

Université de Montréal

Production de vecteurs viraux efficaces pour la transduction de
cellules transformées et de cellules primaires

par
Amélie Pilotte

Département de Biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Biologie Moléculaire

Décembre, 2005
© Amélie Pilotte, 2005



QH
506
U54
2006
v.024

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Production de vecteurs viraux efficaces pour la transduction de
cellules transformées et de cellules primaires

Présenté par :
Amélie Pilotte

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luc DesGroseillers
président-rapporteur

Dr Bernard Massie
directeur de recherche

Dr Daniel Jung
membre du jury

RÉSUMÉ (FRANÇAIS)

Le but de ce travail était de produire des vecteurs viraux de manière à transduire la majorité des cellules avec le minimum d'interférence. Plus spécifiquement, nous voulions marquer les différentes cellules composant les îlots de langerhans afin de suivre leur cheminement lors de la transformation en structure kystique. Les îlots, qui sont des sphères de cellules quiescentes, peuvent se transformer en un kyste composé d'une monocouche de cellules en division ressemblant aux cellules canalaire. Le type de cellule qui se transforme demeurait inconnu jusqu'à ce jour. Nous avons utilisé des vecteurs viraux exprimant la GFP sous le contrôle de promoteurs spécifiques pour marquer les principaux types de cellules d'îlot (α, β, δ) afin de suivre leur cheminement lors de la transformation. Nous avons d'abord utilisé la GFP sous le contrôle du promoteur de l'insuline avec de bons résultats. Cependant, le même marquage avec le promoteur du glucagon n'a pas fonctionné. Nous avons décidé de marquer les cellules avec le promoteur inductible au cumate (CR5) qui nécessite la présence de son transactivateur (cTA) pour être actif. En plaçant le cTA sous le contrôle des promoteurs spécifiques et la GFP sous le contrôle du CR5, nous avons réussi à marquer les cellules α et δ avec une MOI d'au moins cinq fois inférieure à celle utilisée pour marquer les cellules β . Nous avons trouvé que les cellules α et δ semblent prendre part à la formation du kyste, alors que les cellules β ne se divisent pas. L'activité du CR5 a également été testée dans les cellules C2C12. Le CR5 s'est montré très puissant dans les deux phénotypes que ces cellules peuvent prendre.

La deuxième partie de ce travail consistait en l'optimisation du CR5. Certaines modifications ont d'abord été appliquées à ce promoteur, dans l'espoir d'augmenter sa puissance et l'efficacité de sa régulation, mais sans succès. La caractérisation d'un nouveau transactivateur inverse a également été faite.

Mots clés : vecteurs viraux, marquage spécifique, îlots de langerhans, transdifférenciation, promoteur inductible, cumate

RÉSUMÉ (ANGLAIS)

Our goal was to improve the design of viral vectors in such a way that we will be able to transduce the majority of the cells with a minimal interference on their physiology. More specifically, the first part of this work consisted in the labeling of langerhans islet cells to follow their differentiation in cystic structure. Islets, which are stable solid spheroid structures, undergo cavitation as they are induced to transform into duct-like epithelial cystic structures comprised of a single layer of highly proliferative duct-like epithelial cells that no longer express endocrine characteristics. The type of cell that differentiates remains to be found. We use adenoviral vectors expressing GFP under the control of specific promoters to mark the main types of islet cells (α , β , δ) and follow their fate. We first use the insulin promoter to mark β cells with good results. But the same marking with glucagon promoter for α cells did not work because of the lower activity of this promoter. We thus decided to use our strong inducible promoter, CR5, to mark cells. This promoter needs the presence of its transactivator to be active. When we placed the transactivator under the control of the specific promoter and the GFP under the control of the CR5, we succeeded to specifically mark α and δ cells, with a MOI five times lower than the MOI needed to mark β cells with direct marking. While observing the transformation of the marked islet into cyst, we have noticed that the α and δ cells take part in the formation of the cyst, whereas β cells do not seem to divide. As the islets were difficult to obtain, the activity of the CR5 was also tested in C2C12 cells. The CR5 was very powerful in the two phenotypes which these cells can take.

The second part of this work consisted in the optimization of the cumate inducible promoter. Some modifications were applied to this promoter, in the hope to improve its power and its regulation, but without success. The characterization of a new reverse transactivator was also made.

Key words: viral vectors, specific labeling, langerhans islets, transdifferentiation, inducible promoter, cumate

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
Section 1 : Revue de littérature	
<u>1.1 Le pancréas humain</u>	
1.1.1 Plasticité des cellules pancréatiques	2
1.1.2 Marquage des cellules d'îlots de langerhans	6
1.1.2.1 Vecteurs viraux	6
1.1.2.2 Vecteurs non-viraux	10
1.1.2.3 Choix des vecteurs	11
<u>1.2 Le système cumate</u>	
1.2.1 Les systèmes régulables	13
1.2.2 Infection d'îlots de langerhans avec le promoteur inductible au cumate	17
1.2.3 Modification de promoteurs inductibles	18
1.2.4 Le système cumate inverse	20
<u>1.3 Objectifs</u>	21
Section 2 : Matériel et méthode	
<u>2.1 Construction des plasmides</u>	
2.1.1 Vecteurs de transfert adénoviraux	23
2.1.2 Clonage des promoteurs tissu spécifiques dans les vecteurs adénoviraux	26
2.1.3 Vecteurs de transfert lentiviraux	30
<u>2.2 Production des plasmides</u>	32
<u>2.3 Culture cellulaire</u>	33
<u>2.4 Transfection</u>	36
<u>2.5 Immunobuvardage de type Western</u>	36
<u>2.6 Production d'adénovirus recombinants</u>	38
<u>2.7 Amplification des virus</u>	40
<u>2.8 Purification des virus</u>	40
<u>2.9 Titration des virus</u>	41
<u>2.10 Cytofluorométrie de flux</u>	41
<u>2.11 Photographies</u>	41
<u>2.12 Dosage de la phosphatase alcaline</u>	42
<u>2.13 Dosage de la bêta-galactosidase</u>	42
<u>2.14 Immunomarquage</u>	43
Section 3 : Résultats	
<u>3.1 Marquage spécifique des cellules d'îlots de langerhans</u>	
3.1.1 Construction de vecteurs contenant les promoteurs tissu spécifiques	45
3.1.2 Marquage des cellules d'îlots à l'aide de promoteurs spécifiques	47
3.1.3 Efficacité du promoteur CR5 dans les îlots de langerhans humains	49
3.1.4 Marquage spécifique des cellules d'îlots à l'aide du promoteur CR5	51
3.1.5 Spécificité du marquage	54
3.1.6 Transformation en kyste des îlots de langerhans marqués spécifiquement	56
3.1.7 Influence de l'infection adénovirale sur la transformation des îlots en kystes	59

	PAGE
<u>3.2 Efficacité du promoteur CR5 dans les cellules C2C12</u>	60
<u>3.3 Caractérisation des promoteurs CR5 modifiés</u>	
3.3.1 Caractérisation du promoteur CR5 modifié	66
3.3.2 Caractérisation du promoteur CR5 Δ	67
<u>3.4 Caractérisation du transactivateur inverse</u>	
3.4.1 Comparaison de l'efficacité du rcTA par rapport au cTA original	69
3.4.2 Régulation de la quantité de rcTA par l'ajout de CymR	73
3.4.3 Régulation de la quantité de transactivateur par le promoteur CR5	76
Section 4 : Discussion	
<u>4.1 Marquage spécifique des cellules d'îlots de langerhans</u>	80
<u>4.2 Utilisation du système cumate dans les cellules C2C12</u>	86
<u>4.3 Optimisation du système cumate</u>	87
<u>4.4 Conclusion</u>	92
Références	xciii
Annexe I : Plasmides mentionnés dans ce mémoire	ciii

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Mécanismes proposés du passage de la structure tridimensionnelle et fixe des îlots à une monocouche de cellules en division.	5
2	Schématisation des opérons <i>p-cymène</i> et <i>cmt</i> de la bactérie <i>Pseudomonas putida</i> F1.	14
3	Configuration de type répresseur et activateur du système cumate	15
4	Comparaison de la structure des promoteurs CMV, CMV5 et CR5	16
5	Exemple de co-infection d'une cellule α	17
6	Activation du système cumate avec le transactivateur inverse	20
7	Carte générale des vecteurs adénovirus	23
8	Carte générale des vecteurs lentivirus	31
9	Production d'adénovirus recombinants par la méthode d'infection/transfection	39
10	Comparaison de la régulation directe et indirecte de la GFP par le promoteur du glucagon dans les cellules 293CR5GFP	47
11	Marquage des cellules β avec un vecteur adénovirus INSGFP	48
12	Activité comparée des promoteurs CR5 et CMV5 dans les îlots de langerhans	50
13	Activité basale du promoteur CR5 dans les îlots de langerhans	50
14	Activation du CR5 dans les îlots par différentes quantités de cTA	51
15	Exemple de co-infection d'une cellule α	52
16	Comparaison de l'efficacité du marquage d'îlots de langerhans par la GFP régulée de façon directe ou indirecte	53
17	Marquage des cellules α et δ avec des vecteurs adénovirus	54
18	Marquage spécifique des cellules d'îlots avec différents vecteurs adénovirus	55
19	Transformation d'îlots de langerhans humains en kyste (contrôle et insuline)	57
20	Transformation d'îlots de langerhans humains en kyste (glucagon et somatostatine)	58
21	Activité comparée des promoteurs CR5 et CB dans les cellules C2C12 (myoblastes)	61
22	Activité comparée des promoteurs CR5 et CB dans les cellules C2C12 (myotubes)	62
23	Activité comparée des promoteurs CR5 et CMV5 dans les cellules C2C12 (myoblastes)	63
24	Effet de la quantité de cTA sur la régulation du CR5 dans les cellules C2C12 (myoblastes)	64

25	Effet de la quantité de cTA sur la régulation du CR5 dans les cellules C2C12 (myotubes)	65
26	Activité comparée des promoteurs CR5 original et modifié dans les cellules 293acTA	67
27	Activité du promoteur CR5delta dans les cellules 293acTA	68
28	Activité comparée des promoteurs CR5 original et CR5delta dans les cellules 293acTA	68
29	Activité comparée des deux transactivateurs dans les cellules 293aCR5LacZ	71
30	Expression comparée des deux transactivateurs dans les cellules 293aCR5LacZ	72
31	Quantification de la quantité de cTA et de rcTA dans les cellules 293aCR5LacZ	72
32	Le promoteur CR5 dans la configuration double régulée	73
33	La double régulation du promoteur CR5 dans les cellules 293aCR5LacZ	74
34	Régulation du CR5 par le rcTA dans les cellules 293a et 293aCymR	75
35	Le promoteur CR5 dans la configuration auto-réglée	76
36	Auto-régulation du cTA dans les cellules 293a lacZ	77
37	Auto-régulation du rcTA dans les cellules 293aCR5LacZ	78
38	Mécanismes proposés du passage de la structure tridimensionnelle et fixe des îlots à une monocouche de cellules en division	85

