette distinction devient importante pour l'industrie porcine lorsqu'il est question d'exporter les animaux. Pour la suite de ces travaux, il faudrait effectuer les études *in vivo* chez le porc pour vérifier l'immunogénicité de la GP₅/GFPq et comparer la protection induite par le virus répliquatif/non disséminatif avec celle induite par le virus non répliquatif ainsi que les vaccins commercialement disponibles. La stratégie à adopter serait une vaccination avec

un vaccin à ADN suivit d'une restimulation avec le virus répliatif/non disséminatif exprimant le même transgène. Ensuite, il a été démontré par l'analyse du niveau fluorescence de la GFP (indice de fluorescence) que le virus répliatif/non disséminatif exprime beaucoup mieux que le virus non répliatif. Ainsi, il faudrait s'assurer que, bien que la protéine utilisée soit une protéine de fusion (ORF5/GFPq), le niveau de la GP₅ est aussi plus élevé avec un virus répliatif/non disséminatif qu'un virus non répliatif. Suite à la conclusion que la fusion de la GFP à la GP₅ pleine longueur a changé la caractéristique apoptotique de cette dernière, est-il possible que la fusion de la GFPq à d'autres protéines apoptotiques puisse influencer leurs fonctions? Ainsi, est-ce que le caractère apoptotique de la GP₅ serait dépendante de sa conformation? Dans un autre ordre d'idée, il a été démontré que le VSRRP se réplique à de faibles titres *in vitro* (Kim *et al.*, 1993). Le caractère apoptotique de la GP₅ influencerait-elle le taux de répliation du virus? Suite à la création d'une GP₅ non apoptotique, il serait possible de construire un clone infectieux du VSRRP exprimant l'ORF5/GFPq et d'étudier l'impacte de la présence de la protéine de fusion sur la production virale. Si le clone infectieux exprimant l'ORF5 augmente la quantité de particules virales produites, cela pourrait faciliter la réalisation d'expériences *in vitro* utilisant le VSRRP ainsi que la production de vaccin atténué ou tué.

Références

- Albina E., L. Piriou, E. Hutet, R. Cariolet et R. L'Hospitalier (1998). Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol* 61: 49-66.**
- Allende R., T. L. Lewis, Z. Lu, D. L. Rock, G. F. Kutish, A. Ali, A. R. Doster et F. A. Osorio (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 80 (Pt 2): 307-315.**
- Allende R., W. W. Laegreid, G. F. Kutish, J. A. Galeota, R. W. Wills et F. A. Osorio (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol* 74: 10834-10837.**
- Arai K. I., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai et T. Yokota (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 59: 783-836.**
- Asano S., T. Honda, F. Goshima, D. Watanabe, Y. Miyake, Y. Sugiura et Y. Nishiyama (1999). US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal epithelial cells from apoptosis in infected mice. *J Gen Virol* 80 (Pt 1): 51-56.**
- Babiuk L. A., S. van Drunen Littel-van den Hurk, B. I. Loehr et R. Uwiera (2000). Veterinary applications of DNA vaccines. *Dev Biol (Basel)* 104: 73-81.**
- Balasuriya U. B. et N. J. MacLachlan (2004). The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 107-129.**

Barfoed A. M., M. Blixenkroner-Møller, M. H. Jensen, A. Botner et S. Kamstrup (2004). DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. Vaccine 22: 3628-3641.

Barouch D. H. et G. J. Nabel (2005). Adenovirus vector-based vaccines for human immunodeficiency virus type 1. Hum Gene Ther 16: 149-156.

Barry M. A. et S. A. Johnston (1997). Biological features of genetic immunization. Vaccine 15: 788-791.

Bassaganya-Riera J., B. J. Thacker, S. Yu, E. Strait, M. J. Wannemuehler et E. L. Thacker (2004). Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8+ T cells. Viral Immunol 17: 25-37.

