

INRS-Institut Armand-Frappier

ÉTABLISSEMENT D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE ADHÉRENTE
COMPLÉMENTANT LES VECTEURS ADÉNOVIRAUX RÉPLICATIFS NON-
DISSÉMINATIFS ET DÉVELOPPEMENT DE VECTEURS ADÉNOVIRAUX POUR
LA VACCINATION GÉNÉTIQUE CHEZ LES PORCS

par
François Castagner

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

Examineur interne
Examineur externe

Directeur de recherche
Codirecteur de recherche

Claire Simard, Ph. D.
Pierre Belhumeur, Ph. D.
Faculté de médecine
Université de Montréal
Dr. Serge Dea, D.M.V., Ph. D.
Bernard Massie, Ph. D.
Institut de recherche en biotechnologie

Droits réservés de François Castagner, 2002

RÉSUMÉ

La vaccination reste le meilleur moyen de prévenir les pertes économiques engendrées par les infections virales chez les animaux d'élevage comme le porc. Plusieurs nouveaux types de vaccins sont en développement pour les cas où les vaccins traditionnels ne sont pas satisfaisants. Les travaux présentés dans ce mémoire font partie d'un projet plus vaste de développement d'un vaccin génétique contre le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (VSRRP). Ce vaccin utiliserait comme vecteur un adénovirus humain dont le gène de la protéase a été éliminé et qui est capable d'une seule ronde de réplication.

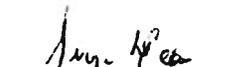
Premièrement, une lignée cellulaire de complémentation adhérente 293A exprimant la protéase des adénovirus humains a été établie pour faciliter la génération, la purification et la titration par plages de lyse des vecteurs dont le gène de la protéase a été éliminé. Deux clones ont été caractérisés et complémentent bien l'absence du gène de la protéase dans les vecteurs.

Il a aussi été démontré que la protéase de l'adénovirus porcin (PAV3) complémente l'absence de la protéase chez les vecteurs adénoviraux humains (Ad5) dans les cellules humaines 293A.

Étant donné que la toxicité de la glycoprotéine 5 (GP5) du VSRRP, le principal candidat comme immunogène, interférait de façon modérée avec la production de vecteurs adénoviraux exprimant ce transgène, plusieurs difficultés ont été rencontrées pour la génération des virus recombinants exprimant cette protéine. Par contre, il a été démontré dans ce travail de maîtrise que le contrôle du gène de la GP5 par un promoteur inductible permet de minimiser ces effets et permettra ainsi la production de ces vecteurs à grande échelle de façon plus efficace.



Étudiant


Directeur de recherche

AVANT-PROPOS

Mes premiers remerciements vont à Bernard Massie et Serge Dea, mes deux directeurs qui m'ont fait confiance et accepté dans leurs laboratoires.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé dans le lab. Particulièrement Claire Guilbeault pour la formation en culture cellulaire, Lucie Bourget pour la formation en cytofluorométrie et les triages cellulaires et Linda Lamoureux pour l'aide en biologie moléculaire. Merci aussi à Carl Gagnon qui m'a servi de référence.

Je ne peux pas passer sous silence ma famille et leur soutien : Bastien Castagner, Marcelle Bastien, Léonard Castagner...

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Avant-propos	iii
Liste des tableaux et figures.....	vii
Liste des abréviations.....	x
1- Introduction.....	1
1.1- Vaccination génétique.....	2
1.1.1- Vaccination génétique versus vaccination traditionnelle	2
1.1.2- Types de vecteurs pour la vaccination génétique.....	3
1.1.2.1- ADN nu.....	3
1.1.2.2- Vecteurs viraux.....	5
1.1.3- Types de vecteurs adénoviraux utilisés en vaccination génétique et thérapie génique.....	9
1.1.3.1- AdV répliatifs.....	9
1.1.3.2- AdV non-répliatifs	10
1.1.3.3- AdV répliatifs non-disséminatifs.....	10
1.1.4- Utilisation de vecteurs adénoviraux humains pour l'immunisation des porcs	11
1.2- Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.....	12
1.2.1- Biologie du virus	12
1.2.2- La GP5 du VSRRP	13
1.3- Vecteurs adénoviraux avec des transgènes toxiques.....	15
1.4- Objectifs.....	17
2- Matériels et méthodes.....	18
2.1- Construction des plasmides.....	19
2.1.1- Plasmide avec promoteur inducible par AMPc (pAdCRE5* <i>lacZ</i>)	19
2.1.2- Plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro.....	21
2.1.3- Plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro.....	23
2.1.4- Plasmide pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro.....	24
2.1.5- Plasmide de transfert pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq.....	25
2.2- Transfections transitoires pour essais des différents promoteurs inducibles.....	26
2.2.1- Cellules et méthode de transfection.....	26
2.2.2- Essais du promoteur CRE5 (inducible par AMPc).....	27
2.2.3- Essais du promoteur MMTV (inducible par glucocorticoïdes)	28
2.2.4- Essais en transfection transitoire du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro	28
2.3- Essai de transcomplémentation des protéases des Ad2 et PAV3.....	29
2.4- Génération et analyse des lignées cellulaires 293A PS	30

2.4.1- Transfection et triage des cellules résistantes à l'hygromycine	30
2.4.2- Clonage du pool de cellules 293A PSAd2.....	31
2.4.3- Analyse des pools en cytofluorométrie	31
2.4.4- Analyse des clones en cytofluorométrie.....	32
2.4.5- Essai de formation de plages de lyse (pool).....	32
2.4.6- Essai de formation de plages de lyse (clones).....	32
2.4.7- Essai de production de progéniture virale	33
2.5- Immunobuvarrages	33
2.5.1- Vérification de l'expression de la protéase par immunobuvarrage	33
2.5.2- Vérification de l'expression de la GP5 par immunobuvarrage	35
2.6- Comparaison des titres viraux en présence ou absence de l'ORF5.....	36
2.7- Essai de génération de virus recombinants avec l'ORF5	37
3- Résultats	39
3.1- Construction des plasmides pour évaluation des promoteurs en expressions transitoires	40
3.1.1- Construction du plasmide pAdCRE5* <i>lacZ</i>	40
3.2- Évaluation des promoteurs inductibles en expression transitoire	44
3.2.1- Évaluation du promoteur CRE5 en expression transitoire.....	44
3.2.2- Évaluation du promoteur MMTV en expression transitoire.....	46
3.3- Construction des plasmides pour les lignées cellulaires 293A PS	48
3.3.1- Construction du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro.....	48
3.3.2- Évaluation du promoteur HSE en expression transitoire.....	50
3.3.3- Construction du plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro	53
3.3.4- Construction du plasmide pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro	53
3.4- Essai de transcomplémentation des protéases des adénovirus Ad2 et PAV3.....	57
3.5- Construction des lignées cellulaires.....	60
3.5.1- Triage en cytofluorométrie.....	60
3.5.2- Analyse des pools en cytofluorométrie	60
3.5.3- Essai de plages de lyse	64
3.5.4- Clonage du pool cellulaire 293A PSAd2	65
3.5.5- Analyse des clones cellulaires sélectionnés.....	65
3.5.5.1- Analyse en cytofluorométrie.....	65
3.5.5.2- Formation de plages de lyse	68
3.5.5.3- Évaluation de la production de progéniture virale.....	68
3.5.5.4- Détection de la protéase par immunobuvarrage de type Western	69
3.6- Construction du plasmide pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq.....	72

3.7- Immunobuvardage de type Western pour vérification de l'expression de la GP5.....	78
3.8- Titres des adénovirus recombinants exprimant la GP5	79
3.9- Rendement de la génération de virus recombinants exprimant la GP5.....	83
4- Discussion.....	85
4.1- Choix du promoteur pour les lignées cellulaires.....	86
4.2- Lignées cellulaires 293A PS.....	87
4.3- Transcomplémentation des protéases des Ad2 et PAV3	89
4.4- Impacts de la toxicité de la GP5.....	92
4.5- Conclusion	94
Références	95
Annexe A: Résultats du triage des pools de cellules 293A PSAd2 et 293A PSPAV3.....	104
Annexe B: Comparaison de la séquence de l'ORF5 obtenue et planifiée.....	111

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I	Brève description de plusieurs essais effectués chez les porcs avec des vaccins à ADN	page 4
Tableau II	Titres de vecteur adénoviral Ad Δ E1 Δ PSlacZ-GFPq obtenus sur les cellules 293A transfectées avec des plasmides exprimant les protéases des virus Ad2 et PAV3	page 59
Tableau III	Indices de fluorescence des différents clones cellulaires 293A PSAd2 sélectionnés en conditions induites et non-induites	page 66
Figure 1	Représentation schématique simplifiée du génome de l'adénovirus humain	page 7
Figure 2	Représentation schématique du système tet	page 16
Figure 3	Représentation schématique de la méthode de génération d'adénovirus recombinants par recombinaison homologe dans les cellules 293A	page 38
Figure 4	Gel d'agarose 1,5% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pAdCRE5* <i>lacZ</i>	page 42
Figure 5	Représentation schématique du promoteur CRE5	page 43
Figure 6	Niveaux d'expression transitoire dans les cellules 293A de la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline (TR5) ou par l'AMPc (CRE5)	page 45
Figure 7	Niveaux d'expression transitoire dans les cellules 293A de la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline (TR5) ou par les glucocorticoïdes (MMTV)	page 47

Figure 8	Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro	page 49
Figure 9	Niveaux d'expression du promoteur HSE obtenus en transfection transitoire dans les cellules 293A	page 52
Figure 10	Électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro	page 54
Figure 11	Électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro	page 55
Figure 12	Représentation schématique du plasmide pHSE*PS-DC-GFPq/tk*Hygro	page 56
Figure 13	Niveaux de fluorescence en cytofluorométrie du pool de cellules 293A PSAd2	page 62
Figure 14	Niveaux de fluorescence en cytofluorométrie du pool de cellules 293A PSPAV3	page 63
Figure 15	Analyse en cytofluorométrie des clones cellulaires sélectionnés	page 67
Figure 16	Titres des virus Ad5 ou Ad5 Δ PS sur les cellules 293A ou 293A PSAd2, clones CB6 et CE2	page 70
Figure 17	Détection de la protéase dans les lignées cellulaires par immunobuvardage	page 71
Figure 18	Représentation schématique du système de répression cumate avec le promoteur CMV5P2	page 73

- Figure 19 Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,2% des ADN de minipréparations effectuées à partir des clones obtenus lors de la construction du plasmide pAdTR5*ORF5-DC-GFPq page 75
- Figure 20 Représentation schématique des plasmides contenant la cassette dicistronique ORF5-GFPq sous le contrôle des promoteurs CMV5P2 ou TR5 page 77
- Figure 21 Détection de la GP5 en transfection transitoire par immunobuvardage de type Western page 80
- Figure 22 Titres de virus AdTR5*GFPq (GFPq) ou AdTR5*ORF5-DC-GFPq (orf5) obtenus sur les cellules 293S ou les 293S rTA induites après 48 heures d'infection page 82
- Figure 23 Nombre de plages de vecteurs GFPq+ (moyenne de deux essais) en fonction du vecteur de transfert utilisé page 84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	anticorps
Ad	adénovirus humain
Ad5	adénovirus humain sérotype 5
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AdV	vecteur adénoviral
Ag	antigène
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine sérique de bœuf
CIAP	phosphatase alcaline intestinale de veau
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
CMV IE	promoteur précoce immédiat du cytomégalovirus
CRE	éléments de réponse à l'AMPc
CREB	protéine se liant aux CRE
DMEM	milieu minimal d'Eagle modifié par Dulbecco
dNTP	désoxynucléosides triphosphate
EAV	virus de l'artérite équine
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
EGFP	protéine de fluorescence verte (modifiée par la compagnie Clontech)
En MLP	séquences activatrices du promoteur majeur tardif de l'adénovirus
FBS	sérum foetal de veau
FMDV	virus de la fièvre aphteuse
GFPq	protéine de fluorescence verte (modifiée par la compagnie Quantum)
GP5	glycoprotéine 5 du VSRRP
gtu	unité transductrice de gène
HBS	solution tamponnée à l'hepes
HSE	éléments de choc thermique
i.d.	intra-dermique
i.m.	intra-musculaire
IRES	site d'entrée interne du ribosome
ITR	répétitions terminales inversées des adénovirus

kpb	kilobases
kDa	kiloDalton
LB	milieu Luria-Bertani
LDV	virus murin élévateur de la déshydrogénase lactique
LTR	longues répétitions terminales
MLP	promoteur majeur tardif de l'adénovirus
MMTV	virus murin des tumeurs mammaires
MOI	multiplicité d'infection
mu	unités de carte du génome de l'adénovirus
ONPG	o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside
ORF	cadre de lecture
PAV	adénovirus porcin
PAV3	adénovirus porcin sérotype 3
pb	paire de bases
PBMC	leucocytes mononucléaires périphériques
PBS	solution saline tamponnée au phosphate
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEI	polyéthylèneimine
pfu	unité formatrice de plaque
PRV	virus de la pseudorage
PS	protéase des adénovirus
PTP	précurseur de la protéine terminale des adénovirus
rpm	révolution par minute
rTA	transactivateur inverse de l'opéron de résistance à la tétracycline
rVV	virus de la vaccine recombinant
SEAP	phosphatase alcaline sécrétée humaine
SHFV	virus de la fièvre hémorragique simienne
SRRP	syndrome reproducteur et respiratoire porcin
TBS	solution saline tamponnée au tris
TCID ₅₀	dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50% des cultures cellulaires infectées
TE	tampon Tris-EDTA
TPL	séquences de tête tripartites de l'adénovirus
tTA	transactivateur tétracycline
VSRRP	virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

1- INTRODUCTION

1.1- VACCINATION GÉNÉTIQUE

1.1.1- Vaccination génétique versus vaccination traditionnelle

La vaccination a connu des succès importants pour le contrôle de plusieurs maladies virales comme la poliomyélite ou la variole. Elle reste le moyen le plus efficace pour lutter contre les infections virales car les chimiothérapies antivirales actuelles ou autres formes de traitement sont en général peu efficaces. La vaccination est d'une importance majeure pour la protection des animaux d'élevage contre les maladies infectieuses. Souvent, l'autre alternative pour le contrôle d'une épidémie dans les élevages est l'abattage des animaux malades pour éradiquer la maladie. Ceci entraîne des pertes importantes pour les producteurs. Les vaccins vétérinaires se doivent d'être peu onéreux, efficaces et, idéalement, ne nécessiter aucun rappel. Malgré les succès des vaccins traditionnels, il existe plusieurs pathogènes contre lesquels il n'existe pas de vaccins efficaces. Les vaccins génétiques ou autres nouveaux moyens de vaccination sont donc dans ces cas des avenues intéressantes à explorer (Babiuk *et al.*, 1999). Les vaccins sous-unitaires et les vaccins faits à partir des micro-organismes morts vont souvent causer des réponses immunitaires faibles et peu persistantes. Il y a aussi souvent des problèmes liés à la sécurité des vaccins atténués (e. g. : Madsen *et al.*, 1998). L'utilisation de certains adjuvants causant des réactions indésirables aux sites d'injection peut aussi poser des problèmes au niveau de la sécurité et de la qualité de la viande. Une immunité pré-existante chez les mères peut aussi interférer avec la vaccination traditionnelle des nouveau-nés.

La vaccination génétique est un domaine en pleine expansion. On peut la définir comme l'administration de transgènes à un hôte dans le but d'induire une réponse immunitaire contre les protéines codées par ces transgènes. Dans certains cas, elle suscite de grands espoirs (Shiver *et al.*, 2002). Le développement de vecteurs efficaces pour livrer les gènes demeure par contre un défi important. Ces vecteurs peuvent être simplement de l'ADN plasmidique (Tang *et al.*, 1992) ou des vecteurs viraux génétiquement modifiés (Morrow *et al.*, 1999). La recherche est donc grandement orientée sur le développement de vecteurs véhiculant les gènes. La vaccination génétique offre l'avantage de pouvoir discerner les individus vaccinés des individus infectés par le pathogène sauvage. Ceci peut être un avantage important pour la surveillance de maladies infectieuses.

1.1.2- Types de vecteurs pour la vaccination génétique

1.1.2.1- ADN nu

Plusieurs essais en vaccination génétique ont été réalisés avec de l'ADN nu ou couplé avec des lipides ou autres produits favorisant l'entrée de l'ADN dans les cellules. L'ADN est injecté tel quel ou couplé avec des billes d'or avant d'être injecté avec un pistolet à air comprimé. L'efficacité de transfection des plasmides dans les cellules reste tout de même faible (Babiuk *et al.*, 1999). Plusieurs groupes cherchent à optimiser les méthodes d'administration de l'ADN. Ce type de vaccin nécessite souvent au moins un rappel. Ces vaccins requièrent souvent l'ajout d'adjuvants pour stimuler une bonne réponse immunitaire, comme des séquences d'ADN riches en G+C ou la toxine du choléra. Par contre, cette forme de vaccination a l'avantage d'être peu coûteuse (Gurunathan *et al.*, 2000; Leitner *et al.*, 1999). Ce type de vaccination a surtout été testé chez les petits animaux de laboratoire, quoique plusieurs essais ont quand même été réalisés chez des animaux de ferme comme les porcs. Un inconvénient de cette méthode chez les animaux plus gros est la grande quantité d'ADN nécessaire pour une immunisation efficace. Le Tableau I résume plusieurs essais effectués chez les porcs.

Tableau I : Brève description d'essais effectués chez les porcs avec des vaccins à ADN (adapté de Babiuk *et al.*, 1999). Ac : anticorps. Ag : antigène. I.m. : intramusculaire. I.d. : intra-dermal. PBMC : lymphocytes mononucléaires périphériques. PRV : virus de la pseudorange. FMDV : virus de la fièvre aphteuse.

virus-antigène	protocole	réponse	protection obtenue	référence
PRV-gD	i.m. 400 µg chez nouveau-nés 1 rappel	peu d'Ac neutralisants après le rappel	pas de protection significative	(Monteil <i>et al.</i> , 1996)
PRV-gD	i.m. 370 µg 1 rappel avec le vaccin commercial	Ac neutralisants après le rappel	meilleure protection comparativement à d'autres vaccins	(Le Potier <i>et al.</i> , 1997)
PRV-gD	i.m. et i.d. 400 µg	Ac neutralisants titres élevés, prolifération Ag-spécifique modérée	signes cliniques plus faibles	(van Rooij <i>et al.</i> , 1998)
PRV-tgB, tgC et gD	i.d. 1.2 mg total 2 rappels	Ac neutralisants titres moyens, prolifération Ag-spécifique élevée	excrétion de virus réduite	(van Rooij <i>et al.</i> , 1998)
PRV-gD et gI ou gC	i.m./i.d. 1,5 µg 3 rappels	Ac neutralisants titres moyens, prolifération Ag- spécifique dans les PBMC	protection partielle avec la gC contre infection-défi	(Gerds <i>et al.</i> , 1997)
VSRRP GP5	i.m. 100 µg 2 rappels	réponse humorale après le 2e rappel prolifération lymphocytaire	protection contre infection-défi	(Pirzadeh et Dea, 1998)
Influenza-HA ou NP	i.d. par pistolet air comprimé 1,25 µg 1 rappel	production d'Ac neutralisants	protection pour HA : élimination plus rapide du virus	(Macklin <i>et al.</i> , 1998)
FMDV Plasmide contenant le génome viral	i.d. ou i.m. 200 µg 3 rappels	production d'Ac neutralisants	protection partielle (pas de corrélation avec niveau d'Ac)	(Ward <i>et al.</i> , 1997)

1.1.2.2- Vecteurs viraux

L'utilisation de virus recombinants comme vecteurs pour livrer l'antigène permet l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale. Plusieurs vecteurs viraux permettent aussi l'induction d'une réponse mucoale, ce qui est plus rare dans le cas des vaccins génétiques avec ADN nu (Morrow *et al.*, 1999).

Parmi les vecteurs viraux utilisés pour les essais de vaccination génétique, on retrouve surtout les poxvirus et les adénovirus. L'un des premiers vaccins génétiques utilisant un vecteur viral fut un vecteur poxvirus répliatif. Ce vaccin était un virus de la vaccine recombinant exprimant une glycoprotéine du virus de la rage. Ce vecteur s'est avéré efficace pour vacciner des mammifères sauvages contre la rage (Pastoret et Brochier, 1996). Pour des raisons de sécurité, les souches présentement à l'essai ne sont plus répliatives. Les souches NYVAC (Tartaglia *et al.*, 1992) et Ankara (Ramirez, *et al.*, 2000) sont deux souches utilisées dans plusieurs essais cliniques. Elles sont toutes les deux non-répliatives chez les mammifères. Le canarypox a aussi été utilisé à plusieurs occasions car ce virus ne peut pas se répliquer chez les mammifères (Rolph et Ramshaw, 1997).

Le virus de la poliomyélite a aussi été utilisé comme vecteur viral dans quelques essais (Morrow *et al.*, 1999). Par exemple, l'injection intramusculaire d'un vecteur poliovirus non-disséminatif exprimant un fragment de la toxine tétanique a protégé des souris contre une injection défi de la toxine (Porter *et al.*, 1997).

La possibilité d'utiliser en vaccination génétique les virus Sinbis, l'influenza et quelques autres fait présentement l'objet de plusieurs études (Morrow *et al.*, 1999). Peu de résultats ont cependant été générés avec ces vecteurs.

Les adénovirus sont aussi des candidats intéressants pour la vaccination génétique. Ce sont des virus à ADN non-enveloppés à capsidie icosaedrique. Ils ont été isolés durant les années 50 et depuis, plus de 47 sérotypes humains ont été identifiés. Plusieurs autres sérotypes ont aussi été isolés chez une grande variété de mammifères (Horwitz, 1996). La plupart des sérotypes humains reconnaissent le récepteur CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) sur les cellules. La fonction de ce récepteur n'est pas encore connue. L'internalisation se fait par endocytose et elle est dépendante du récepteur (Varga *et al.*, 1991). Les intégrines α_v de la cellule hôte servent ici de co-récepteurs et vont médier l'internalisation du virus (Wickham *et al.*, 1993).

Le génome d'environ 35 kpb des adénovirus peut être divisé en deux parties, les gènes précoces (régions E1 à E4) et les gènes tardifs (régions L1 à L5) (Figure 1). Les

quatre groupes de gènes précoces sont exprimés à partir de cinq promoteurs différents. La région E1A code pour des gènes intervenant dans le contrôle de l'expression des gènes viraux. L'inhibition de l'expression des gènes de la cellule est médiée par certains gènes des régions E1B et E4. La région E1B est aussi responsable du métabolisme des ARNm viraux. Plusieurs gènes de la région E3 contribuent à l'évasion du système immunitaire notamment en inhibant l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules. Les régions E2A et E2B codent pour des protéines nécessaires pour la réplication de l'ADN viral et pour la stimulation du promoteur majeur des gènes tardifs (MLP). Les gènes tardifs sont tous sous le contrôle du promoteur majeur des gènes tardifs et sont issus d'un épissage alternatif et de l'utilisation de cinq sites de polyadénylation différents. Ces gènes sont surtout ceux des protéines structurales du virion (Shenk, 1996). Le génome du virus comporte également des répétitions terminales inversées (ITR) à chaque extrémité ainsi qu'une séquence d'encapsidation qui permet au génome viral de se faire encapsider.

Suite à la synthèse des gènes précoces dont l'ADN polymérase du virus, le génome viral va se répliquer. L'ADN linéaire double brin du virus se réplique de façon semi-conservative de l'extrémité 5' à l'extrémité 3'. Le complexe de pré-initiation formé de la polymérase, du précurseur de la protéine terminale (pTP) du virus ainsi que des facteurs de transcription cellulaire NF1 et oct-1 se lie à l'origine de réplication située à l'extrémité du génome et un trinuéclotide 5'-CAT-3' va se lier de façon covalente à la pTP par son extrémité 5' et servir d'amorce pour l'élongation (de Jong et van der Vliet, 1999). La fourche de réplication déplace le brin complémentaire au brin servant de matrice et en synthétise un nouveau. Les ITR situés à chaque extrémité des molécules simple brin ainsi déplacées peuvent par la suite s'hybrider pour former une structure rappelant une poignée de casserole. Ceci crée une extrémité double brin d'où la réplication peut également débiter (Shenk, 1996). Suite à la réplication de l'ADN viral, les gènes tardifs vont s'exprimer et permettre la formation de nouvelles particules virales.

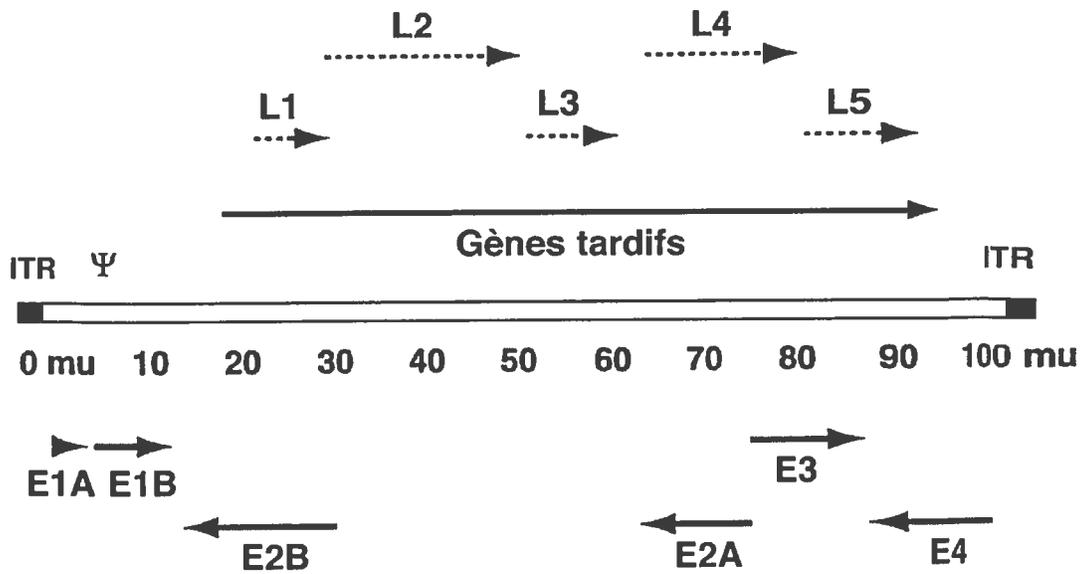


Figure 1 : Représentation schématique simplifiée du génome de l'adénovirus humain (adaptation de Oualikene et Massie, 2000). Les flèches pleines représentent les différents groupes de gènes du virus et le génome viral est représenté par la double ligne. Les flèches pointillées représentent les différents groupes d'ARN messagers de la région tardive. mu : unités de carte. ITR : répétition terminale inversée. Ψ : séquence d'encapsidation. Les différents gènes des différentes régions précoces du génome sont issus de l'épissage alternatif des ARNm. Les gènes tardifs sont tous contrôlés par le même promoteur et sont aussi issus d'un épissage alternatif et de l'utilisation de 5 sites de polyadénylation différents.

Les adénovirus humains, particulièrement les sérotypes Ad5 et Ad2, sont des virus intéressants à considérer pour les fins de thérapie génique ou de vaccination. Ils sont responsables de maladies mineures comme des rhumes, conjonctivites ou des gastro-entérites. Les sérotypes Ad5 et Ad2 sont les plus étudiés et leur biologie est relativement bien connue. Ils possèdent la capacité d'infecter une grande variété de types cellulaires et ne sont pas dépendants de la réplication des cellules (Horwitz, 1996). Ces deux sérotypes peuvent être propagés *in vitro* avec des bons rendements. Des titres de l'ordre de 3×10^4 particules infectieuses par cellule peuvent être obtenus (Oualikene et Massie, 2000).

Des vecteurs adénoviraux humains (AdV) ont été utilisés dans plusieurs essais de vaccination génétique chez des modèles animaux comme le hamster syrien (Morin *et al.*, 1987) ou la souris (Xiang *et al.*, 1996; Xiang et Ertl, 1999). L'intérêt pour ces vecteurs provient, entre autres, de la possibilité de les administrer par voie oronasale. Des adénovirus humains atténués appartenant aux sérotypes 4 et 7 ont aussi été utilisés efficacement pour immuniser par voie orale les recrues de l'armée américaine contre les infections à adénovirus (Top, 1975). Il a également été démontré que les vecteurs adénoviraux administrés par voie oronasale peuvent induire l'établissement d'une réponse mucoale (Xiang et Ertl, 1999). Malgré que l'immunité mucoale ne soit pas très bien connue, elle est d'une importance majeure pour la protection contre plusieurs pathogènes qui s'introduisent par les muqueuses ou qui les infectent (Morrow *et al.*, 1999). Les adénovirus infectent naturellement les voies respiratoires (Horwitz, 1996). Ces virus sont donc des candidats intéressants à envisager comme vaccins recombinants administrés de façon oronasale. Cependant, l'immunité préexistante pourrait être un obstacle à l'utilisation de vecteurs viraux pour la vaccination génétique dans certains cas (Papp *et al.*, 1999). En effet, des études chez les souris ont démontré qu'une immunité préexistante contre les adénovirus ou les poxvirus peut diminuer de façon importante l'expression du transgène et par conséquent, l'efficacité du vaccin (Dong *et al.*, 1996; Moffatt *et al.*, 2000). Chez les souris, les niveaux d'expression d'un transgène dans la trachée et les poumons 24h après inoculation intranasale d'un vecteur adénoviral peuvent diminuer de 10 000 fois chez les animaux pré-immunisés contre le même sérotype d'adénovirus (Moffatt *et al.*, 2000). On peut toutefois contourner le problème en utilisant un virus qui n'infecte pas l'hôte en temps normal. Aussi, si un rappel est nécessaire, on peut utiliser un autre sérotype du même virus (Moffatt *et al.*, 2000). De plus, comme certains gènes de la région E3 semblent interférer avec la réponse immunitaire, cette région est éliminée dans les vecteurs qui sont à l'essai pour la vaccination génétique. Ceci augmente l'immunogénicité de ces vecteurs (Ilan *et al.*, 1997).

Des études comparatives ont été réalisées pour un vecteur adénoviral et un vecteur poxvirus véhiculant le même transgène afin d'évaluer leur capacité respective à induire une réponse immunitaire chez les souris. Dans un cas, les animaux vaccinés avec les vecteurs adénoviraux (AdV) ont produit plus d'anticorps contre le transgène mais il n'y avait pas de différences dans le taux de survie suite à une infection-défi (Gonin *et al.*, 1996). Par ailleurs, dans un autre cas, l'AdV non-réplicatif s'est avéré supérieur au virus recombinant de la vaccine (rVV) réplicatif pour la protection contre une infection-défi et pour la production d'anticorps (Xiang *et al.*, 1996). Toutefois, la comparaison entre ces deux types de vecteurs est souvent non-significative, notamment si différents promoteurs sont utilisés pour l'expression du transgène. Dans ce cas, la variation peut provenir d'une différence dans les niveaux d'expression du transgène.

Des vecteurs adénoviraux porcins (Reddy *et al.*, 1999), bovins (Mittal *et al.*, 1995) ou aviaires (François *et al.*, 2001) ont aussi été générés et certains s'avèrent des candidats intéressants pour la vaccination génétique. Cependant, leur biologie étant moins bien connue, il est difficile de prévoir quelles seront les cellules susceptibles et quels gènes peuvent être éliminés pour obtenir des vecteurs non-réplicatifs pouvant être facilement propagés *in vitro*. Des études plus approfondies sur la génétique et le tropisme de ces virus sont donc requises pour connaître le potentiel réel de ces vecteurs.

1.1.3- Types de vecteurs adénoviraux utilisés en vaccination génétique et thérapie génique

1.1.3.1- AdV réplicatifs

Certains vecteurs ont gardé la capacité de répliquer leur génome viral et permettent la production de progéniture virale infectieuse lorsqu'ils sont administrés à un hôte. Les risques liés aux vecteurs adénoviraux réplicatifs en font des vecteurs peu utilisés sauf pour la thérapie génique anticancéreuse et certains essais en vaccination génétique. Leur dissémination dans l'environnement n'est pas souhaitable. Ces vecteurs ont cependant l'avantage d'exprimer les transgènes à des niveaux élevés, quoique transitoirement, à cause de la réplication du génome. Ceux-ci sont parfois dépourvus de la région E3 pour libérer de l'espace pour le transgène. Ce dernier est souvent inséré à la place de la région E3. Plusieurs de ces vecteurs vont se répliquer préférentiellement dans les cellules cancéreuses et sont envisagés comme traitement anti-cancer (Kirn, 2000). La région E3 n'est pas essentielle pour la réplication du virus *in vitro*.

1.1.3.2- AdV non-réplicatifs

Les vecteurs non-réplicatifs sont les plus souvent utilisés dans des essais pour la vaccination génétique en raison de leur plus grande sécurité. Le génome de ces vecteurs ne peut pas se répliquer en raison de l'absence de la machinerie virale de réplication d'ADN. Il n'y a donc pas de progéniture virale produite. En général, ces vecteurs sont dépourvus des régions E1 et E3 du génome viral et sont cultivés sur des cellules exprimant et complétant la région E1 de l'adénovirus. La région E1 est responsable entre autres du contrôle de l'expression des gènes des autres régions précoces. Par conséquent, les gènes viraux précoces ne sont pas ou peu exprimés en absence de la région E1. Ces vecteurs se propagent *in vitro* à des rendements à peu près similaires à ceux des virus sauvages. Cependant un faible niveau de réplication de ces virus a été observé dans certaines cellules en culture, notamment des cellules cancéreuses (Steinwaerder *et al.*, 2000). Ces vecteurs sont désignés comme étant les vecteurs de première génération.