LISTE DES TABLEAUX

	PAGE
Tableau I : Caractéristiques comparées des principaux vecteurs viraux dans l'infection d'îlots de langerhans	10
Tableau II: Clonage des promoteurs tissu spécifiques	45
Tableau III: Spécificité du marquage des îlots de langerhans	56
Tableau IV: Influence de l'infection adénovirale sur la transformation des îlots en kystes	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% : pourcentage
 µg : microgramme
 µL : microlitre
 Δ : delta, délétion
 aa : acide aminé
 Ad : adénovirus
 ADN : acide désoxyribonucléique
 CK19 : cytokératine 19
 CMV: cytomégalovirus humain
 CsCl : chlorure de césium
 cTa : transactivateur de l'opéron cumate
 CuO: séquence opératrice cumate
 CR5 : promoteur régulable au cumate
 CymR : répresseur de l'opérateur cumate
 DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E. coli : *Escherichia coli*
 ECL : Enhance chemi-luminescence
 Ex : exemple
 g : gramme
 GFP: green fluorescent protein, protéine fluorescente verte
 Kb : kilobases
 kDa: kilodaltons
 LTR: Long Terminal Repeat
 milieu LB : milieu Luria-Bertani
 mlp :major late promoter (promoteur tardif de l'adénovirus)
 mm : millimètre
 MOI: multiplicity of infection, multiplicité d'infection
 ng : nanogrammes
 P2 : opérateur cumate (ou CuO)
 pAd :plasmide ayant la cassette mlp+protéase
 PBS : Phosphate-buffered Saline
 PCR : réaction de polymérisation en chaîne
 PEI : polyéthylèneimine
 pH : potentiel Hydrogène
 PS : protéase
 rcTA: transactivateur inverse (reverse) du promoteur régulable au cumate
 rtTA : transactivateur inverse (reverse) du promoteur régulable à la tétracycline
 SEAP: alcaline phosphatase humaine sécrétée
 tTA : transactivateur inverse du promoteur régulable à la tétracycline
 TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling
 VIH: virus de l'immuno-déficiences humaine
 VP16 : domaine transactivateur de la protéine 16 du virus de l'herpes simplex

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Docteur Bernard Massie pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et supervisée tout au cours de ma maîtrise. Grâce à vous, j'ai eu l'opportunité d'acquérir énormément de connaissances et de travailler avec des gens extrêmement compétents et sympathiques. Je tiens particulièrement à remercier Claire Guilbaut, pour le partage de son expérience et sa patience envers les étudiants et le Dr Rénald Gilbert, pour son expertise. Merci également à Lucie Bourget et Antoine Caron pour leur aide technique. Et un énorme merci à Bruno Gaillet, Cynthia Guilbert, Félix Malenfant et tous les autres membres du laboratoire du Dr Massie pour m'avoir permis de passer deux ans dans une atmosphère de travail formidable. Je voudrais également remercier le Docteur Lawrence Rosenberg, pour sa collaboration et pour avoir fourni les îlots de langerhans, et Stephen Hanley, pour l'enrobage et l'immunomarquage des îlots.

Merci à mes parents pour m'avoir constamment encouragée et soutenue. Merci de m'avoir aidée financièrement et surtout moralement. Vous êtes des parents merveilleux, vous m'avez permis de grandir dans un climat fantastique et je ne serais pas parvenue aussi loin sans vous, dans mes études comme dans ma vie. Merci également à mes tantes pour avoir toujours cru en moi et m'avoir répété qu'elles étaient fières de moi. Et un gros merci à tous mes amis pour m'avoir permis d'oublier le laboratoire quand rien ne fonctionnait et que je ne voyais pas le jour où j'aurais des résultats!

Je voudrais finalement remercier les organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de ce projet :

CRSNG

Département de Biologie Moléculaire

Faculté des Études Supérieures

FRSQ

Réseau de Cellules Souches

Section 1 :
Revue de littérature

1.1 Le pancréas humain

1.1.1 Plasticité des cellules pancréatiques

Le pancréas humain est divisé en deux parties, endocrine et exocrine. La partie exocrine est constituée des cellules acini, qui sécrètent des enzymes digestives dans le duodénum, et des cellules canalaire, qui entourent les îlots de langerhans constituant la partie endocrine. Les cellules endocrines du pancréas régulent la concentration de glucose dans le sang en sécrétant des hormones aux effets opposés, soit l'insuline, qui stimule la conversion du sucre en glucose qui sera entreposé sous forme de glycogène, et le glucagon qui stimule la transformation du glycogène en glucose libéré dans le sang. Les îlots sont en grande majorité (65 à 85%) formés par les cellules β produisant l'insuline. Ces dernières se situent au centre des îlots et sont entourées par les cellules α (15%), produisant du glucagon, les cellules δ (3 à 10%), produisant de la somatostatine, et les cellules PP (1%), produisant du polypeptide pancréatique. L'existence d'une petite quantité de cellules souches dans les îlots a aussi été proposée, mais cela demeure controversé (1;2).

Les cellules des îlots de langerhans ont longtemps été vues comme des cellules stables, au destin déterminé (3). Par contre, il est connu depuis longtemps que les cellules exocrines du pancréas montrent une certaine plasticité (4-6). Cependant, des études récentes ont montré que les cellules d'îlots pouvaient également avoir un certain potentiel de plasticité (7-9), mais les mécanismes moléculaires et cellulaires menant à cette différenciation n'ont pas été totalement élucidés (10;11).

Un modèle approprié pour l'étude de la plasticité des îlots permettrait de mieux comprendre les mécanismes menant à la différenciation de ces cellules chez l'adulte. Cela serait utile pour élucider certaines pathologies du pancréas, incluant certains adénocarcinomes, le cancer pancréatique le plus commun, dont l'origine cellulaire reste indéterminée (8;12). Un tel modèle permettrait aussi de comprendre les changements phénotypiques se produisant suite à l'isolation d'îlots de langerhans. Ces changements dans

l'état de différenciation des cellules pendant et après la greffe d'îlots pourraient expliquer l'échec du rétablissement du contrôle du glucose chez plusieurs patients (13).

Nous savons que la quantité de cellules β d'un individu augmente en fonction de son poids, mais l'origine de ces nouvelles cellules demeure inconnue (14). Ce modèle pourrait également apporter une meilleure conception des changements phénotypiques des cellules pancréatiques, ce qui pourrait aider à comprendre et à contrôler la régénération des cellules β chez l'adulte, et ainsi mener à une meilleure thérapie pour les gens souffrants de diabète.

L'équipe du docteur Lawrence Rosenberg a mis au point un modèle *in-vitro* de transformation d'îlots de langerhans humains en kystes qui sont composés de cellules du système canalaire. Dans ce processus, les îlots de langerhans sont isolés, puis enveloppés dans une matrice de collagène de type I en présence d'un milieu défini une semaine après l'isolation. Les changements qui mènent à la transformation des îlots en kystes semblent se faire en deux étapes, impliquant la mort cellulaire et des changements dans le phénotype cellulaire. De plus, après traitement avec un peptide de 15 aa dérivé de la portion active de la protéine associée à la régénération des îlots (INGAP¹⁰⁴⁻¹¹⁸) (15), les kystes obtenus peuvent être retransformés en structures tridimensionnelles qui contiennent les mêmes types de cellules et produisent les mêmes hormones que les îlots (16).

Pour plusieurs types cellulaires, la stabilité phénotypique est conférée par l'environnement, c'est-à-dire les protéines de la matrice extracellulaire (collagène de type I, laminine) (4;17) et différents facteurs de croissances comme TGF- β , α et FGF-2 (17-19). L'isolation des îlots mène à la destruction des interactions avec la matrice et détruit peut-être d'importantes interactions îlots-matrice et îlots-cellules acini (11;18). Les voies intracellulaires qui médient l'effet de ces interactions ont été associées aux voies de différenciation et de mort cellulaire (20;21). Il a été montré que la balance des signaux des ERK et de la sérine-thréonine kinase Akt ainsi que des signaux des JNK/caspase3 semble définir les deux phases de ce modèle de transformation des îlots en cellules du système canalaire (10). L'activation des deux premières (ERK et Akt) a été impliquée dans la survie

et la différenciation de nombreux types cellulaires, alors que les dernières sont reconnues pour participer à l'induction de l'apoptose dans plusieurs types de cellule (21).

Les îlots fraîchement isolés sont des structures sphériques pleines composées de cellules quiescentes. Les changements phénotypiques observés lors de la transformation des îlots commencent trois jours après que ces derniers aient été placés dans la matrice de collagène. Les changements sont d'abord observés sur le pourtour de l'îlot, puis se poursuivent jusqu'à ce que toute la structure solide de l'îlot ait été remplacée par le kyste, une monocouche de cellules hautement prolifératives ne présentant plus aucune caractéristique endocrine. Ces changements sont accompagnés d'un déclin dans la production d'hormones des cellules d'îlots. Au jour trois, la production d'insuline, de glucagon et de somatostatine baisse d'environ 80%. Au jour douze, les niveaux d'hormones ne sont plus détectables par immunohistochimie. Les cellules de kystes ont été analysées avec la cytokératine-19 (CK-19) comme marqueur des cellules canalaire. Au jour zéro, aucune cellule immunoréactive pour la cytokératine n'est détectée. Au jour six, plus de 95% de la population cellulaire semble s'être transformée en kyste (10).

L'apoptose des cellules a été vérifiée par un essai « cell death ELISA » (Roche diagnostics, Montreal, Qc, Canada). Cet ELISA est utilisé pour la détection quantitative des fragments d'ADN associés aux histones dans des oligonucléosomes, qui sont un marqueur des cellules apoptotiques. Au jour trois, les cellules montrent 57% moins d'apoptose qu'au jour zéro, au jour six la mortalité diminue de 42% et finalement, au jour douze la mortalité chute d'encre 20%. Des essais de co-immunoprécipitation avec la somatostatine, le glucagon et l'insuline avec le TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling) ont été faits pour déterminer quelles cellules entraînent en apoptose. La majorité des cellules entrant en apoptose semblent être les cellules β . Cependant, nous n'avons aucune certitude sur l'identité des cellules d'îlots qui se transforment en cellules du système canalaire (10). Il pourrait s'agir d'un des quatre types de cellules, d'une combinaison de ces cellules, ou bien d'un type cellulaire inconnu (figure 1). Des expériences de co-immunomarquage avec les hormones d'îlots et le CK-19 ont été faites afin de tenter de déterminer quel type de cellule est à l'origine de l'apparition

des kystes. Le CK-19 colocalise avec la somatostatine et le glucagon, mais pas avec l'insuline. Cela renforce l'hypothèse selon laquelle les cellules β à l'intérieur de l'îlot meurent par apoptose alors que les cellules de l'extérieur de l'îlot se transforment (16).