Bastos R. G., O. A. Dellagostin, R. G. Barletta, A. R. Doster, E. Nelson, F. Zuckermann et F. A. Osorio (2004). Immune response of pigs inoculated with Mycobacterium bovis BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vaccine 22: 467-474.

Baulcombe D. C., S. Chapman et S. Santa Cruz (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. Plant J 7: 1045-1053.

Bautista E. M. et T. W. Molitor (1999). IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. Arch Virol 144: 1191-1200.

Benfield D., Nelson, J.K., Rossow, K., Rowland, R.R., Lawson, S.R., Steffen, M., Collins, J.E. (1998). Pathogenesis and persistence of PRRS. Proceedings of the Allende D Lemman Swine Conference 25: 169-171.

Benfield D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorceyca et D. Chladek (1992). Characterization of

swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4: 127-133.

Benjamini E C. R., Sunshine G (2000). *Immunology, a short course*, Quatrième Édition, pp. 498 pages. États-Unis: Publication Wiley-Liss.

Bloom BR F. P. (1994). The BCG experience : implications for future vaccines against tuberculosis., pp. pp 531-558. Édité par B. R. Bloom. Washington DC: ASM Press.

Botner A., B. Strandbygaard, K. J. Sorensen, P. Have, K. G. Madsen, E. S. Madsen et S. Alexandersen (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec* 141: 497-499.

Bourbeau D., G. Lavoie, J. Nalbantoglu et B. Massie (2004). Suicide gene therapy with an adenovirus expressing the fusion gene CD::UPRT in human glioblastomas: different sensitivities correlate with p53 status. *J Gene Med* 6: 1320-1332.

Brown S. B. et J. Savill (1999). Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol* 162: 480-485.

Caamano J. et C. A. Hunter (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15: 414-429.

Cavanagh D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142: 629-633.

Chalfie M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward et D. C. Prasher (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.

Charerntantanakul W., R. Platt, W. Johnson, M. Roof, E. Vaughn et J. A. Roth (2006). Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 109: 99-115.

Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Schlomchik (2001). *Immunobiology*, Cinquième Édition, pp. 732 pages. États-Unis: Garland Publishing.

Chiu W., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi et J. Sheen (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6: 325-330.

Chow Y. H., B. L. Chiang, Y. L. Lee, W. K. Chi, W. C. Lin, Y. T. Chen et M. H. Tao (1998). Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J Immunol* 160: 1320-1329.

Cody C. W., D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast et W. W. Ward (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32: 1212-1218.

Connell N. D., E. Medina-Acosta, W. R. McMaster, B. R. Bloom et D. G. Russell (1993). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11473-11477.

Connolly J. L., S. E. Rodgers, P. Clarke, D. W. Ballard, L. D. Kerr, K. L. Tyler et T. S. Dermody (2000). Reovirus-induced apoptosis requires activation of transcription factor NF-kappaB. *J Virol* 74: 2981-2989.

Cousens L. P., R. Peterson, S. Hsu, A. Dorner, J. D. Altman, R. Ahmed et C. A. Biron (1999). Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* 189: 1315-1328.

de Vries A. A., S. M. Post, M. J. Raamsman, M. C. Horzinek et P. J. Rottier (1995). The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J Virol* 69: 4668-4674.

Dea S., C. A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh et D. Rogan (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 145: 659-688.

Doly J., A. Civas, S. Navarro et G. Uze (1998). Type I interferons: expression and signalization. *Cell Mol Life Sci* 54: 1109-1121.

Eaton R. W. (1997). p-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of p-cymene to p-cumate. *J Bacteriol* 179: 3171-3180.

Elahi S. M., W. Oualikene, L. Naghdi, M. O'Connor-McCourt et B. Massie (2002). Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. *Gene Ther* 9: 1238-1246.

Eloit M. et M. Adam (1995). Isogenic adenoviruses type 5 expressing or not expressing the E1A gene: efficiency as virus vectors in the vaccination of permissive and non-permissive species. *J Gen Virol* 76 (Pt 7): 1583-1589.