Dans certains vecteurs non-réplicatifs, d'autres régions comme les régions E2A, E2B ou E4 ont aussi été éliminées pour diminuer les niveaux d'expression résiduels des gènes viraux observés avec les vecteurs de première génération (Krougliak et Graham, 1995; Wang et Finer, 1996). Ceci rend les vecteurs moins immunogéniques. Ces vecteurs dits de deuxième génération sont surtout envisagés pour le transfert stable de transgènes.

Il y a aussi les vecteurs dits de troisième génération dont tous les gènes viraux ont été enlevés. Il ne reste que les ITR et la séquence d'encapsidation. Ces vecteurs nécessitent un virus auxiliaire (helper) pour fournir les gènes en *trans* (Fisher *et al.*, 1995; Kochanek *et al.*, 1996; Parks *et al.*, 1996).

1.1.3.3- AdV réplicatifs non-disséminatifs

Récemment, des vecteurs adénoviraux dont le gène de la protéase a été éliminé ont été développés. Ces vecteurs ne peuvent effectuer qu'un cycle de réplication (Oualikene *et al.*, 2000). La protéase (PS) de l'adénovirus est codée par un gène tardif de la région L3. Elle est requise lors de l'internalisation du virus et pour le clivage des protéines structurales du virus. Les particules virales ont donc quelque copies de la protéase (autour de 50) dans leur capsid pour permettre la décapsidation (Mangel *et al.*, 1997). Cette quantité n'est toutefois pas suffisante pour permettre le clivage des protéines structurales du virus. Cette protéine a été classée dans la catégorie des cystéine-protéases. Les séquences consensus sont (M, L, I)XGX-G ou (M, L, I)XGG-X où X représente n'importe quel acide aminé. Il a

été démontré que cette protéine clive au moins six protéines virales: pVI, pVII, pVIII, pMu, pTP et pIIIa. Les cytokératines 7 et 18 des cellules hôtes sont aussi clivées (Chen *et al.*, 1993). La protéase est beaucoup plus active en présence d'un petit peptide issu du clivage de la partie carboxylique de la protéine pVI. L'ADN viral pourrait aussi être un co-facteur mais cette hypothèse reste controversée (Mangel *et al.*, 1997). Les virus dont le gène de la protéase a été éliminé peuvent donc répliquer leur ADN, mais il n'y a pas de maturation des protéines structurales et donc, pas de progéniture virale produite. Par conséquent, il n'y a pas de dissémination du vecteur dans l'environnement. Ces virus peuvent être produits sur des lignées cellulaires exprimant la protéase de l'adénovirus (Oualikene *et al.*, 2000).

Un vecteur adénoviral dont le gène de la protéase a été éliminé permet l'expression du transgène en grande quantité tout en restant plus sécuritaire qu'un vecteur répliatif disséminatif. Ces vecteurs pourraient être avantageux pour des cas nécessitant des bons niveaux d'expression de transgènes de façon transitoire. La vaccination génétique ou la thérapie génique anti-cancéreuse sont des cas où ce type de vecteur serait approprié. Ces vecteurs pourraient permettre de diminuer la dose de virus nécessaire pour l'établissement d'une réponse immunitaire efficace, diminuant ainsi les risques d'effets secondaires et les coûts de futurs vaccins.

1.1.4- Utilisation de vecteurs adénoviraux humains pour l'immunisation des porcs

Des AdV non-répliatifs ont été testés entre autres chez la souris et chez les porcs. Chez les porcs, des essais ont été effectués contre le virus de la fièvre aphteuse (Mayr *et al.*, 1999) et contre un alphaherpesvirus porcin, soit le virus de la pseudorage (Adam *et al.*, 1994). Dans les deux cas, il y a eu une bonne production d'anticorps dirigés contre le produit du transgène et aussi une réponse cellulaire accentuée. Ces vaccinations se sont avérées efficaces pour protéger les animaux contre des infections-défis. Les vecteurs ont été administrés par injection intramusculaire. Dans le cas du vaccin contre le virus de la fièvre aphteuse, il fut démontré plus tard qu'une dose de rappel avec le même vecteur résultait en une meilleure protection ainsi que des titres d'anticorps plus élevés que ceux obtenus lors d'une vaccination simple dose (Mayr *et al.*, 2001).

Un vaccin contre le coronavirus causant une gastroentérite (GET) a aussi été essayé chez les porcs par injection intrapéritonéale simultanément avec une administration intranasale d'un vecteur adénoviral répliatif dépourvu de la région E3 (Torres *et al.*, 1996). Le groupe de la Universidad Autónomas Cantoblanco de Madrid a montré que les animaux vaccinés produisaient des anticorps neutralisants. Le même groupe a aussi vérifié les niveaux d'expression de transgènes dans certains tissus porcins suite à une administration

intranasale ou via d'autres routes d'inoculation. L'instillation intranasale s'est avérée la meilleure voie pour atteindre les tissus des voies respiratoires. Des analyses en immunohistochimie ont montré la présence d'antigènes viraux dans les cellules épithéliales des bronchioles, dans les pneumocytes de type II et dans les macrophages alvéolaires (Torres *et al.*, 1996).

1.2- LE VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN

1.2.1- Biologie du virus

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) a été décrit durant les années 80 en Amérique du Nord et quelques années plus tard en Europe. Ce syndrome est endémique dans tous les pays producteurs de porcs ou presque, et est responsable de pertes économiques importantes. L'agent étiologique du SRRP est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité positive de la famille *Arteriviridae*, ordre *Nidovirales*. Ce virus a été classé dans le genre *Arterivirus* avec les virus de l'artérite équine (EAV), le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV) et le virus élévateur de lactate déshydrogénase murin (LDV). Le VSRRP a été isolé pour la première fois en 1991 en Europe (Wensvoort *et al.*, 1991).

Le génome de 15 kpb de ce virus contient 8 cadres de lecture ouverts (ORF). Les ORFs 1A et 1B codent respectivement pour des protéines qui ont des activités polymérase et réplécase. Les trois protéines structurales majeures sont la glycoprotéine GP5, la protéine M et la protéine N de la nucléocapside codées respectivement par les ORFs 5, 6 et 7. Les ORFs 2 et 4 codent pour les protéines GP2 et GP4 qui sont des constituants mineurs de l'enveloppe virale. Le produit de l'ORF 3 a été détecté dans les particules virales des souches européennes, mais pas dans les souches nord-américaines. L'aspect structural de cette protéine n'est donc pas confirmé chez les souches nord-américaines (Dea *et al.*, 2000).

Il existe des variations génétiques et antigéniques assez importantes entre les souches nord-américaines et européennes (Meng, 2000). Il existe probablement des pressions sélectives qui contribuent à cette variabilité surtout pour les protéines de l'enveloppe virale qui sont plus exposées donc, plus immunogéniques. Les virus ont avantage à modifier leurs protéines antigéniques pour être moins bien reconnus par le système immunitaire de l'hôte. Il n'existe qu'entre 50% et 80% d'homologie entre les séquences en acides aminés des protéines structurales des souches européennes et nord-américaines (Mardassi *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 1995 a et b; Morozov *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995). Les niveaux de variabilité des séquences en acides aminés

entre les souches nord-américaines sont plus élevés que ceux existant entre les souches européennes. On ne retrouve que 90% d'identité entre les protéines structurales de différentes souches nord-américaines (Meng *et al.*, 1995 b). Cette variabilité doit être considérée car elle peut avoir des implications dans le développement d'un vaccin (Meng, 2000).

Le VSRRP est responsable d'avortements spontanés, de taux plus élevés de fœtus momifiés, de mortinatalité et de porcelets nés faibles chez les truies de différentes parités et en fin de gestation ainsi, que des problèmes respiratoires chez les porcs de tous âges. La composante respiratoire de la maladie est associée à une pneumonie interstitielle lymphomononucléaire non-spécifique. Les cellules cibles au niveau du système respiratoire sont les monocytes et les macrophages alvéolaires.

Les vaccins actuels n'ont qu'une faible efficacité. L'apparition aux États-Unis d'une souche plus virulente du VSRRP pouvant infecter les porcs vaccinés avec les vaccins disponibles actuellement démontre bien le besoin pour un vaccin plus efficace. Aussi, il n'est pas possible de distinguer par les tests sérologiques conventionnels les animaux vaccinés avec les vaccins atténués disponibles actuellement des animaux infectés avec le virus sauvage. Il y a aussi un risque de retour à la virulence des souches atténuées utilisées pour la vaccination.

1.2.2- La GP5 du VSRRP

La protéine GP5 du virus SRRP est la glycoprotéine majeure de l'enveloppe. Elle forme des hétérodimères avec la protéine M dans le réticulum endoplasmique avant d'être exportée vers la membrane (Mardassi *et al.*, 1996). La GP5 de la souche de référence québécoise IAF-Klop possède trois sites de glycosylation potentiels (Mardassi *et al.*, 1995). Les fonctions de cette protéine n'ont pas été clairement établies. Elle pourrait avoir un rôle dans la liaison du virus aux récepteurs cellulaires. Cette protéine induit l'apoptose dans les cellules permissives (MARC-145) ou macrophages alvéolaires porcins. Cette apoptose n'est pas inhibée par une surexpression de l'oncogène Bcl-2 (Suarez *et al.*, 1996).

Une relation entre le pouvoir neutralisant des sérums porcins convalescents et la présence d'anticorps dirigés contre la GP5 a été établie (Gonin *et al.*, 1999). Des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes linéaires et conformationnels de la GP5 avec pouvoir neutralisant ont aussi été caractérisés. Cependant, l'injection de porcs avec la GP5 produite dans *E. coli* n'a pas provoqué la production d'anticorps neutralisants (Pirzadeh et

Dea, 1998). En effet, la protéine produite dans un vecteur procaryote a plutôt aggravé les symptômes de la maladie suite à une infection-défi. Le phénomène des anticorps facilitants est sûrement en cause ici. Ce phénomène a été observé chez les porcs lors d'une infection avec le VSRRP (Yoon *et al.*, 1997). Ces anticorps non-neutralisants se lient au virus et augmentent son opsonisation par l'intermédiaire des récepteurs Fc des gammaglobulines retrouvés à la surface des macrophages, augmentant ainsi le nombre de macrophages infectés. Apparemment, les épitopes conformationnels jouent un rôle important dans l'efficacité de la réponse immunitaire.

La vaccination génétique par injection intramusculaire d'un plasmide qui contient l'ORF5 a suscité la production d'anticorps neutralisants contre la GP5 et protégé les animaux contre une infection-défi (Pirzadeh et Dea, 1998). Aussi, l'injection intramusculaire de vecteurs adénoviraux non-réplicatifs avec un ORF5 modifié ou synthétique a suscité la production d'anticorps neutralisants dirigés contre la GP5 (Cléroux *et al.*, résultats non-publiés). Des mutations silencieuses ont été introduites dans près de la moitié des codons afin d'obtenir des codons qui sont plus souvent utilisés dans les cellules des mammifères, augmentant ainsi les taux de protéine exprimée. Il reste à vérifier si les porcs immunisés avec un vecteur adénoviral exprimant le gène modifié sont protégés contre une infection-défi. Le même type de vecteur adénoviral avec l'ORF5 sauvage n'a pas suscité la production de niveaux significatifs d'anticorps neutralisants (Cléroux *et al.*, résultats non-publiés). Les niveaux d'expression du transgène ont sûrement un impact important sur l'efficacité d'un vaccin génétique utilisant les AdV.

La glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale est aussi celle qui varie le plus entre les différentes souches du VSRRP. On ne retrouve qu'une identité de 50% dans la séquence en acide aminé entre les souches nord-américaines et européennes (Mardassi *et al.*, 1995). Un vaccin basé sur la glycoprotéine GP5 de souches nord-américaines ne serait donc probablement pas efficace pour protéger contre les sérotypes européens et vice et versa. D'ailleurs, l'inoculation de truies avec une souche nord-américaine du VSRRP a induit une protection complète contre une réinfection par la même souche, mais seulement une protection partielle contre une réinfection par une souche européenne (Lager *et al.*, 1999). Aussi, la vaccination de porcs destinés à la production de semence pour l'insémination artificielle au Danemark à l'aide d'un vaccin atténué dérivé d'une souche nord-américaine a causé l'apparition dans quelques troupeaux danois d'une souche révertante du VSRRP reliée aux souches nord-américaines (Madsen *et al.*, 1998).

1.3- VECTEURS ADÉNOVIRAUX AVEC DES TRANSGÈNES TOXIQUES

Les vecteurs adénoviraux exprimant un transgène apoptotique vont souvent voir leur efficacité de production diminuée. L'apoptose précoce des cellules les empêche de produire une grande quantité de particules virales. Aussi, la génération de recombinants peut être très inefficace voire impossible. Les réarrangements du génome de ces virus peuvent aussi causer des problèmes car les adénovirus recombinants ayant perdu le transgène ont un avantage sélectif important. La quantité de particules virales révertantes, capables de se répliquer ou ayant perdu le transgène sera donc plus importante.

Un moyen pour éviter ce phénomène est de contrôler le transgène avec un promoteur inductible dont le niveau basal est suffisamment faible ou avec un promoteur répressible ayant un niveau d'expression réprimée faible. Dans plusieurs cas, il a été impossible de créer des vecteurs viraux exprimant des transgènes toxiques de façon constitutive (Massie *et al.*, 1998a, b; Matthews *et al.*, 1999). Toutefois, des virus recombinants exprimant de tels gènes ont été obtenus en contrôlant l'expression du transgène par un promoteur inductible. Par exemple, la génération d'AdV exprimant une version tronquée et toxique de la ribonucléotide réductase du virus de l'herpès fut possible seulement en utilisant un promoteur inductible par la tétracycline (TR5) pour contrôler les niveaux d'expression du gène. On peut donc produire le virus dans des conditions où l'expression du transgène n'est pas induite (Massie *et al.*, 1998a). Également, des adénovirus recombinants exprimant la glycoprotéine du virus de la rage furent obtenus en utilisant un promoteur répressible par un répresseur dérivé du répresseur de l'opéron lactose (Matthews *et al.*, 1999).

Le promoteur inductible par la tétracycline est un des plus utilisés dans les cellules de mammifères pour contrôler l'expression des transgènes. Une protéine de fusion comprenant le répresseur tétracycline (tetR) de *Escherichia coli* et le domaine d'activation de la VP16 du virus de l'herpès a été générée. Ce transactivateur tétracycline (tTA) chimérique se lie à l'ADN au niveau des séquences opératrices de l'opéron tet (tetO) en absence de tétracycline ou de ses dérivés. Donc, un promoteur minimal (séquence TATA) avec des séquences tetO en amont est inductible par ce transactivateur. L'ajout de tétracycline ou de ses dérivés inhibe la liaison à l'ADN du transactivateur et ne permet pas l'expression du gène (Gossen et Bujard, 1992). Il y a aussi un mutant de ce transactivateur, le transactivateur tétracycline inverse (rtTA), qui se lie aux séquences tetO en présence de tétracycline ou de ses dérivés (e. g. doxycycline). La présence dans le milieu de tétracycline ou de ses dérivés permet la liaison à l'ADN du transactivateur et active ainsi la transcription (Gossen *et al.*, 1995) (Figure 2).

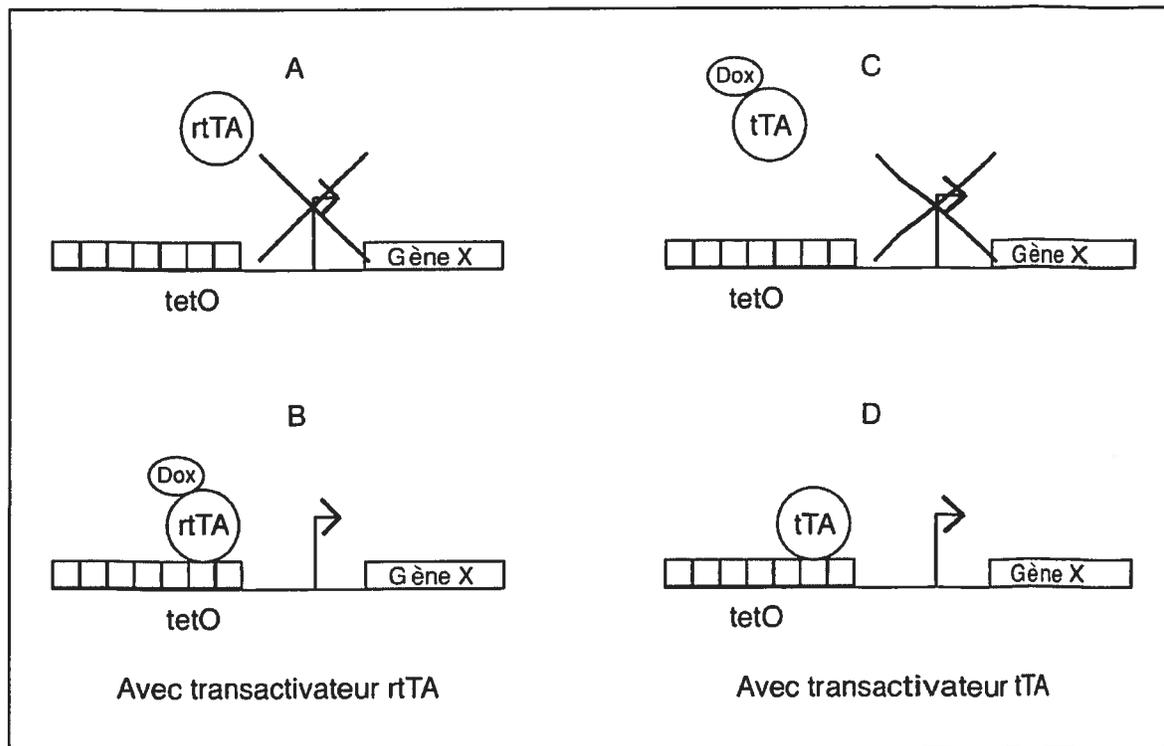


Figure 2 : Représentation schématique du système Tet. **A:** Le transactivateur rTA ne se lie pas à l'ADN en absence de doxycycline et n'active pas la transcription du gène. **B:** En présence de doxycycline, le rTA se lie à l'ADN et active la transcription. **C:** Le transactivateur tTA ne se lie pas à l'ADN en présence de doxycycline et n'active pas la transcription du gène. **D:** En absence de doxycycline, le tTA se lie à l'ADN et active la transcription.

Dans les cas où le transgène induit l'apoptose des cellules, un des moyens de contourner le problème consiste à propager le virus sur une lignée cellulaire exprimant un gène anti-apoptotique. Les cellules seraient ainsi protégées contre les effets du transgène et pourraient mieux propager le virus. Par exemple, la lignée cellulaire 293A exprimant un gène anti-apoptotique des poxvirus, CrmA, permet une augmentation importante du titre d'un virus exprimant le gène FasL d'un facteur d'environ 100 fois supérieur (Bruder *et al.*, 2000).

1.4- OBJECTIFS

Le premier objectif de ce travail de maîtrise fut la génération d'une lignée cellulaire stable et adhérente exprimant la protéase (PS) de l'adénovirus humain à partir des cellules humaines 293A. Cette lignée devrait faciliter la purification et la titration des virus recombinants, dont le gène PS a été éliminé, par la méthode de plages de lyse. La lignée cellulaire PS actuellement disponible permettant la complémentation dérive des cellules 293 rTA qui sont des cellules adaptées à la croissance en suspension. Il est donc difficile d'obtenir des plages de lyse avec ces cellules.

Le deuxième objectif consistait à vérifier si la protéase des adénovirus porcins peut compléter l'absence du gène de la protéase chez les adénovirus humains. Cette information est pertinente pour évaluer la biosécurité des AdV humains dans le contexte d'une utilisation potentielle chez des porcs possiblement pré-infectés avec un adénovirus porcin.

Le dernier objectif des travaux effectués consistait à évaluer l'impact de la toxicité de la GP5 sur les titres d'AdV exprimant cette protéine et sur la facilité à générer des virus recombinants.

2- MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1- CONSTRUCTION DES PLASMIDES

2.1.1- Plasmide avec promoteur inductible par AMPc (pAdCRE5**lacZ*)

La stratégie pour obtenir ce plasmide consistait en remplacer les séquences opératrices (*tetO*) d'un promoteur fort inductible par tétracycline (TR5) (Massie *et al.*, 1998a) par les éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE). Un plasmide comportant le gène *lacZ* en aval d'un promoteur TR5, dont les séquences *tetO* avaient été éliminées (pAdTR5-*tetO***lacZ*) a été gracieusement obtenu du Dr Alaka Mullick. Des CRE ont donc été insérés dans ce plasmide.

Sept copies de la séquence CRE, provenant du promoteur du gène humain du peptide vasoactif intestinal (VIP) ont été amplifiées à partir du plasmide pZ8CVS qui contient ce promoteur avec des amorces générant des sites *Hind* III, *Sal* I et *Afl* II en amont du fragment, de même qu'un site *Kpn* I en aval. Le plasmide pZ8CVS a été gracieusement fourni par le Dr Yves Durocher de l'Institut de recherche en biotechnologie.

Hind III *Sal* I *Afl* II

Amorce sens: 5'-CCCAAGCTTGTGCGACGGGCTTAAGGATAGCTTGATATC-3'

Kpn I

Amorce antisens: 5'-CGGGGTACCGGCCATGGGCTGCAG-3'

L'amplification a été effectuée avec 2 U de l'enzyme Vent (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) dans le tampon Thermopol [10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100] (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) supplémenté avec 1 mM de MgCl₂ et 200 nM d'un mélange de désoxynucléosides triphosphates (dNTP). Cent pmoles des amorces et 7,5 ng de pZ8CVS ont été utilisés dans un volume réactionnel de 100 µl. L'amplification a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur PHC-3 (Techne Ltd., Duxford Cambridge, UK). Les conditions d'amplification étaient les suivantes:

1 cycle	94°C	3 min
	51°C	2 min
	72°C	2 min
30 cycles	94°C	30 sec
	51°C	30 sec
	72°C	1 min 30 sec
1 cycle	72°C	10 min

Le produit de 250 pb, obtenu suite à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), a été collecté à partir de 4 tubes et purifié à partir de gel d'agarose à l'aide des billes

QiaEXII (Qiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne) selon le protocole du fabricant. Un total de 4,5 µg du plasmide de départ pAdTR5-tetO*lacZ a été linéarisé par digestion avec 5 U de l'enzyme *Hind* III dans du tampon NEBuffer #2 [10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol] (New England Biolabs Inc., Beverly, MA). La digestion a été incubée pendant 18 heures à 37°C. L'ADN clivé a ensuite été purifié à l'aide des billes QiaEXII selon le protocole du fabricant.

Par la suite, les extrémités du vecteur et du fragment contenant les CRE ont été rendues franches par un traitement avec la T4 ADN polymérase. Les réactions ont été effectuées avec environ 2 µg de vecteur ou le quart du fragment purifié dans du tampon NEBuffer #2 supplémenté avec 50 µg/ml d'albumine sérique de boeuf (BSA) et du mélange de dNTPs à une concentration finale de 100 nM chacun. Le volume final a été complété à 60 µl et 6 U d'ADN polymérase du phage T4 a été ajouté. La réaction a été réalisée à 12°C pendant 20 minutes et a ensuite été arrêtée par l'ajout de 20 mM d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA). L'ADN a ensuite été purifié avec les billes QiaEXII selon le protocole du fabricant.

Le vecteur linéarisé a ensuite été déphosphorylé et le fragment obtenu contenant les séquences CRE a été phosphorylé. Pour la déphosphorylation, le vecteur a été incubé avec 10 U de phosphatase alcaline intestinale de veau (CIAP) dans du tampon NEBuffer #2 pendant une heure à 37°C. Le fragment a été incubé avec 20 U de la polynucléotide kinase du phage T4 dans du tampon ligase [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA] (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) pendant une heure à 37°C pour permettre la phosphorylation. Environ 5 ng du fragment et 50 ng de vecteur ont été ligués en présence de 400 U d'ADN ligase du phage T4 dans le tampon ligase [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM dithiothreitol, 5% (poids/volume) polyéthylène glycol-8000] (Gibco Life Sciences, Buckinghamshire, UK) supplémenté avec 10 µM ATP. La réaction a été réalisée pendant 18 heures à 4°C. Des bactéries *Escherichia coli* DH5α ont été transformées avec le produit de la ligation. La transformation a été effectuée en incubant 100 µl de bactéries compétentes *E. coli* DH5α avec le produit de ligation pendant 30 minutes sur glace. Les bactéries ont ensuite été incubées à 42°C pendant 1 minute avant d'être refroidies sur la glace pour 2 minutes. Un volume de 900 µl de milieu Luria-Bertani (LB) a par la suite été ajouté et les bactéries ont été incubées à 37°C sous agitation pendant 30 minutes. Finalement, les bactéries ont été étalées sur des pétris de LB agar contenant 100 µg d'ampicilline par ml, et incubées à 37°C jusqu'au lendemain. Les bactéries des différentes colonies ont ensuite été mises en culture dans 5 ml de milieu LB contenant 100 µg d'ampicilline par ml. L'ADN plasmidique de ces

cultures a été extrait avec la trousse QIAprep spin miniprep kit (Qiagen GmbH, Schwalbach,. Allemagne). La présence du fragment et son orientation dans le vecteur ont été vérifiées par suited'une digestion à l'aide des enzymes *Stu* I et *Hind* III résultant en des fragments de 346 pb, 2859 pb et 7174 pb. Le plasmide a ensuite été séquencé avec le mélange dRhodamine (Amersham Pharmacia Biotech, San-Francisco, CA). Une quantité de 1 µg de plasmide a été utilisée pour la réaction de séquençage avec 4 µl de mélange dRhodamine et 2 pmoles d'amorces LL-16 s'hybridant en amont du site *Hind* III qui a été utilisé pour le clonage. La réaction a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystems, Foster city, CA). Les conditions d'amplification étaient les suivantes:

25 cycles	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	4 min

Le produit de la réaction PCR a ensuite été purifié par précipitation en présence de glycogène/éthanol. Pour ce faire, des volumes de 40 µl de tampon Tris-EDTA (TE) contenant 500 ng/µl de glycogène et de 100 µl d'éthanol anhydre ont été ajoutés dans chaque échantillon. Le tube a ensuite été laissé sur la glace pendant 30 minutes et centrifugé à 12 000 rpm pendant 25 minutes. Le culot a ensuite été lavé avec 150 µl d'éthanol 70% et recentrifugé à 14 000 rpm pendant 3 minutes avant d'être séché à l'air pendant 10 minutes. L'échantillon a finalement été envoyé au service de séquençage de l'Institut de recherche en biotechnologie.

2.1.2- Plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro

Pour obtenir un plasmide comportant une cassette d'expression dicistronique contenant le gène de la protéine fluorescente verte modifiée (GFPq) est placé en aval d'un site d'entrée interne du ribosome (IRES) sous le contrôle d'un promoteur inductible par choc thermique (HSE), Un plasmide possédant cette même cassette sous le contrôle du promoteur TR5 (pTR5-DC-GFPq/Tk*Hygro) a été utilisé pour n'en changer que le promoteur. Ce plasmide possède aussi un gène de résistance à l'hygromycine dans une autre cassette d'expression constitutive. Le plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro a été construit en enlevant la cassette du gène de résistance à l'hygromycine et le promoteur inductible par la tétracycline TR5, du plasmide pTR5-DC-GFPq/tk*Hygro. Ces séquences ont été remplacées par la cassette du gène de résistance à l'hygromycine et le promoteur inductible par choc thermique (HSE) du plasmide pHSE*GFPq/tk*Hygro, obtenu gracieusement du Dr Dick Mosser de l'Institut de recherche en biotechnologie.

Pour ce faire, 9 µg de plasmide pTR5-DC-GFPq/tk*Hygro a été digéré par l'ajout de 10 U de l'enzyme *Mlu* I et 10 U de l'enzyme *Bgl* II dans le tampon NEBuffer #3 [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol] et le mélange a été incubé 18 heures à 37°C. Un fragment de 4377 pb correspondant au vecteur a été obtenu, puis purifié sur gel à l'aide des billes QiaEXII.

La cassette de résistance à l'hygromycine et le promoteur HSE ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces dans lesquelles des sites *Bgl* II et *Pme* I ont été ajoutés en 3'. Un site *Asc* I a aussi été ajouté à l'extrémité 5' de l'amorce sens.

Asc I

Amorce sens: 5'-TTGGCGCGCCTGTCTGCTCAGTCCAGT C-3'

Bgl II *Pme* I

Amorce antisens: 5'-GGAGATCTGTTTAAACTTGCGCGCCCGCGGAGG-3'

La réaction d'amplification a été réalisée avec un total de 9 ng de plasmide pHSE*GFPq/tk*Hygro en présence de 2 U de l'enzyme Vent (New England Biolab) ainsi que 100 pmol de chacune des amorces dans le tampon Thermopol supplémenté de 5% DMSO. Chacun des dNTPs ont aussi été ajoutés à une concentration finale de 200 nM. Le volume final de la réaction a été complété à 100 µl avec de l'eau. La réaction a été effectuée dans un thermocycleur PHC-3 (Techne Ltd., Cambridge, UK) sous les conditions suivantes:

1 cycle	94°C	3 min
	48°C	2 min
	72°C	2 min
30 cycles	94°C	30 sec
	48°C	30 sec
	72°C	1 min 30 sec
1 cycle	72°C	10 min

Le produit de la réaction PCR ayant une taille de 1920 pb a été collecté à partir de deux tubes et fractionné sur gel d'agarose puis, purifié avec les billes QiaEXII selon le protocole du manufacturier. Finalement, le fragment d'ADN a été digéré suite à une période d'incubation de 18 heures à 37°C en présence de 10 U de l'enzyme *Bgl* II dans du tampon NEBuffer #3 (New England Biolab). Le fragment contenant le promoteur HSE et le gène de résistance à l'hygromycine a ensuite été purifié à l'aide des billes QiaEXII et digéré pendant 18 heures à 37°C en présence de 10 U de l'enzyme *Asc* I dans le tampon NEBuffer #4 [20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM dithiothreitol]. Ce fragment a été inséré dans le plasmide receveur. Pour la réaction de ligation, 30 ng du vecteur et 25 ng du fragment ont été incubés en présence de

400 U de ligase. La réaction a été réalisée à la température de la pièce pendant 4 heures dans le tampon ligase (New England Biolab).

Des bactéries *E. coli* DH5 α ont été transformées comme précédemment avec le produit de ligation. La présence et l'orientation du fragment ont été vérifiées en digérant 17,5 μ l de l'éluat de miniprep avec 10 U de *Aat* II. La réaction a été effectuée dans le tampon NEBuffer #4 pendant 4 heures à 37°C. Deux bandes correspondant à des fragments d'ADN d'environ 4740 pb et 1720 pb devaient être obtenues suite à l'électrophorèse sur gel d'agarose.

2.1.3- Plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro

Pour insérer le cadre de lecture de la protéase en amont de l'IRES dans la cassette dicistronique du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro, le site unique de clonage *Bgl* II a été utilisé. Le cadre de lecture de la protéase de l'Ad2 a été obtenu en digérant le plasmide pKS.PS, fourni gracieusement par la Dr Wahiba Oualikene de l'Institut de recherche en biotechnologie, en présence de 20 U de *Bam*HI. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 18 heures à 37°C dans le tampon pour *Bam*H I [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol] (New England Biolab) supplémenté de 100 μ g/ml de BSA. Le fragment d'environ 700 pb a ensuite été purifié sur gel à l'aide des billes QiaEXII, selon les directives du manufacturier.

Environ 16 μ g du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro ont été digérés par l'addition de 10 U de l'enzyme *Bgl* II dans le tampon NEBuffer #3 (New England Biolab). Après une période d'incubation de 18 heures à 37°C, 10 U de CIAP ont été ajoutés au mélange pour déphosphoryler le vecteur. Le mélange a été incubé une heure et le vecteur a été purifié sur gel d'agarose à l'aide des billes QiaEXII, selon le protocole du manufacturier.

Par la suite, 9 ng du fragment d'ADN amplifié et 30 ng de vecteur ont été ligués en présence de 400 U d'ADN ligase dans le tampon ligase (New England Biolab). Le mélange réactionnel a été incubé à 16°C pendant 6 heures. Le produit de ligation a été transformé et l'ADN plasmidique des colonies a été extrait comme précédemment. La présence et l'orientation du fragment ont été vérifiées dans les différents clones par digestion de 17,5 μ l des minipréparations d'ADN plasmidique en présence de 5 U de l'enzyme *Nru* I dans le tampon pour *Nru* I [100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂] (New England Biolab). Des bandes correspondant à des fragments d'ADN de 365 pb, 2095 pb et 4625 pb devaient être obtenues suite à l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Le gène de la protéase a ensuite été séquencé en utilisant le mélange réactionnel BigDye (PE Applied Biosystems Inc., Foster city, CA). La réaction a été réalisée à partir de 400 ng d'ADN plasmidique et 1,6 pmol de l'amorce s'hybridant à environ 70 pb de la séquence TATA du promoteur HSE (HSEseq3') ou de l'amorce s'hybridant au début de l'IRES (IRESseq5'). Puis, 8 µl de mélange BigDye ont été ajoutés et le volume de la réaction a été complété à 20 µl. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Foster city, CA). Les conditions d'amplification étaient les suivantes:

1 cycle	96°C	2 min
25 cycles	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	4 min

Le produit de la réaction a ensuite été purifié à l'aide des colonnes Centri-Sep (Princeton Separations, Adelphia, NJ), selon le protocole du manufacturier et envoyé au service de séquençage de l'Institut de recherche en biotechnologie.