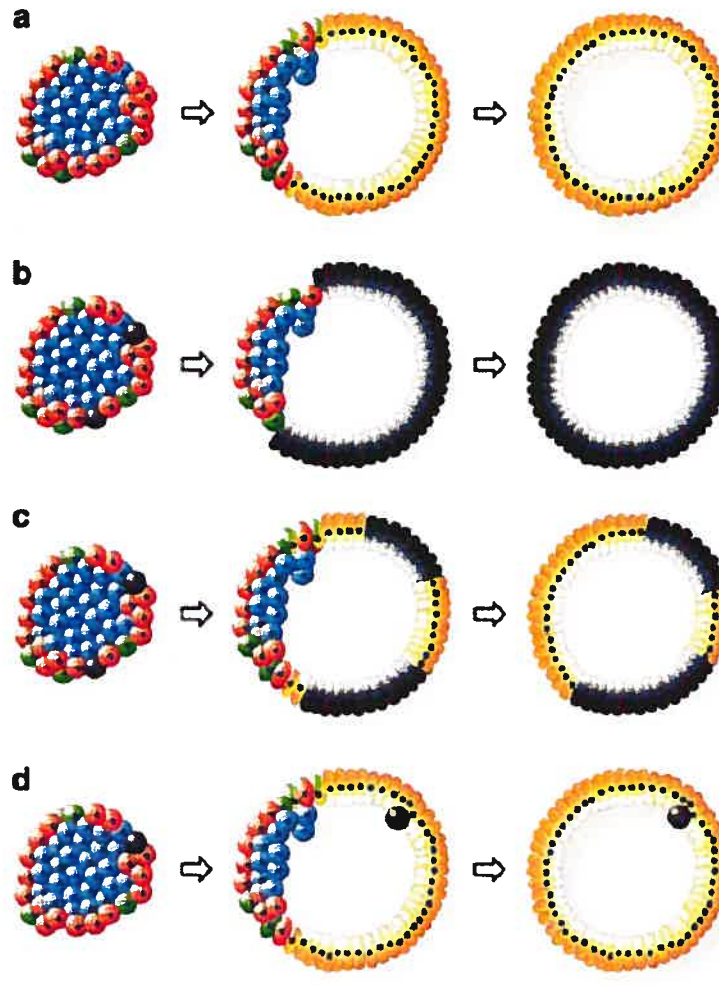


Figure 1: Mécanismes proposés du passage de la structure tridimensionnelle et fixe des îlots à une monocouche de cellules en division.

a. Des cellules endocrines en périphérie se transforment, avec une perte des cellules β internes et aucune participation de cellules souches.

b. Quelques cellules souches réparties dans l'îlot forment toutes les cellules kystiques, sans participation des cellules endocrines.

c. Les cellules kystiques proviennent à la fois de cellules endocrines en périphérie et de cellules souches.

d. Les cellules kystiques proviennent des cellules en périphérie, mais des cellules souches restent associées à la structure kystique, sans participer à la formation du kyste.

Cellules bleues : cellules β

Cellules rouges : cellules α

Cellules vertes : cellules δ

Cellules noires : cellules souches

1.1.2 Marquage des cellules d'îlots de langerhans

L'étude de la transformation des cellules endocrines du pancréas pourrait être facilitée par l'expression ectopique d'un gène rapporteur, comme la protéine verte fluorescente (GFP). Cette protéine, isolée de la méduse *Aequorea victoria*, a été clonée et séquencée pour la première fois en 1992 (22). Elle a depuis été largement utilisée comme gène rapporteur (23). Depuis 1995, cette protéine est aussi utilisée comme gène rapporteur dans des vecteurs viraux puisqu'elle comporte plusieurs avantages comme une fluorescence intrinsèque donc indépendante de tout co-facteurs ou substrat et une résistance à la photo-instabilité permettant une détection sur une longue période de temps. De plus, elle semble non toxique et ne nuit pas à la croissance des cellules et à leurs fonctions (24).

L'expression de la GFP pourrait être faite de manière spécifique dans chaque type de cellule endocrine en utilisant les promoteurs exprimés de manière caractéristique dans ces cellules, permettant ainsi de suivre leur destin au cours de la transformation des îlots en kyste.

1.1.2.1 Vecteurs viraux

Plusieurs types de vecteurs viraux ont déjà été utilisés afin de marquer les cellules des îlots de langerhans. Le type de virus qui a été le plus utilisé jusqu'ici est l'adénovirus. Les adénovirus (Ad) ont été isolés pour la première fois dans les années 50 comme les agents responsables d'infections mineures comme les rhumes, les conjonctivites ou les gastro-entérites. Il y a plus de 100 sérotypes d'adénovirus actuellement identifiés à ce jour, chez les mammifères et les oiseaux. Le virion adénovirus est une particule non enveloppée, de forme icosaédrique de 70 à 100 nm de diamètre composée de 252 capsomères et contenant un génome linéaire d'ADN double brin de 25 à 45 kb variable selon le sérotype. Les sérotypes Ad2 et Ad5 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. Ces deux sérotypes peuvent être propagés *in vitro* avec de bons rendements (25). Les vecteurs adénovirus sont utilisés depuis longtemps et ils ont subis diverses modifications. Les vecteurs de première génération possèdent une délétion de la région E1, qui contient des gènes nécessaires à la réplication des adénovirus. Ces virus ne peuvent se répliquer que dans des cellules possédant la région E1, afin de pouvoir compléter la délétion du virus. Ces vecteurs comprennent aussi parfois une délétion de la région E3, qui n'est pas essentielle à la réplication du virus. Des vecteurs de seconde génération ont ensuite été créés. Ces vecteurs ont également une région E1 et/ou E3 déléetée, mais ils ont également des délétions dans les régions essentielles E4, E2A ou E2B et ont besoin d'une seconde complémentation afin de pouvoir se répliquer. Finalement, des vecteurs viraux de troisième génération, déléetés de tous les gènes viraux et ayant besoin de la présence d'un adénovirus-aide pour leur réplication ont été créés. La fibre (protéine qui détermine la spécificité de l'attachement des adénovirus à la cellule) des vecteurs adénovirus peut également être modifiée afin de permettre l'attachement de ces virus à des cellules autres que celles définies par leur tropisme naturel ou un meilleur attachement aux cellules n'exprimant pas beaucoup le CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor). Des recherches ont déjà démontré que de tels vecteurs sont beaucoup plus efficaces à basse MOI pour l'infection de cellules endocrines du pancréas que les vecteurs adénovirus non-modifiés (26). Les vecteurs adénovirus se maintiennent de manière épisomale dans la cellule. Ils ne peuvent donc pas causer de mutations en s'intégrant aléatoirement, mais leur expression n'est pas stable à long terme dans des cellules en division. Des recherches ont été faites afin de prolonger l'expression des gènes portés par des vecteurs adénovirus lors de la prolifération cellulaire. Deux principales stratégies ont été utilisées jusqu'ici : l'intégration dans le génome de la cellule grâce à des chimères avec différents virus (rétrovirus (27;28) ou AAV (29;30)) ou avec l'aide d'une transposase (31) et la réplication épisomale de l'ADN viral (32;33).

Les lentivirus, des virus à ARN enveloppés, sont un second type de vecteur utilisé dans les îlots de langerhans. Les lentivirus utilisés pour infecter les îlots sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) mais sont déléetés de tous les gènes viraux. Ils ne peuvent donc pas se répliquer seuls, car les éléments nécessaires à leur réplication

doivent leur être apportés en *trans*. Les lentivirus ne peuvent pas être produits à des titres aussi élevés que ceux obtenus pour les adénovirus. Les lentivirus ont la capacité de transduire les cellules quiescentes. De plus, ils s'intègrent de façon stable dans le génome, permettant ainsi une expression continue du transgène (34). D'autres études ont également montrées que des vecteurs basés sur les lentivirus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) et de l'immunodéficience féline (FIV) peuvent transduire les cellules des îlots de langerhans, mais avec une efficacité moindre que celles des vecteurs lentivirus basés sur le VIH (35). Comme tous les éléments doivent être apportés en *trans* pour la production de ce type de vecteur, le tropisme des lentivirus peut facilement être modifié en changeant l'enveloppe du virus. Jusqu'ici, l'enveloppe la plus efficace pour la transduction des îlots semble être celle du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (36).

Des études ont prouvé qu'à des MOI équivalentes, les vecteurs adénovirus et lentivirus ont des efficacités de transduction similaires dans les cellules endocrines du pancréas, soit une efficacité de transduction variant de 55 à 70%, pour une MOI de 5000 par îlot. Un îlot comportant environ 1000 cellules, une MOI de 5000 par îlots correspond à 5 particules virales infectieuses par cellule. Comme les îlots sont une structure en trois dimensions, il est normal que les cellules en périphérie (autres que les cellules β) soient plus accessibles. Par contre, si les îlots sont dispersés en une monocouche de cellules, l'efficacité de transduction peut être augmentée jusqu'à frôler les 100%, que ce soit pour les vecteurs adénovirus ou lentivirus (37-39). De plus, les cellules β infectées par les deux types de vecteurs montrent une sécrétion d'insuline comparable à celle des cellules non infectées en réponse à l'augmentation de la concentration du glucose dans le milieu, ce qui indique que l'infection par ces deux vecteurs n'affecte pas la fonction de ces cellules. Toutefois, les cellules endocrines infectées par les vecteurs adénovirus montrent une fluorescence plus élevée en moyenne que celles infectées par les vecteurs lentivirus, bien que les délais observés avant l'apparition de la fluorescence soient similaires (40).

Le troisième type de vecteur viral utilisé couramment dans les îlots de langerhans est dérivé des virus associés aux adénovirus (AAV) (41-44). Ce sont des virus à ADN simple brin non-enveloppés dont le génome est composé de deux ITR (inverted terminal

repeat) encadrant les gènes viraux Rep et Cap. Ils requièrent la présence d'un autre virus (adénovirus, herpès, vaccinia ou cytomégalovirus) pour leur réplication. Les AAV peuvent infecter les cellules qui ne se divisent pas et ils ne sont associés à aucune pathologie chez l'humain. Ils s'intègrent dans le génome humain, préférentiellement dans le chromosome 19. Les vecteurs AAV ne contiennent aucun gène viral et sont composés uniquement du transgène encadré par les deux ITR viraux. Ils ne peuvent être produits sans l'apport des gènes AAV et d'un adénovirus-aide (ou autre virus) ou de gènes adénoviraux apportés par un plasmide. Ils sont difficiles à produire en grande quantité (45;46). Les vecteurs AAV ne s'intègrent pas car ils ont besoin des protéines Rep pour le faire. Il existe six sérotypes connus d'AAV humains. Deux sérotypes d'AAV simiesque (sérotypes 7 et 8) ont également été utilisés pour la thérapie génique chez l'humain (47). Les sérotypes 2, 6 et 8 sont les plus efficaces pour l'infection d'îlots humains (48). Le changement de sérotype des vecteurs est facile (par la capsid, gène Cap) et permet le redirigement.

L'efficacité de transduction pour les cellules endocrines du pancréas est environ sept fois plus grande pour les vecteurs adénovirus que pour les vecteurs AAV. L'expression des gènes exprimés par ce dernier type de virus dans le pancréas est décalée dans le temps par rapport aux vecteurs adénovirus, avec un maximum d'expression après quatre semaines, alors que les gènes apportés par des vecteurs adénovirus montrent un maximum d'expression après une semaine (44). En effet, les AAV sont normalement des virus à l'ADN simple brin. Cet ADN ne peut être transcrit avant d'être converti en un ADN double brin, ce qui augmente le délai avant l'apparition dans la cellule de la nouvelle protéine par rapport aux autres types de vecteurs. Certains vecteurs AAV capables d'encapsider un ADN double brin ont été créés. Ces nouveaux vecteurs montrent une meilleure capacité d'infection des îlots de langerhans que les vecteurs standards simple brin et un délai d'expression plus court. Cependant, la taille de l'ADN pouvant être encapsidé y est considérablement réduite, celui-ci devant être inférieur à 2,5 kb alors que les vecteurs AAV standards peuvent encapsider jusqu'à 4,5 kb (48).