Fernandez A., P. Suarez, J. M. Castro, E. Tabares et M. Diaz-Guerra (2002). Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death. *Virus Res* 83: 103-118.

Finkel T. H., G. Tudor-Williams, N. K. Banda, M. F. Cotton, T. Curiel, C. Monks, T. W. Baba, R. M. Ruprecht et A. Kupfer (1995). Apoptosis occurs predominantly

in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. Nat Med 1: 129-134.

Foss D. L., M. J. Zilliox, W. Meier, F. Zuckermann et M. P. Murtaugh (2002). Adjuvant danger signals increase the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Viral Immunol 15: 557-566.

Gaffen S. L. et K. D. Liu (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. Cytokine 28: 109-123.

Gagnon C. A. (2001). Propriétés moléculaires et variabilités antigéniques et génomiques des protéines structurales du virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (VSRRP), thèse de doctorat, pp. 267 pages. Laval: Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier.

Gagnon C. A., G. Lachapelle, Y. Langelier, B. Massie et S. Dea (2003). Adenoviral-expressed GP5 is distinct from the authentic protein that is included in the porcine reproductive and respiratory syndrome virions. Arch Virol 148: 951-972.

Gonin P., B. Pirzadeh, C. A. Gagnon et S. Dea (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. J Vet Diagn Invest 11: 20-26.

Goodkin M. L., A. T. Ting et J. A. Blaho (2003). NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. J Virol 77: 7261-7280.

Goyal S. M. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome. J Vet Diagn Invest 5: 656-664.

Graham F. L., J. Smiley, W. C. Russell et R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36: 59-74.

H. Lodish A. B., S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell (2000). **Molecular cell biology. Dans Media Connected, Quatrième Édition, pp. 1084 pages. Édité par W. H. F. company. New York.**

Harada J. N., A. Shevchenko, D. C. Pallas et A. J. Berk (2002). **Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. J Virol 76: 9194-9206.**

Hengartner M. O. (2000). **The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-776.**

Higashimoto Y., W. M. Elliott, A. R. Behzad, E. G. Sedgwick, T. Takei, J. C. Hogg et S. Hayashi (2002). **Inflammatory mediator mRNA expression by adenovirus E1A-transfected bronchial epithelial cells. Am J Respir Crit Care Med 166: 200-207.**

Holmgren L., A. Szeles, E. Rajnavolgyi, J. Folkman, G. Klein, I. Ernberg et K. I. Falk (1999). **Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. Blood 93: 3956-3963.**

Horak J. (2004). **Down-regulation of model yeast proteins by ubiquitin-dependent proteolysis. Physiol Res 53 Suppl 1: S99-102.**

Iordanov M. S., J. D. Kirsch, O. P. Ryabinina, J. Wong, P. N. Spitz, V. B. Korcheva, A. Thorburn et B. E. Magun (2005). **Recruitment of TRADD, FADD, and caspase 8 to double-stranded RNA-triggered death inducing signaling complexes (dsRNA-DISCs). Apoptosis 10: 167-176.**

Jan J. T., B. H. Chen, S. H. Ma, C. I. Liu, H. P. Tsai, H. C. Wu, S. Y. Jiang, K. D. Yang et M. F. Shaio (2000). **Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved. J Virol 74: 8680-8691.**

Jeff Zimmerman, Kyoung-Jin Yoon, Eric Neumann (éd.) (2003). 2003 PRRS Compendium Producer Edition, pp. 141 pages. Des Moines, Iowa: National Pork Board.

Jiang P., W. Jiang, Y. Li, S. Wu et J. Xu (2004). Humoral immune response induced by oral administration of *S. typhimurium* containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 321-328.

Karber G. (1931). 50% end-point calculation. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162: 480-483.

Keffaber K. K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *A.A.S.P. Newsletter* 1: 1-10.

Keicho N., W. M. Elliott, J. C. Hogg et S. Hayashi (1997a). Adenovirus E1A upregulates interleukin-8 expression induced by endotoxin in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol* 272: L1046-1052.