2.1.4- Plasmide pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro

Pour insérer le cadre de lecture de la protéase dans la cassette dicistronique inductible par choc thermique comme pour la protéase de l'Ad2, la procédure était sensiblement la même. La protéase de l'adénovirus porcine sérotype 3 (PAV3) a été obtenue par amplification à partir de l'ADN génomique de la souche 6618 du virus. Cette amplification par PCR a été réalisée en utilisant des amorces s'hybridant au début et à la fin du cadre de lecture de la protéase. Ces amorces possédaient en leur extrémité des sites *BamH I* pour le clonage ultérieur du fragment. Un motif mimant la séquence de Kozak (GCC)₃ a aussi été ajouté en 5' (Kozak, 1987).

BamH I **Kozak**

Amorce sens : 5'-CCGGGGGATCCGCGCCGCCATGGGCAGCACCGAG-GACGAGCTCCGAGCCATG-3'

BamH I

Amorce antisens : 5'-CCGGGGGATCCTTATTGCATATCGAGCGCTTTG-TGC-AGGTG-3'

La réaction d'amplification a été réalisée comme pour la construction du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro à partir de 6,5 ng d'ADN génomique du PAV3 sous les conditions suivantes :

1 cycle	95°C	3 min
---------	------	-------

	68°C	1 min
	72°C	1 min
30 cycles	95°C	1 min
	68°C	1 min
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	7 min

Le produit de la réaction PCR, soit un fragment d'ADN d'une longueur d'environ 700 pb ont ensuite été purifiés sur des colonnes de gel de silice de la trousse PCR purification Kit (Qiagen GmbH, Schwalbach, Allemagne) selon les directives du manufacturier. L'amplification et la purification du fragment ont été effectuées par Mr Daniel Larocque. Ensuite, une aliquote de 20 µl contenant le fragment d'ADN attendu a été digéré en présence de 20 U d'enzyme *Bam*H I dans le tampon *Bam*H I (New England Biolab) supplémenté de 100 µg/ml de BSA. La réaction a été réalisée pendant 18 heures à 37°C. Subséquemment, le fragment d'ADN comportant le cadre de lecture de la protéase a été purifié sur gel d'agarose à l'aide des billes QiaEXII et cloné dans le vecteur pHS E-DC-GFPq/tk*Hygro digéré par *Bgl* II comme dans le cas de la protéase de l'Ad2. La présence et l'orientation de la protéase ont été vérifiées par digestion de 17,5 µl de miniprep avec 5 U de *Mlu* I. La réaction a été effectuée pendant 18 heures à 37°C dans le tampon NEBuffer #2 (New England Biolab). Des bandes correspondant à des fragments d'ADN de 1 110 pb et 5978 pb devaient être obtenues suite à l'électrophorèse sur gel d'agarose. Le gène de la protéase a également été séquencé de la même façon que celui de la protéase de l'Ad2.

2.1.5- Plasmide de transfert pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq

Ce plasmide a été construit à partir du plasmide de transfert pAdCMV5P2-DC-GFPq obtenu gracieusement du Dr Alaka Mullick de l'Institut de recherche en biotechnologie. Ce plasmide possède une cassette d'expression dicistronique comportant le gène de la GFPq en aval de l'IRES contrôlée par un promoteur chimérique répressible par le répresseur cumate. Le cadre de lecture de la GP5, soit l'ORF5 du VSRRP, a été obtenu d'un plasmide comportant une cassette d'expression dicistronique avec ce gène placé en amont le l'IRES. Cette cassette d'expression est sous le contrôle du promoteur TR5. L'ORF5 a été extrait et inséré dans le plasmide de transfert pAdCMV5P2-DC-GFPq en utilisant deux sites de restriction situés dans les séquences de tête tripartites de l'adénovirus (TPL) présentes dans les promoteurs CMV5P2 et TR5 et au début de l'IRES, soit les sites des enzymes *Xho* I et *Hpa* I, respectivement. L'ORF5 a été extrait du plasmide de transfert pAdTR5*ORF5-DC-GFPq par digestion avec ces enzymes et a été inséré dans le plasmide pAdCMV5P2-DC-GFPq linéarisé en présence de ces mêmes enzymes.

Le plasmide pAdTR5*ORF5-DC-GFPq obtenu gracieusement du Dr Carl Gagnon de l'INRS-Institut Armand-Frappier a été digéré en présence de 5 U et 10 U des enzymes *Hpa* I et *Xho* I, respectivement. La réaction fut réalisée dans le tampon NEBuffer #4 (New England Biolab) supplémenté de 100 µg/ml de BSA pendant 18 heures à 37°C. Le vecteur pAdCMV5P2-DC-GFPq a aussi été linéarisé par digestion avec les enzymes *Hpa* I et *Xho* I. Le fragment d'ADN comportant l'ORF5 et le vecteur ont été purifiés sur gel d'agarose et extraits à l'aide des billes QIAEXII, selon les directives du manufacturier. Les fragments de 1790 pb pour l'ORF5 et 6500 pb pour le vecteur ont été purifiés, puis ligés suite à une incubation en présence de 200 U de l'enzyme ADN ligase du phage T4 dans le tampon ligase (New England Biolab). La réaction fut réalisée pendant 4 heures à la température de la pièce avec environ 30 ng du vecteur et 50 ng du fragment d'ADN contenant le transgène. Des bactéries *E. coli* DH5α ont ensuite été transformées avec le produit de ligation et les colonies obtenues ont été testées pour la présence du transgène par digestion avec l'enzyme *Bam*H I, donnant des fragments d'ADN de 729 pb et 8096 pb. La séquence de l'ORF5 a ensuite été vérifiée par séquençage. La réaction de séquençage fut effectuée avec 8 µl du mélange BigDye (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) pour environ 650 ng du plasmide et 3,2 pmoles d'amorce s'hybridant dans la séquence d'épissage, immédiatement en amont de l'ORF5 ou dans l'IRES immédiatement en aval de l'ORF5. Les conditions d'amplification utilisées ont été les mêmes que celles utilisées pour le séquençage des gènes des protéases. Le produit de la réaction PCR fut purifié sur colonne Centri-Sep, selon les directives du manufacturier, et envoyé au service de séquençage de l'Institut de recherche en biotechnologie.

2.2- TRANSFECTIONS TRANSITOIRES POUR ESSAIS DES DIFFÉRENTS PROMOTEURS INDUCTIBLES

2.2.1- Cellules et méthode de transfection

Les cellules 293A sont des cellules transformées qui proviennent de fibroblastes rénaux humains (Graham *et al.*, 1977). Ces cellules possèdent la région E1 des adénovirus humains. Les cellules 293S dérivent des cellules 293A et sont adaptées à la culture en suspension (Garnier *et al.*, 1994). Les cellules 293 CymR sont des cellules 293A qui expriment le répresseur de l'opéron cumate. Les cellules 293A, 293S, de même que les lignées dérivées de ces cellules, ont été cultivées dans le milieu minimal d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté de 2 mM de L-glutamine et de 5% de sérum fœtal bovin (FBS). Les cultures étaient incubées à 37°C sous une atmosphère contenant 6% de CO₂.

Les transfections ont été réalisées suivant la méthode du phosphate de calcium (Jordan *et al.*, 1996). Pour ce faire, trois tubes étaient préparés. Le tube 1 contenait 10 µg d'ADN dans 100 µl d'une solution de TE 0.1X. Le tube 2 contenait 337.6 µl d'eau avec 10 µl de CaCl₂ 2M. Le contenu du tube 1 était ajouté au tube 2 en plus de 52 µl de CaCl₂ 2M. Ce mélange était ensuite ajouté goutte à goutte, en faisant buller le précipité, dans un troisième tube contenant 500 µl de solution tamponnée à l'hépes (HBS) 2X [0.28 M NaCl, 0.05 M Hepes, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.05]. Le précipité généré était ensuite déposé goutte à goutte sur les cellules dont le milieu avait été changé 4 heures auparavant. Les cellules ont été rincées le lendemain dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pour enlever le surplus de précipité. Un précipité de 1 ml pouvait servir pour la transfection des cellules contenues dans un pétri de 100 mm ou dans deux puits d'un plateau de 6 puits.

2.2.2- Essais du promoteur CRE5 (inductible par AMPc)

Un total de 300 000 cellules 293A par puits ont étéensemencées la veille dans des plateaux de 6 puits et co-transfectées avec 3 µg de plasmide pAdTR5**lacZ* ou pAdCRE5**lacZ* en présence de 2 µg de plasmide pcDNASEAP contenant l'ADNc de la phosphatase alcaline sécrétée humaine (SEAP) sous le contrôle du promoteur précoce immédiat du cytomégalovirus (CMV IE). Ce plasmide a été gracieusement obtenu du Dr Yves Durocher de l'Institut de recherche en biotechnologie. Ce plasmide a été utilisé afin d'obtenir un total de 5 µg d'ADN par échantillon. De même, 50 ng du plasmide pUHD172.1 contenant le gène du transactivateur rtTA (Gossen *et al.*, 1995) a été aussi transfecté avec le plasmide pTR5**lacZ*.

Les cellules ont été induites par l'ajout de 1 µg de doxycycline par ml de milieu pour le promoteur TR5 ou de forskoline à une concentration finale de 1 mM pour le promoteur CRE5. Les drogues inductrices ont été ajoutées au moment de la transfection.

Les cellules ont été récoltées 48 heures post-transfection. La récolte a été réalisée en enlevant le milieu, en rinçant au PBS et en décollant les cellules avec un grattoir dans 1 ml de PBS. Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes et élimination du surnageant, le culot a été resuspendu dans 50 µl de tampon Tris 0,25 M. Les cellules ont par la suite été lysées par trois cycles de gel-dégel dans de la glace sèche. Les débris cellulaires ont été éliminés suivant une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min et le surnageant a été conservé sur la glace.

Pour le dosage de la β -galactosidase, des aliquotes de 10 μ l des extraits cellulaires ont été mises dans un plateau de 96 puits, puis 1 μ l d'une solution 0.1 M de $MgCl_2$ et 4.5 M de β -mercaptoéthanol ont été ajoutés en plus de 67 μ l d'une solution de phosphate de sodium 0.1 M à pH 7.5 et 22 μ l d'une solution de 4 mg/ml o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) dissous dans la même solution de phosphate de sodium. Les plaques ont ensuite été lues trois fois à des intervalles de 10 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre Dynatech MR500 (Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, VA) à une longueur d'onde de 450 nm.

2.2.3- Essais du promoteur MMTV (inductible par glucocorticoïdes)

Les essais ont été réalisés avec le plasmide pUT530 (Cayla, Toulouse, France), contenant le gène lacZ sous le contrôle de la longue répétition terminale (LTR) du virus des tumeurs mammaires murin (MMTV). Les transfections ont été effectuées comme précédemment avec 3 μ g de plasmide pUT 530 et 2 μ g de pAdCMV5*GFPq sur les cellules 293A, par précipitation au phosphate de calcium. L'induction a été déclenchée en ajoutant de la dexaméthazone à une concentration dans le milieu de 10 nM à 10 μ M, selon les échantillons. La dexaméthazone a été ajoutée au moment de la transfection.

La récolte des cellules et le dosage de la β -galactosidase ont été réalisés de la même façon que pour l'essai du promoteur CRE5.

2.2.4- Essais en transfection transitoire du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro

Les transfections ont été effectuées sur des cellules 293A dans des plaques de 6 puits par précipitation au phosphate de calcium, de la même façon que les autres transfections. Les transfections ont été réalisées avec 3 μ g de plasmide pTR5-DC-GFPq/tk*Hygro ou pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro et 2 μ g de plasmide psl1190 ne contenant aucun gène eucaryote (Amersham Life sciences, Buckinghamshire, UK) de façon à avoir 5 μ g d'ADN par échantillon. Aussi, 50 ng de plasmide pUHD172.1 contenant le transactivateur rTA ont été transfectés avec le plasmide TR5.

Les cellules ont été induites par choc thermique ou par ajout de 1 μ g de doxycycline par ml de milieu, 24 h post-transfection. Les cellules ont par la suite été trypsinées, resuspendues dans 5 ml de milieu et transférées dans des tubes à bouchon vissable. Les cellules transfectées avec le même ADN ont été mélangées pour éviter les variations dues aux différences d'efficacité de transfection. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C ou

à 43°C pour un choc thermique pendant 45 minutes. Par la suite, les cellules ont été remises à la température d'incubation de 37°C dans des plateaux de 6 puits.

Les niveaux d'expression de la GFPq ont été déterminés par cytofluorométrie 24 h post-induction. Un total de 1 ml des cellules trypsinées et resuspendues dans 8 ml de milieu a ensuite été analysé en cytofluorométrie avec un système de cytométrie en flux Epics® XL-MCL™ (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Les cellules ont été excitées par le laser argon de 15 mW à 488 nm et la fluorescence de la GFPq a été détectée à l'aide d'un filtre passe-bande de 525 nm.

2.3- ESSAI DE TRANSCOMPLÉMENTATION DES PROTÉASES DES Ad2 ET PAV3

Des feuillettes de cellules 293A ont été transfectées avec les plasmides pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro ou pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro et ensuite infectées avec un vecteur ΔPS. La progéniture virale a ensuite été titrée.

La transfection transitoire des cellules a été réalisée par précipitation au polyéthylèneimine (PEI), selon un protocole optimisé par le Dr Yves Durocher (Durocher *et al.*, sous presse). Pour ce faire, des pétris de 100 mm ont étéensemencés la veille avec 2 millions de cellules. Pour la transfection, 6 µg d'ADN ont été ajoutés à 200 µl de milieu sans sérum. Par la suite, un total de 8 µl d'une solution aqueuse de 1 mg/ml de PEI linéaire de 25 kDa (Polyscience, Niles, IL) a été ajouté et le mélange a été laissé à la température ambiante pendant 10 minutes. Le précipité a ensuite été réparti sur le feuillet de cellules. Après 18 heures, les cellules ont été infectées avec un Ad5ΔE1ΔPS lacZ-EGFP à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 dans 4 ml de milieu. Ce virus est un vecteur répliquatif non-disséminatif exprimant les gènes de la β-galactosidase et de la GFPq (Oualikene *et al.*, 2000). Les cellules infectées ont été incubées 5 heures sous agitation pour permettre aux virus de s'attacher, puis ont été rincées trois fois avec du PBS et trypsinées avant d'être resuspendues dans 20 ml de milieu et réparties dans cinq tubes à bouchon vissable. Une partie de cette suspension a été congelée tandis que les 4 autres parties ont été soumises à un choc thermique à 43°C pendant 45 minutes ou incubées à 37°C comme contrôle. Ces cellules ont finalement été placées dans des pétris 60 mm et incubées pour 48 heures. Les cellules ont ensuite été congelées à -20°C. Les échantillons ont été soumis à deux cycles de gel-dégel pour permettre la lyse des cellules.

La production d'une progéniture virale a été estimée par la méthode de la dose infectieuse causant un effet cytopathique dans 50% des cultures cellulaires infectées

(TCID₅₀). Des aliquotes de 50 µl des dilutions des lysats de cellules de 10⁻³ à 10⁻⁹ ont été étalées sur des cellules 293 rTA PS dans des plateaux de 96 puits. Le lendemain, 200 µl de milieu ont été rajoutés sur les cellules et ces dernières ont été laissées sous incubation jusqu'à infection de la majorité des cellules. Par la suite, la plus faible dilution capable d'infecter les cellules dans la moitié des puits a été déterminée. Cette titration a été faite une deuxième fois en étalant les dilutions de 10⁻² à 5 x 10⁻⁸. Le contrôle qui a été utilisé pour la titration est le stock de Ad5ΔPS lacZ-EGFP titrant à 10⁷ unités formatrices de plaques (pfu) /ml.

2.4- GÉNÉRATION ET ANALYSE DES LIGNÉES CELLULAIRES 293A PS

2.4.1- Transfection et triage des cellules résistantes à l'hygromycine

Les plasmides pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro ou pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro ont été linéarisés par digestion avec 10 U de l'enzyme *Ssp* I avant d'être purifiés par extraction au phénol-chloroforme. Pour la purification, le volume des échantillons a été complété à un volume de 100 µl avec du tampon TE. Par la suite, 1 volume de phénol a été ajouté au tube contenant l'échantillon qui a finalement été agité et centrifugé à 14 000 rpm pendant 3 minutes. La phase supérieure a été transférée dans un nouveau tube et 1 volume d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique 25:24:1 a été ajouté et l'échantillon a été agité et recentrifugé. La même méthodologie a été réalisée avec un mélange chloroforme-alcool isoamylique 24:1. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M a été ajouté. Le tube a été mélangé et 2,5 volumes d'éthanol anhydre ont été ajoutés. L'échantillon a par la suite été incubé à -80°C pendant une heure avant d'être centrifugé à 14 000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant a été vidangé doucement et le culot a été rincé avec 250 µl d'éthanol 70% froid. Le tube contenant le mélange a été recentrifugé pendant 3 minutes à 14 000 rpm et le culot fut séché à l'air pendant 5 minutes. L'ADN du culot a finalement été resuspendu dans du tampon TE 1X pH 8 stérile à une concentration approximative de 1 µg/µl.

Des pétris de 100 mm ont étéensemencés la veille avec 2 millions de cellules 293A et les cellules ont été transfectées par la méthode du phosphate de calcium avec 15 µl des plasmides linéarisés.

À 48 heures post-transfection, les cellules ont été transférées dans des pétris de 150 mm avec du milieu contenant 200 µg d'hygromycine par ml pour la sélection des clones résistants. Le milieu a été remplacé par du milieu frais à toutes les semaines jusqu'au

moment où les colonies de cellules résistantes étaient assez grosses pour être transférées dans un pétri de 100 mm de diamètre.

Les cellules ont ensuite été triées en cytofluorométrie pour sélectionner les cellules exprimant le plus de GFPq. Les cellules ont été trypsinées et 1 200 000 cellules ont été resuspendues dans un tube contenant 10 ml de milieu et incubées à 43°C pendant 45 minutes. Les cellules ont ensuite été transférées dans un pétri de 100 mm de diamètre. À 24 heures post-induction, les cellules ont été trypsinées et resuspendues dans 2 ml de milieu avant d'être triées en cytofluorométrie à l'aide d'un système de triage Epics® ELITE-ESP™ (Beckman-Coulter, Fullerton, CA) avec le même type de laser et même type de filtre.

2.4.2- Clonage du pool de cellules 293A PSAd2

Pour le clonage par dilution limite des cellules transfectées avec le plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro, les cellules ont été trypsinées et diluées de façon à obtenir 5 cellules par ml dans du milieu supplémenté avec un mélange d'anti-oxydants. L'ajout des anti-oxydants augmente l'efficacité des clonages selon un groupe du National Institute for Environment and Health à Munich (Brielmeier *et al.*, 1998). Du pyruvate de sodium, du α -thioglycérol et du sel disodique d'acide bathocuproindisulphonique ont été ajoutés au milieu à des concentrations finales respectives de 1 mM, 50 μ M et 20 nM. Cette suspension cellulaire a ensuite été répartie dans des plateaux de 96 puits à raison de 200 μ l par puits. Après s'être assuré qu'il n'y avait qu'une seule cellule par puits, les plateaux ont été incubés afin de permettre aux cellules de se multiplier, le milieu étant changé une fois par semaine. Par la suite, les cellules ont été transférées dans des plateaux de 24 puits dans du milieu contenant 200 μ g d'hygromycine par ml de milieu. Lorsque les cellules ont atteint la confluence, ces dernières ont été transférées dans des plateaux de 6 puits.

2.4.3- Analyse des pools en cytofluorométrie

Pour l'analyse des pools de cellules 293A PSAd2 et 293A PSPAV3 triées et non-triées en cytofluorométrie, les feuillets cellulaires ont été trypsinées et 750 000 cellules resuspendues dans des tubes ont été incubées pendant 45 minutes à 37°C ou 43°C. Elles ont ensuite été transférées dans des plaques de 6 puits. À 18 heures post-induction, les cellules ont été trypsinées et resuspendues dans 2.5 ml de milieu avant d'être analysées par cytofluorométrie avec un appareil Epics® XL-MCL™ comme précédemment.

2.4.4- Analyse des clones en cytofluorométrie

Les cellules ont été trypsinées et 1 million de cellules des différents clones ont été resuspendues dans 5 ml de milieu, transférées dans un tube de 15 ml et incubées à 37°C ou 43°C pendant 45 minutes. Ces cellules ont ensuite été transférées dans des plaques de 6 puits et incubées à 37°C. Les cellules ont été récoltées 24 heures post-induction. Pour la récolte, le surnageant a été transféré dans un tube de 15 ml tandis que les cellules ont été rincées avec 1 ml de PBS qui a lui aussi été transféré dans le tube. Les cellules ont ensuite été trypsinées et resuspendues dans 5 ml de milieu avant d'être transférées dans le même tube qui, subséquemment a été centrifugé à 1 000 rpm pendant 10 minutes. Les cellules du culot ont finalement été resuspendues dans 2 ml de milieu afin d'être analysées avec un système de cytométrie en flux Epics® XL-MCL™ (Beckman-Coulter, Fullerton, CA) comme précédemment.

2.4.5- Essai de formation de plages de lyse (pool)

Le protocole utilisé pour tester la capacité des lignées cellulaires à générer des plages de lyse a été décrit dans la revue *Cytotechnology* (Massie *et al.*, 1998b).

Les cellules ont été trypsinées et 500 000 d'entre elles ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et infectées le lendemain à raison de MOI de 2 ou 20 du virus Ad5ΔE1ΔPS lacZ-EGFP ou Ad5ΔE1 lacZ-EGFP (Oualikene *et al.*, 2000). Après une période d'incubation de 6 heures sous agitation, le milieu a été enlevé et remplacé par de l'agarose SeaPlaque® GTG® (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME). Les cellules infectées ont par la suite été incubées jusqu'à l'apparition de plages de lyse.

2.4.6- Essai de formation de plages de lyse (clones)

Les clones CB6 et CE2 ont étéensemencés dans des plaques de 6 puits à raison de 750 000 cellules par puits. Le lendemain, les feuillets cellulaires ont été infectés avec une MOI d'environ 40 du virus Ad5ΔE1 lacZ-EGFP ou Ad5ΔE1ΔPS lacZ-EGFP dans un volume de 1 ml. Après 5 heures d'incubation sous agitation, le milieu a été remplacé par 5 ml d'agarose SeaPlaque® GTG®. Les cultures cellulaires infectées ont été incubées jusqu'à l'apparition de plages de lyse.

2.4.7- Essai de production de progéniture virale

Cette expérience a été faite en duplicata. Les deux clones CB6 et CE2 ainsi que les cellules 293A parentales ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits. Les feuillets cellulaires ont été infectés le lendemain avec 200 µl d'Ad5 sauvage ou d'Ad5ΔPS à des MOI de 10. Ces virus ont été décrits précédemment (Oualikene *et al.*, 2000). Après une période d'adsorption de 5 heures sous agitation, un volume de 800 µl de milieu fut ensuite ajouté à chacun des puits et les cultures cellulaires ont été ré-incubées pour une période de 48 heures avant d'être soumises à deux cycles de gel-dégel.

Les titres de virus obtenus ont ensuite été déterminés par titration par la méthode des plages de lyse. Des pétris de 60 mm de diamètre ont étéensemencés la veille avec 1 million de cellules du pool 293A PSAd2. Le lendemain, les feuillets cellulaires ont été infectés avec 1 ml des dilutions 10^{-5} à 10^{-10} des lysats de cellules infectées. L'infection s'est faite pendant 5 heures sous agitation. Le milieu a ensuite été remplacé par de l'agarose SeaPlaque® GTG® et les cellules incubées jusqu'à l'apparition des plages qui ont été par la suite dénombrées.

2.5- IMMUNOBUVARDAGES

2.5.1- Vérification de l'expression de la protéase par immunobuvardage

Les cellules ont été trypsinées et 500 000 cellules 293A, 293A PSAd2 CB6 et CE2 et 293S rTA PS ont été induites par choc thermique comme précédemment ou par l'ajout de 1 µg de doxycycline par ml de milieu dans le cas des cellules 293S rTA PS. Après une incubation de 48 heures dans des plaques de 6 puits, les cellules ont été récoltées de la façon suivante: le milieu a été vidangé et les cellules ont été détachées de la surface de culture à l'aide d'un grattoir policeman dans 1 ml de PBS. Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 minutes de la suspension cellulaire, le culot a été rincé avec 1 ml de PBS, resuspendu et puis recentrifugé. Les culots ont été ensuite resuspendus dans 80 µl de tampon Laemmli sans glycérol [0.1 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% p/v SDS] avant d'être congelés à -20°C . Pour les échantillons de cellules infectées, des plaques de 6 puits ont étéensemencées avec 500 000 cellules 293A et infectées 4 heures plus tard avec un adénovirus sauvage ou avec un adénovirus ΔPS à raison d'une MOI de 10. Après 48 heures d'incubation, les cellules infectées ont été récoltées de la façon suivante : les cellules ont été détachées de la surface des plaques à l'aide d'un grattoir policeman dans le milieu et

transférées dans un tube de 15 ml. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et le culot cellulaire a été rincé 2 fois avec 1 ml de PBS, resuspendu et centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Les culots ont finalement été resuspendus dans 80 µl de tampon Laemmli sans glycérol avant d'être congelés à -20°C.

Le dosage des protéines totales des extraits cellulaires a été fait selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) à l'aide des réactifs de la trousse de dosage de protéines DC (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA). Des aliquotes de 5 µl des extraits dilués 1:1 ont été déposées dans des plaques de 96 puits et 25 µl du réactif A' ont été ajoutés. Finalement, 200 µl du réactif B ont été ajoutés et la plaque a été incubée pour une période de 20 minutes. La lecture de l'absorbance à 590 nm a été effectuée à l'aide d'un lecteur de plaques de 96 puits Dynatech MR500 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA). Les concentrations en protéines ont été déterminées par comparaison à une courbe étalon établie avec des quantités connues de BSA.

La migration par électrophorèse des protéines a été effectuée en utilisant un gel de polyacrylamide-SDS de 14% Novex (Invitrogen Corporation, Calsbad, CA). Chaque puits a été chargé avec 40 µg de protéines et leur migration a été effectuée sous une tension de 120 V et un courant de 30 mA pendant environ 3 heures. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond™ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) sous une tension de 115 V et un courant de 350 mA pendant 1 heure. Le blocage ou saturation des membranes a été effectué avec 5% de lait en poudre écrémé préparé dans du tampon PBS contenant 0.05% de Tween20 pendant 18 heures à 4°C.

Puis, la membrane a été incubée pendant 1 heure 30 minutes en présence de sérum hyperimmun de lapin anti-PS (Weber et Tihani., 1994) dilué 1/20 000 dans du tampon de blocage. La membrane a été soumise à des lavages dans le tampon PBS-Tween puis incubée en présence d'une dilution 1/10 000 d'un anticorps de mouton anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Life sciences, Buckinghamshire, UK) pendant 1 heure 30 minutes. La membrane a par la suite été rincée avec le tampon PBS-Tween et finalement incubée 5 minutes dans une solution du réactif de chimiluminescence SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Ltd., Rockford, IL) pour ensuite être exposée 10 minutes sur un film BIOMAX MR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

2.5.2- Vérification de l'expression de la GP5 par immunobuvardage

Les niveaux d'expression en conditions induites et non-induites de l'ORF5 dans les plasmides pAdTR5*ORF5-DC-GFPq et pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq ont été vérifiés par des des expérience d'expression transitoire dans les cellules 293A.

Des plaques de 6 puits ont étéensemencées avec 500 000 cellules 293A (ou 293A CymR pour répression du promoteur CMV5P2). Le lendemain, les cellules ont été transfectés avec 3 µg des plasmides ne contenant pas l'ORF5 ou contenant l'ORF5 par la méthode avec PEI telle que décrite précédemment avec un précipité de 100 µl contenant 4 µg de PEI. Une quantité de 100 ng du plasmide pUHD172.1 contenant le transactivateur rtTA a été co-transfecté avec les plasmides TR5 dans les puits où ce promoteur devait être induit. L'induction a été déclenchée au moment de la transfection en ajoutant 1 µg de doxycycline par ml de milieu.

Les cellules ont été récoltées à 48 heures post-transfection. Le milieu des cellules a été vidangé et remplacé par 1 ml de PBS. Les cellules ont par la suite été détachées de la surface des puits à l'aide d'un grattoir et la suspension obtenue fut centrifugée à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans du tampon de Laëmmli et congelés à -20°C. Les cellules ont ensuite été homogénéisées avec un sonicateur ultrasonic processor W-375 (Heat systems-Ultrasonic inc., Farmingdale, NY).

Le dosage des protéines totales à partir des extraits cellulaires a été fait comme précédemment (voir section 2.5.1.).

La séparation des protéines par électrophorèse a été réalisée sur un gel de polyacrylamide 12% Novex (Invitrogen Corporation, Calsbad, CA). Les puits ont été chargés avec 30 µg de protéines et la migration fut effectuée sous une tension de 120 V et un courant de 30 mA pendant environ 3 heures. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond™ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) sous une tension de 90 V et un courant de 250 mA pendant 1 heure 30 minutes. La membrane fut saturée dans un tampon de blocage consistant en une solution saline tamponnée au Tris (TBS) contenant 5% de lait en poudre écrémé et 0.05% de Tween20 pendant 18 heures à 4°C.

La membrane a été incubée pendant 1 heure 30 minutes en présence d'une dilution 1/600 d'un mélange de sérums hyperimmuns de lapin dirigé contre la GP5 de quatre souches nord-américaines du VSRRP (ONT-TS, 653, 6357 et 6360). Puis, la membrane a été rincée à quelques reprises dans le tampon TBS-Tween et incubée pendant 1 heure en

présence d'une dilution 1/10 000 anticorps de mouton anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Life sciences, Buckinghamshire, UK). La membrane a ensuite été rincée dans le tampon TBS-Tween et incubée 1 minute dans la solution du réactif de chimiluminescence ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) pour ensuite être exposée 1 minute sur un film BIOMAX MR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

2.6- COMPARAISON DES TITRES VIRAUX EN PRÉSENCE OU ABSENCE DE L'ORF5

Pour comparer les titres viraux obtenus avec des AdV exprimant la GP5 en conditions induites et non-induites, les puits de plaques de 24 puits ont étéensemencés avec 100 000 cellules 293S ou 293S exprimant le rTA (293S rTA). Ces cellules ont été infectées 20 heures plus tard avec le virus Ad5TR5*ORF5-DC-GFPq ou Ad5TR5*GFPq comme contrôle à des MOI de 20. Ces virus expriment la GP5 et la GFPq sous le contrôle du promoteur TR5 (Ad5TR5*ORF5-DC-GFPq) ou la GFPq seulement sous le contrôle du même promoteur (Ad5TR5*GFPq). Les cellules ont été incubées 5 heures avec les différents virus dans 250 µl de milieu. Ensuite, 750 µl de milieu ont été rajoutés et les cellules infectées ont été incubées pendant 48 heures. Ces infections ont été faites en triplicata. Les cellules et les surnageants de culture ont été congelés jusqu'au moment où la progéniture virale fut titrée par cytofluorométrie.

Le principe de la titration par cytofluorométrie est basé sur l'existence d'une relation linéaire entre le pourcentage de cellules infectées (exprimant la GFPq) et la multiplicité d'infection. Pour ce faire, des pétris de 60 mm de diamètre ont étéensemencés avec un million de cellules 293A dans 2 ml de milieu supplémenté de 2.5% FBS et les cellules ont été infectées 4 heures plus tard avec 1 ml des dilutions des lysats des cellules. Les dilutions de 10^{-2} à 1.37×10^{-5} ont servi à l'infection des cultures cellulaires. Les cellules infectées ont par la suite été incubées sous agitation pendant 20 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées en les décollant par agitation "up and down" et transférées dans les tubes de cytofluorométrie. Les cellules ont été fixées en ajoutant 1 ml de paraformaldéhyde 4% dans les tubes qui ont ensuite été laissés sur la glace pendant 30 minutes. Les échantillons ont finalement été analysés à l'aide d'un cytofluoromètre XL-MCL de Beckman-Coulter. Les cellules ont été excitées par le laser argon de 15 mW à 488 nm et la fluorescence de la GFPq fut détectée à l'aide d'un filtre passe-bande de 525 nm. Le pourcentage des cellules GFPq positives a été utilisé ultérieurement pour les calculs de détermination du titre en comparant avec le contrôle qui consistait en une dilution du stock

de AdTR5*ORF5-DC-GFPq titrant à 5×10^8 pfu/ml. En accord avec la distribution de Poisson, seuls les échantillons avec moins de 50% de cellules positives ont été utilisés pour les calculs.

2.7- ESSAI DE GÉNÉRATION DE VIRUS RECOMBINANTS AVEC L'ORF5

Cette expérience a été réalisée en duplicata. La méthode classique pour générer des adénovirus recombinants consiste en une co-transfection de cellules avec de l'ADN du virus Ad5 Δ E1 Δ E3, dont la séquence d'encapsidation et l'ITR en 5' ont été éliminés par digestion avec l'enzyme *Cla* I, et un plasmide de transfert linéarisé contenant l'ITR et la séquence d'encapsidation suivi de la cassette d'expression du transgène et une séquence d'homologie pour permettre la recombinaison homologue (Jani *et al.*, 1997). Ainsi, seulement l'ADN viral ayant recombiné avec le plasmide de transfert permettra la génération d'une particule infectieuse (Figure 3).