Finalement quelques études sur l'infectabilité des îlots ont utilisé les virus de l'herpès simplex (49;50) et les baculovirus (51). Ces deux virus semblent avoir une bonne

efficacité de transduction des îlots, sans nuire à leur capacité de réagir à la présence de glucose.

	Adénovirus	Lentivirus	AAV
Caractéristique			
Production	Titres élevés	Titres moins élevés que les adénovirus	Difficiles à produire
Intégration	Ne s'intègrent pas (peuvent s'intégrer ou se maintenir de manière épisomale après d'importantes modifications)	S'intègrent aléatoirement	S'intègrent de manière spécifique en présence de Rep
Infection des îlots	Bonne efficacité (55-70%)	Bonne efficacité (55-70%)	Moins efficace (10%)
Expression dans les îlots	Forte expression	Moins bonne expression que les Ad	Forte expression
Délai avant l'expression	Court (24-48 heures)	Court (24-48 heures)	Long (une semaine) Court pour AAV double brin
Gènes viraux	Dépendamment des types de vecteurs (moins il y a de gènes viraux, plus les vecteurs sont difficiles à produire)	Aucun	Aucun
Capacité d'encapsidation	Grande (moins il y a de gènes viraux, plus la capacité d'encapsidation est grande)	Grande	Faible (4.5kb pour les vecteurs simple brin, 2,5 kb pour les vecteurs double brins)
Altération du tropisme	Modification de la fibre (compliqué)	Changement d'enveloppe (simple)	Changement de sérotype (simple)

Tableau I : Caractéristiques comparées des principaux vecteurs viraux dans l'infection d'îlots de langerhans

1.1.2.2 Vecteurs non-viraux

Des études de transfections transitoires avec des transporteurs liposomals et polymériques (lipofectamine et superfect) ont également été faites sur des îlots de

langerhans humains. Ces méthodes d'apport de gènes aux cellules d'îlots ont une efficacité de beaucoup inférieure aux vecteurs viraux. En effet, le pourcentage maximum de cellules d'îlots exprimant le gène rapporteur que les chercheurs ont réussi à atteindre n'est que de 6%. Encore une fois, la fonctionnalité des îlots a été testée en mesurant la réponse des cellules β à l'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu. La transfection des cellules avec ces transporteurs ne semblent pas perturber leur fonctionnalité (52;53).

La biolistique est une autre méthode qui a été utilisée pour introduire des gènes dans les îlots de langerhans. La transfection biolistique consiste à faire pénétrer à l'intérieur des cellules des billes de tungstène ou d'or recouvertes d'ADN. Les billes sont placées dans de l'hélium gazeux sous haute pression et pénètrent jusqu'au cytosol de la cellule, où l'ADN est solubilisé puis exprimé.

Après la transfection, environ trois pour cent des cellules montraient une expression du gène rapporteur. Cependant, seulement 53% des îlots étaient viables suite au bombardement. L'expression du gène rapporteur était 35 fois plus élevée suite à la transfection par la biolistique qu'après la transfection à la lipofectamine mais 25 fois moins élevée que lorsque le gène était introduit via un vecteur adénovirus à une MOI de 2500 par îlot. La fonctionnalité des îlots survivants a de nouveau été testée en mesurant la réponse des cellules β à l'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu. La biolistique ne semble pas perturber la fonctionnalité des îlots survivants, bien qu'elle réduise de façon très significative la viabilité globale des îlots (54).

1.1.2.3 Choix des vecteurs

Nous avons préféré utiliser les vecteurs adénovirus, car nous avons besoin d'une expression forte et rapide du gène rapporteur. De plus ils sont faciles à produire et à purifier. Le marquage de cellules d'îlots de manière spécifique à l'aide de vecteurs adénovirus exprimant la GFP a déjà été fait, pour l'isolation et l'étude des cellules β du pancréas. La GFP était alors sous le contrôle du promoteur de l'insuline (55;56). La MOI

utilisée pour infecter les îlots se situait entre 10^2 et 10^4 particules infectieuses par cellule, pour un compte d'environ 1000 cellules par îlot (57).

Cependant, les adénovirus contiennent des gènes qui peuvent initier et moduler la mort cellulaire par l'induction ou la suppression de processus spécifiques dans la cellule hôte, ces effets étant dépendants du génome de l'adénovirus et du type de cellule infectée (58). En effet, des études menées sur des îlots humains ont montré qu'à des MOI de 10^2 particules virales par cellule, des adénovirus présentant une délétion de la région E4 seulement induisaient la mort d'environ 50% des cellules, alors qu'à la même MOI des adénovirus présentant une délétion E1 et E3 induisaient la mort de seulement 10% des cellules (59).

D'autres études ont montré qu'à partir de MOI de 10^3 particules virales infectieuses par cellule, les cellules des îlots de langerhans infectées avec des vecteurs $\Delta E1$ et $\Delta E3$ présentent une forte apoptose, qui n'est pas présente lorsqu'elles sont infectées à des MOI allant de 10^1 à 10^2 . Par contre, les cellules restantes semblent avoir une production normale d'insuline en réponse au taux de glucose dans le milieu (60).

Les adénovirus ne se maintiennent pas dans les cellules en division. Cependant, comme les gènes portés par les vecteurs viraux seront sous le contrôle de promoteurs spécifiques qui ne seront plus actifs lorsque les cellules commenceront à se différencier et à se diviser nous n'avons pas à en tenir compte. Par contre, ces vecteurs ne pourraient pas être utilisés lors d'études où les îlots seraient transformés en kystes puis les kystes retransformés en îlots.

Au cas où les promoteurs spécifiques utilisés pour marquer les cellules d'îlots ne produiraient pas assez de gène rapporteur et nécessiteraient une MOI élevée, nous avons pensé utiliser un promoteur inductible très puissant mis au point dans notre laboratoire afin de diminuer la MOI nécessaire au marquage. Il s'agit du promoteur inductible au cumate.

1.2 Le système cumate

1.2.1 Les systèmes régulables

Il peut être utile de réguler l'expression de gène pour les études fonctionnelles dans les cellules de mammifères. En effet, la capacité de réguler le niveau et la durée d'expression d'un gène peut être profitable dans les cas où la protéine exprimée s'avère toxique ou nuisible pour la cellule. De nombreux systèmes inductibles utilisant des métaux lourds, des hormones ou autres ont été créés afin de répondre à ce besoin (61-63). Par contre, l'utilisation de ces molécules peut avoir des effets sur les cellules, que ce soit *in-vivo* ou *in-vitro*. L'utilisation d'hormones d'insecte a aussi été proposée afin de minimiser l'effet sur les cellules animales (64).

Le système régulable le plus utilisé est sans aucun doute le système tétracycline. Ce système est basé sur les éléments de l'opéron de résistance à la tétracycline de la bactérie *Escherichia coli*. Il exploite la spécificité du répresseur tet (tetR) pour la séquence opératrice tet (TetO) et la sensibilité du tetR pour la tétracycline. En absence de tétracycline ou d'un de ses analogues, le tetR se lie à la séquence d'ADN TetO. En présence de ces composants, le tetR change de conformation et libère l'ADN. L'extrémité COOH du tetR a été fusionnée à l'extrémité COOH du transactivateur du virus de l'herpès simplex (VP16) afin de créer un transactivateur capable d'activer un promoteur composé de sept séquences TetO suivi du promoteur minimal (boite TATA) du cytomegalovirus. Le transactivateur se lie à l'ADN en absence de tétracycline ou de ses analogues.

Malgré la diversité des systèmes régulables disponibles, il existe un besoin pour des moyens de régulation additionnels, comme le montre la variété de nouveaux systèmes apparus récemment (65-67). La diversité des systèmes régulables est nécessaire afin de pouvoir contrôler simultanément et indépendamment plusieurs gènes dans un même système (68).

Notre laboratoire travaille sur l'élaboration d'un nouveau système inductible basé sur le même principe que le système régulable à la tétracycline (69). Le système cumate est

un système d'expression pour les cellules de mammifères (70). Il est dérivé de l'opéron *p-Cymène* de la bactérie *Pseudomonas putida F1* (71;72). Cet opéron contient les gènes responsables de la dégradation du *p*-cymène (ou *p*-isopropyltoluène, une molécule trouvée dans les huiles volatiles de plusieurs espèces de plantes) en *p*-cumate (*p*-isopropylbenzoate). Cet opéron est suivi de l'opéron *cmt*, qui est responsable de la dégradation du *p*-cumate en isobutyrate, pyruvate, et acetyl coenzyme A. Les séquences d'ADN inversées régulant l'expression de ces gènes sont appelées P1 et P2. La transcription des gènes est réprimée par une protéine de 28 kDa, le répresseur de l'opérateur cumate (CymR) (figure 2). Cette protéine lie l'ADN seulement en présence de cumate ou de cymène, les molécules effectrices.

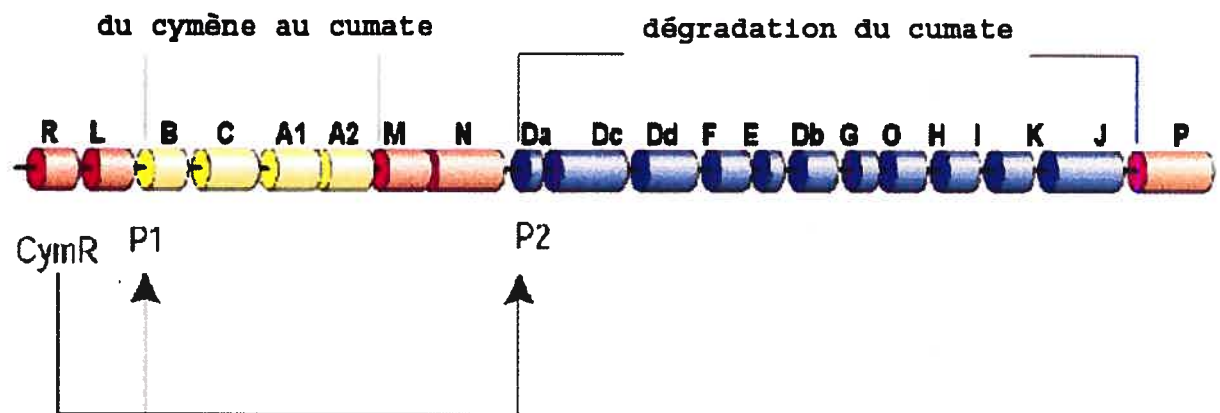


Figure 2: Schématisation des opérons *p*-cymène et *cmt* de la bactérie *Pseudomonas putida F1*. (Voir explications dans le texte)

Ces propriétés ont été utilisées afin de contrôler l'expression de gènes dans les cellules de mammifères. Il existe deux stratégies différentes pour contrôler l'expression (figure 3) de la protéine. Dans la première stratégie, la séquence CuO (P2) est placée en aval d'un promoteur constitutif. La répression de la transcription est causée par le répresseur (CymR) lors de la liaison de ce dernier à l'opérateur en absence du cumate. Lors de l'ajout de cumate à des concentrations non toxiques pour la cellule, la répression est levée. La seconde stratégie en est une d'activation. La séquence CuO est répétée six fois et

est suivie des éléments minimaux du promoteur des gènes immédiats précoces du cytomégalo virus humain (boite TATA). Le promoteur ainsi créé est appelé le promoteur inductible au cumate, ou CR5. L'activation de la transcription se fait par le transactivateur (cTa) lors de la liaison de celui-ci à l'opérateur en absence de cumate. Le cTa est une molécule hybride formée de la fusion entre l'extrémité carboxyle du CymR et celle du VP16. Un petit peptide de cinq glycines forme le lien entre le CymR et le VP16. En présence de cumate, le transactivateur ne peut plus se lier à l'opérateur empêchant ainsi la transcription (70).