Keicho N., W. M. Elliott, J. C. Hogg et S. Hayashi (1997b). Adenovirus E1A gene dysregulates ICAM-1 expression in transformed pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 23-30.

Keicho N., Y. Higashimoto, G. P. Bondy, W. M. Elliott, J. C. Hogg et S. Hayashi (1999). Endotoxin-specific NF-kappaB activation in pulmonary epithelial cells harboring adenovirus E1A. *Am J Physiol* 277: L523-532.

Kheyar A., A. Jabrane, C. Zhu, P. Cleroux, B. Massie, S. Dea et C. A. Gagnon (2005). Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs. *Vaccine* 23: 4016-4022.

Kim H. S., J. Kwang, I. J. Yoon, H. S. Joo et M. L. Frey (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol 133: 477-483.

Kim J. J., K. A. Simbiri, J. I. Sin, K. Dang, J. Oh, T. Dentchev, D. Lee, L. K. Nottingham, A. A. Chalian, D. McCallus, R. Ciccarelli, M. G. Agadjanyan et D. B. Weiner (1999). Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV. J Interferon Cytokine Res 19: 77-84.

Kim J. J., J. S. Yang, K. H. Manson et D. B. Weiner (2001). Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccination in rhesus macaques through the use of IL-2, IFN-gamma, or IL-4 gene adjuvants. Vaccine 19: 2496-2505.

Kim T. S., D. A. Benfield et R. R. Rowland (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. Virus Res 85: 133-140.

Kotsopoulou E., V. N. Kim, A. J. Kingsman, S. M. Kingsman et K. A. Mitrophanous (2000). A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. J Virol 74: 4839-4852.

Labarque G., S. Van Gucht, H. Nauwynck, K. Van Reeth et M. Pensaert (2003). Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. Vet Res 34: 249-260.

Labarque G. G., H. J. Nauwynck, K. Van Reeth et M. B. Pensaert (2000). Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. J Gen Virol 81: 1327-1334.

Lamontagne L., C. Page, R. Larochelle et R. Magar (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and

tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells. *Viral Immunol* 16: 395-406.

Langermann S., S. R. Palaszynski, J. E. Burlein, S. Koenig, M. S. Hanson, D. E. Briles et C. K. Stover (1994). Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J Exp Med* 180: 2277-2286.

Lee C., D. Rogan, L. Erickson, J. Zhang et D. Yoo (2004). Characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoprotein 5 (GP5) in stably expressing cells. *Virus Res* 104: 33-38.

Lee S. M. et S. B. Kleiboeker (2005). Porcine arterivirus activates the NF-kappaB pathway through IkappaB degradation. *Virology* 342: 47-59.

Lopez O. J. et F. A. Osorio (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 155-163.

Madsen K. G., C. M. Hansen, E. S. Madsen, B. Strandbygaard, A. Botner et K. J. Sorensen (1998). Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch Virol* 143: 1683-1700.

Mardassi H., S. Mounir et S. Dea (1995). Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch Virol* 140: 1405-1418.

Mardassi H., B. Massie et S. Dea (1996). Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 221: 98-112.

Matsumoto S., H. Yukitake, H. Kanbara, H. Yamada, A. Kitamura et T. Yamada (2000). *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin induces protective immunity

against infection by *Plasmodium yoelii* at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. *Vaccine* 19: 779-787.

Mayo M. A. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147: 1655-1663.

Mbawuike I. N., P. R. Wyde et P. M. Anderson (1990). Enhancement of the protective efficacy of inactivated influenza A virus vaccine in aged mice by IL-2 liposomes. *Vaccine* 8: 347-352.

McCann C. M., F. M. Bareyre, J. W. Lichtman et J. R. Sanes (2005). Peptide tags for labeling membrane proteins in live cells with multiple fluorophores. *Biotechniques* 38: 945-952.