Des aliquotes de 15 μ g des plasmides de transfert pAdTR5*ORF5-DC-GFPq et pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq ont été digérées avec l'enzyme *Fse* I et purifiés par extraction au phénol-chloroforme avant d'être resuspendus dans 13 μ l de tampon TE. Les transfections ont été réalisées par la méthode au PEI utilisant 3 μ g de vecteur de transfert et 3 μ g d'ADN viral digéré par *Cla* I sur des feuillettes de cellules 293A ou 293A CymR dans des pétris de 100 mm de diamètre. Un échantillon de 200 ng de pUHD172.1 contenant le transactivateur rTA a aussi été co-transfecté dans les pétris où le promoteur TR5 a été induit. L'induction du promoteur TR5 a été déclenchée au moment de la transfection par l'ajout de 1 μ g de doxycycline par ml de milieu. Le lendemain, les cellules transfectées ont été réparties dans quatre pétris de 100 mm de diamètre. Le surlendemain, le milieu a été remplacé par de l'agarose pour permettre l'apparition de plages de lyse. Les cellules ont ensuite été incubées jusqu'à apparition des plages qui ont été dénombrées.

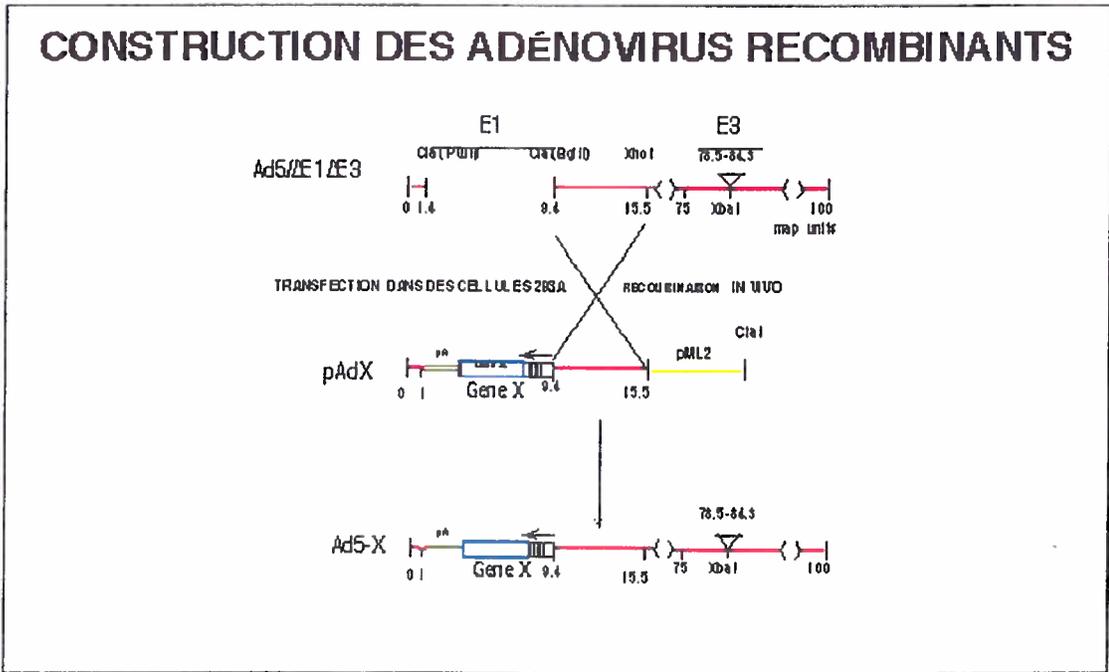


Figure 3 : Représentation schématique de la méthode de génération d'adénovirus recombinants par recombinaison homologue dans les cellules 293A. Les séquences du plasmide de transfert présentant de l'homologie avec le génome viral permettent la recombinaison homologue avec l'ADN viral clivé. Un génome viral recombinant arborant le transgène est donc obtenu.

3- RÉSULTATS

3.1- CONSTRUCTION DES PLASMIDES POUR ÉVALUATION DES PROMOTEURS EN EXPRESSIONS TRANSITOIRES

La protéase de l'adénovirus semble avoir des effets cytostatiques quand elle est exprimée en grandes quantités. Aussi, selon les résultats obtenus avec les cellules adaptées à la culture en suspension actuellement disponibles pour compléter l'absence du gène de la protéase dans les vecteurs adénoviraux, soit la lignée cellulaire 293S rTA PS, les niveaux d'expression non-induits du promoteur fort inductible par la tétracycline (TR5) qui est utilisé dans cette lignée cellulaire se sont avérés suffisants pour compléter la perte du gène. À plus forte raison, ces cellules permettent la production de vecteurs adénoviraux à des rendements moins élevés quand l'expression de la protéase est induite (Oualikene *et al.*, 2000). L'un des premiers objectifs du projet consistait donc à trouver un promoteur inductible permettant des niveaux d'expression relativement faibles afin de contrôler l'expression de la protéase dans les futures lignées cellulaires. Le promoteur se devait toutefois d'avoir des niveaux d'expression suffisants afin de permettre une complémentarité efficace. L'utilisation d'un promoteur inductible était souhaitable car ce type de promoteur permet d'activer l'expression d'un gène seulement quand son expression est désirée. Ceci est particulièrement important quand le gène en question a des effets toxiques ou cytostatiques. Un autre avantage d'utiliser un promoteur inductible est qu'il est possible de surexprimer le transgène en quantité suffisante pour permettre une bonne détection et ainsi faciliter le criblage des clones cellulaires obtenus. Il était également souhaitable de trouver un système qui ne nécessite pas de transactivateur, exogène, éliminant ainsi le besoin de construire une lignée cellulaire exprimant le transactivateur nécessaire pour contrôler l'expression de la protéase.

3.1.1- Construction du plasmide pAdCRE5**lacZ*

Un plasmide comportant le gène de la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'élévation du taux d'AMP cyclique (AMPc) dans la cellule a donc été construit afin de pouvoir comparer les niveaux d'expression de ce type de promoteur avec ceux du promoteur TR5 utilisé dans la lignée de complémentarité actuellement disponible. Le gène *LacZ* a été utilisé ici car il est facilement dosable quantitativement par un simple test colorimétrique. Les éléments de réponse à l'AMPc (CRE) sont les sites de liaison à l'ADN du facteur de transcription CREB. Ce facteur de transcription devient actif quand il y a augmentation d'AMPc dans la cellule. Ce système fonctionne bien dans le cas des cellules 293E qui sont des cellules 293 adaptées à la culture en suspension exprimant la

protéine EBNA-1 du virus Epstein-Barr (Durocher *et al.*, 2000). L'induction se fait par l'ajout d'un agent élévateur d'AMPc comme la forskoline dans le milieu de culture. Ce système ne requiert pas de transactivateur exogène. Il était donc intéressant d'essayer ce système dans les cellules 293A.

Les séquences tetO dans le promoteur TR5 ont donc été remplacées par sept copies de la séquence consensus CRE dans un plasmide contenant le gène LacZ sous le contrôle du promoteur TR5. Les séquences CRE ont été amplifiées avec succès à partir du plasmide pZ8CVS contenant un promoteur avec 7 copies de la séquence CRE. Des fragments migrant à 250 pb ont été obtenus et purifiés. Ces séquences ont été insérées dans un plasmide exprimant la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur TR5 dont les séquences tetO ont été enlevées, soit le plasmide pAdTR5(-tetO)*lacZ digéré par l'endonucléase *Hind* III. Les différents clones obtenus ont été testés par digestion et le clone 3 s'est avéré positif pour la présence dans la bonne orientation des éléments CRE. Le patron de digestion de ce clone par les enzymes *Stu* I et *Hind* III a révélé la présence de fragments d'environ 350 pb, 2850 pb et 7150 pb (Figure 4). Un plasmide contenant le gène LacZ contrôlé par un promoteur chimérique inducible par l'AMPc (CRE5) fut donc obtenu. L'analyse des séquences a révélé la présence de sept répétitions en tandem inversé du pentanucléotide CGTCA en amont de la séquence TATA du promoteur précoce immédiat du CMV. Il a aussi été possible de retrouver en aval du site d'initiation de ce promoteur les séquences de tête tripartites de l'adénovirus, des sites donneurs et receveurs d'épissage ainsi qu'une séquence activatrice (enhancer) du MLP de l'adénovirus (Figure 5). Ces éléments, également présents dans le promoteur TR5, sont reconnus pour augmenter les niveaux d'expression des gènes (Massie *et al.*, 1995). Ce plasmide a permis de tester le système inducible par AMPc dans les cellules 293A.

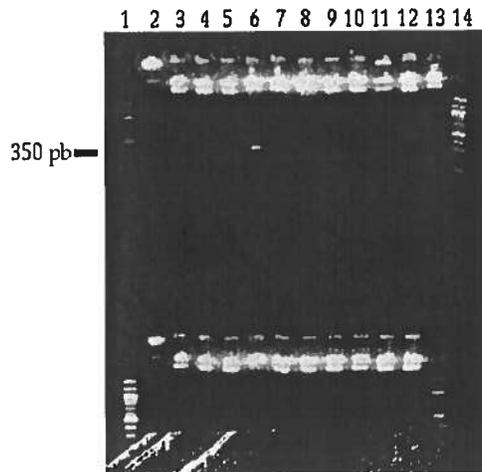


Figure 4 : Gel d'agarose 1,5% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pAdCRE5*1aIZ.

Haut du gel - Piste 1 et 14 : Étalons de poids moléculaire 100 pb de NEB, piste 2 : clone 1 non digéré, piste 3 : clone 1 digéré par l'enzyme *Stu* I, pistes 4 à 13 : clone 1 à 10 digérés par les enzymes *Stu* I et *Hind* III.

Bas du gel - Piste 1 et 13 : Étalons de poids moléculaire 100 pb de NEB, piste 2 : clone 11 non digéré, pistes 3 à 12 : clone 11 à 20 digérés par les enzymes *Stu* I et *Hind* III.

Une bande à environ 350 pb apparaît dans la piste du clone 3 digéré et indique que ce clone est positif.

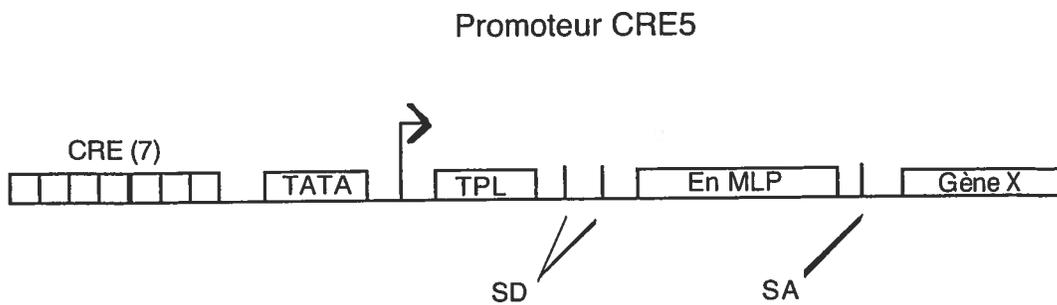


Figure 5 : Représentation schématique du promoteur CRE5. Ce promoteur contient les éléments de réponse à l'AMPc (CRE), la séquence TATA du promoteur précoce immédiat du CMV (TATA), des sites donneurs et receveurs d'épissage (SD et SA), les séquences de tête tripartites de l'adénovirus (TPL) et une séquence activatrice du MLP (En MLP). Le facteur de transcription CREB se lie aux CRE et active le gène en réponse à l'augmentation d'AMPc dans la cellule. Les autres éléments en aval de la séquence TATA augmentent le niveau d'expression du gène.

3.2- ÉVALUATION DES PROMOTEURS INDUCTIBLES EN EXPRESSION TRANSITOIRE

3.2.1- Évaluation du promoteur CRE5 en expression transitoire

Pour trouver un promoteur satisfaisant les critères établis précédemment, des essais de promoteurs en transfection transitoire ont été effectués. En premier lieu, le plasmide pAdCRE5**lacZ* obtenu par le clonage décrit précédemment a été testé en transfection transitoire afin de déterminer les niveaux d'expression en conditions induites et non-induites du promoteur chimérique CRE5 en comparaison avec le promoteur TR5 du plasmide pAdTR5**LacZ*. Ces deux constructions ont donc été transfectées dans les cellules 293A. Les cellules ont été induites par l'ajout de 1µg de doxycycline par ml de milieu pour le promoteur TR5 ou de forskoline à une concentration finale de 1 mM pour le promoteur CRE5 au moment de la transfection. Après 48 heures post-transfection, les cellules ont été récoltées et la β-galactosidase a été dosée par colorimétrie. Le niveau d'activité fut calculé en unités arbitraires correspondant à la pente de l'absorbance estimée en fonction du temps.

Il ne fut pas possible d'induire le promoteur CRE5 dans les cellules 293A. L'activité β-galactosidase des cellules est demeurée faible même en présence de forskoline. Le niveau d'expression de la β-galactosidase pour le promoteur CRE5 s'est avéré être environ 10 fois plus faible que le niveau basal obtenu avec le promoteur TR5. Une activité d'environ 7×10^{-4} fut obtenue avec le promoteur CRE5 par rapport à environ 7×10^{-3} pour le promoteur TR5 non-induit. Les cellules non-transfectées démontrèrent une activité de 4×10^{-4} . Cette construction plasmidique était fonctionnelle car un facteur d'induction d'environ 3 dans les cellules 293E fut obtenu dans cette même expérience (résultats non-présentés). Le promoteur n'est donc pas induit par l'ajout de forskoline dans les cellules 293A.

Avec le promoteur TR5, un facteur d'induction d'un peu moins de 5 fut obtenu (Figure 6). Le niveau d'expression basal du promoteur TR5 s'est avéré plus intense que celui obtenu avec le promoteur CRE5 alors que le promoteur minimal était le même dans les deux cas. Il est probable que ce résultat soit attribuable à la présence du transactivateur rTA qui possède une activité même en absence de doxycycline. Dans les cellules 293, l'activité du promoteur TR5 semble augmenter de 3 à 5 fois quand le rTA est exprimé dans les cellules même en absence de tétracycline ou ses dérivés (Massie *et al.*, résultats non-publiés).

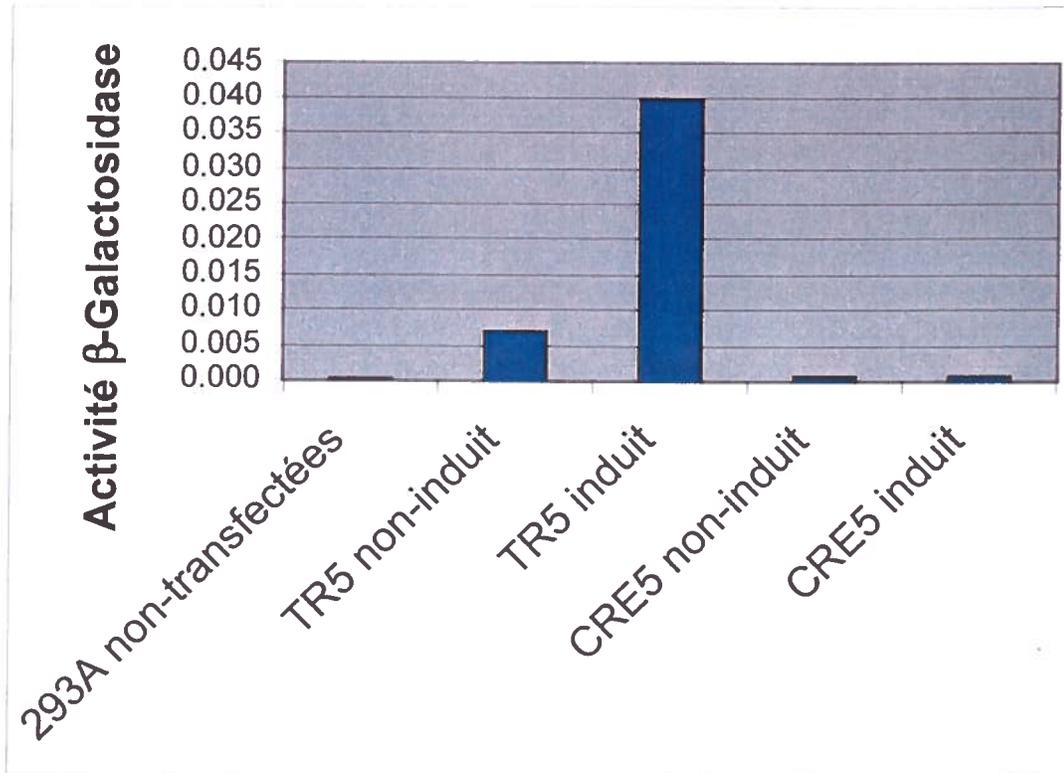


Figure 6 : Niveaux d'expression transitoire dans les cellules 293A de la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline (TR5) ou par l'AMPc (CRE5). Le transactivateur rtTA fut co-transfecté avec les constructions TR5. L'induction fut déclenchée par l'ajout de 1 μ g/ml de doxycycline (TR5) ou de 1 mM de forskoline (CRE5) dans le milieu de culture au moment de la transfection. Les cellules ont été récoltées après 48 heures et la β -galactosidase a été dosée par colorimétrie.

3.2.2- Évaluation du promoteur MMTV en expression transitoire

Considérant que le promoteur CRE5 n'est pas inductible dans les cellules 293A, un autre type de promoteur inductible n'ayant pas besoin de transactivateur exogène fut évalué. Le promoteur contenu dans la longue répétition terminale (LTR) du virus des tumeurs mammaires murin (MMTV) a été utilisé avec succès pour l'obtention de lignées cellulaires stables (Jakobovits *et al.*, 1984; Friedman *et al.*, 1989; Van Waardenburg *et al.*, 1997). Ce promoteur inductible par les glucocorticoïdes (e.g. dexaméthazone) a été essayé dans les cellules 293A.

Le plasmide pUT530 de la compagnie Cayla qui est un plasmide contenant le gène de la β -galactosidase immédiatement en aval du LTR du MMTV est la construction qui a été testée. Le plasmide utilisé précédemment exprimant la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur TR5 (pAdTR5**lacZ*) a aussi été utilisé dans cette expérience à des fins de comparaison. Les cellules 293A ont été transfectées avec ces plasmides et récoltées 48 heures plus tard. Le promoteur TR5 a été induit comme précédemment (voir section 3.2.1) et le promoteur MMTV a été induit par l'ajout de dexaméthazone au moment de la transfection à des concentrations variant de 10 nM à 10 μ M. La β -galactosidase a ensuite été dosée.

Dans les cellules 293A, des niveaux indétectables de β -galactosidase ont été obtenus avec le promoteur MMTV dans nos conditions expérimentales (Figure 7). L'activité β -galactosidase était semblable à celle des cellules non-transfectées. Une activité de $1,5 \times 10^{-4}$ a été obtenue avec les cellules non-transfectées et des activités variant entre $-0,5 \times 10^{-4}$ et 1×10^{-4} ont été obtenues avec le promoteur MMTV. Le promoteur MMTV n'a donc pas montré d'induction suffisante dans les cellules 293A. Il a été possible d'observer que le niveau d'expression de ce promoteur est très faible et en dessous du seuil de détection de l'essai colorimétrique. Ce promoteur est d'ailleurs reconnu pour son niveau d'expression basal faible (Friedman *et al.*, 1989).

Le promoteur TR5 a montré un facteur d'induction de 3 dans cette expérience. Le niveau basal de ce promoteur était également élevé, probablement pour les mêmes raisons que lors de l'expérience précédente.

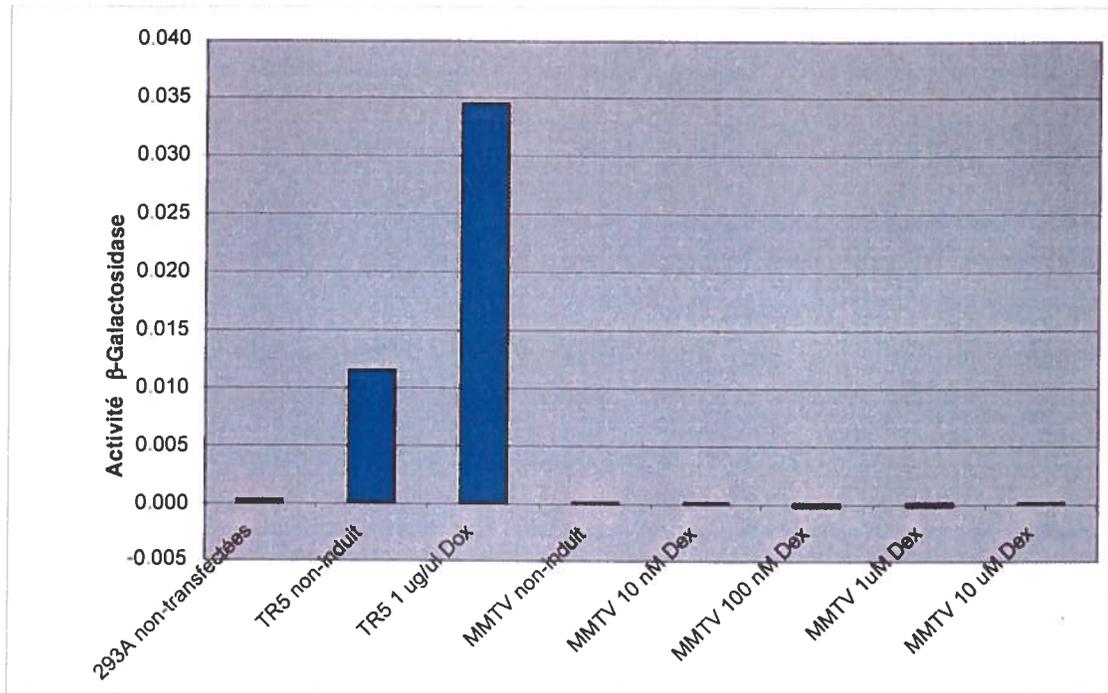


Figure 7 : Niveaux d'expression transitoire de la β -galactosidase dans les cellules 293A sous le contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline (TR5) ou par les glucocorticoïdes (MMTV). Le transactivateur rtTA a été co-transfecté avec le promoteur TR5. L'induction a été déclenchée par l'ajout de doxycycline (TR5) ou de dexaméthazone à différentes concentrations (MMTV) dans le milieu au moment de la transfection. Les cellules ont été récoltées après 48 heures et la β -galactosidase a été dosée par colorimétrie.

3.3- CONSTRUCTION DES PLASMIDES POUR LES LIGNÉES CELLULAIRES

293A PS

Comme les deux autres promoteurs n'ont pas donné des niveaux d'expression satisfaisants, le promoteur HSE qui est inductible par choc thermique a donc été choisi. Ce promoteur chimérique contient des éléments de choc thermique (HSE) sur lesquels se lient les facteurs de choc thermique de même que la séquence TATA du promoteur précoce immédiat du cytomégalovirus (CMV IE). Il était connu que ce promoteur est fonctionnel dans les cellules 293A (Mosser, résultats non-publiés). Ce promoteur fut donc utilisé pour les lignées cellulaires.

3.3.1- Construction du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro

Afin de produire les lignées cellulaires adhérentes exprimant le gène de la protéase pour permettre la complémentation des vecteurs adénoviraux, un plasmide contenant ce promoteur a été construit. Ce plasmide a été doté d'une cassette d'expression dicistronique pour permettre l'expression du gène de la protéine fluorescente verte mutée pour être plus fluorescente (GFPq) à partir du même ARN messenger. La cassette dicistronique comprend le promoteur, le site d'initiation de la transcription, le cadre de lecture du gène en première position, un site d'entrée interne du ribosome pour permettre au cadre de lecture en deuxième position de se faire traduire et finalement, le cadre de lecture du deuxième gène suivi des séquences de polyadénylation. Ce système permettait le criblage facile des clones cellulaires en se basant sur la fluorescence des cellules. Ce plasmide contient aussi un gène de résistance à l'hygromycine pour permettre la sélection des cellules ayant intégré le plasmide.

Le promoteur TR5 d'un plasmide comportant une cassette d'expression dicistronique avec le gène de la GFPq en deuxième position et aucun gène en première position a été remplacé par le promoteur HSE. Le promoteur HSE et la cassette de résistance à l'hygromycine ont donc été extraits du plasmide pHSE*GFPq/tk*Hygro, obtenu du Dr Dick Mosser de l'Institut de recherche en biotechnologie et insérées dans le plasmide pTR5-DC-GFPq/tk*Hygro (Mosser *et al.*, 2000) à la place du promoteur TR5 et de la cassette de résistance à l'hygromycine de ce plasmide.

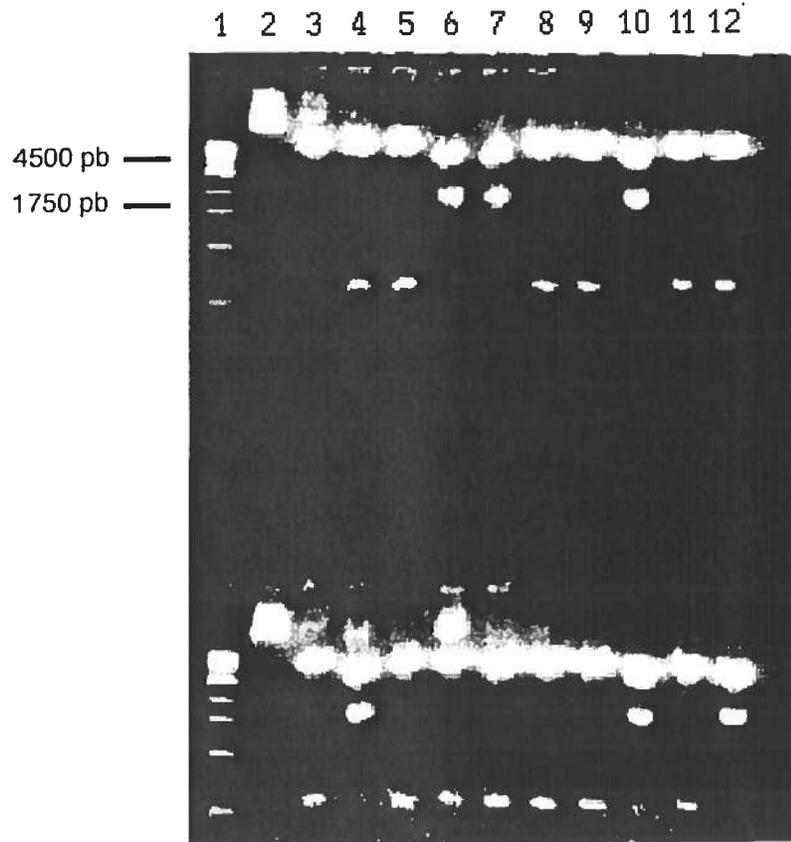


Figure 8 : Gel d'agarose 1,2% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro.

Haut du gel - Piste 1: Étalons de poids moléculaire 1 kpb de NEB, piste 2 : clone 1 non digéré, pistes 3 à 12 : clone 1 à 10 digéré par l'enzyme *Aat II*.

Bas du gel - Piste 1: Étalons de poids moléculaire 1 kpb de NEB, piste 2 : clone 11 non digéré, pistes 3 à 12 : clone 11 à 20 digéré par l'enzyme *Aat II*.

Une bande à environ 1750 pb est apparue dans les pistes des clones 4,5,8,12,18 et 20 digérés, ce qui indique que ces clones sont positifs.

Un fragment d'ADN avec le promoteur HSE et la cassette de résistance à l'hygromycine a été amplifié par PCR à partir du plasmide pHSE*GFPq/tk*Hygro et un fragment d'environ 1920 pb a été obtenu et purifié. La grosseur de ce fragment correspond à celle qui était attendue. Le plasmide pTR5-DC-GFPq/tk*Hygro a été linéarisé suite à une digestion par les enzymes *Mlu* I et *Bgl* II et le fragment d'environ 4380 pb correspondant au plasmide linéarisé ayant perdu le promoteur TR5 et la cassette de résistance à l'hygromycine a été purifié. Le fragment et le vecteur ont été ligués et les clones obtenus ont été analysés suite à une digestion par l'enzyme *Aat* II. Plusieurs clones dont la digestion a généré des fragments de 4660 pb et 1750 pb ont été obtenus (Figure 8). Ce patron de digestion correspond à ce qui était attendu si le fragment était présent et dans la bonne direction. La séquence du promoteur a été vérifiée par séquençage et correspondait à celle attendue.

Un plasmide avec une cassette d'expression dicistronique comportant le gène de la GFPq en deuxième position a donc été obtenu. Cette cassette d'expression est contrôlée par le promoteur chimérique HSE comportant des éléments de choc thermique sur lesquels se lient les facteurs de choc thermique. Les éléments de choc thermique sont composés de 5 répétitions inversées les unes par rapport aux autres du pentanucléotide NGAAN. Il est possible d'insérer un gène en première position de la cassette dicistronique grâce aux sites de restriction uniques *Bgl* II ou *Pme* I. Ce plasmide contient aussi un gène de résistance à l'hygromycine pour permettre la sélection des cellules ayant intégré ce plasmide. Ce plasmide est celui qui a été utilisé pour la construction des lignées cellulaires exprimant les protéases de l'adénovirus humain Ad2 et de l'adénovirus porcin PAV3. Les gènes des protéases ont été insérées en première position de la cassette dicistronique du plasmide (Figure 12).

3.3.2- Évaluation du promoteur HSE en expression transitoire

Les niveaux d'expression induits et non-induits du promoteur HSE et TR5 en transfection transitoire ont été comparés dans les 293A. Les cellules 293A ont donc été transfectées par la méthode du phosphate de calcium avec des plasmides contenant une cassette d'expression dicistronique contenant le gène de la GFPq en deuxième position (pTR5-DC-GFPq/tk*Hygro ou pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro). Il n'y avait aucun gène en première position. Les cassettes d'expression transfectées étaient sous le contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline (TR5) ou inductible par choc thermique (HSE). Le transactivateur rTA fut co-transfecté avec le plasmide inductible par la tétracycline. Les cellules ont été induites le lendemain par choc thermique en incubant les cellules à 43°C

pendant 45 minutes dans des tubes à bouchon vissable ou par ajout de 1 µg/ml doxycycline dans le milieu de culture. Les cellules ont été analysées par cytofluorométrie à 24 heures post-induction.

L'expression de la GFPq a été observée dans plus de 50% de cellules quand les cellules ont été transfectées avec un plasmide pAdCMV5*GFPq soit un plasmide véhiculant le gène de la GFPq sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort. Ceci suggérait que l'efficacité de la transfection était adéquate.

Le niveau d'expression fut déterminé en évaluant l'index de fluorescence correspondant au pourcentage de cellules GFPq positives multiplié par le niveau de fluorescence moyen des cellules positives. Avec le promoteur TR5, des index de 40.1 en condition non-induites et de 115.8 en conditions induites furent obtenus. Le facteur d'induction fut évalué à 2.9. Ceci correspond à ce qui est normalement obtenu avec le promoteur TR5 et le transactivateur rTA. Pour le promoteur HSE non-induit, l'index était plutôt de 2,9 et en conditions d'induction, l'index a atteint 16,1. Un facteur d'induction de 5,6 fut donc obtenu avec ce promoteur (Figure 9). Ce promoteur, en transfections transitoires, donne normalement des facteurs d'induction d'environ 3 (Mosser, communication personnelle).

Il est à noter que les niveaux d'expression du promoteur HSE se sont avérés plus faibles que ceux obtenus avec le promoteur TR5. Le niveau d'expression du promoteur HSE non-induit était 14 fois plus faible que celui obtenu avec le promoteur TR5. Quand les promoteurs furent induits, le promoteur HSE s'est avéré 7 fois plus faible que le promoteur TR5. La différence des niveaux d'expression peut s'expliquer par la présence de plusieurs éléments dans le promoteur TR5 augmentant les niveaux d'expression de 5 à 10 fois (Massie *et al.*, 1998b). Ces éléments sont absents dans le cas du promoteur HSE. Aussi, le niveau d'expression basal élevé du promoteur TR5 peut s'expliquer par la présence du transactivateur rTA (voir section 3.2.1). Quoi qu'il en soit, le promoteur HSE a donc semblé donner des niveaux d'expression satisfaisants pour le contrôle de la protéase dans les lignées cellulaires. En effet, la lignée cellulaire 293S rTA PS exprime, en conditions non-induites, la protéase à des niveaux 10 fois moindre que les cellules infectées par le virus sauvage. Or ce niveau d'expression s'est avéré suffisant pour la complémentation (Oualikene *et al.*, 2000). Une expression trop prononcée de cette protéine est d'ailleurs non souhaitable car elle a des effets cytostatiques. Les titres des vecteurs adénoviraux sur cette lignée étaient d'ailleurs plus faibles quand l'expression de la protéase était induite.