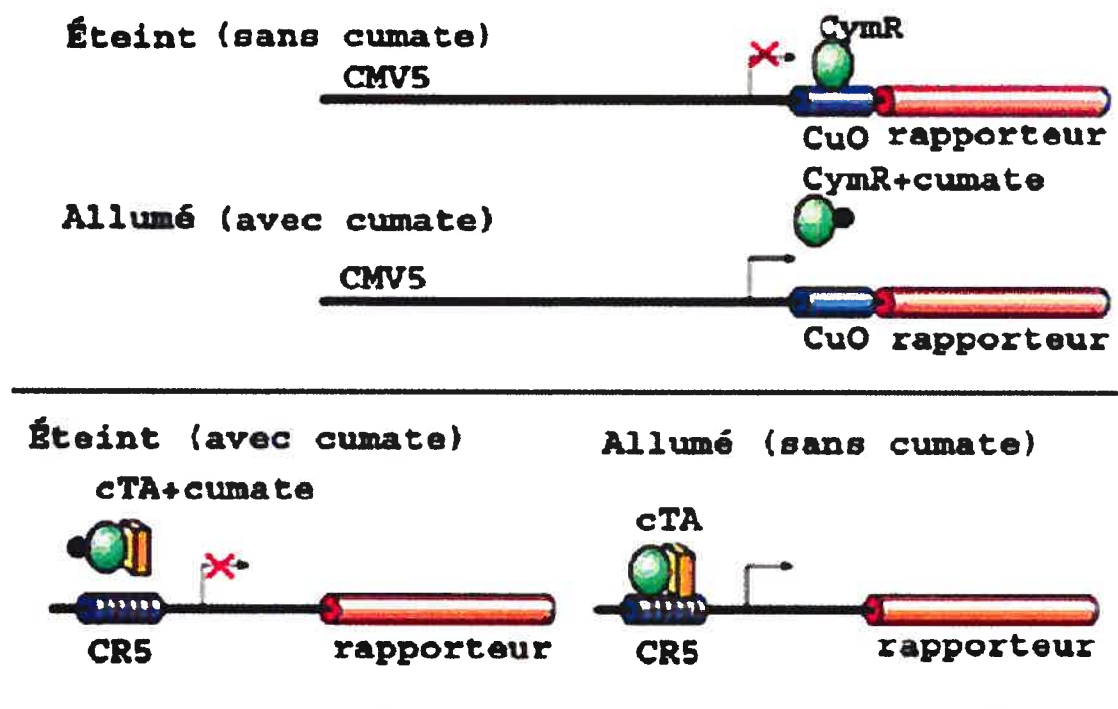


Figure 3 : Configuration de type répresseur et activateur du système cumate
(voir détails dans le texte)

La comparaison des systèmes inductibles à la tétracycline et au cumate en configuration de type activateur par des infections d'adénovirus dans les cellules Hela (qui ne répliquent pas les adénovirus) montre que le promoteur CR5 est beaucoup plus actif que le promoteur tétracycline et ce même en présence de dix fois moins de transactivateur. Le promoteur CR5 est aussi 30 fois plus actif que le promoteur CMV5 dans ces cellules (70;73). Le promoteur CMV5 a également été mis au point dans notre laboratoire. Il s'agit de la fusion du promoteur CMV du cytomégalo virus avec le leader tripartite et l'intron de

l'adénovirus de type 5. Cette nouvelle configuration améliore de dix fois la performance du promoteur dans les cellules 293a (73). La même configuration est utilisée pour le promoteur CR5, qui est donc identique au promoteur CMV5 à partir de la boîte TATA (73) (figure 4).

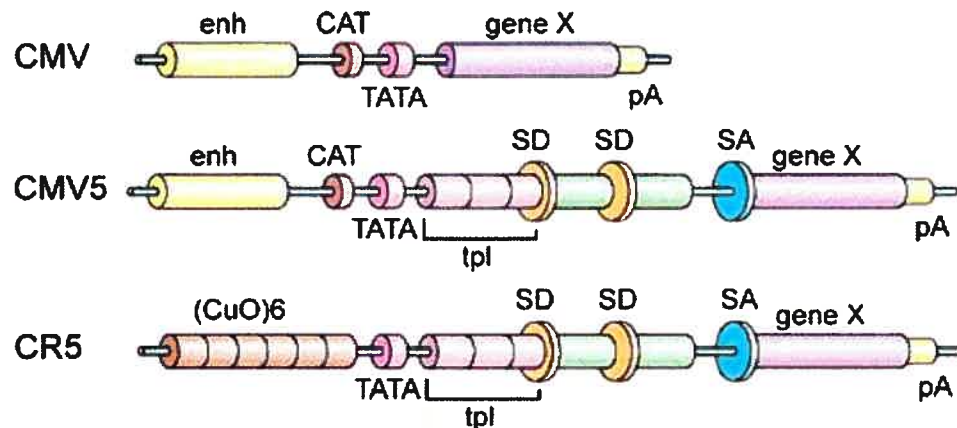


Figure 4: Comparaison de la structure des promoteurs CMV, CMV5 et CR5
enh : enhancer, activateur **cat** : Boîte Cat **TATA** : Boîte TATA **pA** : signal de poly-Adénylation
tpl : tripartite leader de l'adénovirus **SD** : site donneur de l'intron de l'adénovirus
SA : Site accepteur de l'intron de l'adénovirus **CuO** : séquence opératrice cumate

La grande efficacité du promoteur CR5 à de faibles MOI permet de minimiser la charge virale nécessaire à la bonne expression des gènes dans la cellule. Ceci est très utile dans les études fonctionnelles, qui peuvent être influencées par la quantité de virus dans chaque cellule. En effet, il a été montré que les virus pouvaient causer des dommages cellulaires, surtout lorsqu'ils sont utilisés à de fortes MOI (74-76).

1.2.2 Infection des îlots de langerhans avec le promoteur inductible au cumate

Pour marquer les îlots de langerhans avec la plus grande efficacité possible, dans l'hypothèse où les promoteurs spécifiques ne produiraient pas assez du gène rapporteur, nous pourrions faire des co-infections où le cTA serait sous le contrôle des promoteurs spécifiques à chaque cellule dans un vecteur adénovirus, alors que la GFP serait sous le contrôle du promoteur CR5 dans un autre vecteur. Toutes les cellules seraient infectées par les virus. Cependant, les seules cellules vertes seraient celles où le promoteur contrôlant le cTA est actif (Figure 5).

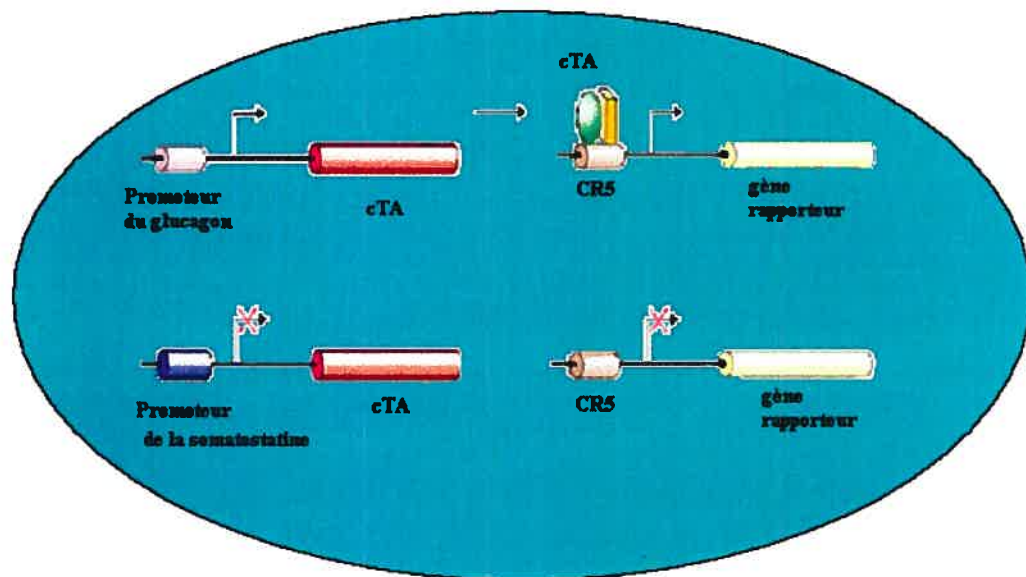


Figure 5: Exemple de co-infection d'une cellule α
(voir détails dans le texte)

Un tel système a déjà été utilisé avec le promoteur tétracycline. Le promoteur de l'insuline contrôlait alors la transcription du transactivateur et le promoteur du système régulalement à la tétracycline le gène d'intérêt (77;78).

1.2.3 Modifications de promoteurs inductibles

Le promoteur inductible à la tétracycline a été utilisé pour de nombreuses études aux fil des ans, et de nombreuses modifications lui ont été apportées afin d'augmenter son efficacité ou sa régulation (79-82). Par exemple, on a utilisé un répresseur afin de bloquer la transcription basale, et la fusion d'un domaine répresseur au TetR afin de générer une molécule qui éteint l'activité du promoteur. Un autre groupe a également utilisé un promoteur MMTV (mouse mammary tumor virus) modifié en remplacement du promoteur minimal du CMV afin de diminuer le niveau d'expression basal du promoteur régulable à la tétracycline (83). Des recherches ont aussi montré qu'un tTA au domaine VP16 tronqué est mieux toléré par les cellule (84).

Ces modifications pourraient théoriquement avoir le même effet si elles étaient apportées au promoteur régulable au cumate. Des modifications apportées par le groupe de Lotze (82) au promoteur tétracycline sont particulièrement intéressantes en ce qui nous concerne. En modifiant le nombre de base séparant deux séquences TetO, ils sont arrivés à construire un promoteur qui, pour le même nombre de séquences TetO, était environ quatre fois plus efficace. La puissance du promoteur augmente aussi avec l'addition de séquences TetO. La modification du nombre de paires de bases séparant deux séquences change le côté de la double hélice d'ADN où ces dernières seront situées, et par conséquent le côté de l'hélice où se fera la liaison des multiples tTA. Des hypothèses ont été formulées sur le fait que la synergie qui accompagne l'accumulation de plusieurs molécules de VP16 passe par la formation d'un complexe en épingle à cheveux des molécules transactivatrices sur le même côté de l'hélice d'ADN (85). De plus, un modèle a été proposé par Lederer dans lequel la liaison tetR-tetO impliquait un relâchement de la double hélice de 0,4 tours entre deux TetO séparés par 30 paires de bases, ce qui place les deux transactivateurs sur des côtés opposés de l'hélice (86). Dans le promoteur original, les centres de deux séquences TetO sont séparés par 30 paires de bases, ce qui place possiblement les deux molécules transactivatrices sur les côtés opposés de la double hélice, réduisant ainsi éventuellement la synergie entre deux transactivateurs. Effectivement, les conditions d'efficacité maximale du promoteur modifié semblent être celles où deux TetO consécutifs sont sur des côtés

opposés de la double hélice (26, 36 et 47 paires de bases séparant deux centres), ce qui signifie que lors de la liaison des tTA, ces derniers se retrouvent sur le même côté de la double hélice selon le modèle de Lederer. L'efficacité maximale a été observée lorsque 36 paires de bases séparent deux séquences opératrices.