Meier W. A., J. Galeota, F. A. Osorio, R. J. Husmann, W. M. Schnitzlein et F. A. Zuckermann (2003). Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309: 18-31.

Meier W. A., R. J. Husmann, W. M. Schnitzlein, F. A. Osorio, J. K. Lunney et F. A. Zuckermann (2004). Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 299-314.

Meng X. J., P. S. Paul, P. G. Halbur et I. Morozov (1995). Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 12): 3181-3188.

Mengeling W. L., K. M. Lager, A. C. Vorwald et K. J. Koehler (2003). Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 93: 13-24.

Metcalf J. P. (1996). Adenovirus E1A 13S gene product upregulates tumor necrosis factor gene. Am J Physiol 270: L535-540.

Miller L. C. et J. M. Fox (2004). Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Immunol Immunopathol 102: 131-142.

Miller L. C., W. W. Laegreid, J. L. Bono, C. G. Chitko-McKown et J. M. Fox (2004). Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. Arch Virol 149: 2453-2463.

Moss J. B., A. L. Price, E. Raz, W. Driever et N. Rosenthal (1996). Green fluorescent protein marks skeletal muscle in murine cell lines and zebrafish. Gene 173: 89-98.

Mosser D. D., A. W. Caron, L. Bourget, P. Jolicoeur et B. Massie (1997). Use of a dicistronic expression cassette encoding the green fluorescent protein for the screening and selection of cells expressing inducible gene products. Biotechniques 22: 150-154, 156, 158-161.

Murtaugh M., Xiao, Johnson, Dee, Batista (2003). Porcine immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) : systemic and local response in acute and persistent infection. Proceedings of the IX International Symposium on Nidoviruses (Arterivirus and Coronavirus): (Abstract 5.7) p.61.

Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365.

Nelson E. A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J. E. Collins et D. A. Benfield (1993). Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 31: 3184-3189.

Niswender K. D., S. M. Blackman, L. Rohde, M. A. Magnuson et D. W. Piston (1995). Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J Microsc* 180 (Pt 2): 109-116.

Ogorelkova M., S. M. Elahi, D. Gagnon et B. Massie (2004). DNA delivery to cells in culture: generation of adenoviral libraries for high-throughput functional screening. *Methods Mol Biol* 246: 15-27.

Ostrowski M., J. A. Galeota, A. M. Jar, K. B. Platt, F. A. Osorio et O. J. Lopez (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 76: 4241-4250.

Oualikene W., L. Lamoureux, J. M. Weber et B. Massie (2000). Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum Gene Ther* 11: 1341-1353.

Oualikene W. et B. Massie (2000). Adenovirus vectors in functional genomics. Dans *Cell Engineering*, pp. pp 80-154. Édité par Al-Rubeai. Netherlands: Luwer Academiv Publishers.

Paton D. J., I. H. Brown, S. Edwards et G. Wensvoort (1991). 'Blue ear' disease of pigs. *Vet Rec* 128: 617.

Peluffo M. C., K. A. Young et R. L. Stouffer (2005). Dynamic expression of caspase-2, -3, -8, and -9 proteins and enzyme activity, but not messenger ribonucleic acid, in the monkey corpus luteum during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2327-2335.

Pirzadeh B. et S. Dea (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78: 1867-1873.

Pirzadeh B. et S. Dea (1998). Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 79: 989-999.

Pirzadeh B., C. A. Gagnon et S. Dea (1998). Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. Can J Vet Res 62: 170-177.

Plagemann P. G., R. R. Rowland et K. S. Faaberg (2002). The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. Arch Virol 147: 2327-2347.

Plana Duran J., I. Climent, J. Sarraseca, A. Urniza, E. Cortes, C. Vela et J. I. Casal (1997). Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. Virus Genes 14: 19-29.

Powell P. P., L. K. Dixon et R. M. Parkhouse (1996). An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. J Virol 70: 8527-8533.

Prasher D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast et M. J. Cormier (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene 111: 229-233.