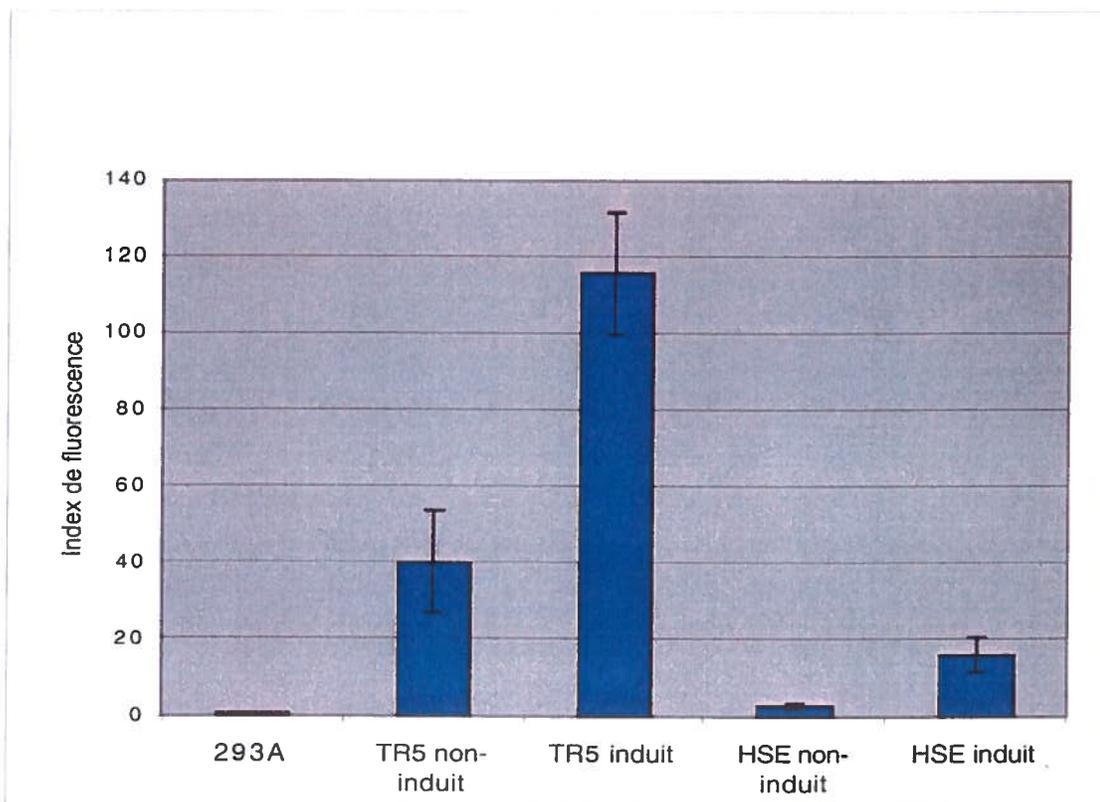


Figure 9 : Niveaux d'expression du promoteur HSE obtenus en transfection transitoire dans les cellules 293A. Les cellules 293A ont été transfectées avec le gène de la GFPq contrôlé par un promoteur inductible par tétracycline (TR5) ou par choc thermique (HSE). Les cellules transfectées ont été induites le lendemain par choc thermique à 43°C pendant 45 minutes (HSE) ou par l'ajout de doxycycline 1 µg/ml dans le milieu de culture (TR5) et analysées au cytofluoromètre 24h post-induction. L'index de fluorescence fut déterminé en multipliant le nombre de cellules GFP+ par l'indice de fluorescence moyen des cellules positives.

3.3.3- Construction du plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro

Le gène de la protéase de l'adénovirus humain Ad2 a été inséré dans le plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro décrit précédemment pour obtenir un plasmide comportant une cassette d'expression dicistronique sous le contrôle du promoteur HSE, constituée du gène de la protéase en première position et du gène de la GFPq en deuxième position. Ce plasmide est celui qui a été utilisé pour les transfections stables dans le but d'obtenir les lignées cellulaires de complémentation.

Le cadre de lecture de la protéase de l'Ad2 a été obtenu par digestion du plasmide KS.PS obtenu gracieusement du Dr Wahiba Oualikene de l'Institut de recherche en biotechnologie par l'endonucléase *Bgl* II. Le fragment d'ADN d'environ 700 pb correspondant au cadre de lecture de la protéase a été purifié et inséré dans le plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro au site de clonage *Bgl* II. La présence et l'orientation du cadre de lecture de la protéase dans les différents clones obtenus a été vérifiée par digestion avec *Nru* I. Pour les clones 3 et 4, la digestion a résulté en l'apparition de fragments d'environ 360 pb, 1960 pb et 4500 pb (Figure 10). Ce profil correspondait à celui attendu si le gène était dans la bonne orientation. L'exactitude de la séquence du gène a été confirmée par séquençage.

3.3.4- Construction du plasmide pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro

Pour permettre ultérieurement des études de transcomplémentation des protéases des adénovirus humains et porcins, le gène de la protéase de l'adénovirus porcine PAV3 a été inséré dans le plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro comme pour le gène de la protéase de l'Ad2.

L'amplification du cadre de lecture de la protéase du PAV3 fut réalisée à partir de l'ADN génomique du virus. Un fragment amplifié par PCR d'environ 700 pb, correspondant au cadre de lecture de la protéase du PAV3, a été purifié et inséré dans le plasmide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro au niveau du site unique *Bgl* II. Les clones obtenus ont été testés par digestion avec l'enzyme *Mlu* I et les clones 6 et 7 ont donné des fragments d'environ 1000 pb et 8000 pb, correspondant au profil de digestion attendu si le cadre de lecture de la protéase était présent et dans la bonne orientation (Figure 11). Comme pour la protéase de l'Ad2, la séquence a été confirmée par séquençage.

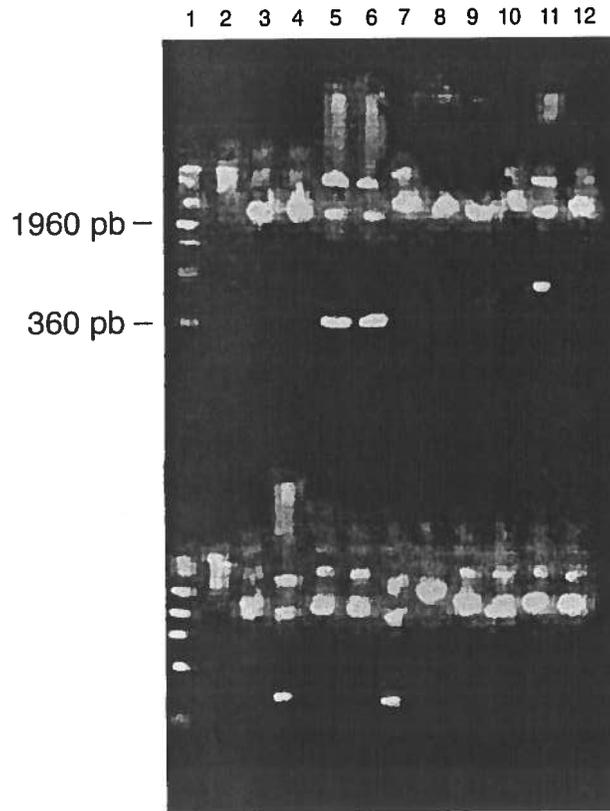


Figure 10 : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro.

Haut du gel - Piste 1 et 14: Étalons de poids moléculaire 1 kpb de NEB, piste 2 : clone 1 non digéré, pistes 3 à 12 : clone 1 à 10 digérés par l'enzyme *Nru* I.

Bas du gel - Piste 1 et 13 : Étalons de poids moléculaire 1 kpb de NEB, piste 2 : clone 11 non digéré, pistes 3 à 12 : clone 11 à 20 digérés par l'enzyme *Nru* I.

Une bande à environ 360 pb apparaît dans les pistes des clone 3 et 4 digérés et indique que ces clones sont positifs.



Figure 11 : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% des ADN élués des minipréparations des clones obtenus lors des essais de construction du plasmide pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro. Piste 1: Étalons de poids moléculaire 1 kpb de NEB; Piste 2 : pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro non digéré; Piste 3 : pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro digéré par l'enzyme *Mlu* I; Piste 4 : clone 1 non digéré; Pistes 5 à 14 : clone 1 à 10 digérés par l'enzyme *Mlu* I.

Une bande à environ 1000 pb est apparue dans les pistes des clones 6 et 7 digérés et indique que ces clones sont positifs.

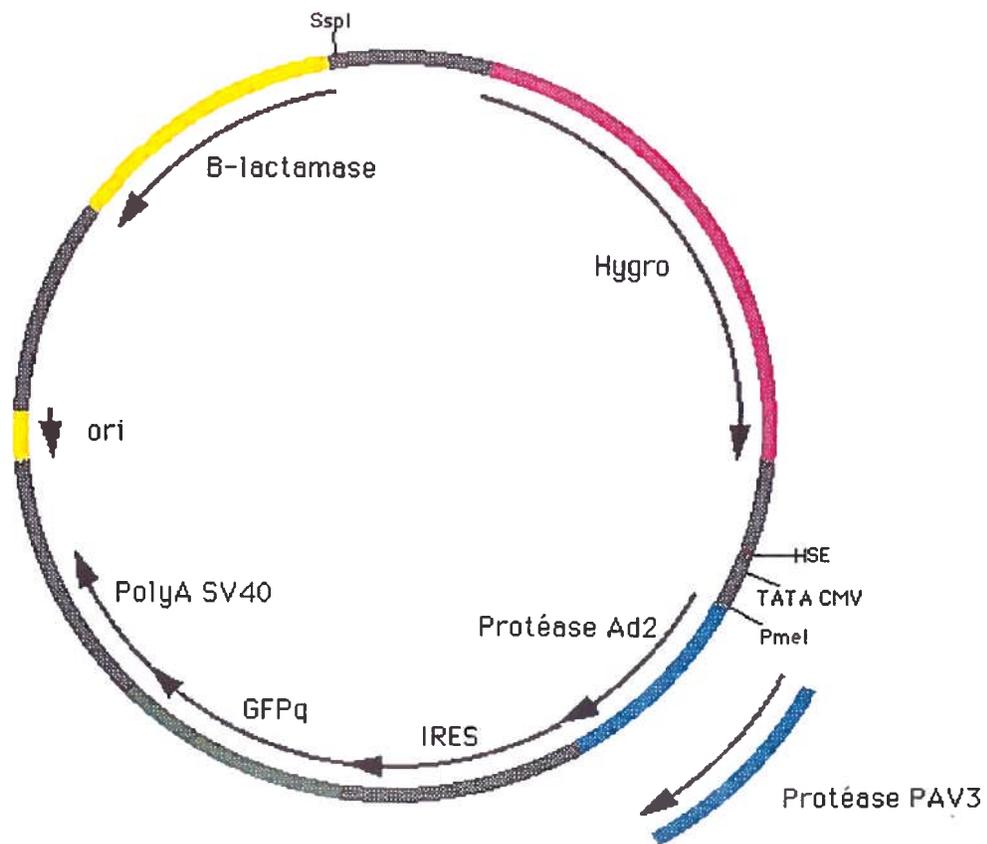


Figure 12 : Représentation schématique des plasmides pHSE*PS-DC-GFPq/tk*Hygro. La cassette d'expression dicistronique inducible par choc thermique contient le gène de la protéase des adénovirus Ad2 ou PAV3 suivi du gène de la GFPq. β -lactamase : gène bactérien de résistance à l'ampicilline. Ori : origine de réplication de *E. coli*. PolyA SV40 : Séquences de polyadénylation du virus SV40. GFPq : cadre de lecture de la GFPq. IRES : site d'entrée interne du ribosome. TATA CMV : Séquence TATA du promoteur précoce immédiat du CMV. HSE : éléments de choc thermique. Hygro : gène de résistance à l'hygromycine.

3.4- ESSAI DE TRANSCOMPLÉMENTATION DES PROTÉASES DES ADÉNOVIRUS Ad2 ET PAV3

L'objectif à long terme étant d'utiliser des vecteurs adénoviraux humains n'exprimant plus la protéase pour vacciner les porcs contre le VSRRP, des études préalables seront nécessaires pour évaluer la biosécurité de tels vecteurs. Considérant qu'il y a une possibilité que ces vecteurs soient administrés à des animaux préalablement infectés par un adénovirus porcine sauvage, l'éventualité d'une co-infection dans la même cellule par le vecteur et l'adénovirus porcine sauvage se doit d'être prise en compte. Par conséquent, la capacité de la protéase des adénovirus porcins à compenser l'absence du gène de la protéase dans ces vecteurs a été vérifiée pour évaluer les risques de dissémination des vecteurs en cas de co-infection. Ce test était un test préliminaire pour déterminer si la protéase du PAV3 pouvait compléter une absence du gène de la protéase dans les vecteurs adénoviraux humains.

Des cellules 293A ont été transfectées avec des plasmides exprimant la protéase des adénovirus Ad2 ou PAV3. Ces cellules ont ensuite été infectées le lendemain avec des AdV Δ PS pendant 5 heures et rincées au PBS trois fois avant d'être incubées à 37°C ou 43°C pendant 45 minutes. Une partie des cellules a été récoltée et le reste a été incubé pendant 48 heures et ensuite récolté. La progéniture virale a ensuite été titrée par détermination de la dose infectieuse causant un effet cytopathique dans 505 des cultures cellulaires infectées (TCID₅₀).

Les cellules transfectées avec le plasmide pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro ont permis la croissance d'un vecteur Δ PS. Il y avait 400 fois plus de virus après 48 heures d'incubation qu'au temps 0. Lorsque l'expression de la protéase n'était pas induite, il y avait aussi production de progéniture virale mais de façon moins importante. En conditions de non induction, environ 40% de la progéniture virale obtenue en conditions induites fut obtenue.

Les cellules transfectées avec le plasmide pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro ont aussi permis la production de progéniture virale. Le titre du virus Δ PS fut augmentée de 1500 fois par rapport au niveau basal après 48 heures d'incubation. En conditions de non induction, le titre viral fut augmenté d'un facteur de 200 fois. Ces résultats démontrent que la transcomplémentation de la protéase des adénovirus humains est possible avec celle du PAV3.

Il est à remarquer aussi que les cellules transfectées avec le gène de la protéase du PAV3 produisaient 3 fois plus de virus Δ PS que les mêmes cellules transfectées avec la protéase de l'adénovirus humain. Les quantités moyennes de protéase du PAV3 présentes dans les cellules étaient possiblement différentes de celles de la protéase de l'Ad2 pour des raisons de stabilité de l'ARN messager ou d'efficacité de traduction. En fait, des cellules transfectées avec le plasmide exprimant la protéase du PAV3 étaient plus fluorescentes que celles transfectées avec le plasmide exprimant la protéase de l'Ad2 (résultats non présentés). Ceci suggère que la protéase du PAV3 était possiblement exprimée plus fortement. Il est donc possible que la protéase du PAV3 était exprimée à des niveaux plus adéquats en moyenne que la protéase de l'Ad2. Ceci pourrait expliquer une plus grande progéniture virale produite sur les cellules 293A exprimant la protéase du PAV3. Les cellules 293A transfectées avec le plasmide vide pHSE-DC-GFPq/tk*Hygro n'ont pas permis la production de progéniture virale (Tableau II).

Tableau II : Titres de vecteur adénoviral Ad Δ E1 Δ PSlacZ-GFPq obtenus sur les cellules 293A transfectées avec des plasmides exprimant les protéases des virus Ad2 et PAV3 ou seulement la GFPq comme contrôle. Les cellules ont été infectées à 18 heures post-transfection et récoltées immédiatement après une période d'adsorption de 5 heures (0 h) ou incubées pendant 48 heures supplémentaires et récoltées par la suite (48 h). La progéniture virale a été titrée par TCID₅₀ en duplicata.

CONSTRUCTION	TEMPS P. I.	Titre (TCID ₅₀) U.I./ml
HSE-DC-GFPq	0 h	$< 2 \times 10^3$
	48 h N-I	$< 2 \times 10^3$
	48 h I	$< 2 \times 10^3$
HSE*PSAd5-DC-GFPq	0 h	2×10^3
	48 h N-I	3×10^5
	48 h I	8×10^5
HSE*PSPAV3-DC-GFPq	0 h	2×10^3
	48 h N-I	4×10^5
	48 h I	3×10^6

3.5- CONSTRUCTION DES LIGNÉES CELLULAIRES

Pour l'obtention des lignées cellulaires stables exprimant les protéases, les plasmides avec le promoteur inductible par choc thermique ont été utilisés (Figure 12). Ce promoteur était celui qui s'avéra avoir les niveaux d'expression les plus adéquats, c'est-à-dire pas très élevés, pour le contrôle de la protéase. Les cellules 293A ont été transfectées avec les plasmides pHSE*PSAd2-DC-GFPq/tk*Hygro et pHSE*PSPAV3-DC-GFPq/tk*Hygro linéarisés par l'enzyme *Ssp I*. Les cellules résistantes à l'hygromycine ont ensuite été sélectionnées en présence de l'antibiotique.

3.5.1- Triage en cytofluorométrie

Après que les cellules non-résistantes aient été éliminées, les cellules transfectées apparemment intactes ont été triées par cytofluorométrie pour ne conserver que les cellules les plus fluorescentes. Pour le pool de cellules 293A PSAd2, il n'y avait qu'une population de cellules légèrement fluorescentes. Seulement 0,5% de cette population a été conservée soit les cellules les plus fluorescentes. Lors du triage du pool de cellules 293A PSPAV3, il fut possible de distinguer une population de cellules positives représentant environ les deux tiers de la population totale et une autre population négative représentant le tiers des cellules. Les cellules les plus fluorescentes ont été conservées soit environ 33% de la population (voir annexe A).

3.5.2- Analyse des pools en cytofluorométrie

Les cellules triées ont ensuite été amplifiées et analysées par cytofluorométrie en comparaison avec les pools de cellules non-triées. Dans le cas des cellules 293A PSAd2, le triage n'a pas modifié le profil du pool et la fluorescence moyenne des cellules demeura sensiblement la même (Figure 13). Ceci suggère qu'au départ, la population était relativement homogène. En effet, seulement 0,5% des cellules les plus positives ont été triées et une population avec le même profil d'expression de la GFPq qu'avant le triage fut obtenue. Par ailleurs, la population négative du pool de cellules 293A PSPAV3 (environ 30% de la population) a été éliminée lors du triage sans toutefois modifier l'indice de fluorescence moyen des cellules positives (Figure 14).

Les analyses en cytofluorométrie des pools de cellules 293A PSAd2 et 293A PSPAV3 ont démontré qu'après triage, les cellules exprimaient la GFPq à des niveaux faibles. Après le triage, l'indice de fluorescence moyen était de 2,7 pour les cellules 293A PS Ad2 et de 2,4 pour les cellules 293A PSPAV3 comparativement à 0,2 pour les cellules

293A parentales. La fluorescence était difficilement visible sous un microscope à fluorescence. Les pools triés étaient homogènes. Il n'y avait que peu de cellules négatives soit environ 5% dans le cas des cellules 293A PSAd2 et 9% pour les cellules 293A PSPAV3.

Il est à noter que l'induction par choc thermique 24 heures avant l'analyse n'a pas changé les niveaux de fluorescence des cellules dans aucun des pools triés ou non-triés. Un choc thermique fait de la même façon (45 minutes à 43°C dans des tubes 15 ml) était par contre suffisant pour induire le même promoteur lors des essais en transfection transitoire. Les indices de fluorescence moyens pour les cellules 293A PSAd2 et les cellules 293A PSPAV3 après induction étaient respectivement de 2,6 et 2,5 (Figures 11 et 13). Cette expérience a été effectuée une seconde fois avec l'obtention de résultats semblables. Il semble donc que le promoteur HSE dans les lignées cellulaires stables avait perdu son inductibilité. Il est à noter que d'autres essais effectués dans le laboratoire du Dr Bernard Massie pour obtenir des lignées cellulaires 293A et HeLa exprimant des gènes sous le contrôle de ce même promoteur n'ont pas donné de clones inductibles. Des essais effectués avec les cellules PEER ont toutefois permis l'obtention de clones avec des niveaux d'induction élevés (Mosser, communication personnelle). Des tentatives pour générer des lignées cellulaires exprimant des gènes sous le contrôle du promoteur TR5 ont aussi résulté à l'occasion en des clones exprimant le gène sans que celui-ci soit inductible. Il est possible que le transgène se soit intégré dans un endroit inaccessible aux facteurs de choc thermique.

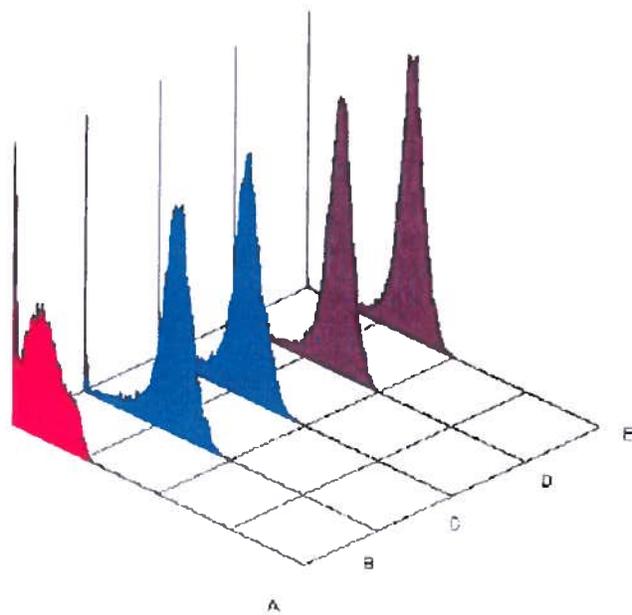


Figure 13 : Niveaux de fluorescence en cytofluorométrie des cellules 293A (A), du pool de cellules 293A PSAd2 non-triées non-induites (B), induites (C), triées non-induites (D) et triées induites (E). Le graphique présente le nombre de cellules en fonction de la fluorescence. L'induction par choc thermique a été faite à 43°C pendant 45 minutes, 24 heures avant l'analyse. L'axe des y représente le nombre de cellules et l'axe des x, la fluorescence des cellules.

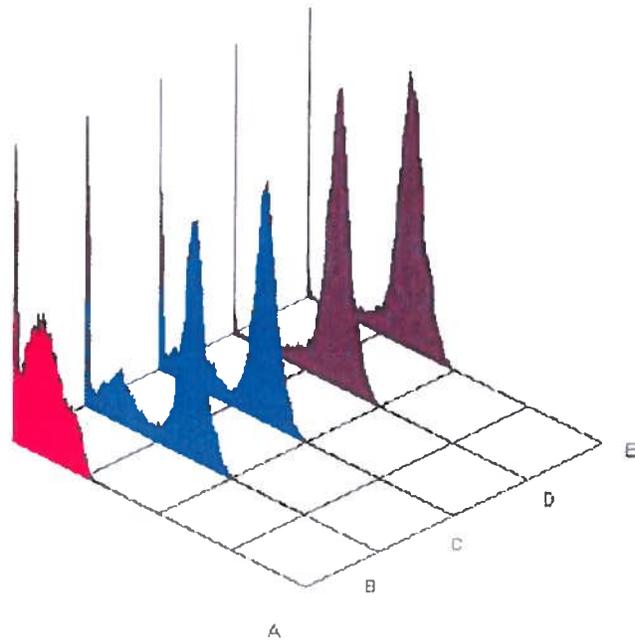


Figure 14 : Niveaux de fluorescence en cytofluorométrie des cellules 293A (A), du pool de cellules 293A PSPAV3 non-triées non-induites (B), induites (C), triées non-induites (D) et triées induites (E). Le graphique présente le nombre de cellules en fonction de la fluorescence. L'induction par choc thermique a été faite à 43°C pendant 45 minutes, 24 heures avant l'analyse. L'axe des y représente le nombre de cellules et l'axe des x, la fluorescence des cellules.

3.5.3- Essai de plages de lyse

Pour vérifier si la protéase était exprimée en quantité suffisante dans les cellules des pools, un premier test fonctionnel fut effectué. Les pools de cellules 293A PSAd5 et 293A PSPAV3 triées furent infectées avec un Ad5 Δ E1 Δ PS lacZ-EGFP (Oualikene *et al.*, 2000) et l'apparition des plages de lyse fut vérifiée. Ce test permettait aussi de vérifier la capacité de la protéase de l'adénovirus porcin PAV3 à compléter la perte du gène de la protéase dans les vecteurs adénoviraux humains Ad5.

Les cellules furent ensemencées dans des plaques de 6 puits et infectées le lendemain avec les virus Ad Δ E1 Δ PSlacZ-EGFP ou Ad Δ E1 lacZ-EGFP pendant 5 heures. Le milieu était ensuite remplacé par de l'agarose et les cultures infectées étaient incubées jusqu'à l'apparition de plages.

Le pool de cellules 293A PSAd2 a permis la formation de plages de lyse par un vecteur Δ PS. Après 13 jours, les plages obtenues avec ce vecteur Δ PS étaient légèrement plus petites que celles obtenues avec un vecteur possédant le gène de la protéase. Les plages obtenues suite à l'infection avec le vecteur Δ PS avaient environ 80% de la taille de celles obtenues avec le vecteur exprimant la protéase. Les niveaux de protéase exprimés dans les lignées cellulaires ont donc semblé suffisants pour permettre l'apparition de plages.

Le pool de cellules 293A PSPAV3 a aussi permis l'apparition de plages de lyse par les vecteurs Δ PS. Les plages obtenues sur les cellules 293A PSPAV3 étaient un peu plus grosses que celles obtenues sur les cellules 293A PSAd2. Le nombre de plages obtenues sur les cellules 293A PSAd5 et les cellules 293A PSPAV3 était sensiblement le même. Ceci constitua une preuve supplémentaire nous démontrant que la protéase du PAV3 peut compléter une absence de la protéase de l'Ad2.

Les cellules 293A n'ont pas permis l'apparition de plages par le vecteur Δ PS. Toutefois, il fut possible d'observer des cellules fluorescentes isolées.

Les plages des virus possédant le gène de la protéase étaient aussi grosses sur les cellules 293A que sur les lignées cellulaires étudiées. Ces cellules permettent donc la formation de plages de lyse aussi bien les vecteurs adénoviraux que les 293A parentales.

3.5.4- Clonage du pool cellulaire 293A PSAd2

Pour s'assurer de l'homogénéité de la lignée cellulaire, les cellules ont été clonées. Le pool trié de 293A PSAd2 a été cloné par la technique de dilution limite et environ une dizaine de clones de cellules ayant une belle apparence ont été obtenus. Ces cellules avaient aussi un rythme de croissance pouvant se comparer aux cellules 293A parentales.

3.5.5- Analyse des clones cellulaires sélectionnés

3.5.5.1- Analyse en cytofluorométrie

Afin de vérifier si les clones exprimaient bel et bien la GFP et donc, probablement la protéase, l'expression de la GFP de quatre clones a été évaluée en cytofluorométrie. Comme pour les analyses des pools, les cellules ont été induites par choc thermique et cultivées subséquemment dans des plaques de 6 puits avant d'être analysées 24 heures plus tard.

Les différents clones testés possédaient des indices de fluorescence moyens similaires au pool cellulaire parental et présentaient également une belle homogénéité (Tableau III et Figure 15). Les clones cellulaires CB6 et CE2 ont semblé toutefois un peu plus homogènes et ont été caractérisés davantage.

Tableau III : Indices de fluorescence moyens des différents clones cellulaires 293A PSA₂ sélectionnés en conditions induites et non-induites. Vingt-quatre heures avant l'analyse en cytofluorométrie, les cellules ont été induites par choc thermique pendant 45 minutes à 43°C.

cellules	Indice de fluorescence	
	non-induit	induit
293A	0,3	-
293A PSA ₂ Pool trié	2,6	2,4
293A PSA ₂ BC1	2,4	2,2
293A PSA ₂ BG11	2,7	2,3
293A PSA ₂ CB6	2,9	2,8
293A PSA ₂ CE2	2,5	2,3

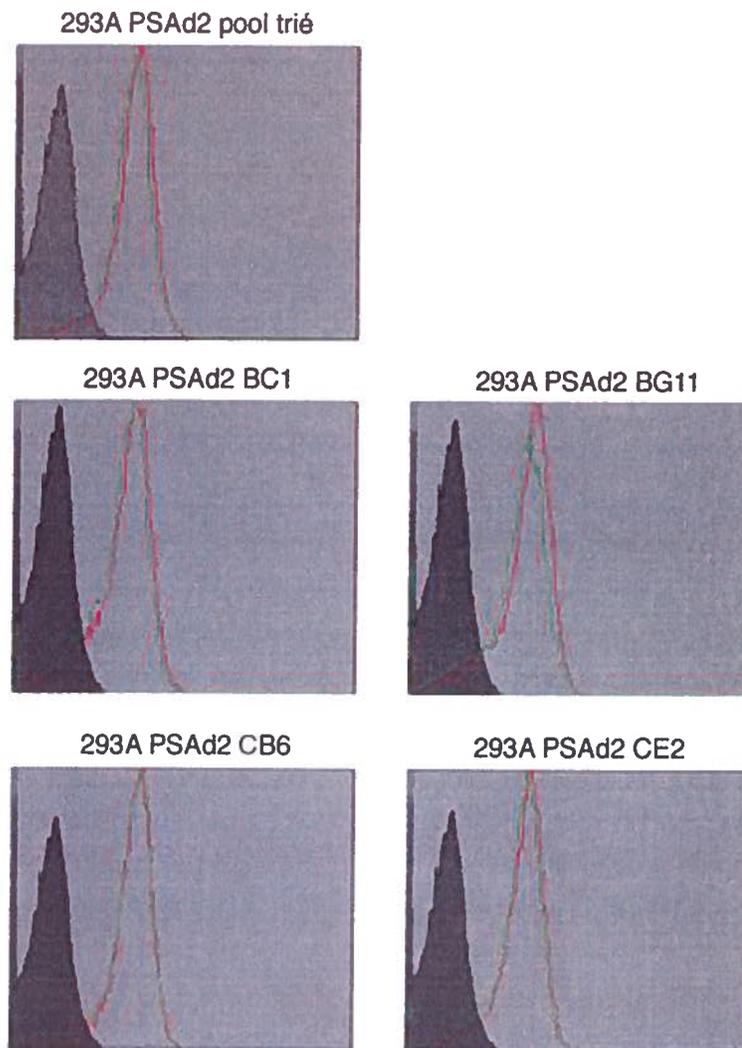


Figure 15 : Analyse en cytofluorométrie des clones cellulaires sélectionnés. Trait rouge : cellules non-induites. Trait vert : cellules induites. En gris : 293A parentales. Vingt-quatre heures avant l'analyse en cytofluorométrie, les cellules ont été induites par choc thermique à 43°C pendant 45 minutes. Le graphique représente le nombre de cellules en fonction de la fluorescence. L'axe des y représente le nombre de cellules et l'axe des x, la fluorescence des cellules.

3.5.5.2- Formation de plages de lyse

Comme le but premier de ces lignées cellulaires est de permettre la purification par plage de lyse et la titration par plages de lyse des vecteurs adénoviraux dont le gène de la protéase a été éliminé, il était important d'évaluer la capacité de ces lignées à générer des plages de lyse suite à une infection par ces vecteurs adénoviraux. Les deux clones cellulaires sélectionnés ont été testés de la même façon que le pool de cellules parentales au point 3.5.3. Les clones CB6 et CE2 infectés par le virus Ad Δ E1 Δ PS lacZ-EGFP ont permis l'apparition de plages de lyse comme dans le cas des cellules du pool parental et le diamètre des plages obtenues était aussi gros.

À 12 jours post-infection, les plages étaient généralement plus petites que celles formées par le virus Ad Δ E1 lacZ-EGFP sur les mêmes cellules. Leur diamètre moyen était d'environ 80% de celui des plages formées par le virus Ad Δ E1 lacZ-EGFP.

3.5.5.3- Évaluation de la production de progéniture virale

Les titres infectieux des particules virales produites sur les lignées cellulaires CB6 et CE2 ont été déterminés afin d'évaluer leur capacité à compléter le gène PS des vecteurs adénoviraux.

Une plaque de 24 puits a étéensemencée à raison de 200 000 cellules par puits et les cellules ont été infectées le lendemain avec l'Ad5 sauvage ou l'Ad5 Δ PS à des MOI de 10. Quarante huit heures plus tard, les cellules ont été récoltées et les titres de la progéniture virale ont été déterminés selon le nombre de plages de lyse formées à différentes dilutions des surnageants cellulaires.

Dans le cas des cellules 293A, des titres du virus sauvage de l'ordre de 5×10^8 pfu par ml ont été obtenus. Les titres du virus sauvage obtenus avec les clones cellulaires 293A PSAd2 CB6 et CE2 étaient semblables, soit de $5,8 \times 10^8$ et $6,6 \times 10^8$ pfu par ml, respectivement. Des différences significatives entre les clones de cellules CB6 et CE2 et les 293A parentales n'ont pas été démontrées, utilisant un "test-t" de Student en considérant que les variances sont différentes. Les titres du virus Ad5 Δ PS sur ces clones cellulaires étaient toutefois inférieurs d'un peu plus d'un \log_{10} à ceux obtenus avec l'Ad5. Des titres d'Ad5 Δ PS de $4,0 \times 10^7$ et $4,8 \times 10^7$ pfu/ml ont été obtenus avec les clones CB6 et CE2, respectivement. Des différences significatives n'ont pas été démontrées entre les deux clones (Figure 16). La détermination des titres viraux par la technique du dénombrement des plages de lyse a été effectuée sur le pool trié de 293A PSAd2. Après 10 jours post-

infection, les plages de lyse du virus sauvage étaient généralement trois fois plus grosses que celles induites par les virus Δ PS. Aussi, celles-ci apparaissaient plus tardivement soit environ 3 jours plus tard (résultats non-présentés).