L'efficacité de la régulation a quant à elle été améliorée par la modification de la position du promoteur minimal en aval du dernier TetO. La configuration optimale pour la régulation la plus efficace est celle où le promoteur minimal est placé à dix paires de bases du dernier TetO (un tour d'hélice). Ceci permet d'obtenir un ratio allumé/éteint de 50 000, alors que le promoteur dans sa configuration originale (avec un espacement de 39 paires de bases entre le promoteur minimal et le dernier TetO) avait un ratio de 2000. Le niveau basal est extrêmement diminué (sous la barre de détection par ELISA). Par contre, le niveau de protéine obtenu lorsque le promoteur est dans un état actif diminue également (environ trois fois moins de protéine produite). La combinaison des deux modifications permet quant à elle d'atteindre un ratio allumé/éteint de 100 000.

Les modifications décrites plus haut pourraient permettre d'améliorer la puissance et la régulation du promoteur inductible au cumate car il a un fonctionnement similaire à celui du promoteur inductible à la tétracycline.

1.2.4 Le système cumate inverse

Certaines études fonctionnelles nécessitent un contrôle très étanche de la production de la protéine par le promoteur régulable. Afin d'améliorer cette étanchéité, une molécule possédant un domaine répresseur à la place du domaine activateur pourrait être utilisée. Dans cette optique, une librairie de mutants a été créée à partir du répresseur original afin de rechercher une nouvelle molécule qui lierait l'opérateur cumate en présence de cumate ou de cymène, plutôt que l'inverse. Un tel CymR à l'activité inversée, fusionné à un domaine répresseur, permettrait de diminuer le niveau basal du promoteur en présence de cumate. En absence de cumate, l'activité du promoteur serait assurée par le transactivateur original. Un tel répresseur a été trouvé, puis fusionné avec le VP16 afin de créer un transactivateur, appelé le cTA inverse (rcTA), qui sera utilisé pour caractériser la nouvelle molécule. La séquence d'ADN codant pour ce répresseur présente trois modifications (aux positions 125, 142 et 144) qui la distingue de la séquence originale (87) (figure 6).

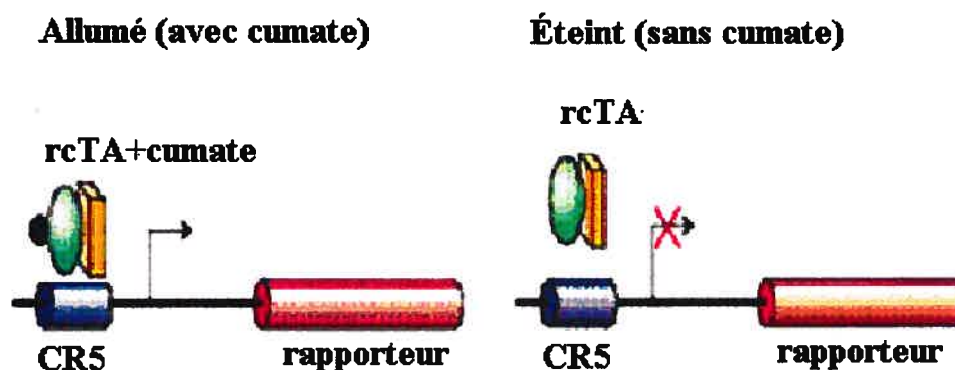


Figure 6: Activation du système cumate avec le transactivateur inverse
(voir détails dans le texte)

1.3 Objectifs

L'objectif global de cette maîtrise était de produire des vecteurs viraux efficaces pour la transduction de la majorité des cellules primaires et transformées avec le minimum d'interférence sur leur physiologie.

Nous avons d'abord fabriqué et testé des vecteurs adénovirus afin de pouvoir suivre le destin de chaque type de cellules d'îlots de langerhans dans leur transformation en cellules de kyste.

Nous avons également testé différents promoteurs dans les cellules C2C12 et les îlots de langerhans, afin d'illustrer la différence de puissance de ces promoteurs selon le type de cellule et l'état de différenciation.

L'optimisation du promoteur régulable au cumate entre également dans la poursuite de l'objectif global. Nous avons d'abord appliqué au promoteur cumate des modifications comparables à celles faites sur le promoteur tétracycline par le groupe de Lotze afin de tenter d'augmenter la puissance et l'efficacité de la régulation de notre promoteur. Par la suite, nous avons caractérisé la nouvelle molécule transactivatrice inverse (rcTA), par des expériences de transfection transitoire.

Section 2 :
Matériel et méthode

2.1 Constructions des plasmides

2.1.1 Vecteurs de transfert adénoviraux

Toutes les enzymes utilisées proviennent de New England Biolabs, Beverly, Mass., É-U.

La GFP (Green Fluorescent Protein) utilisée dans la construction des plasmides est la GFPq de Qbiogène (Qbiogène-MP biomedicals, É-U).

Les plasmides appelés pAd construits dans le cadre de ce mémoire possèdent tous la même structure. Ils comprennent une région d'homologie identique avec l'adénovirus de type 5 (Ad5), une origine de réplication bactérienne (ori), un gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase), le gène de la protéase de l'adénovirus sous le contrôle du promoteur mlp (major late promoter) et la cassette d'expression, qui est composée d'un promoteur et du ou des gènes d'intérêt (88).

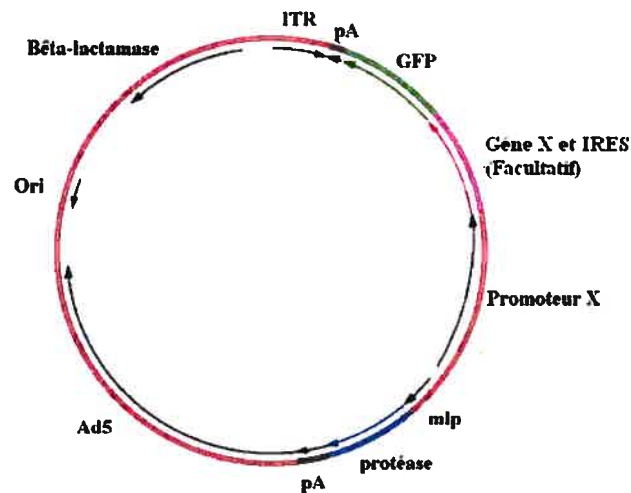


Figure 7 : Carte générale des vecteurs adénovirus

pAdCR5/cTA-IRES-GFP

Le fragment de 1808 paires de bases cTA-IRES a été isolé du pAdCMV/cTA-IRES-GFP en utilisant les enzymes BglII et NheI. Le vecteur pAdCR5/IRES-GFP a également été coupé avec ces mêmes enzymes, puis déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés sur un gel d'agarose (Wisent, Canada) 0,8% en utilisant le "QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit" (Qiagen Inc) et élués dans 30 μ L de tampon. Les fragments ont ensuite été ligués (2 μ L de vecteur et 3 μ L d'insert, dans un volume total de 20 μ L) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

pAdCMV5/IRES-GFP

Le fragment de 781 paires de bases contenant le début du promoteur CMV5 a été isolé du pLCMV5/GFP (sera décrit plus loin) digéré avec XhoI. Le vecteur pAdCR5/IRES-GFP a également été digéré avec cette enzyme, puis il a été déphosphorylé avec l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés sur un gel d'agarose 0,8% (Wisent, Canada) en utilisant le "QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit" (Qiagen Inc) et élués dans 30 μ L de tampon. Les fragments ont ensuite été ligués en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase (1 μ L insert et 0,8 μ L vecteur dans un volume total de 20 μ L) et incubés 16 heures à 16°C.

pAdCMV5/cTA-IRES-GFP

Le fragment de 1808 paires de bases cTA-IRES a été isolé du pAdCR5/cTA-IRES-GFP en utilisant les enzymes BglII et NheI. Le vecteur pAdCMV5/IRES-GFP (89) a également été coupé avec ces mêmes enzymes, puis déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés sur un gel d'agarose (Wisent, Canada) 0,8% en utilisant le "QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élués dans 30 μ L de tampon. Les fragments ont ensuite été ligués (1 μ L de

vecteur et 2 μL d'insert, dans une réaction de 20 μL total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

pAdCMV/rcTA-IRES-GFP

Le fragment de 1046 paires de bases rcTA a été isolé du pADENOCMV5/rcTA-CMV/BFPq en utilisant les enzymes BglII et PmeI. Le vecteur pAdCMV/cTA-IRES-GFP a également été coupé avec ces mêmes enzymes, puis déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élués dans 50 μL de tampon. Les fragments ont ensuite été ligués (2,5 μL de chaque ADN, dans une réaction de 20 μL total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés deux heures à 25°C. Les plasmides ont ensuite été testés par transfection transitoire en absence ou en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumate dans la lignée stable 293aCR5GFP afin de s'assurer du bon remplacement du cTA par le rcTA.

pAdCR5/rcTA-IRES-GFP

Le fragment de 1046 paires de bases rcTA a été isolé du pAdCMV/rcTA-IRES-GFP en utilisant les enzymes BglII et PmeI. Le vecteur pAdCR5/IRES-GFP a également été coupé avec ces mêmes enzymes, puis déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élués dans 50 μL de tampon. Les fragments ont ensuite été ligués (2,5 μL de chaque ADN, dans une réaction de 20 μL total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés deux heures à 25°C.

pAdCMV5CuO/rcTA-IRES-GFP

Le fragment de 1046 paires de bases rcTA a été isolé du pAdCR5/rcTA-IRES-GFP en utilisant les enzymes BglII et PmeI. Le vecteur pAdCMV5CuO/IRES-GFP a également été coupé avec BglII, puis les extrémités des deux vecteurs ont été rendues franches en utilisant l'enzyme "DNA polymerase I, Large (klenow) fragment". Le vecteur a ensuite été

purifié avec le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.), puis déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élués dans 50 µL de tampon. Ils ont ensuite été ligués (2,5 µL de chaque ADN, dans un volume total de 20 µL) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés deux heures à 25°C.