Qiu H. J., Z. J. Tian, G. Z. Tong, Y. J. Zhou, J. Q. Ni, Y. Z. Luo et X. H. Cai (2005). Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. Vet Immunol Immunopathol 106: 309-319.

Querido E., P. Blanchette, Q. Yan, T. Kamura, M. Morrison, D. Boivin, W. G. Kaelin, R. C. Conaway, J. W. Conaway et P. E. Branton (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* 15: 3104-3117.

Randrianarison-Jewtoukoff V. et M. Perricaudet (1995). Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals* 23: 145-157.

Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne (2000). *Kuby Immunology, Quatrième Édition*, pp. 670 pages. New York: W.H. Freeman et Compagnie.

Rocha C. D., B. C. Caetano, A. V. Machado et O. Bruna-Romero (2004). Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Int Microbiol* 7: 83-94.

Rompato G., E. Ling, Z. Chen, H. Van Kruiningen et A. E. Garmendia (2006). Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 109: 151-160.

Rossow K. D. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol* 35: 1-20.

Royae A. R., R. J. Husmann, H. D. Dawson, G. Calzada-Nova, W. M. Schnitzlein, F. A. Zuckermann et J. K. Lunney (2004). Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 199-216.

Samsom J. N., T. G. de Bruin, J. J. Voermans, J. J. Meulenberg, J. M. Pol et A. T. Bianchi (2000). Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells. *J Gen Virol* 81: 497-505.

Santoro M. G., A. Rossi et C. Amici (2003). NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *Embo J* 22: 2552-2560.

Schwartz L. M., S. W. Smith, M. E. Jones et B. A. Osborne (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 980-984.

Schwarz E. M., C. Badorff, T. S. Hiura, R. Wessely, A. Badorff, I. M. Verma et K. U. Knowlton (1998). NF-kappaB-mediated inhibition of apoptosis is required for encephalomyocarditis virus virulence: a mechanism of resistance in p50 knockout mice. *J Virol* 72: 5654-5660.

Shen S., J. Kwang, W. Liu et D. X. Liu (2000). Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. *Arch Virol* 145: 871-883.

Shisler J. L. et X. L. Jin (2004). The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation. *J Virol* 78: 3553-3560.

Shiver J. W., T. M. Fu, L. Chen, D. R. Casimiro, M. E. Davies, R. K. Evans, Z. Q. Zhang, A. J. Simon, W. L. Trigona, S. A. Dubey, L. Huang, V. A. Harris, R. S. Long, X. Liang, L. Handt, W. A. Schleif, L. Zhu, D. C. Freed, N. V. Persaud, L. Guan, K. S. Punt, A. Tang, M. Chen, K. A. Wilson, K. B. Collins, G. J. Heidecker, V. R. Fernandez, H. C. Perry, J. G. Joyce, K. M. Grimm, J. C. Cook, P. M. Keller, D. S. Kresock, H. Mach, R. D. Troutman, L. A. Isopi, D. M. Williams, Z. Xu, K. E. Bohannon, D. B. Volkin, D. C. Montefiori, A. Miura, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, N. L. Letvin, M. J. Caulfield, A. J. Bett, R. Youil, D. C. Kaslow et E. A. Emini (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415: 331-335.

Shiver J. W. et E. A. Emini (2004). Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu Rev Med* 55: 355-372.

**Sirinarumitr T., Y. Zhang, J. P. Kluge, P. G. Halbur et P. S. Paul (1998). A pneumo-
virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome
virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. J Gen Virol 79:
2989-2995.**

**Snijder E. J., J. C. Dobbe et W. J. Spaan (2003). Heterodimerization of the two
major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. J Virol 77: 97-104.**

**Snijder EJ M. J. (2001). Arteriviruses. Dans Fields Virology, Fourth edition,
Lippincott, Williams and Wilkins, pp. pp. 1202-1220. Philadelphia.**

**Spetz A. L., B. K. Patterson, K. Lore, J. Andersson et L. Holmgren (1999).
Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism.
J Immunol 163: 736-742.**