3.5.5.4- Détection de la protéase par immunobuvardage de type Western

Cette expérience a été réalisée afin d'estimer les niveaux d'expression de la protéase dans les lignées 293A PSAd2 en comparaison à ceux obtenus lors d'une infection normale sur les cellules 293A. Les cellules 293A, 293S rTA PS ou 293A PSAd2 ont été induites par l'ajout de 1 μ g/ml de doxycycline dans le milieu de culture ou par choc thermique ou infectées avec un adénovirus sauvage (Oualikene *et al.*, 2000) et récoltées et lysées 48 heures plus tard. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été effectuée en utilisant 40 μ g de protéines des lysats des cellules infectées dans chaque puits. La protéase a été révélée par immunobuvardage utilisant un anticorps anti-PS (Weber et Tihani., 1994)

Une bande qui apparaît correspondant à environ 23 kDa fut observée dans la piste contenant l'extrait de cellules infectées (Figure 17, puits 8). Cette bande était aussi présente dans la piste correspondant aux extrait des cellules 293S rTA PS induites (puits 7). Cependant, cette bande n'était pas détectable ailleurs (Figure 17). Les 293S rTA PS non-induites ainsi que la lignée cellulaire 293A PSAd2 n'expriment pas la protéase à des niveaux détectables. Toutefois, la protéase était présente dans ces cellules car elles ont la capacité de compléter la perte du gène de la protéase dans les vecteurs.

La protéase dans les 293S rTA PS non-induites n'avait d'ailleurs pas pu être détectée par immunobuvardage avec cet anticorps anti-PS lors d'expériences antérieures (Oualikene *et al.*, 2000; Elahi *et al.*, sous presse). Les niveaux d'expression étaient probablement trop faibles pour être détectés dans les conditions utilisées.

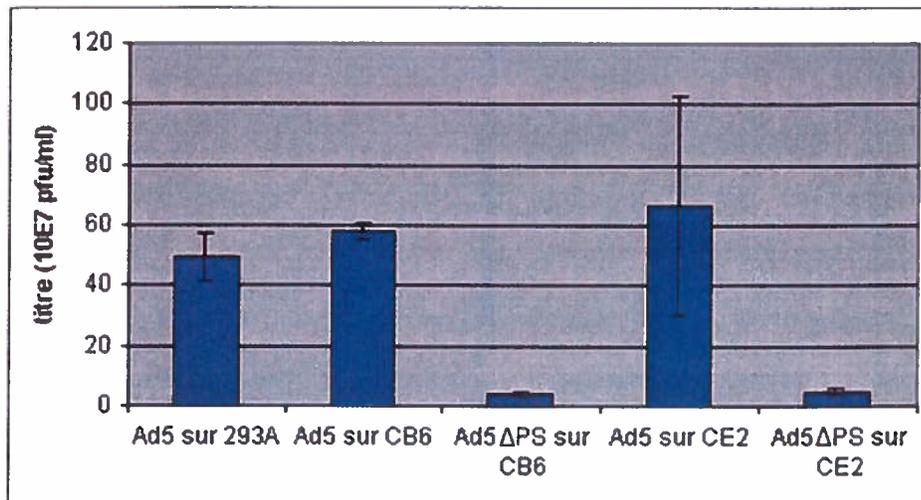


Figure 16 : Titres des virus Ad5 ou Ad5ΔPS sur les cellules 293A ou 293A PSAd2, clones CB6 et CE2. Les cellules ont été infectées et récoltées à 48 heures post-infection. La progéniture virale fut titrée par la technique du dénombrement des plages de lyse et les titres furent exprimés en unités formatrices de plages (pfu).

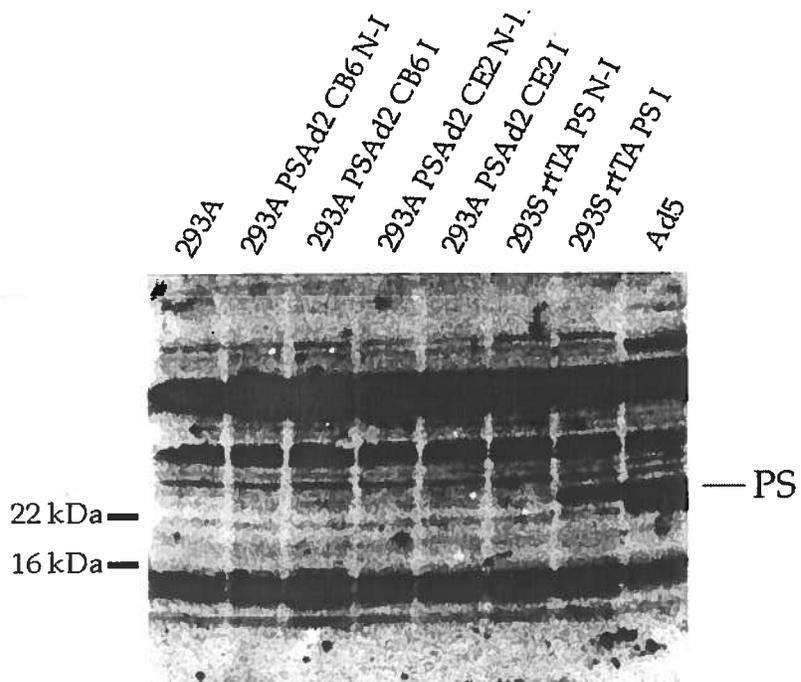


Figure 17 : Détection de la protéase dans les lignées cellulaires par immunobuvardage. Les cellules ont été induites 48 heures avant la récolte par un choc thermique à 43°C pendant 45 minutes (293A PSAd2) ou par l'ajout de doxycycline 1 µg/ml (293S rTA PS). Des cellules 293A parentales ont aussi été infectées par un adénovirus sauvage et récoltées 48 heures plus tard (Ad5). N-I : non-induit. I : induit.

3.6- CONSTRUCTION DU PLASMIDE pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq

La GP5 est considérée comme le principal candidat comme immunogène en vue du développement d'un futur vaccin génétique utilisant un vecteur adénoviral chez le porc contre le VSRRP (Pirzadeh et Dea, 1998). Les vecteurs adénoviraux actuellement disponibles expriment le gène codant pour cette protéine sous le contrôle du promoteur TR5 (Gagnon, 2001). Ce type de vecteur nécessite la co-infection de l'animal avec un vecteur adénoviral exprimant le transactivateur tTA pour activer l'expression de la GP5. Ceci augmente le nombre de particules virales injectées à l'animal, ce qui pourrait diminuer l'efficacité du vaccin s'il y a interférence entre les deux types de vecteurs et, également, aggraver les effets secondaires possibles de ce type de vaccination. De plus, ce procédé augmente les coûts reliés à la vaccination d'autant plus que le système «tet» est breveté. Il faudrait donc acheter les droits pour utiliser ce système dans les vaccins. Il était donc souhaitable de trouver un autre type de promoteur pour le contrôle du transgène dans les vecteurs. Considérant que cette protéine est toxique pour la cellule, il était important que le promoteur contrôlant ce gène soit inductible ou répressible.

Un système basé sur un promoteur (CMV5P2) régulable par le répresseur bactérien de l'opéron cumate (CymR) fut donc préconisé. Ce promoteur contient tous les éléments du promoteur constitutif fort CMV5 décrit précédemment (Massie *et al.*, 1998a) avec une séquence de liaison à l'ADN (CuO) du répresseur CymR juste en aval de la séquence TATA. Ceci donne un promoteur qui est inactif quand le répresseur se lie à l'ADN. Le promoteur est actif lorsque le répresseur est absent ou lorsque le cumate se lie au répresseur CymR (Figure 18). Le cumate empêche le répresseur de se lier à l'ADN. Donc, quand les vecteurs sont injectés à l'animal, le gène s'exprime car le répresseur CymR est absent. En outre ce système, appartenant à l'Institut de recherche en biotechnologie, contribuera à minimiser les coûts de licence d'un vaccin développé en partenariat avec l'industrie. Ce système élimine également la nécessité de co-infecter avec un autre vecteur adénoviral exprimant un transactivateur.

Pour générer ce type de vecteur adénoviral, un plasmide de transfert comportant une cassette d'expression dicistronique permettant l'expression de la GP5 et de la GFPq sous le contrôle du promoteur CMV5P2 devait être construit. Ce sous-clonage avait pour but de placer l'ORF5, qui est le cadre de lecture codant pour la GP5, dans une cassette dicistronique sous le contrôle du promoteur CMV5P2.

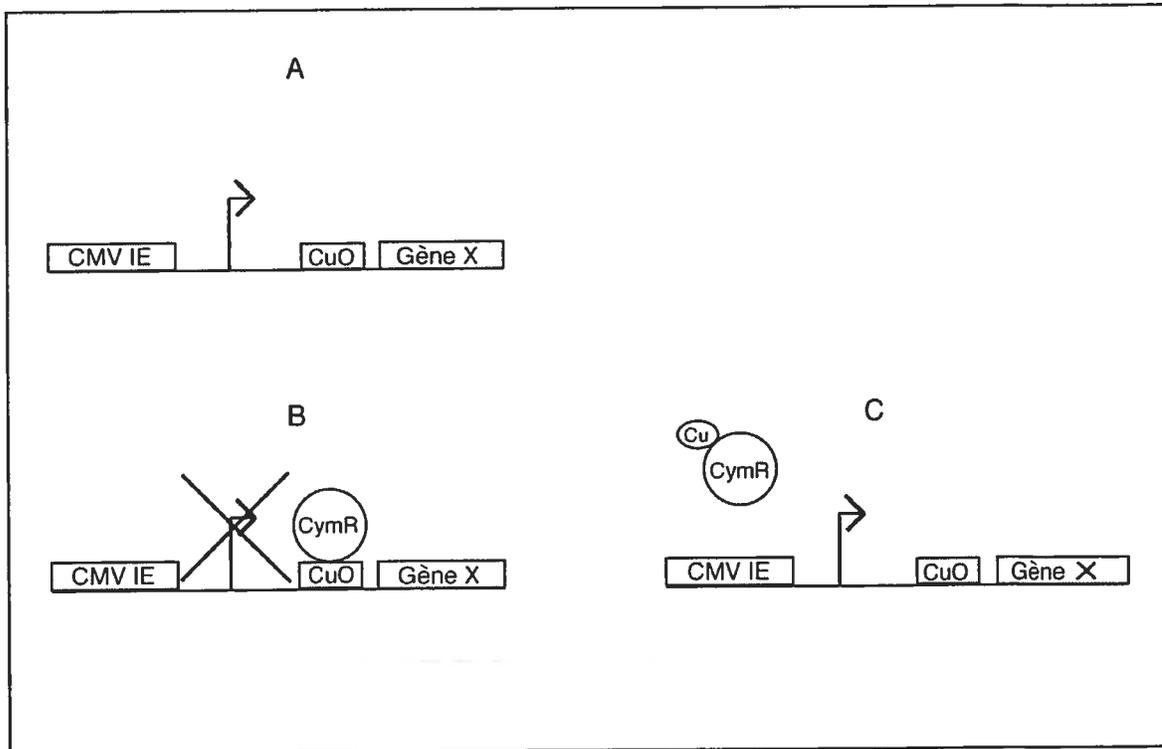


Figure 18 : Représentation schématique du système de répression cumate avec le promoteur CMV5P2. Le promoteur est constitué du promoteur précoce immédiat du CMV (CMV IE) avec une séquence de liaison à l'ADN du répresseur CymR (CuO) juste en aval de la séquence TATA. (A) Sans le répresseur, le gène est exprimé. (B) En présence du répresseur, l'expression est bloquée. (C) Le cumate permet l'expression du gène en empêchant le répresseur de se lier à l'ADN.

L'ORF5 utilisé est la version modifiée du gène du VSRRP. Ce gène a une séquence identique en acides aminés mais un peu plus de la moitié des codons ont été modifiés pour permettre une traduction plus efficace. L'ORF5 du virus sauvage est un cadre de lecture qui ne permet pas une bonne expression du gène de la GP5. La séquence en ribonucléotide du génome du virus a probablement évolué pour avoir une structure secondaire appropriée au détriment de l'efficacité des codons utilisés. Des études ont démontré que l'optimisation des codons du gène de la gp160 du VIH augmentait l'efficacité d'un vaccin génétique utilisant ce gène (André *et al.*, 1998).

L'ORF5 modifié avec une partie de l'IRES et une partie du promoteur ont été extraits par digestion du plasmide pAdTR5*ORF5-DC-GFPq avec les enzymes *Hpa* I et *Xho* I. Ce plasmide de transfert contient une cassette d'expression dicistronique comportant l'ORF5 modifié et le gène de la GFPq sous le contrôle du promoteur TR5. Le fragment de 1790 pb a été purifié. Le plasmide de transfert pAdCMV5P2-DC-GFPq comportant une cassette dicistronique avec le gène de la GFPq en deuxième position sous le contrôle du promoteur CMV5P2 a été aussi ouvert par digestion avec *Hpa* I et *Xho* I. Le fragment de 6500 pb correspondant au vecteur linéarisé a été purifié et le fragment d'ADN comprenant l'ORF5 a été ligué dans le vecteur. La présence de l'ORF5 a été vérifiée par digestion avec *Bam*H I. Le clone 18 et quelques autres ont permis d'obtenir des bandes correspondant à des fragments d'environ 700 pb et 8100 pb ce qui correspond à ce qu'on attendait des clones positifs (Figure 19).

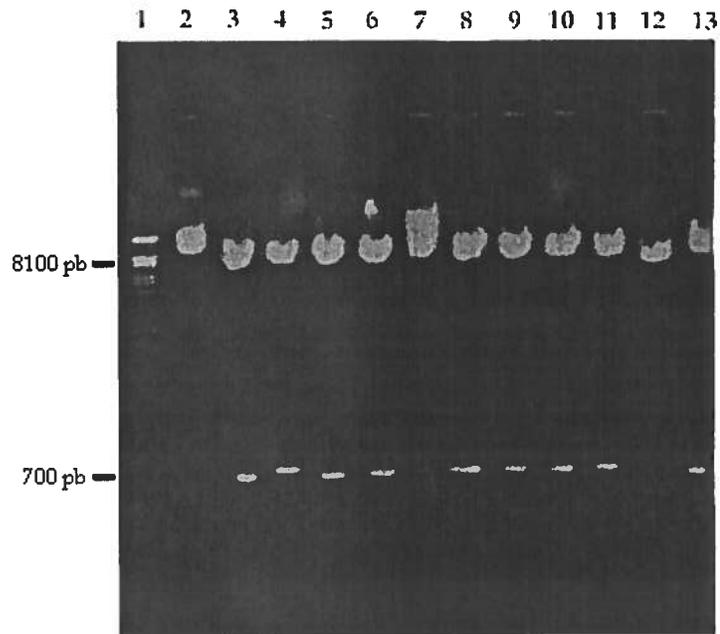


Figure 19 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,2% des ADN de minipréparations effectuées à partir des clones obtenus lors de la construction du plasmide pAdTR5*ORF5-DC-GFPq. Piste 1 : Étalons de poids moléculaire λ /BstE II, piste 2 : ADN obtenu d'une maxipréparation du clone 18 non digéré, piste 3 : ADN obtenu d'une maxipréparation du clone 18 digéré par *Bgl* II, pistes 4 à 13 : clones 1 à 10 digérés par *Bgl* II.

Une bande à environ 700 pb apparaît dans la piste du clone 18 digéré et indique que ce clone est positif.

La séquence de l'ORF5 modifié a ensuite été vérifiée par séquençage. Il a été possible de mettre en évidence 12 erreurs dans le cadre de lecture de l'ORF5 modifié par rapport à ce qui était planifié (voir annexe B). Neuf des erreurs ne modifient pas l'acide aminé mais 3 d'entre elles entraînent des substitutions d'acides aminés dans la protéine. Voici les mutations:

Cys48→Tyr
Ala63→Ser
Trp155→Leu

Ces substitutions ont aussi été retrouvées dans le plasmide pAdTR5*ORF5-DC-GFPq ayant servi pour le clonage. Il est à noter que les substitutions ne semblent pas modifier le caractère toxique et le pouvoir immunogénique de la protéine selon les travaux effectués dans le laboratoire du Dr Serge Dea avec cette version modifiée de l'ORF5 (Gagnon, 2001; Cléroux *et al.*, résultats non-publiés). Cette version mutée de la protéine sera donc utilisée pour évaluer les impacts de la toxicité de cette protéine.

On a donc un plasmide de transfert avec une cassette dicistronique contenant l'ORF5 modifié et le cadre de lecture de la GFPq sous le contrôle d'un promoteur répressible par le répresseur cumate (CMV5P2). Ce plasmide sera utilisé pour comparaison avec le plasmide de transfert pAdTR5*ORF5-DC-GFPq qui contient la même cassette sous le contrôle du promoteur inductible par la tétracycline ou ses dérivés (TR5) (Figure 20).

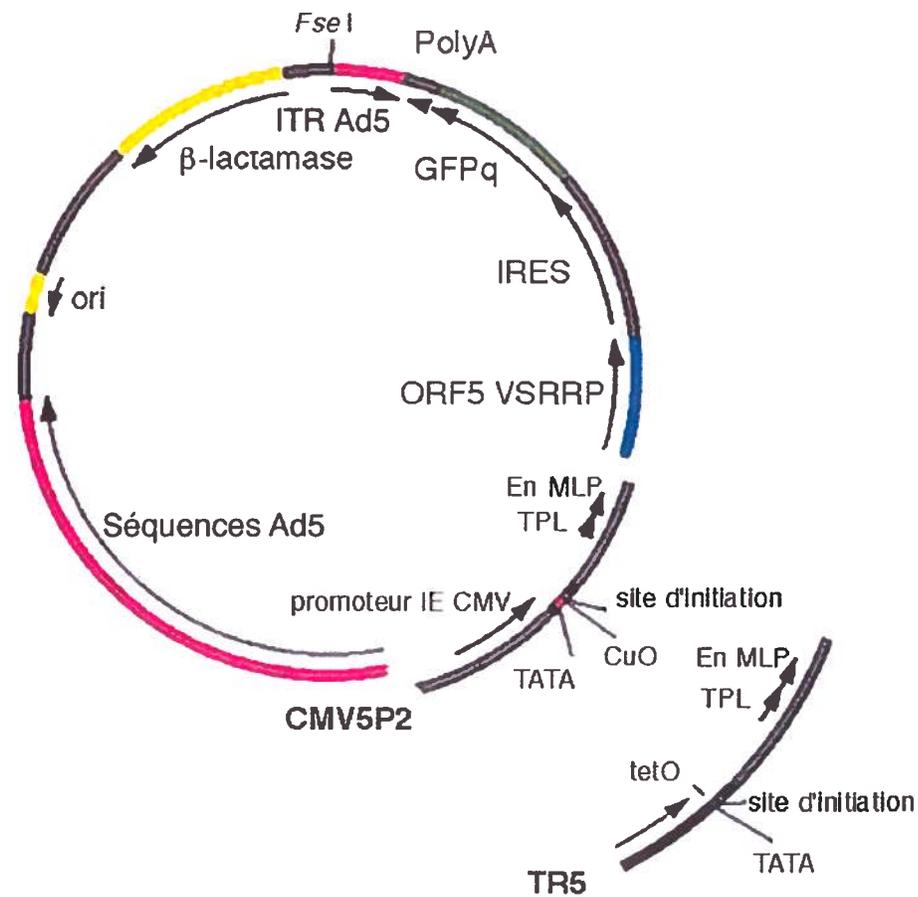


Figure 20 : Représentation schématique des plasmides de transfert contenant la cassette dicistronique ORF5-GFPq sous le contrôle des promoteurs CMV5P2 ou TR5. β -lactamase : gène bactérien de résistance à l'ampicilline. Ori : origine de répliation de *E. coli*. PolyA : Séquences de polyadénylation du gène de la globine. GFPq : cadre de lecture de la GFPq. IRES : site d'entrée interne du ribosome. ORF5 VSRRP : cadre de lecture de la GP5. TATA : Séquence TATA du promoteur précoce immédiat du CMV. CuO : séquences de liaison à l'ADN du répresseur cumate. TPL : Séquences de tête tripartites de l'adénovirus. En MLP : séquence activatrice du promoteur majeur tardif des adénovirus. TetO : séquences de liaison à l'ADN du transactivateur rTA ou tTA. ITR Ad5 : répétition terminale inversée de l'adénovirus 5. Séquences Ad5 : partie du génome de l'adénovirus correspondant à la région de 9.4 à 15.5 unités de carte (map units).

3.7- IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN POUR VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA GP5

Afin de vérifier les niveaux d'expression de la GP5 sous le contrôle du nouveau promoteur, nous avons comparé en transfection transitoire les niveaux d'expression de la GP5 quand le promoteur CMV5P2 est réprimé ou non-réprimé en comparant avec les niveaux d'expression du promoteur TR5 qui a été utilisé dans les vecteurs actuellement disponibles.

Des cellules 293A ont été transfectées avec des plasmides contenant des cassettes d'expression dicistroniques exprimant la GP5 et la GFPq ou seulement la GFPq. Ces cassettes étaient sous le contrôle du promoteur inductible par la tétracycline (TR5) ou le promoteur répressible par le répresseur CymR (CMV5P2). Pour la répression du promoteur CMV5P2, les transfections étaient faites dans des cellules 293A exprimant le répresseur cymR. Le plasmide pUHD172.1 exprimant le promoteur rtTA a été transfecté avec le plasmide TR5 dans les cas où celui-ci devait être induit. L'induction du promoteur TR5 s'est faite au moment de la transfection par l'ajout de 1 µg de doxycycline par ml de milieu. Après 48 heures post-transfection, les cellules ont été récoltées et lysées. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été effectuée avec les extraits cellulaires et la GP5 a été révélée par immunobuvardage. Ces expériences ont permis de comparer les niveaux d'expression médiés par ces deux promoteurs et de vérifier s'il y avait bien expression de la GP5.

Une bande correspondant à une protéine dont le poids moléculaire se situe entre 20 et 25 kDa et une plus faible en intensité d'environ 16 kDa furent observés dans la piste contenant les extraits de cellules transfectées avec le plasmide pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq en conditions non-réprimées (Figure 21, puits 9) et aussi dans la piste contenant l'extrait de cellules transfectées avec le plasmide pTR5*ORF5-DC-GFPq en conditions induites (puits 5). Ces deux bandes étaient environ 5 fois plus intenses quand l'ORF5 était contrôlé par le promoteur CMV5P2 plutôt que par le promoteur TR5. Ces bandes étaient absentes dans les autres pistes et n'étaient pas visibles lorsque l'expression de la GP5 n'était pas induite ou réprimée. D'autres bandes étaient aussi visibles dans toutes les pistes incluant le contrôle de cellules non-transfectées (Figure 21).

La bande protéique d'environ 25 kDa correspond donc sûrement à la GP5. Celle-ci était exprimée plus fortement en transfection transitoire sous le contrôle du promoteur CMV5P2 non-réprimé par rapport au promoteur TR5 en conditions d'induction. Il fut

impossible de comparer les niveaux d'expression en conditions non-induites ou réprimées car la GP5 n'était pas détectable dans ces conditions.

3.8- TITRES DES ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS EXPRIMANT LA GP5

Pour la production à grande échelle d'un éventuel vecteur adénoviral exprimant la GP5 à coûts raisonnables, il est important de pouvoir obtenir des titres viraux assez élevés. Il a été démontré préalablement que la GP5 est toxique pour les cellules (Suarez *et al.*, 1996; Gagnon, 2001). Il était donc important de vérifier à quel point cette toxicité pouvait interférer avec les titres des vecteurs adénoviraux exprimant cette protéine et de quantifier une baisse potentielle des titres infectieux.

Des cellules 293S ou 293S rtTA ont été infectées avec des virus exprimant la GP5 et la GFPq en conformation dicistronique sous le contrôle du promoteur TR5 ou la GFPq seulement comme contrôle, soit les virus AdTR5*ORF5-DC-GFPq et AdTR5*GFPq, respectivement. La progéniture virale obtenue a été titrée pour vérifier si l'expression de la GP5 avait un impact sur les titres des vecteurs exprimant ce gène. Les cellules 293S rtTA expriment le transactivateur rtTA ce qui permet d'induire le promoteur TR5 en ajoutant de la doxycycline dans le milieu de culture à raison de 1 µg/ml. Ces dernières sont donc infectées et récoltées après 48 heures quand la quasi totalité des cellules étaient fluorescentes vertes et présentaient un effet cytopathique (cellules rondes et décollées). La progéniture virale fut ensuite titrée par cytofluorométrie. Des cellules 293A à raison de 1 million de cellules par pétri ont été infectées avec 1 ml des dilutions des lysats de cellules et le pourcentage de cellules exprimant la GFPq a été déterminé par cytofluorométrie. Seuls les échantillons ayant un pourcentage inférieur à 50% ont été considérés pour les calculs. Les titres sont déterminés en comparaison avec une courbe standard de la multiplicité d'infection en fonction du pourcentage de cellules fluorescentes.

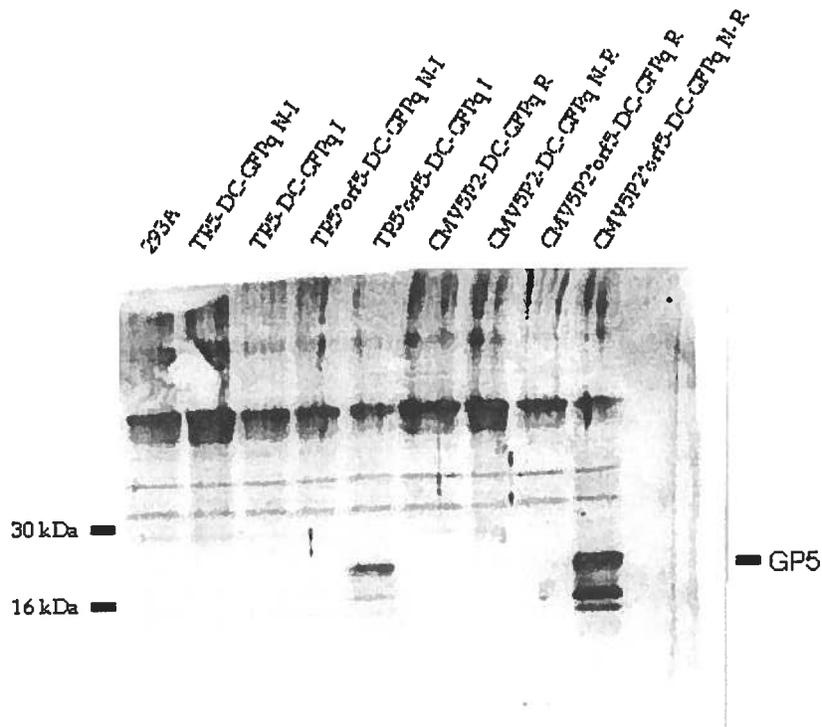


Figure 21 : Détection de la GP5 en transfections transitoire par immunobuvardage de type Western. Les cellules 293A ont été transfectées avec les plasmides comportant l'ORF5 et le gène de la GFPq en conformation dicistronique sous le contrôle du promoteur inductible par tétracycline (TR5*ORF5-DC-GFPq) ou du promoteur répressible par le répresseur cumate (CMV5P2*ORF5-DC-GFPq). Des plasmides comportant ces mêmes cassettes d'expression sans l'ORF5 ont été utilisés comme contrôle (TR5-DC-GFPq et CMV5P2-DC-GFPq). Le promoteur TR5 a été induit en co-transfectant avec le transactivateur rtTA et par l'ajout de doxycycline 1 µg/ml. Le promoteur CMV5P2 a été réprimé en transfectant le plasmide dans une lignée cellulaire 293A exprimant le répresseur CymR. 293A : cellules non-transfectées. I : induit. N-I : non-induit. R : réprimé. N-R : non-réprimé.

Le virus AdTR5*GFPq a donné des titres de $2,2 \times 10^9$ unités transductrices de gènes par ml avec les cellules 293A (promoteur TR5 non-induit) et de $2,6 \times 10^9$ unités transductrices de gènes (gtu) par ml avec les cellules 293S rtTA (promoteur TR5 induit). La différence entre les deux lignées cellulaires n'était pas importante. Le virus AdTR5*ORF5-DC-GFPq nous a donné des titres environ deux fois plus faibles dans les mêmes conditions quand l'ORF5 n'était pas induit soit environ $1,1 \times 10^9$ unités transductrices de gènes par ml. Le titre de ce virus a diminué de deux fois à environ $0,5 \times 10^9$ unités transductrices de gènes par ml suite à l'induction du promoteur TR5 (Figure 22). Cette différence est significative avec une valeur de $p < 0,001$.

Donc, une diminution du titre viral d'un facteur de 2 a été obtenue suite à l'induction de la GP5. Cette différence n'était pas importante si on considère que l'expression de protéines toxiques peut faire diminuer les titres de façon plus importante. Par exemple, les titres de vecteurs exprimant une version tronquée et toxique de la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase ($\Delta R1$) de l'herpès virus type 1 sous le contrôle du promoteur TR5 diminuent de 20 fois quand le promoteur est induit (Massie *et al.* 1998a). Les titres de vecteurs adénoviraux exprimant la glycoprotéine du virus de la rage diminuent également de 20 fois quand le gène est exprimé (Matthews *et al.*, 1999)

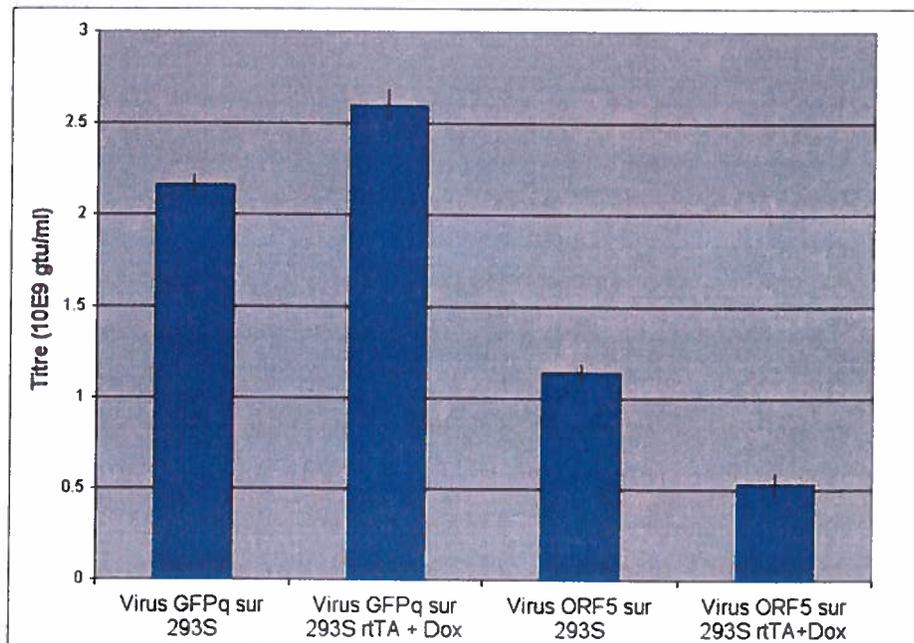


Figure 22 : Titres de virus AdTR5*GFPq exprimant la GFPq sous le contrôle du promoteur TR5 (GFPq) ou AdTR5*ORF5-DC-GFPq exprimant la GP5 et la GFPq sous le contrôle du promoteur TR5 (ORF5) obtenus sur les cellules 293S ou les 293S rTA induites par 1 µg/ml doxycycline. Les cellules ont été récoltées à 48 heures post-infection et la progéniture virale a ensuite été titrée par cytofluorométrie suivant une relation linéaire entre la MOI et le pourcentage de cellules positives pour la GFPq. Les titres sont exprimés en unités transductrices de gène.

3.9- RENDEMENT DE LA GÉNÉRATION DE VIRUS RECOMBINANTS EXPRIMANT LA GP5

Les essais afin d'obtenir des vecteurs recombinants exprimant la GP5 de façon constitutive n'ayant pas fonctionné, l'impact de la toxicité de la GP5 sur la facilité avec laquelle il est possible de générer des virus recombinants exprimant ce gène a également été quantifié.

Pour ce faire, des cellules 293A ou des cellules exprimant le répresseur de l'opéron cumate (293A CymR) ont été co-transfectées avec de l'ADN viral coupé par l'enzyme *Cla* I et des vecteurs de transfert comportant une cassette d'expression dicistronique comprenant l'ORF5 et la gène de la GFPq sous le contrôle du promoteur TR5 (pAdTR5*ORF5-DC-GFPq) ou CMV5P2 (pAdCMV5P2*ORF5-DC-GFPq) linéarisés par l'enzyme *Fse* I. Ceci nous a permis en même temps de comparer les deux promoteurs TR5 et CMV5P2 pour le contrôle d'un transgène toxique dans un AdV. Des plasmides de transfert avec ces mêmes cassettes d'expression sans l'ORF5 (pAdTR5-DC-GFPq et pAdCMV5P2-DC-GFPq) ont été utilisés comme contrôles.

Une grande variabilité dans les résultats fut observée. Le nombre de plages obtenues avec un même vecteur de transfert pouvait varier de plus de 3 fois. L'efficacité de la transfection ou autres facteurs pouvait faire varier le rendement de génération de virus recombinants de façon importante même si le même ADN viral et le même plasmide de transfert étaient utilisés.

L'obtention de plages de virus exprimant la GFPq fut possible dans tous les cas. Il est à noter que les essais avec les plasmides comportant l'ORF5 induit ont donné que peu de plages. Environ une douzaine de plages par essai furent obtenues alors que les vecteurs de transfert sans l'ORF5 ont donné entre 40 et 100 plages par essai. Il est possible également de remarquer que les essais effectués avec le promoteur CMV5P2 réprimé sur les cellules 293A CymR ont donné aussi peu de plages indépendamment de la présence de l'ORF5 dans les vecteurs de transfert. Environ une douzaine de plages en moyenne ont été obtenues (Figure 23). Il est possible que le clone de cellules 293A CymR utilisé avait une efficacité de transfection plus faible que les cellules 293A parentales.