2.1.2 Clonage des promoteurs tissu spécifiques dans les vecteurs adénoviraux

Les séquences des promoteurs spécifiques ont été trouvés dans la bases de données informatiques GenBank du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

pAdINS/IRES-GFP

Le fragment d'environ 600 paires de bases du promoteur de l'insuline a été isolé par PCR sur l'ADN génomique de cellules 293a extrait par le "DNeasy tissue kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca). Les séquences des amorces utilisées pour le PCR sont les suivantes :

Ttt ctc gag aca ggg gtg tgg gga cag ainsi que **Gct ttg ata tcc ctg acg caa agg ccc tg.**

Les conditions de PCR sont les suivantes :

200ng d'ADN		5 minutes à 95°C
5 µL de tampon 10X		1 minute à 95°C
2,5 µL d'amorce à 10 mM	Répété 30 fois	1 minute à 56°C
1,25 µL de dNTPs à 2 mM		1,5 minutes à 72°C
1 µL de l'enzyme PFU		7 minutes à 72°C
33,75 µL de dH ₂ O		Infini à 4°C

Le produit de PCR a ensuite été digéré avec les enzymes XhoI et EcoR5. Le vecteur pAdCR5/IRES-GFP a été coupé avec BglII, puis les extrémités ont été rendues franches en utilisant l'enzyme "DNA polymerase I, Large (klenow) fragment". Le vecteur a ensuite été purifié avec le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.), puis coupé avec

l'enzyme XhoI avant d'être déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) Ils ont ensuite été ligués (2,5 µL de chaque ADN, dans une réaction de 20 µL total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

pAdINS/GFP

Le fragment de 196 paires de bases d'une partie de la GFP a été isolé du pLCMV5/GFP en utilisant les enzymes PmeI et SpeI puis déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Le vecteur pAdINS/IRES-GFP a également été coupé avec PmeI et SpeI. Ce plasmide a aussi été coupé avec PacI afin de faciliter le clonage. Les deux fragments ont été purifiés par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) Ils ont ensuite été ligués (2,5 µL de chaque ADN, dans une réaction de 20 µL total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

pAdINS/cTA-IRES-GFP

Le fragment de 1319 paires de bases cTA-IRES a été isolé du pAdCR5/cTA-IRES-GFP en utilisant les enzymes BglII et NheI. Le plasmide a d'abord été coupé par BglII, puis les extrémités ont été rendues franches en utilisant l'enzyme "DNA polymerase I, Large (klenow) fragment". Le plasmide a alors été purifié par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) puis coupé avec NheI et PacI afin de faciliter le clonage. Le vecteur pAdINS/IRES-GFP a été coupé avec EcoR5 et NheI, puis déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). Ils ont ensuite été ligués (2,5 µL de chaque ADN, dans une réaction de 20 µL total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

pAdGLU/IRES-GFP

Le fragment d'environ 800 paires de bases du promoteur du glucagon a été isolé par PCR sur l'ADN génomique de cellules 293a extrait par le "DNeasy tissue kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca). Les séquences des amorces utilisées pour le PCR sont les suivantes : **egg aac tcg aga aac aga aca cat agg ggt** ainsi que **ctg aga tat cct tca ctg tcc gcc aaa c**. Les conditions de PCR et de clonage sont les mêmes que pour le pAdINS/IRES-GFP.

pAdGLU/GFP

Les conditions de clonage sont les mêmes que pour le pAdINS/GFP (avec le pAdGLU/IRES-GFP en remplacement du pAdINS/IRES-GFP).

pAdGLU/cTA-IRES-GFP

Les conditions de clonage sont les mêmes que pour le pAdINS/cTA-IRES-GFP (avec le pAdGLU/IRES-GFP en remplacement du pAdINS/IRES-GFP).

pAdSOM/IRES-GFP

Le fragment d'environ 1300 paires de bases du promoteur de la somatostatine été isolé par PCR sur l'ADN génomique de cellules 293a extrait par le "DNeasy tissue kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca). Les séquences des amorces utilisées pour le PCR sont les suivantes : **ccg ctc gag gct tcc tga cat aaa act atg c** ainsi que **gct ttg ata tcc ctg acg caa agg ccc tg**. Les conditions de PCR et de clonage sont les mêmes que pour le pAdINS/IRES-GFP.

pAdSOM/cTA-IRES-GFP

Les conditions de clonage sont les mêmes que pour le pAdINS/cTA-IRES-GFP (avec le pAdSOM/IRES-GFP en remplacement du pAdINS/IRES-GFP).

pAdPP/IRES-GFP

Le fragment d'environ 1200 paires de bases du promoteur du polypeptide pancréatique a été isolé par PCR sur l'ADN génomique de cellules 293a extrait par le "DNeasy tissue kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca). Les séquences des amorces utilisées pour le PCR sont les suivantes : **gcg gcg ggc gga tat cgt ggg aaa tta taa caa tac** ainsi que **ggc gga gat cta gag taa atg ggc act aga ac**. Les conditions de PCR sont les mêmes que pour le pAdINS/IRES-GFP. Le produit de PCR a ensuite été digéré avec les enzymes BglII et EcoR5. Le vecteur pAdCR5/IRES-GFP a été coupé avec XhoI, puis les extrémités ont été rendues franches en utilisant l'enzyme "DNA polymerase I, Large (klenow) fragment". Le vecteur a ensuite été purifié avec le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.), puis coupé avec l'enzyme BglII avant d'être déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés par le "PCR purification kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). Ils ont ensuite été ligués (2,5 µL de chaque ADN, dans une réaction de 20 µL total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

pAdPP/cTA-IRES-GFP

Les conditions de clonage sont les mêmes que pour le pAdINS/cTA-IRES-GFP (avec le pAdPP/IRES-GFP en remplacement du pAdINS/IRES-GFP).

Tous les promoteurs spécifiques obtenus par PCR sur de l'ADN génomique ont été séquencés une fois clonés dans les vecteurs contenant l'IRES-GFP. Le séquençage a été effectué par la plateforme de séquençage de l'Université McGill à l'aide de l'amorce suivante :

ggc cgc tgc aat caa ctt

pAdCMV5/SEAP-IRES-GFP

Le fragment de 1046 paires de bases SEAP-IRES-GFP a été isolé du pAdCR5/SEAP-IRES-GFP en utilisant les enzymes *AscI* et *PacI*. Le vecteur pAdCMV5CuO/IRES-GFP a également été coupé avec ces enzymes. Le vecteur a ensuite été déphosphorylé en utilisant l'enzyme phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés sur un gel d'agarose (Wisent, Canada) 0,8% en utilisant le "QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca) et élués dans 30 μ L de tampon. Les fragments ont ensuite été ligués (2 μ L de vecteur et 2 μ L d'insert, dans une réaction de 20 μ L total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

pADENOCR5/LacZ

Les pADENO contiennent une région d'homologie avec l'adénovirus de type 5 mais pas le gène de la protéase. Ce plasmide a été construit dans notre laboratoire (70).

2.1.3 Vecteurs de transfert lentiviraux

Les plasmides lentivirus (pL) (90) utilisés dans ce travail sont composés d'un promoteur CR5 contrôlant la GFP. La GFP est suivie d'une séquence WPRE (woodchuck posttranscriptional regulatory element), qui est reconnue pour stimuler la transcription de l'ADN (91). Ils contiennent également une séquence de polypurine centrale (cPPT) qui est reconnue pour améliorer l'efficacité de la transduction et l'expression du transgène (92). Ils possèdent une origine de répllication bactérienne (*ori*) et un gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase). Le LTR de 5' y est remplacé par le promoteur RSV (Rous sarcoma virus) ce qui rend la répllication du génome viral indépendante d'autres gènes viraux et le LTR de 3' y est délété afin que le virus soit inactivé une fois intégré dans le génome de la cellule.

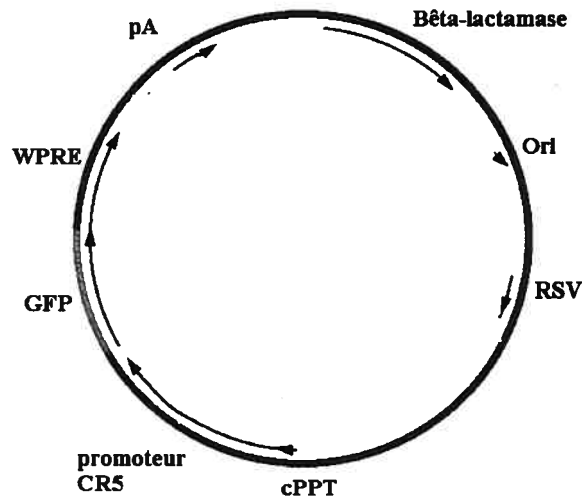


Figure 8 : Carte générale des vecteurs lentivirus

pLCR5mod/GFP

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le CR5 original comprend six séquences CuO répétitives, chacune étant espacées de 32 paires de bases, alors que le CR5 modifié a 36 paires de bases qui séparent chacune de ses six séquences CuO. Ce nouveau promoteur (CR5mod) a été commandé à la compagnie GeneArt. Le plasmide de GeneArt et le pLCR5/GFP ont été digérés avec les enzymes *ClaI* et *SmaI* puis le pLCR5/GFP a été déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline. Les deux fragments ont été purifiés sur un gel d'agarose (Wisent, Canada) 0,8% en utilisant le "QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit" (Qiagen, Mississauga, ON, Ca) et élués dans 30 μ L de tampon. Les fragments ont ensuite été ligués (2 μ L de vecteur et 2 μ L d'insert, dans une réaction de 20 μ L total) en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 16 heures à 16°C.

La nouvelle séquence est :

```
Acctacgcgtacctatcgattaacaaacagacaatctggctctgtttgtattatacctaacaaacagacaatctggctctgtttgtattata
cctaacaaacagacaatctggctctgtttgtattatacctaacaaacagacaatctggctctgtttgtattatacctaacaaacagacaatc
tggtctgtttgtattatacctaacaaacagacaatctggctctgtttgtattataagcttggtaccggggtcga
```

et l'ancienne était :

été incubé 16 heures à 37°C avec agitation. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait par le "Plasmid Maxi kit" (Qiagen, Missisauga, ON, Ca). L'ADN a été dosé par absorbance à 260nm/280nm avec le spectrophotomètre Genova (Jenway, Angleterre). 5 µL de la solution d'ADN à doser a été dilué dans 500 µl d'eau déionisée et l'absorbance a été mesurée à 260 et 280 nm. Le ratio A260/A280 renseigne sur l'état de pureté de l'ADN et le "blanc" a été réalisé à l'aide de 500 µl d'eau déionisée. Une unité d'absorbance à 260nm équivaut à 50 µg/mL d'ADN double brin.

2.3 Culture cellulaire

Les cellules humaines HEK-293a (93) sont un sous-clone d'une lignée stable de fibroblastes rénaux qui expriment constitutivement les gènes E1A et E1B de l'adénovirus de type 5 (cellules 293) (94). Ces cellules sont cultivées dans du DMEM (Wisent, Canada) additionné de 5% de sérum de veau fœtal (HyClone, Logan, É-U) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Canada). Les cellules 293a sont utilisées entre autre pour la propagation des adénovirus qui ne possèdent pas la région E1.

Les cellules 293aCymR sont dérivées de cellules 293a qui ont été transfectées de façon stable avec le pCymR/tk-neo (72). Le meilleur clone a été sélectionné en infectant les cellules avec un AdCMV5-Cuo/LacZ en présence ou en absence de cumate. Les conditions de culture sont les mêmes que pour les cellules 293a.

Les cellules 293aCR5LacZ sont dérivées de cellules 293a qui ont été transfectées de façon stable avec le pADENOCR5/LacZ. Le meilleur clone a été sélectionné en infectant les cellules avec un AdCMV/cTA. Les conditions de culture sont les mêmes que pour les cellules 293a.

Les cellules 293aCR5GFP sont dérivées de cellules 293a qui ont été transduites de façon stable avec un lentivirus CR5GFP. Le meilleur clone a été sélectionné en infectant

les cellules avec un AdCMV/cTA. Les conditions de culture sont les mêmes que pour les cellules 293a.