**Suarez P., M. Diaz-Guerra, C. Prieto, M. Esteban, J. M. Castro, A. Nieto et J. Ortin
(1996). Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome
virus as a cause of virus-induced apoptosis. J Virol 70: 2876-2882.**

**Sur J. H., A. R. Doster, J. S. Christian, J. A. Galeota, R. W. Wills, J. J. Zimmerman
et F. A. Osorio (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell
death by apoptosis. J Virol 71: 9170-9179.**

**Sur J. H., A. R. Doster et F. A. Osorio (1998). Apoptosis induced in vivo during
acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Pathol
35: 506-514.**

**Tobiasch E., R. Kehm, U. Bahr, C. A. Tidona, N. J. Jakob, M. Handermann, G.
Darai et M. Giese (2001). Large envelope glycoprotein and nucleocapsid protein of
equine arteritis virus (EAV) induce an immune response in Balb/c mice by DNA
vaccination; strategy for developing a DNA-vaccine against EAV-infection. Virus
Genes 22: 187-199.**

Verheije M. H., R. C. Olsthoorn, M. V. Kroese, P. J. Rottier et J. J. Meulenberg (2002). Kissing interaction between 3' noncoding and coding sequences is essential for porcine arterivirus RNA replication. *J Virol* 76: 1521-1526.

Wang S. et T. Hazelrigg (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369: 400-403.

Wang X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A. Beg et A. Garcia-Sastre (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol* 74: 11566-11573.

Waris G., A. Livolsi, V. Imbert, J. F. Peyron et A. Siddiqui (2003). Hepatitis C virus NS5A and subgenomic replicon activate NF-kappaB via tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha and its degradation by calpain protease. *J Biol Chem* 278: 40778-40787.

Wensvoort G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 13: 121-130.

Westermann J. et R. Pabst (1992). Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Investig* 70: 539-544.

Wissink E. H., H. A. van Wijk, M. V. Kroese, E. Weiland, J. J. Meulenberg, P. J. Rottier et P. A. van Rijn (2003). The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol* 84: 1535-1543.

Wissink E. H., M. V. Kroese, J. G. Maneschijn-Bonsing, J. J. Meulenberg, P. A. van Rijn, F. A. Rijsewijk et P. J. Rottier (2004). Significance of the oligosaccharides of

the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. J Gen Virol 85: 3715-3723.

Wu W. H., Y. Fang, R. R. Rowland, S. R. Lawson, J. Christopher-Hennings, K. J. Yoon et E. A. Nelson (2005). The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. Virus Res 114: 177-181.

Xiao Z., L. Batista, S. Dee, P. Halbur et M. P. Murtaugh (2004). The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. J Virol 78: 5923-5933.

Xue Q., Y. G. Zhao, Y. J. Zhou, H. J. Qiu, Y. F. Wang, D. L. Wu, Z. J. Tian et G. Z. Tong (2004). Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN γ . Vet Immunol Immunopathol 102: 291-298.

Yeh E., K. Gustafson et G. L. Boulianne (1995). Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7036-7040.

Yoon I. J., H. S. Joo, S. M. Goyal et T. W. Molitor (1994). A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. J Vet Diagn Invest 6: 289-292.

Zheng L., G. Fisher, R. E. Miller, J. Peschon, D. H. Lynch et M. J. Lenardo (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. Nature 377: 348-351.

Zoll J., W. J. Melchers, J. M. Galama et F. J. van Kuppeveld (2002). The mengovirus leader protein suppresses alpha/beta interferon production by inhibition of the iron/ferritin-mediated activation of NF-kappa B. J Virol 76: 9664-9672.