Il semble donc que l'ORF5 ait interféré même si on a obtenu des plages de vecteur GFP+ en présence de la GP5. Celles-ci étaient moins nombreuses. Une diminution d'environ 5 fois du rendement fut obtenue lorsque l'ORF5 était exprimé.

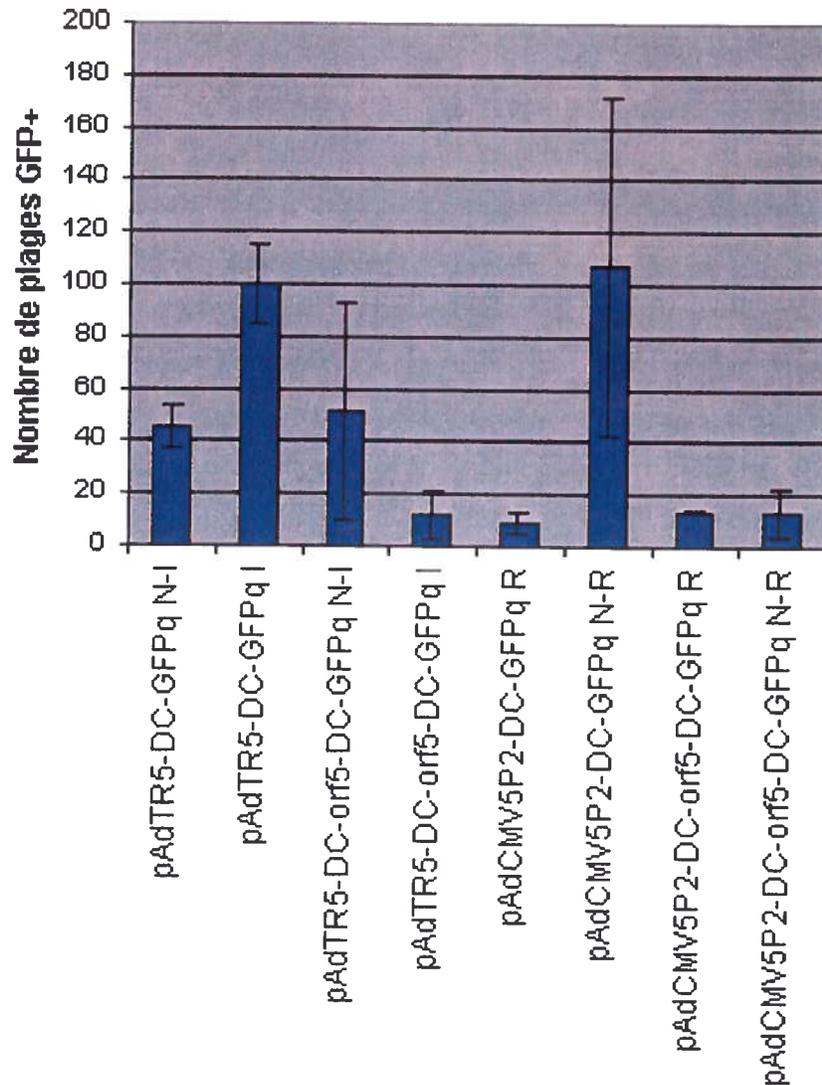


Figure 23 : Nombre de plages de vecteurs GFPq+ (moyenne de deux essais) en fonction du vecteur de transfert utilisé. Différents plasmides de transfert comportant l'ORF5 sous le contrôle des promoteurs TR5 et CMV5P2 ont été comparés afin d'évaluer l'impact de la GP5 sur les rendements de génération d'AdV. L'induction du promoteur TR5 a été faite en co-transfectant avec le transactivateur rtTA ainsi que par l'ajout de doxycycline 1 µg/ml dans le milieu de culture. Le promoteur CMV5P2 est réprimé par le répresseur CymR présent dans les cellules 293A CymR. I : induit. N-I : non-induit. R : réprimé. N-R : non-réprimé.

4- DISCUSSION

4.1- CHOIX DU PROMOTEUR POUR LES LIGNÉES CELLULAIRES

L'objectif principal de ce projet était d'évaluer des vecteurs adénoviraux répliquatifs non-disséminatifs pour leur utilisation éventuelle en prophylaxie chez les porcs. Dans un premier temps, une lignée cellulaire de complémentation adhérente a été générée pour faciliter la génération, la purification et la titration de ces vecteurs. Or, la protéase semble avoir des effets cytostatiques lorsqu'elle est exprimée en grande quantité (Oualikene *et al.*, 2000). Il était donc préférable d'utiliser un promoteur inductible ayant des niveaux d'expression relativement faibles pour contrôler son expression dans les lignées cellulaires. Le premier objectif de ce projet consistait à trouver un promoteur inductible permettant d'obtenir des niveaux d'expression adéquats pour le contrôle de la protéase dans les futures lignées cellulaires. Il a été établi que le promoteur HSE était, parmi les promoteurs testés, celui qui s'est avéré le plus adéquat dans les conditions utilisées.

Les essais avec le plasmide pAdCRE5**lacZ* ont permis de constater que le promoteur inductible par AMPc ne peut être induit dans les cellules 293A par l'ajout de forskoline. Les cellules 293EBNA sont des cellules dérivées des cellules 293A qui expriment la protéine EBNA-1 du virus Epstein-Barr. De plus, ces cellules se cultivent en suspension. Il est possible que l'adaptation de ces cellules à la culture en suspension ait modifié le profil d'expression et le degré d'activation des différentes isoformes des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Les voies de signalisation cellulaire utilisant l'AMPc comme second messenger sont reliées à celles menant à l'activation de la protéine ERK qui est une kinase de la famille des MAPK (Houslay et Kolch, 2000). Les interactions entre ces deux types de protéines sont spécifiques du type de cellule et sont retrouvées à plusieurs niveaux dans les cascades de signalisation. Ceci ajoute à la complexité de la signalisation par l'AMPc. L'augmentation du niveau d'AMPc résulte en l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui peut à son tour phosphoryler les membres de la famille des protéines se liant aux éléments de réponse à l'AMPc (CREB). Cette famille comporte trois membres: CREB, CREM et ATF-1. La phosphorylation du facteur de transcription CREB ainsi que le recrutement de certains autres facteurs mènent à l'activation des gènes régulés par les CRE. Il semble que CREB soit aussi une cible pour la phosphorylation par la protéine ERK (Gavin et Nebreda, 1999). Des modifications à plusieurs niveaux dans ces cascades peuvent mener à des changements dans l'activation de CREB et dans l'inductibilité des promoteurs comportant des CRE. Le promoteur MMTV ne semble pas être inductible non plus dans la lignée cellulaire 293A.

Le promoteur chimérique inductible par choc thermique (HSE) fut donc celui choisi pour la suite des travaux. Ce promoteur, reconnu pour être fonctionnel dans les cellules 293A, a permis d'obtenir des niveaux d'expression suffisamment bas pour le contrôle de la protéase. Considérant que le promoteur HSE donne des niveaux d'expression satisfaisants, nous ne nous sommes pas attardés à vérifier pourquoi les deux autres promoteurs n'ont pas montré d'induction dans les 293A.

Le promoteur HSE a donc permis de minimiser les effets cytostatiques de la protéase. D'ailleurs, il a été démontré que seulement de faibles quantités de protéase étaient nécessaires pour la complémentation. Les niveaux non-induits du promoteur TR5 étaient suffisants pour la complémentation (Oualikene *et al.*, 2000). Le promoteur HSE a donc été utilisé dans les lignées cellulaires 293A pour contrôler le gène de la protéase.

4.2- LIGNÉES CELLULAIRES 293A PS

Une lignée cellulaire adhérente capable de compléter une perte du gène de la protéase dans les vecteurs adénoviraux était souhaitable. Tel qu'espéré, les lignées cellulaires ont été établies avec succès. Il a été démontré que les cellules 293A PSAd2 complètent en *trans* l'absence du gène de la protéase des vecteurs viraux dérivés des Ad5. Des plages de lyse des vecteurs Δ PS ont pu être obtenues.

L'analyse en cytofluorométrie des clones ont permis de démontrer que les clones testés étaient homogènes. Il est donc probable qu'ils proviennent véritablement d'une seule cellule pour la plupart même si le pool était lui aussi homogène.

Le promoteur HSE a semblé avoir perdu son inductibilité dans les lignées cellulaires étudiées. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est que l'ADN transfecté ne se soit pas intégré dans le génome cellulaire dans un compartiment du noyau qui est accessible pour les facteurs de choc thermique. Le facteur HSF-1 semble se localiser dans des endroits précis du noyau suite à son induction. Ainsi, les trimères transcriptionnellement actifs de cette protéine sont possiblement confinés dans un compartiment nucléaire (Cotto *et al.*, 1997). Par conséquent, si le transgène s'intègre dans un autre compartiment, celui-ci ne sera pas inductible. Le rôle des granules observés lors de l'induction des HSF-1 reste toutefois à déterminer. Il est également possible que le promoteur soit devenu inaccessible pour certains autres facteurs basaux nécessaires pour l'induction. Il est aussi possible que la structure de l'ADN ait été modifiée suite à l'intégration ce qui rendrait le promoteur inaccessible pour certains facteurs. Les interactions de l'ADN génomique avec les histones peuvent donner lieu à des changements dans l'activité du promoteur d'un gène qui peut être

plus ou moins actif selon s'il se trouve dans une partie transcriptionnellement active ou non (Jenuwein et Allis, 2001).

Les niveaux d'expression de la protéase dans les clones CB6 et CE2 n'étaient pas perceptibles par immunobuvardage de type Western. Il en fut de même pour les cellules 293S rTA PS non induites. La capacité de ces cellules à compléter l'absence du gène de la protéase est pourtant une indication que la protéine est présente malgré l'incapacité de la détecter par immunobuvardage avec l'anticorps actuellement disponible. La quantité de protéase dans les lignées cellulaires construites était cependant inférieure à celle retrouvée dans des cellules 293A infectées avec le virus sauvage. D'après une estimation utilisant la GFP co-exprimée dans la lignée 293S rTA PS, en condition non-induites le niveau de protéase serait au moins trente cinq fois plus bas que dans une infection avec le virus sauvage (Oualikene *et al*, 2000). Dans les conditions utilisées, le promoteur HSE a démontré un niveau d'expression basal faible et n'était pas inductible dans les lignées 293A PS. Ceci peut expliquer les niveaux faibles mais suffisants d'expression de protéase obtenus. L'utilisation d'une cassette dicistronique a permis de sélectionner facilement les clones. Ce système a aussi permis d'évaluer l'expression du transgène quantitativement, de même que l'homogénéité des clones. Ce système est d'autant plus utile quand des niveaux d'expression de transgène ne sont pas détectables par Western.

Les résultats obtenus ont démontré que l'efficacité de complémentation des lignées cellulaires développées n'est pas de 100%. Il est à noter que les plages étaient un peu plus petites et nécessitaient un peu plus de temps pour apparaître. Aussi, les titres de virus après 48 heures d'infection diminuaient d'environ 10 fois sur ces cellules lorsque la protéase était absente des virus. Avec les cellules 293S rTA PS, les titres des vecteurs Δ PS après 72 heures étaient semblables à ceux obtenus avec des virus ayant le gène de la protéase (Oualikene *et al.*, 2000). Il est possible que les virus Δ PS prennent un peu plus de temps que les virus exprimant la protéase à se disséminer sur les lignées 293A PS. Il serait intéressant de vérifier les titres viraux produits après 72 heures sur les lignées cellulaires développées dans ce travail de maîtrise. Étant donné que les niveaux d'expression de la protéase sont plus faibles dans la lignée cellulaire développée que lors d'une infection par le virus sauvage, ceci pourrait expliquer un retard de croissance. Un autre facteur qui pourrait avoir un impact est la cinétique d'expression de la protéase. La cinétique d'expression de la protéase dans notre lignée cellulaire n'est probablement pas la même que lors d'une infection. La protéase est un gène tardif et ne s'exprime donc pas au début de l'infection normale alors que dans nos lignées, la protéase s'exprime de façon constante. Ceci pourrait avoir des effets sur l'efficacité de l'infection. Cependant, les titres de vecteurs Δ PS

légèrement supérieurs obtenus sur les cellules exprimant la protéase du PAV3 en transfection transitoire (Tableau II) ainsi que les plages légèrement plus grosses obtenues sur les cellules 293A PSPAV3 qui sont légèrement plus fluorescentes suggèrent que la protéase du PAV3 qui semble s'exprimer à des niveaux légèrement plus élevés est plus efficace. Ceci est un élément supplémentaire nous portant à croire que les niveaux de complémentation sub-optimaux obtenus avec la protéase de l'Ad2 sont dûs à une expression trop faible dans les lignées cellulaires. Des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer le niveau minimal d'expression de la PS permettant la croissance normale de mutants Ad Δ PS.

Le but premier de cette lignée cellulaire était de permettre de purifier facilement par plages de lyse des vecteurs adénoviraux Δ PS. Ces cellules répondent à cet objectif. Malgré que les plages produites soient un peu plus petites, la purification des vecteurs Δ PS ainsi que la génération de virus recombinants par co-transfection pourront être réalisés plus aisément. Il sera aussi possible de titrer des virus Δ PS par plages de lyse sur cette lignée cellulaire sans problème. Il serait souhaitable ultérieurement de vérifier les titres des vecteurs Δ PS obtenus en titrant sur nos lignées cellulaires par la technique de dénombrement de plages de lyse et de les comparer avec les titres obtenus par titration par cytofluorométrie. Ceci nous permettrait de vérifier la capacité de ces lignées cellulaires à donner des titres viraux exacts. La titration par cytofluorométrie est une méthode précise, mais elle ne permet pas de déterminer le titre de vecteurs n'exprimant pas de protéines fluorescentes.

La production de vecteurs Δ PS à des titres appréciables peut être obtenue sur les lignées cellulaires 293S rtTA PSAd2 (Oualikene *et al.*, 2000). Les stocks viraux destinés à l'injection chez les animaux ou chez les humains qui doivent être produits selon des normes plus strictes pourront éventuellement être produits sur des cellules 293SF (Coté *et al.*, 1998) qui sont adaptées à la culture sans sérum qui seront transfectées de façon stable avec le gène de la protéase. Le plasmide comprenant le gène de la protéase sous le contrôle du promoteur HSE facilitera le développement d'une telle lignée car il n'est pas nécessaire de fournir en *trans* un transactivateur exogène par transfection.

4.3- TRANSCOMPLÉMENTATION DES PROTÉASES DES Ad2 ET PAV3

Les protéases des adénovirus sont classées parmi les cystéine protéases. Le site catalytique de ces enzymes est caractérisé par la présence d'une triade d'acides aminés essentiels. Dans le cas de la protéase de l'Ad2, cette triade est composée des acides aminés

His54, Gln71 et Cys122 (Ding *et al.*, 1996; Rancourt *et al.*, 1996). La cystéine en position 104 se lie par des ponts disulfure avec le peptide activateur pVIc (Ding *et al.*, 1996). Ces mêmes acides aminés dans la séquence de la protéase du PAV3 sont situés à peu près aux mêmes positions. Seule la Gln71 est décalée de 7 acides aminés. Les autres, y compris la cystéine servant à la liaison du peptide activateur, sont décalés d'un acide aminé. Ces acides aminés pourraient être la triade catalytique de l'enzyme.

La séquence consensus de la protéase des adénovirus porcins n'a pas été établie. Il est toutefois possible de constater que la séquence consensus de la protéase de l'Ad2 ne se retrouve pas dans certaines protéines du PAV3 dont les homologues chez les Ad2 sont clivés. Les protéines pIIIa, PIX et la DBP du PAV3 ne possèdent pas la séquence consensus de la protéase de l'Ad2. Étant donné que les sites de clivage ne sont pas nécessairement conservés entre les Ad2 et PAV3, il est possible qu'il existe des différences dans les séquences consensus reconnues par leurs protéases respectives. Il est également possible que ces protéines n'aient pas besoin d'être clivées chez les adénovirus porcins. Il n'était donc pas possible de présumer qu'il y aurait transcomplémentation entre les deux protéines, d'où la nécessité de le tester formellement.

La comparaison entre les séquences de la protéase des deux virus à l'aide du logiciel Blast 2 sequences utilisant la matrice blosum62 (Tatusova et Madden, 1999) a permis de démontrer l'existence de 60% d'identité et de 72% d'homologie entre ces deux protéines.

Les résultats obtenus ont aussi permis de démontrer que la protéase de l'adénovirus porcine PAV3 semble pouvoir transcomplémenter les vecteurs Ad5 Δ PS. Il a été possible de mettre en évidence la production d'une progéniture de vecteurs Δ PS sur les cellules transfectées transitoirement avec le plasmide contenant le gène de la protéase du PAV3, mais pas sur les cellules transfectées avec le même plasmide ne possédant pas le gène de la protéase. Ces résultats démontrent clairement que la protéase du PAV3 est responsable de cet effet. Comme ces résultats ont été obtenus à partir d'expériences ayant été effectuées sur des transfections transitoires, il est difficile d'en tirer des conclusions quantitatives. Il existe une grande variabilité associée aux transfections transitoires entre deux échantillons et aussi entre les différentes cellules qui peuvent avoir été transfectées avec des quantités très différentes du transgène. Aussi, la qualité de l'ADN transfecté peut grandement influencer l'efficacité de transfection. Il a donc été impossible de déterminer quelle quantité de protéase du PAV3 est nécessaire pour compléter optimalement des vecteurs Δ PS. Les titres de vecteurs AdV Δ PS se sont avérés plus élevés sur les cellules transfectées avec le plasmide exprimant la protéase du PAV3 par rapport à la protéase de l'Ad2 (Tableau II).

Ceci est probablement dû à la présence de la protéase du PAV3 en quantités possiblement plus élevées et plus optimales en moyenne par rapport à la protéase de l'Ad2.

Quoi qu'il en soit, l'apparition de plages de lyse de vecteur Δ PS sur la lignée cellulaire 293A PPSAV3 a constitué une évidence supplémentaire que la protéase du PAV3 présente une activité de transcomplémentation.

Un faible nombre de copies de la protéase des adénovirus humains est encapsidée dans des particules virales et est requise pour l'internalisation (Cotten et Weber, 1995). La protéine pVI de l'adénovirus est clivée par la protéase virale lors de l'internalisation (Greber *et al.*, 1996). Puisque les vecteurs Δ PS peuvent produire des particules infectieuses sur les cellules exprimant la protéase des PAV, il est fort probable que la protéase des adénovirus porcins se fasse aussi encapsider dans les particules de vecteurs Δ PS.

La protéine pVI est présente à l'intérieur des capsides et est difficilement accessible pour une protéase à l'extérieur de la capside. Cette protéine est impliquée dans la stabilisation de la structure du virion probablement en faisant un lien entre les composantes du nucleoïde (core) et l'hexon (Shenk, 1996). Les Ad5 Δ PS produits en présence de la protéase du PAV3 sont capables d'infecter d'autres cellules. Il est donc envisageable que la protéase est bel et bien encapsidée et que cet effet n'est pas dû à la protéase de l'Ad2 présente dans les lignées cellulaires sur lesquelles les virus ont été titrés.

Il est probable que le niveau d'expression de la protéase du PAV3 dans la lignée cellulaire établie soit différent de celui produit lors d'une infection sauvage par un PAV3. Il est toutefois possible que dans le contexte d'une co-infection d'une cellule porcine par un vecteur adénoviral Δ PS et un adénovirus porcine, qu'il y ait dissémination du vecteur. Cependant, des essais avec des vecteurs adénoviraux répliatifs chez les porcs n'ont pas montré d'effets secondaires importants (Torres *et al.*, 1996). Il est donc probable que ces vecteurs soient rapidement éliminés par le système immunitaire de l'animal.

Il serait bon de vérifier *in vivo* la dissémination des vecteurs Δ PS quand l'animal est infecté par un adénovirus porcine et en même temps, les effets secondaires du vecteur seul et dans le contexte d'une co-infection. Il serait aussi intéressant de vérifier la persistance du vecteur *in vivo* pour évaluer les risques potentiels de ces vecteurs adénoviraux Δ PS dans le contexte d'une utilisation chez les porcs éventuellement destinés à la consommation humaine. Ceci pourrait aussi nous servir de modèle pour étudier la co-dissémination des AdV Δ PS chez l'homme et générer des données pré-cliniques en vue d'une utilisation potentielle de ces vecteurs chez l'humain.

4.4- IMPACTS DE LA TOXICITÉ DE LA GP5

Le séquençage de l'ORF5 modifié utilisé dans ce projet a permis de constater qu'il y a 12 substitutions de nucléotide dont 3 résultent en un changement de l'acide aminé du codon correspondant. Cependant, des études réalisées dans les laboratoires du docteur Serge Dea avec cette version synthétique du gène montrent que la protéine mutée a quand même des effets toxiques similaires à la protéine sauvage (Gagnon, 2001). Elle a aussi un pouvoir immunogénique semblable (Cléroux *et al.*, résultats non-publiés). Comme la toxicité de la protéine mutée est semblable à celle de la protéine sauvage, il a été possible d'utiliser cette protéine comme modèle pour déterminer le meilleur système AdV pour la vaccination génétique chez le porc. Cette protéine mutée a donc été utilisée comme exemple de transgène toxique dans les expériences décrites dans ce mémoire. Le gène synthétique sera toutefois corrigé pour avoir la bonne séquence en acides aminés. Des expériences ultérieures se feront avec cette version corrigée.

Les résultats présentés dans ce mémoire indiquent que l'expression de l'ORF5 a un impact sur la production de vecteurs viraux exprimant cette protéine. Toutefois, cet impact n'est pas majeur. Les titres de vecteur baissent de moitié quand l'expression de la GP5 est induite. La GP5 elle-même est par conséquent sûrement responsable de cet effet. Il n'y a pas de différences majeures entre les titres du virus exprimant la GFPq en conditions induites et non-induites. Cette légère différence est peut-être due à une différence d'état physiologique des cellules 293S et 293S rTA au moment de l'expérience. Le virus GFPq a donné des titres infectieux deux fois plus élevés que le virus ORF5-GFPq même lorsque l'expression de la GP5 n'était pas induite. Cette variation peut être attribuable à des différences intrinsèques existant entre ces deux virus indépendamment de l'expression de la GP5. Il est également possible que la quantité de GP5 dans les cellules soit suffisante pour interférer un peu même si le gène n'est pas induit.

Due à la variabilité des résultats obtenus lors de l'évaluation des rendements de génération de virus recombinants, aucune conclusion définitive ne peut être tirée. Toutefois, les rendements avaient plutôt tendance à être plus faibles quand l'ORF5 était exprimé. Plusieurs tentatives pour obtenir des virus recombinants exprimant l'ORF5 de façon constitutive n'avaient pas fonctionné alors que l'obtention de virus recombinants a été possible avec un promoteur inductible. Ceci renforce l'hypothèse de départ postulant que la toxicité de la GP5 influence les rendements des co-transfections réalisées en vue d'obtenir des virus recombinants. Même si des plages de virus exprimant la GFPq ont pu être obtenues en présence de la GP5, il n'est pas certain que celles-ci expriment bien la protéine.

Les essais pour obtenir des virus recombinants exprimant la GP5 de façon constitutive avaient donné des plages de virus exprimant la GFPq mais pas la GP5.

Les faibles quantités de plages obtenues avec les cellules 293A CymR peuvent avoir été causées par une transfectabilité plus faible de ce clone cellulaire par rapport aux cellules 293A parentales. Une différence dans l'efficacité de transfection peut faire varier grandement les rendements de génération de virus recombinants. Ceci met en évidence l'importance de bien caractériser les clones cellulaires lors de l'obtention d'une lignée cellulaire stable et de vérifier s'ils n'ont pas perdu de leurs caractéristiques comme la transfectabilité.

La GP5 est connue pour causer l'apoptose des cellules (Gagnon, 2001; Suarez *et al.*, 1996). Dans le cas de la GP5 des souches nord-américaines, l'apoptose semble induite au niveau des mitochondries bien que ceci reste à confirmer et que le mécanisme reste à éclaircir (Gagnon, 2001). L'activation des caspases effectrices est cependant détectable seulement après 72 heures dans les cellules MARC. Or, cette protéine diminue les titres d'AdV après 48 heures dans les cellules 293. Il est à noter cependant que les vecteurs adénoviraux utilisés pour ces essais ne se répliquent pas dans les cellules MARC. L'expression du transgène est donc plus faible. Ceci pourrait expliquer le délai d'apparition de l'apoptose. Il est toutefois aussi possible que cette protéine ait certains effets sur les cellules et leur capacité à répliquer des adénovirus avant de déclencher l'apoptose. Il est également possible que la GP5 interfère directement avec la réplication des adénovirus par un mécanisme inconnu indépendamment de ses effets toxiques sur les cellules. L'expression de la GP5 n'a pas un impact important sur les titres des vecteurs adénoviraux. Les cellules ont probablement le temps de produire des vecteurs adénoviraux en quantités suffisantes avant que les effets toxiques de la GP5 se manifestent. Les cellules 293 sont des cellules qui ont été transformées avec la région E1 des adénovirus. Il est possible que la protéine 19K de la région E1B des adénovirus exprimée par les 293A protège en partie les cellules. Ceci reste hypothétique car le ou les mécanismes d'induction de l'apoptose par la GP5 ne sont pas connus. Il est bien connu que la 19K bloque l'apoptose en se liant à certaines protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 notamment Bax à leur domaine BH3. Cette protéine inhibe aussi l'activation de la caspase FLICE par la molécule adaptatrice FADD (White, 1998).

L'utilisation d'un promoteur inductible suffisamment étanche pour le contrôle de l'ORF5 dans les vecteurs semble être un bon moyen pour minimiser les impacts de la toxicité de cette protéine. Il est impossible de tirer des conclusions concernant la comparaison entre les promoteurs TR5 et CMV5P2 à cause de la variabilité des résultats.

Aussi, les niveaux d'expression non-induits des deux promoteurs n'ont pas permis la détection de la GP5 par immunobuvardage. Il est donc impossible de savoir lequel des deux systèmes donne le niveau basal le plus faible. Cependant, le promoteur CMV5P2 a l'avantage de ne pas nécessiter de transactivateur pour l'activation. Ceci est un atout important si on veut induire l'expression d'un gène *in vivo* comme dans le cas d'un vecteur pour vaccination génétique. Il n'est pas nécessaire de co-infecter l'animal avec un autre AdV exprimant le transactivateur requis pour l'induction du transgène du premier vecteur. Le promoteur CMV5P2 est donc celui qui est envisagé le plus pour le contrôle du gène de la GP5 dans les futurs vecteurs adénoviraux.

4.5- CONCLUSION

Le premier objectif de ce travail de maîtrise était de construire une lignée cellulaire adhérente complétant l'absence du gène de la protéase virale dans des vecteurs adénoviraux. Cette lignée a été obtenue avec succès et pourra être utilisée pour la génération, la purification et la titration des vecteurs Δ PS.

Un autre objectif était de vérifier si la protéase du PAV3 complétait l'absence du gène de la protéase chez les AdV humains. Il a été possible de constater qu'il y avait transcomplémentation au moins partielle. Il reste maintenant à vérifier les impacts que ceci pourrait avoir *in vivo*.

Le dernier objectif était d'évaluer les effets de la toxicité de la GP5 sur la génération et la production de vecteurs viraux exprimant cette protéine. Il semble que l'expression de la GP5 interfère un peu, mais ces effets peuvent être minimisés par l'utilisation d'un promoteur inductible suffisamment étanche.

L'utilisation de vecteurs adénoviraux Ad5 Δ E3 Δ PS comme vaccin génétique chez les porcs est une avenue prometteuse pour contrer les problèmes reliés au VSSRP. Les travaux avec ce type de vecteurs seront simplifiés par l'utilisation de la lignée cellulaire 293A PSAd2. Aussi, la toxicité de la GP5 ne sera pas un obstacle majeur à son utilisation comme immunogène si son expression est bien contrôlée par un promoteur inductible. Le vecteur optimal semble donc un Ad5 Δ E3 Δ PS avec une cassette d'expression contrôlée par le promoteur CMV5P2 avec les gènes de la GP5 et de la GFPq. La GFPq permet une purification et une identification facile des recombinants. Cependant, ce gène pourrait être remplacé par un autre gène (un immunomodulateur ou un deuxième antigène viral, par exemple) lors de la construction du vecteur final qui sera utilisé comme vaccin.

RÉFÉRENCES

- Adam M., Lepottier M. et Eloit M. 1994. Vaccination of pigs with replication-defective adenovirus vectored vaccines: the example of pseudorabies. *Veterinary Microbiology*, vol. **42**, p. 205-215
- André S., Seed B., Eberle J., Schraut W., Bültmann A. et Haas J. 1998. Increased Immune Response Elicited by DNA Vaccination with a synthetic gp120 Sequence with Optimized Codon Usage. *Journal of Virology*, vol. **72**, p. 1497-1503
- Babiuk L., van Drunen Littel-van den Hurk S. et Babiuk S. 1999. Immunization of animals: from DNA to the dinner plate. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. **72**, p. 189-202
- Betts A., Jennings A., Lamont P. et Page Z. 1962. Inoculation of pigs with adenoviruses of man. *Nature*, vol. **193**, p. 45-46
- Brielmeier M., Béchet J., Falk M., Pawlita M., Polak A. et Bornkamm G. 1998. Improving stable transfection efficiency: antioxidants dramatically improve the outgrowth of clones under dominant marker selection. *Nucleic Acids Research*, vol. **26**, p.2082-2085
- Bruder J., Appiah A., Kirkman W., Chen P., Tian J., Reddy D., Brough D., Lizonova A. et Kovesdi I. 2000. Improved Production of Adenovirus Vectors Expressing Apoptotic Transgenes. *Human Gene Therapy*, vol. **11**, p. 139-149
- Chen P., Ornelles D. et Shenk T. 1993. The adenovirus L3 23-Kilodalton Proteinase Cleaves the amino-Terminal head Domain from Cytokeratin 18 and Disrupts the Cytokeratin Network of HeLa Cells. *Journal of Virology*, vol. **67**, p. 3507-3514
- Côté, J., Garnier, A., Massie, B., et Kamen, A. 1998. Serum-free production of proteins and adenoviral vectors by 293SF cells. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. **59**, p. 567-575
- Cotten M. et Weber J. 1995. The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology*, vol. **213**, p. 494-502
- Cotto J., Fox S. et Morimoto R. 1997. HSF-1 granules: a novel stress-induced nuclear compartment of human cells. *Journal of Cell Science*, vol. **110**, p. 2925-2934
- Dea S., Gagnon C., Mardassi H., Pirzadeh B. et Rogan D. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology*, vol. **145**, p.1-30
- De Jong R. et van der Vliet P. 1999. Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene*, vol. **236**, p. 1-12

- Ding J., McGrath W., Sweet R. et Mangel W. 1996. Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *The EMBO Journal*, vol **15**, p.1778-1783
- Dong J., Wang D., Van Ginkel F., Pascual D. et Frissell R. 1996. Systematic analysis of repeated gene delivery into animal lungs with a recombinant adenovirus vector. *Human Gene Therapy*, vol. **10**, p. 319-331
- Durocher Y., Perret S., Thibaudau E., Gaumont M., Kamen A., Stocco R. et Abramovitz M. 2000. A reporter gene assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells grown in suspension culture. *Analytical Biochemistry*, vol. **284**, p. 316-326
- Elahi M., Oualikeke W., Naghdi L., O'Connor-McCourt, M. et Massie B. 2001. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. (manuscript soumis pour publication)
- Fisher KJ., Choi H., Burda J., Chen SJ. et Wilson JM. 1995. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, vol. **217**, p. 11-22
- François A., Eterradossi N., Delmas B., Payet V. et Langlois P. 2001. Construction of Avian Adenovirus CELO Recombinants in Cosmids. *Journal of Virology*, vol **75**, p. 5288-5301
- Friedman H., Yee A., Diggelmann H., Hastings J., Tal-Signer R., Seidel-Dugan C., Eisenberg R. et Cohen G. 1989. Use of a glucocorticoid-inducible promoter for expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC1, a cytotoxic protein in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, vol. **9**, p. 2303-2314
- Gagnon C. 2001. Propriétés moléculaires et variabilités antigéniques et génomiques des protéines structurales du virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (VSRRP). Thèse soumise pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.) en virologie et immunologie, Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, 285 p.
- Garnier A., Cote J., Nadeau I., Kamen A. et Massie B. 1994. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology*, vol. **15**, p. 145-155
- Gavin AC. et Nebreda AR. 1999. A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Current Biology*, vol. **9**, p. 281-284
- Gerds V., Jöns A., Makoschey B., Visser N. et Mettenleiter T. 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *Journal of General Virology*, vol. **78**, p.2139-2146
- Gonin P., Oualikene W., Fournier A. et Eloit M. 1996. Comparison of the efficacy of replication-defective adenovirus and Nyvac poxvirus as vaccine vectors in mice. *Vaccine*, vol. **14**, p. 1083-1087

- Gonin P., Pirzadeh B., Gagnon C. et Dea S. 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, vol. **11**, p. 11-20
- Gossen M. et Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. **89**, p. 5547-5551
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W. et Bujard H. 1995. Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science*, vol. **268**, p. 1766-1769
- Graham F., Smiley J., Russel W. et Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus 5. *Journal of General Virology*. vol. **36**, p. 59-72
- Greber U., Webster P., Weber J. et Helenius A. 1996. The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *The EMBO Journal*, vol **15**, p.1766-1777
- Gurunathan S., Klinman DM. et Seder RA. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review of Immunology*, vol. **18**, p. 927-74
- Horwitz M. 1996. *Adenoviridae*. chapitre dans *Virology* vol. 2. Philadelphie : Lippincott-Raven, Fields, B. éditeur, 2950 p.
- Houslay M. et Kolch W. 2000. Cell-Type Specific Intregation of Cross-Talk between Extracellular Signal-Regulated Kinase and cAMP Signaling. *Molecular Pharmacology*, vol. **58**, p. 659-668
- Ilan Y., Droguett G., Chowdhury N., Li Y., Sengupta K., Thummala N., Davidson A., Chowdhury J., et Horwitz M. 1997. Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. **94**, p. 2587-2592
- Jakobovits E., Majors J. et Varmus H. 1984. Hormonal regulation of the Rous sarcoma virus src gene via a heterologous promoter defines a threshold dose for cellular transformation. *Cell*, vol. **38**, p. 757-765
- Jani A., Lochmuller H., Ascadi G., Simoneau M., Huard J., Garnier A., Karpati G. et Massie B. 1997. Generation, validation and large scale production of adenoviral recombinants with large size inserts such as a 6.3 kb human dystrophin cDNA. *Journal of Virological Methods*, vol. **64**, p. 111-124
- Jenuwein T. et Allis C. 2001. Translating the histone code. *Science*, vol. **293**, p. 1074-1080
- Jordan M., Schallhorn A. et Wurm FM. 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research*, vol. **24**, p. 596-601
- Kirn D. 2000. Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aim targets in cancer. *Oncogene*, vol. **19**, p. 6660-6669

- Kochanek S., Clemens PR., Mitani K., Chen HH., Chan S. et Caskey CT. 1996. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. **93**, p. 5731-5736
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids Research*, vol. **15**, p. 8125-8148
- Krougliak V. et Graham F. 1995. Developpement of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Human Gene Therapy*, vol. **6**, p. 1575-1586
- Lager K., Mengeling W. et Brockmeier S. 1999. Evaluation of protective immunity in guilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *American Journal of Veterinary Research*, vol. **60**, p. 1022-1027
- Leitner WW., Ying H. et Restifo NP. 1999. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, vol. **18**, p. 765-77
- Le Potier M., Monteil M., Houdayer C. et Eloit M. 1997. Study of the delivery of the gD gene of pseudorabies virus to one-day-old piglets by adenovirus or plasmid DNA as ways to by-pass the inhibition of immune response by colostral antibodies. *Veterinary Microbiology*, vol. **55**, p.75-80
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A. et Randall R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, vol. **193**, p. 265-275
- Macklin M., McCabe D., McGregor M., Neumann V., Meyer T., Callan R., Hinshaw V et Swain W. 1998. Immunization of Pigs with a Particle-Mediated DNA Vaccine to Influenza A Virus Protects Against Challenge with Homologous Virus. *Journal of Virology*, vol. **72**, p. 1491-1496
- Madsen K., Hansen C., Madsen E., Stanbygaard B., Bodner, A. et Sorensen K. 1998. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Archives of Virology*, vol. **143**, p. 1683-1700
- Mangel W., Toledo D., Ding J., Sweet R. et McGrath J. 1997. Temporal and Spatial control of the Adenoviru Protease by Both a peptide and the viral DNA. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. **22**, p. 393-398
- Mardassi H., Massie B. et Dea S. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, vol. **221**, p. 98-112
- Mardassi H., Mounir S. et Dea S. 1995. Molecular analysis of the ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Archives of Virology*, vol. **140**, p. 1405-1418

- Massie B., Dionne J., Lamarche N., Fleurent J. et Langelier Y. 1995. Improved Adenovirus vector provides herpes Simplex virus Ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Bio/Technology*, vol. **13**, p. 602-608
- Massie B., Couture F., Lamoureux I., Mosser D., Guilbault C., Jolicoeur P., Bélanger F. et Langelier Y. 1998a. Inducible Overexpression of a Toxic Protein by an Adenovirus Vector with a Tetracycline-Regulatable Expression cassette. *Journal of Virology*, vol. **72**, p. 2289-2296
- Massie B., Mosser D., Kotroumanis M., Vitté-Mony I., Lamoureux L., Couture F., Paquet L., Guilbault C., Dionne J., Chala D., Jolicoeur P. et Langelier Y. 1998b. New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology*, vol. **28**, p. 53-64
- Matthews D., Cummings D., Eveleigh C., Graham F. et Prevec L. 1999. Development and use of a 293 cell line expressing *lac* repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. *Journal of General Virology*, vol. **80**, p. 345-353
- Mayr G., Chinsangaram J. et Grubman M. 1999. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*, vol. **363**, p. 496-506
- Mayr G., O'Donnell V., Chinsangaram J., Mason P. et Grubman M. 2001. Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine*, vol. **19**, p. 2152-2162
- Meng X., Paul P. et Harbur P. 1994. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, vol. **75**, p. 1795-1801
- Meng X., Paul P., Harbur P. et Lum M. 1995a. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Archives of Virology*, vol. **75**, p. 1795-1801
- Meng X., Paul P., Harbur P. et Morozov I. 1995b. Sequence comparison of open reading frame 2 to 5 of low and high virulence US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, vol. **76**, p. 3181-3188
- Meng X. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*, vol. **74**, p. 309-329
- Mittal SK., Prevec L., Graham FL. et Babiuk LA. 1995. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. *Journal of General Virology*, vol. **76**, p. 93-102

- Moffatt S., Hays J., HogenEsch H. et Mittal S. 2000. Circumvention of Vector-Specific Neutralizing Antibody Response by Alternating Use of Human and Non-Human Adenoviruses: Implication in Gene Therapy. *Virology*, vol. 272, p. 159-167
- Monteil M., Le Potier M., Guillotin J., Charioler R., Houdayer C. et Eloit M. 1996. Genetic immunization of seronegative one-day-old piglets against pseudorabies induces neutralizing antibodies but not protection and is ineffective in piglets from immune dams. *Veterinary Research*, vol. 27, p. 443-452
- Morin J., Lubeck M., Barton J., Conley A., Davis A. et Hung P. 1987. Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 84, p. 4626-4630
- Morozov I., Meng XJ. et Paul PS. 1995. Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archive of Virology*, vol. 140, p. 1313-1319
- Morrow C., Novak M., Ansardi D., Porter D. et Moldoveanu Z. 1999. Recombinant Viruses as vector for Mucosal Immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 236, p. 255-273
- Mosser D., Caron A., Bourget L., Meriin A., Sherman M., Morimoto R, et Massie B. 2000. The chaperone function of hsp 70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, p. 7146-7159
- Murtaugh M., Elam M. et Kakach L. 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Archives of Virology*, vol. 140, p. 1451-1460
- Oualikene W. et Massie B. 2000. Adenovirus vectors in functional genomics. dans: *Cell Engineering Vol. 2*. Kluwer Academic Publishers. Mohamed Al-Rubeai, éditeur p. 80-154
- Oualikene W., Lamoureux, L., Weber J. et Massie B. 2000. Protease-Deleted adenovirus vectors and complementing Cell Lines: Potential applications of single round replication Mutants for vaccination and Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, vol. 11, p. 1341-1353
- Papp Z., Babiuk L. et Baca-Estrada M. 1999. The effects of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induces by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. *Vaccine*, vol. 17, p. 933-943
- Parks RJ., Chen L., Anton M., Sankar U., Rudnicki MA. et Graham FLA. 1996. helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93, p. 13565-13570

- Pastoret PP. et Brochier B. 1996. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiology and Infection*, vol. **116**, p. 235-240
- Pirzadeh B. et Dea S. 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, vol. **79**, p. 989-999
- Porter D., Wang J., Moldoveanu Z., McPherson S. et Morrow C. 1997. Immunization of mice with poliovirus replicons expressing the C-fragment of tetanus toxin protects against lethal challenge with tetanus toxin. *Vaccine*, vol. **15**, p. 257-264
- Ramirez J., Gherardi M. et Esteban M. 2000. Biology of Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Recombinant vector in Mice: Virus fate and Activation of B- and T-Cell Immune responses in Comparison with the Western reserve Strain and Advantages as a Vaccine. *Journal of Virology*, vol. **74**, p. 923-933
- Rancourt C., Keyvani-Amineh H., Diouri M. et Weber J. 1996. Mutagenesis of Conserved residues of the Adenovirus Protease. *Virology*, vol. **224**, p. 561-563
- Reddy PS., Idamakanti N., Hyun BH., Tikoo SK. et Babiuk LA. 1999. Development of porcine adenovirus-3 as an expression vector. *Journal of General Virology*, vol. **80**, p. 563-70
- Robbins P. et Ghivizzani S. 1998. *Viral Vectors for Gene Therapy. Pharmacology and Therapeutics*, Vol. **80**, p. 35-47
- Rolph M. et Ramshaw I. 1997. Recombinants viruses as vaccines and immunological tools. *Current Opinion in Immunology*, vol. **9**, p. 517-524
- Shenk T. 1996. Adenoviruses and their replication. chapitre dans *Virology* vol. 2. Philadelphie : Lippincott-Raven, Fields, B. éditeur, 2950 pages
- Shiver J., Fu T., Chen L. *et al.* 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, vol. **415**, p. 331-335
- Steinwaerder D., Carlson C. et Lieber A. 2000. DNA Replication of First-Generation Adenovirus Vectors in Tumor Cells. *Human gene Therapy*, vol. **11**, p. 1933-1948
- Suarez P., Diaz-Guerra M., Prieto C., Esteban M., Castro J., Nieto A. et Ortin J. 1996. Open reading Frame 5 of Porcine Reproductive and respiratory Syndrome Virus as a Cause of Virus-Induced Apoptosis. *Journal of Virology*, vol. **70**, p. 2876-2882
- Tang DC., De Vit M. et Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, vol. **356**, p. 152-154
- Tartaglia J., Cox W., Taylor J., Perkus M., Meignier B. et Paoletti E. 1992. Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. **8**, p. 1445-1447

- Tatusova TA. et Madden TL. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. **174**, p. 247-250
- Top F. 1975. Control of Adenovirus acute Respiratory Disease in U.S. Army Trainees. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. **48**, p. 185-195
- Torres J., Alonso C., Ortega A., Mittal S., Graham F. et Enjuanes L. 1996. Tropism of Human Adenovirus Type 5 Based vectors in Swine and Their Ability To protect against transmissible gastroenteritis Coronavirus. *Journal of Virology*, vol, **70**, p. 3770-3780
- Van Rooij E., Haagmans B., de Visser Y., de Bruin M., Boersma W. et Bianchi A. 1998. Effect of vaccination route and composition of DNA vaccine on the induction of protective immunity against pseudorabies infection in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. **66**, p. 113-126
- Van Waardenburg R., Meijer C., Burger H., Nooter K., De Vries E., Mulder N. et De Jong S. 1997. Effects of an inducible anti-sense c-myc gene transfer in a drug-resistant human small-cell-lung-carcinoma cell line. *International Journal of Cancer*, vol. **73**, p. 544-550
- Varga M., Weibull C. et Everitt E. 1991. Infectious Entry Pathway of Adenovirus type 2. *Journal of Virology*, vol. **65**, p. 6061-6070
- Wang Q. et Finer M. 1996. Second-generation adenovirus vectors. *Nature Medicine*, vol. **2**, p. 714-716
- Ward G., Rieder E. et Mason P. 1997. Plasmid DNA Encoding Replicating Foot-and-Mouth Disease Virus Genomes Induces Antiviral Immune responses in Swine. 1997. *Journal of Virology*, vol. **71**, p. 7442-7447
- Weber J. et Tihani K. 1994. Adenovirus endopeptidases. *Methods in Enzymology*, vol. **244**, p. 595-604
- Wensvoort G., Terpstra C., Pol JM., ter Laak EA., Bloemraad M., de Kluyver EP., Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F. *et al.* 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary quarterly*, vol. **13**, p. 121-130
- White E. 1998. Regulation of Apoptosis by adenovirus E1A and E1B Oncogenes. *Seminars in Virology*, vol. **8**, p. 505-513
- Wickham T., Mathias P., Cheresch D. et Nemerow G. 1993. Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ Promote Adenovirus Internalization but Not Virus Attachment. *Cell*, vol. **73**, p. 309-319
- Xiang Z. et Ertl C. 1999. Induction of mucosal immunity with a replication-defective adenoviral recombinant. *Vaccine*, vol. **17**, p. 2003-2008
- Xiang Z., Yang Y., Wilson J. et Ertl H. 1996. A Replication-Defective Human Adenovirus Recombinant Serves as a Highly Efficacious Vaccine Carrier. *Virology*, vol. **219**, p. 220-227

Yoon K., Wu L., Zimmerman J., Hill H. et Platt K. 1997. Antibody dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRSSV) infection in pigs. *Viral Immunology*, vol. **9**, p. 51-63

ANNEXE A

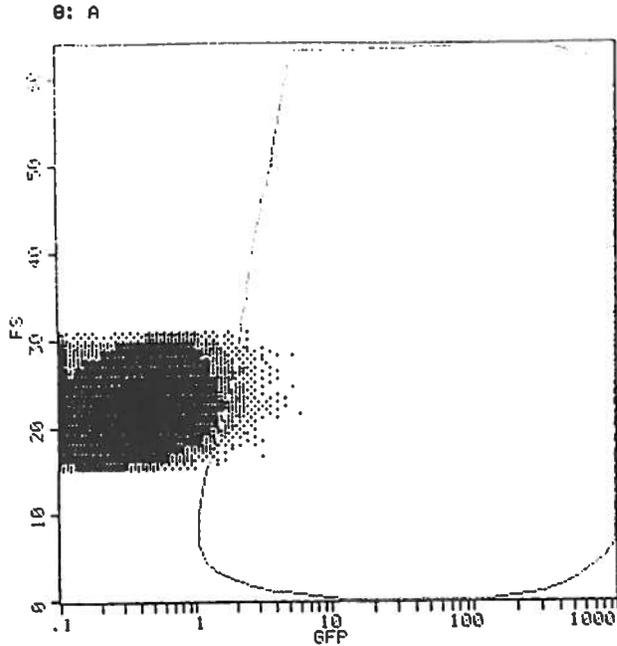
Résultats du triage des pools de cellules 293A PSAd2 et 293A PSPAV3

SAMPLE NAME : 293a PS Ad5 Francois C.
 SAMPLE NUMBER: 2

SAMPLE DATE: 08Feb01
 SAMPLE TIME: 15:28:09

```

scale
  2547
  515
  103
  20
  4
  1
  
```



FOR EVENT EQUATION:

SAMPLE INFO

PROTOCOL :	293a PS pAd5	HIST COUNT :	224,104	LIST FILE :	castPSAd.LMD
PA RATE :	489			PROT FILE :	29000668.PRO
INSTRUMENT :	Elite			SAMPLE DATE:	08Feb01
SAMPLE NAME :	293a PS Ad5 Francois C.			SAMPLE TIME:	15:28:09
SAMPLE NUMBER:	2				
EVENTS :					

STATISTICS

DUAL PARAMETER STATISTICS

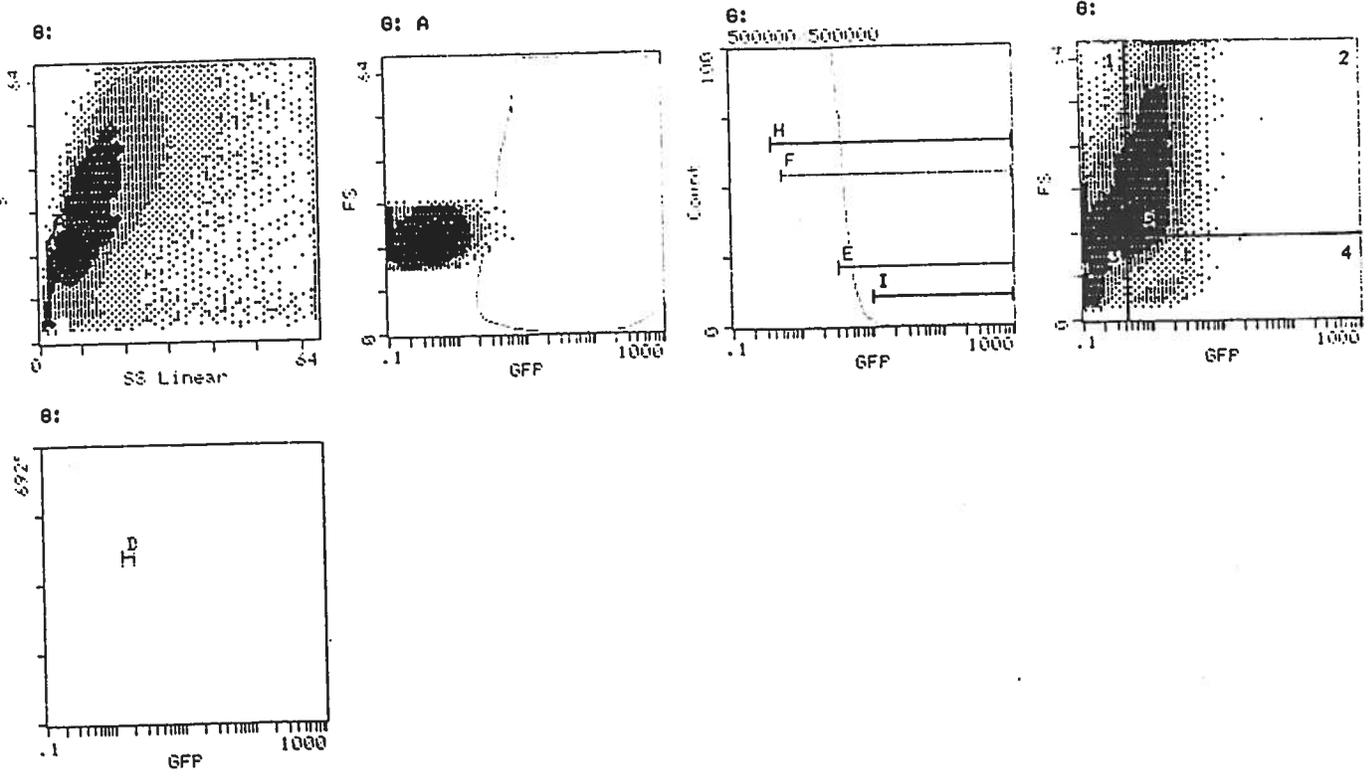
D	Pcnt	AreaPeak.....	X Channel....		Y Channel....			
			Position	Height	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	
:	0.5	1035	1.4,	19	89	1.04	0.400	22.2	21.8	2.9	13.1

GFP AMORPHOUS

HISTOGRAM DISPLAY

SAMPLE NAME : 293a P5 Ad5 Francois C.
 MPLE NUMBER: 2

SAMPLE DATE: 08Feb01
 SAMPLE TIME: 15:28:09



LOR EVENT EQUATION:

SAMPLE INFO

ROTOCOL : 293a P5 pAd5
 TA RATE : 147
 TRUMENT : Elite
 MPLE NAME : 293a P5 Ad5 Francois C.
 MPLE NUMBER: 2
 MENTS :

TOTAL COUNT : 500,000

LAST HIST :
 LIST FILE : castP5Ad.LMD
 PROT FILE : 29000660.PRO
 SAMPLE DATE: 08Feb01
 SAMPLE TIME: 15:28:09

STATISTICS

SINGLE PARAMETER STATISTICS

Pcnt	AreaPeak.....	X Channel.....					
		Position	Height	Mean	SD	FullCV	HalfCV	Min	Max
4.0	19917	1.5	775	1.73	0.185	10.7	118.9	1.5	2.2
0.7	3361	3.2	100	4.17	1.00	24.1	168.8	3.2	1024
50.7	253583	0.54	3889	0.876	0.383	43.7	38.8	0.52	1024
75.4	377053	0.54	3889	0.692	0.346	49.9	38.8	0.35	1024
0.0	27	9.7	2	11.9	3.61	38.2	3.44	9.7	1024

DUAL PARAMETER STATISTICS

Pct	AreaPeak.....	X Channel....		Y Channel....		
		Position	Height	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
62.8	314891	6, 28	12778	7.2	2.1	29.0	21.1	2.6	12.5
0.0	89	2.8, 22	7	3.13	0.586	18.7	22.5	2.9	13.8

QUADSTAT STATISTICS

Pct	AreaPeak.....	X Channel....		Y Channel....		
		Position	Height	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
26.2	131183	0.37, 28	7118	0.265	0.097	36.6	23.8	5.2	22.7
57.0	285125	0.43, 28	7577	0.739	0.343	46.5	29.6	10.7	36.1
18.8	53936	0.37, 18	3776	0.211	0.089	42.3	13.9	4.8	34.7
6.8	29756	0.43, 18	3762	0.628	0.275	43.8	15.9	3.5	22.1

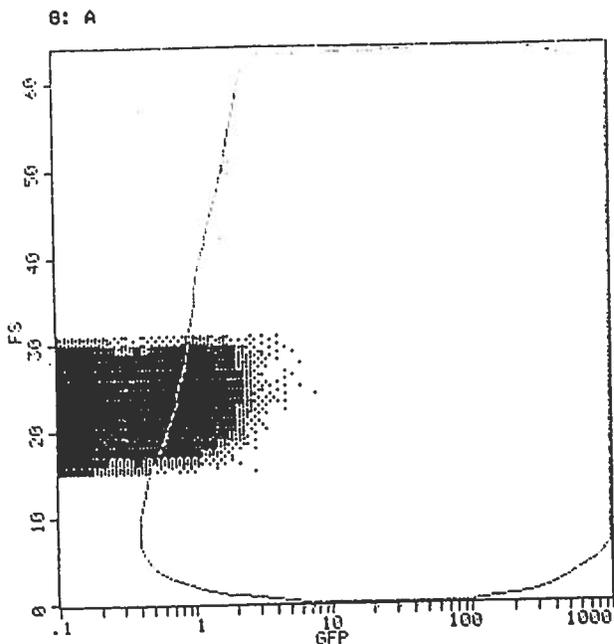
- Low Channel = 1.5, High Channel = 2.2 D
- Low Channel = 3.2, High Channel = 1824 E
- Low Channel = 0.52, High Channel = 1824 F
- Low Channel = 0.35, High Channel = 1824 H
- Low Channel = 9.7, High Channel = 1824 I
- A AMORPHOUS
- GFP AMORPHOUS
- X Intercept = 0.43, Y Intercept = 19 6

SAMPLE NAME : 293a P5 PAV3 Francois C.
 PLE NUMBER: 3

SAMPLE DATE: 08Feb01
 SAMPLE TIME: 16:26:55

scale

388
 120
 43
 14
 4
 1



FOR EVENT EQUATION:

SAMPLE INFO

PROTOCOL : 293a P5 PAV3
 GATE RATE : 547
 INSTRUMENT : Elite
 SAMPLE NAME : 293a P5 PAV3 Francois C.
 PLE NUMBER: 3
 COMMENTS :
 HIST COUNT : 69,500
 LIST FILE : castPAV3.LMD
 PROT FILE : 29000461.PRO
 SAMPLE DATE: 08Feb01
 SAMPLE TIME: 16:26:55

STATISTICS

DUAL PARAMETER STATISTICS

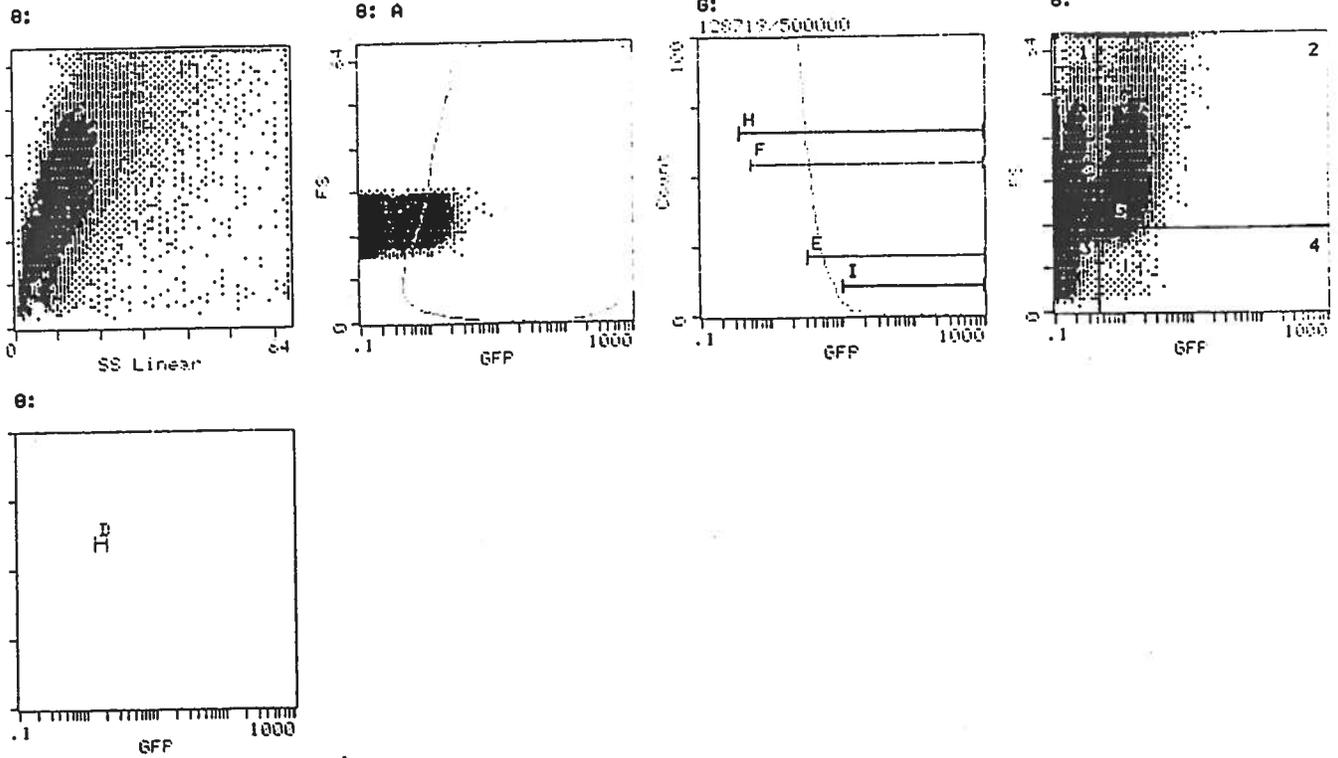
D	Pcnt	AreaPeak.....	X Channel....		Y Channel....			
			Position	Height	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	
	32.7	22693	0.89,	22	536	1.01	0.326	32.3	23.0	3.0	13.2

GFP AMORPHOUS

HISTOGRAM DISPLAY

FILE NAME : 293a P5 PAV3 Francois C.
 FILE NUMBER: 3

SAMPLE DATE: 08Feb01
 SAMPLE TIME: 16:26:55



FOR EVENT EQUATION:

SAMPLE INFO

PROTOCOL : 293a P5 PAV3
 COUNT RATE : 547
 INSTRUMENT : Elite
 SAMPLE NAME : 293a P5 PAV3 Francois C.
 FILE NUMBER: 3
 COMMENTS :

TOTAL COUNT : 128,719

LAST HIST :
 LIST FILE : castPAV3.LMD
 PROT FILE : 29000661.PRO
 SAMPLE DATE: 08Feb01
 SAMPLE TIME: 16:26:55

STATISTICS

SINGLE PARAMETER STATISTICS

) Pcnt	AreaPeak.....	X Channel.....					
		Position	Height	Mean	SD	FullCV	HalfCV	Min	Max
7.0	9811	1.5	322	1.74	0.187	18.7	66.0	1.5	2.2
2.7	3478	3.2	75	4.73	1.63	34.4	166.3	3.2	1824
43.9	56478	0.98	582	1.28	0.688	56.5	36.6	0.52	1824
58.1	64494	0.98	582	1.06	0.673	63.6	36.6	0.35	1824
0.1	155	9.7	10	12.3	3.84	24.7	0.591	9.7	1824

DUAL PARAMETER STATISTICS

ID	Pcnt	AreaPeak.....	X Channel....		Y Channel....			
			Position	Height	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	
A	54.8	69500	6,	22	1656	7.8	2.3	32.3	22.8	3.3	14.3
C	32.7	22693	0.89,	22	536	1.01	0.326	32.3	23.0	3.0	13.2

QUADSTAT STATISTICS

I	Pcnt	AreaPeak.....	X Channel....		Y Channel....			
			Position	Height	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV	
U	40.9	52587	0.14,	21	789	0.165	0.061	36.6	28.8	9.8	34.0
G2	44.3	57073	0.89,	22	548	1.08	0.647	59.8	33.3	13.1	39.4
	12.2	15761	0.14,	18	444	0.151	0.051	33.6	12.4	4.9	39.6
	2.6	3298	0.77,	18	166	0.708	0.347	44.0	15.4	3.9	25.2

D Low Channel = 1.5, High Channel = 2.2 D
 Low Channel = 3.2, High Channel = 1024 E
 Low Channel = 0.52, High Channel = 1024 F
 H Low Channel = 0.35, High Channel = 1024 H
 T Low Channel = 9.7, High Channel = 1024 I
 A AMORPHOUS
 - GFP AMORPHOUS
 B X Intercept = 0.43, Y Intercept = 19 0

ANNEXE B

Comparaison de la séquence de l'ORF5 obtenue et planifiée

	v10	v20	v30	v40	v50	v60	v70	v80
ORF5 planifié	ATGCTGGGCAAGTGCCCTGACCGCCGGCTGTGTGCTCCCAAGCTGCCCTTCTCTGTGGTGTATCGTGGCCCTTCTGTGTTTCGCCGC							
ORF5 séquencé	ATGCTGGGCAAGTGCCCTGACCGCCGGCTGTGTGCTCACAGCTGCCCTTCTCTGTGGTGTATCGTGGCCCTTCTGTGTTTCGCCGC							
	^10	^20	^30	^40	^50	^60	^70	^80
	v90	v100	v110	v120	v130	v140	v150	v160
ORF5 planifié	CCTGGTGAACGCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCAAGCTGCAGTCCATCTACAACCTGACCATCTGTGAGCTGAACGGCACCG							
ORF5 séquencé	CCTGGTGAACGCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCAAGCTGCAGTCCATCTACAACCTGACCATCTGTGAGCTGAACGGCACCG							
	^90	^100	^110	^120	^130	^140	^150	^160
	v170	v180	v190	v200	v210	v220	v230	v240
ORF5 planifié	ACTGGCTGAACAAGAACTTTCGACTGGCCGGTGGAGACCTTCGTGATCTTCCCGTGTCTGACCCACATCGTGTCTTACGGC							
ORF5 séquencé	ACTGGCTGAACAAGAACTTTCGACTGGCCGGTGGAGACCTTCGTGATCTTCCCGTGTCTGACCCACATCGTGTCTTACGGC							
	^170	^180	^190	^200	^210	^220	^230	^240
	v250	v260	v270	v280	v290	v300	v310	v320
ORF5 planifié	GCCCTGACCACCTCCCACTTCCCTGGACGCCGGTGGCCCTGATCACCGTGTCCACCGCCGGCTACTACCAACGGCCGGCTACGT							
ORF5 séquencé	GCCCTGACCACCTCCCACTTCCCTGGACGCCGGTGGCCCTGATCACCGTGTCCACCGCCGGCTACTACCAACGGCCGGCTACGT							
	^250	^260	^270	^280	^290	^300	^310	^320
	v330	v340	v350	v360	v370	v380	v390	v400
ORF5 planifié	GCTGTCTCCCGTGTACGCCGGTGTGGCCCTGGCCGCCCTGATCTGCTTTCGTGATCCGCCTGACCAAGAAGTGCATGTCT							
ORF5 séquencé	GCTGTCTCCCGTGTACGCCGGTGTGGCCCTGGCCGCCCTGATCTGCTTTCGTGATCCGCCTGACCAAGAAGTGCATGTCT							
	^330	^340	^350	^360	^370	^380	^390	^400
	v410	v420	v430	v440	v450	v460	v470	v480
ORF5 planifié	GGCGTACTCCTGTACCCGCTACACCAACTTCTGCTGGACTCCAAGGGCAAGCTGTACCGCTGGCGCTCCCCCGTGATC							
ORF5 séquencé	GGCGTACTCCTGTACCCGCTACACCAACTTCTGCTGGACTCCAAGGGCAAGCTGTACCGCTGGCGCTCCCCCGTGATC							
	^410	^420	^430	^440	^450	^460	^470	^480
	v490	v500	v510	v520	v530	v540	v550	v560
ORF5 planifié	ATCGAGAAGGGCGGCAAGGTGGAGGTGGACGGCCACCTGATCGAAGCGCGTGGTGTCTGGACGGCTCCGGCCAC							
ORF5 séquencé	ATCGAGAAGGGCGGCAAGGTGGAGGTGGACGGCCACCTGATCGAAGCGCGTGGTGTCTGGACGGCTCCGGCCAC							
	^490	^500	^510	^520	^530	^540	^550	^560
	v570	v580	v590	v600				
ORF5 planifié	CCCCGTGACCAAGGTGTCCCGGAGCAGTGGTGTCCGCCCTAG							
ORF5 séquencé	CCCCGTGACCAAGGTGTCCCGGAGCAGTGGTGTCCGCCCTAG							
	^570	^580	^590	^600				