Annexe A

Réactifs de CsCl (Qbiogene) et de purification sur colonne NAP25 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc)

CsCl 1.2 : 26.8 g CsCl + 92mL 10mM Tris pH 7.9; filtrer

CsCl 1.4 : 53.0 g CsCl + 87mL 10mM Tris pH 7.9; filtrer

10mM Tris pH 7.9 : 605.7mg Tris, ajouter 400mL d'H₂O, ajuster le pH à 7.9, compléter le volume à 500mL, filtrer

Tampon de congélation : 2.5% de glycérol, 20mM Tris pH8, 25mM NaCl, filtrer

Annexe B

Titre des virus utilisés dans le présent mémoire

VIRUS	TITRE EN TCID ₅₀ /ML	PURIFIÉ/NON PURIFIÉ*
AdCMV5GFPq	1,00X10 ¹⁰	Non purifié
Ad-IRES-GFPq	7,50X10 ⁹	Purifié
Ad-ORF5-IRES-GFPq	3,16X10 ⁷	Purifié
Ad-ORF5/GFPq	5,62X10 ¹⁰	Purifié
Ad-ORF5(118-200aa)/GFPq	5,62X10 ¹⁰	Purifié
Ad-ORF5(1-90aa)/GFPq	1,00X10 ¹⁰	Purifié
Ad-ORF5-IRES-E1A	1,00X10 ⁸	Non purifié
Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A	3,16X10 ⁹	Purifié

* Purifié au CsCl;

* Non purifié : tous les pétris infectés sont récoltés dans un seul tube, centrifugés, resuspendus dans un volume de 3mL, 3 cycles de gel-dégel sont effectués, le tube est encore centrifugé et seul la partie supérieur (sans les débris cellulaires) est conservée dans un nouveau tube.

Annexe C

Tous les résultats de cytofluorométrie en flux ont été analysés par une agente technique spécialisée dans ce domaine afin de s'assurer que les différentes barrières fixées étaient les mêmes d'un échantillon à un autre et d'une lignée cellulaire à l'autre. Une fois que les résultats étaient uniformisés, les calculs suivants ont été effectués :

1) L'indice de fluorescence (IF) est défini comme le produit du pourcentage de cellules positives (cellules vertes) multiplié par la fluorescence moyenne des cellules positives.

Exemple :

Pour les cellules 293A infectées à une MOI de 1 (expérience du 16-02-05) :

Pourcentage de cellules positives est de : 42,48%

La fluorescence moyenne de ces cellules est de : 92,80

Donc l'indice de fluorescence (IF) = $42,48 \times 92,80 = 3942,14$

2) Le ratio entre l'indice de fluorescence (IF) d'un virus répliquatif/non disséminatif par rapport au virus non répliquatif pour une même MOI est calculé de la façon suivante :

Premièrement, soustraire l'indice de fluorescence du niveau basal d'autofluorescence des cellules non infectées à l'indice de fluorescence du virus répliquatif/non disséminatif et à l'indice du virus non répliquatif. Puis faire le rapport des deux valeurs obtenues

Exemple :

A : Pour les cellules 293 A non infectées (expérience du 16-02-05), le pourcentage de cellules positives est de 1,09% et la fluorescence moyenne de 2,80, donc l'indice d'autofluorescence est de : $IF = 1,09 \times 2,80 = 3,05$.

B : Pour les cellules infectées à une MOI de 1 du virus répliquatif/non disséminatif (Ad-ORF5/GFPq-IRES-E1A) (expérience du 16-02-05), le pourcentage de cellules positives est de 42,48% et la fluorescence moyenne de 92,80 alors l'indice de fluorescence est de : $IF = 42,48\% \times 92,80 = 3942,14$.

C : Pour les cellules infectées à une MOI de 1 du virus non répliatif (Ad-ORF5/GFPq) (expérience du 16-02-05), le pourcentage de cellules positives est de 25,21% et la fluorescence moyenne de 120,2 donc l'indice est de : $IF = 25,21\% \times 120,2 = 3030,242$.

Donc le ratio est :

$$\text{Ratio} = (B-A)/(C-A) = (3942,14-3,05)/(3030,242-3,05) = 1,3$$

Alors on peut dire que le virus répliatif/non disséminatif exprime 1,3 fois plus de GFPq que le virus non répliatif.