Les cellules 220-8 (95) sont une lignée stable dérivée des cellules A549 qui expriment constitutivement les gènes E1A et E1B de l'adénovirus de type 5. Ces cellules sont cultivées dans du DMEM (Wisent, Canada) additionné de 5% de sérum de veau fœtal (HyClone, Logan, É-U) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Canada). Les cellules 220-8 sont utilisées pour produire le virus dans les premières phases d'amplification car elles n'ont pas de région d'homologie avec les adénovirus et ne peuvent donc pas produire de révertants (RCA).

Les cellules C2C12 sont un sous-clone d'une lignée de myoblastes murins établie à partir du muscle de la jambe d'une souris C3H. Ces cellules se différencient rapidement. Elles produisent des myotubes qui se contractent et expriment des protéines musculaires caractéristiques. Elles sont un bon modèle pour étudier la myogenèse et la différenciation cellulaire (96). Ces cellules sont cultivées dans du DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal (HyClone, Logan, É-U) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Canada). La différenciation en myotubes est initiée par le changement de milieu lorsque les cellules sont à confluence. Ce milieu est du DMEM additionné de 2% de sérum équin (HyClone, Logan, É-U) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Canada).

Les îlots de langerhans humains utilisés dans les travaux présentés sont des cultures primaires qui proviennent de donneurs cadavériques. Les îlots sont isolés moins de huit heures après le prélèvement du pancréas. L'organe est alors placé sous perfusion avec de la "Liberase HI" (Roche diagnostics, Montreal, Qc, Canada) dans un système fermé et chauffé à 37°C pour activer l'enzyme. Lorsque les îlots semblent être libérés, le système est refroidi, puis les tissus sont récupérés et lavés. Les tissus sont placés sur un gradient continu de "Ficoll" (Biochrom KG, Berlin, Allemagne) dans un processeur cellulaire (COBE). Les îlots libres d'un diamètre de 75 à 400 µm, déterminées comme étant purs à 90% par coloration avec du dithizone (Sigma, St-Louis, MO, É-U), un agent chélateur de

zinc, sont récoltés et lavés. Une immunohistochimie est faite pour s'assurer de l'absence d'amylase et de cytokératine, afin de s'assurer de la pureté des îlots.

Les îlots sont maintenus dans du RPMI (Wisent, Canada) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (HyClone, Logan, É-U) et d'antibiotique-antimycotique (Wisent, Canada).

Les îlots sont infectés de deux à trois jours après l'isolation. L'infection se fait toute la nuit avec agitation à une concentration de 600 îlots par mL. Par la suite, les îlots sont maintenus à 200 îlots par mL.

L'enrobage des îlots se fait sept jours après l'isolation. Les îlots sont enrobés dans une matrice de collagène de type I à une densité de 2000 îlots par 25 cm². La matrice de collagène est recouverte de DMEM/F12 (GIBCO, Burlington, ON, Canada) contenant 10% de sérum de veau fœtal (HyClone, Logan, É-U), 1 mM dexaméthasone (Sigma, St-Louis, MO, É-U), 10 ng/mL de facteur de croissance épithélial (EGF) (Sigma, St-Louis, MO, É-U), 24 mU/mL d'insuline (Sigma, St-Louis, MO, É-U) et 100 ng/mL de toxine du choléra (Sigma, St-Louis, MO, É-U). Le milieu est changé tous les deux jours.

L'isolation et l'enrobage des îlots sont faits au centre universitaire de santé McGill, dans le laboratoire du Dr Lawrence Rosenberg.

Les îlots sont dispersés en plaçant 10000 îlots dans dix mL de trypsine-EDTA (Wisent, Canada) à 37°C avec agitation pendant dix minutes, puis le tube est placé sur glace durant cinq minutes afin que les îlots encore entiers se déposent au fond. Le surnageant contenant les cellules est prélevé et gardé sur glace, puis la manipulation est répétée en ajoutant 10 autres mL de trypsine au culot d'îlots.

2.4 Transfection

Pour la transfection au PEI, 500 000 cellules ont étéensemencées dans une plaque de six puits. Le lendemain, le milieu a été changé. Par la suite, le mélange de transfection a été ajouté goutte à goutte aux cellules. Le mélange de transfection est constitué de 3 µg d'ADN, auxquels on ajoute du DMEM (Wisent, Canada) sans sérum ni glutamine pour un volume final de 100 µL et 6 µg de Polyéthylèneimine linéaire (Polysciences, inc. É-U). L'ordre ADN/DMEM/PEI est important. Le mélange est incubé 10 minutes à température pièce avant d'être ajouté goutte à goutte aux cellules (97).

Pour la transfection à la Lipofectamine, un million de cellules ont étéensemencées dans une plaque de six puits. Six heures plus tard, le mélange de transfection a été ajouté aux cellules préalablement lavées avec 1mL de PBS (Wisent, Canada). Le mélange de transfection est constitué de 2 µg d'ADN, auxquels on ajoute du DMEM (Wisent, Canada) sans sérum ni glutamine pour un volume final de 375 µL et 12 µL de Lipofectamine (Invitrogen, É-U) dans 375 µL de DMEM (Wisent, Canada) sans sérum ni glutamine. Les solutions de DMEM contenant l'ADN et la Lipofectamine sont ensuite mélangées, puis incubées 20 minutes à température de la pièce. 750 µL de DMEM (Wisent, Canada) sans sérum ni glutamine sont ensuite ajoutés au mélange, et le tout est placé sur les cellules. Six heures plus tard, 1,5 mL de DMEM (Wisent, Canada) contenant 20% de sérum de veau foetal HyClone, Logan, É-U) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Canada) est ajouté aux cellules.

2.5 Immunobuvardage de type Western

Un million de cellules 293a en six puit a été transfecté à la lipofectamine avec 2 µg d'ADN. Deux jours après la transfection, le milieu a été aspiré, puis les cellules ont été lavées deux fois avec 1 mL de PBS (Wisent, Canada). Les cellules ont été récoltées avec le deuxième mL de PBS et centrifugées à 291 g (Centrifugeuse Sorwall RC-B, rotor H6000-A) durant 5 minutes. Le culot a ensuite été resuspendu dans 200 µl de tampon Laemmli (10

mM Tris- HCl, pH 7,4, + 150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0,25% SDS, 1 mM EDTA). Le tout a ensuite été soniqué (Heat system ultrasonic, Farmingdale, NY) jusqu'à la disparition de la viscosité. Les protéines ont été dosées en utilisant le protocole "DC Protein Assay micro plate" de Bio- Rad laboratories (Hercules, CA). L'absorbance a été lue en utilisant le lecteur de micro plaques MR 5000 de Dynatech à une longueur d'onde de 590 nm. Les échantillons ont été dilués dans du tampon Laemmli réducteur (120 mM Tris- HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% mercaptoethanol, 0,01% Bromophenol Blue) pour avoir une concentration finale de 20 µg de protéines dans 20 µL. Les protéines ont ensuite été dénaturées en les plaçant à 95°C durant 3 à 5 minutes. Par la suite les échantillons ont été chargés sur un gel d'électrophorèse sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) 10% "acrylamide Tris- glycine gel" (NOVEX) et la migration a été faite à 125 volts durant 3 heures. Le tampon d'électrophorèse est constitué de 15 g de TRIS, 72 g de glycine et 5 g de SDS, pour un volume final d'un litre. Par la suite, le gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose "Trans- Blot membrane" (Bio- Rad Laboratories, Richmond, CA) à 275 mA durant une heure. Le tampon de transfert est constitué de 3.3 g de Tris, 14.1 g de glycine et 250 mL d'éthanol, pour un volume final d'un litre. Les sites de liaisons non spécifiques ont été bloqués en incubant la membrane dans une solution à 5% de lait en poudre une heure à température ambiante avec agitation. Par la suite, la membrane a été lavée deux fois avec 5 mL de PBS-Tween (PBS 1X+0.1%Tween). Pour les immunobuvardages utilisant l'anti-VP16, la membrane a été incubée toute la nuit avec agitation (agitateur de Nordic immunological laboratories) à 4°C avec l'anticorps primaire anti-VP16 (Clonotech, É-U) à une dilution de 1/5000 dans du PBS-Tween. La membrane a alors été lavée trois fois 10 minutes avec 5 mL de PBS-Tween, puis incubée une heure avec agitation à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin (Amersham Pharmacia biotech, San Francisco, CA) dilué 1/10000 dans du PBS-Tween. Pour l'immunobuvardage utilisant l'anti-actine, la membrane a d'abord été déshybridée en la laissant 20 minutes à 80°C dans 20 mL de tampon (0.2 M glycine, 0.05% tween-20) puis elle a été lavée trois fois 10 minutes avec 5 mL de PBS-Tween. Les sites de liaisons non spécifiques ont été bloqués en incubant la membrane dans une solution à 5% de lait en poudre une heure à température ambiante avec agitation. La membrane a alors été incubée toute la nuit avec agitation (agitateur de Nordic immunological laboratories) à 4°C avec

l'anticorps primaire anti-actine (MP Biomedicals, É-U) à une dilution de 1/40000 dans du PBS-Tween. La membrane a ensuite été lavée trois fois 10 minutes avec 5 mL de PBS-Tween, puis incubée une heure avec agitation à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-souris (Amersham Pharmacia biotech, San Francisco, CA) dilué 1/10000 dans du PBS-Tween. La membrane a été lavée comme précédemment et révélée en utilisant le "ECL chimioluminescent detection kit" (Amersham Pharmacia biotech, San Francisco, CA). Les films Kodak BIOMAX MR (Eastem Kodak Rochester, NY) ont été utilisés pour enregistrer le signal.

2.6 Production d'adénovirus recombinants

Tous les virus ont été produits et amplifiés dans du milieu complet (DMEM, 5% de sérum de veau foetal (HyClone, Logan, É-U) et 5 mM glutamine (Wisent, Canada)) additionné d'antibiotique-antimycotique (Wisent, Canada).

Les virus ont été produits par sélection positive par la protéase (PS) (figure 9). La protéase de l'adénovirus est une des protéines tardives de l'adénovirus et elle est, entre autre, responsable de la libération des virions des cellules infectées (98). Ainsi seulement les adénovirus exprimant la PS peuvent se répliquer et infecter les cellules avoisinantes. Donc dans le système de sélection positive à la protéase, le plasmide (vecteur de transfert) contenant le gène d'intérêt comprend également la PS. Quant au virus avec lequel il y aura recombinaison homologue, il ne contient pas la PS (Δ PS) et ne peut pas former de plages virales sans la complémentation de la PS provenant du vecteur de transfert. Pour produire des virus avec cette méthode, 600 000 cellules 293a en plaque de six puits ont été infectées avec le virus Ad Δ E1 Δ E3 Δ PS à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,3 dans 0,5 mL durant six heures puis le virus a été retiré et les cellules ont été transfectées au PEI avec trois μ g du vecteur de transfert linéarisé avec l'enzyme Pac I. Quand l'effet cythopathique est apparu sur toutes les cellules, les virions ont été libérés par trois cycles de gel-dégel. Ensuite, des cellules 293a à confluence en plaques de 6 puits (ou 293aCR5GFP pour les virus exprimant le cTA) ont été infectées avec des dilutions du produit de la recombinaison

homologue durant 4 heures puis ont été recouvertes de "Seaplaque GTG Agarose" (Cambrex Bioscience, É-U). Théoriquement, seuls les virions ayant obtenu la PS (et par le fait même, le gène d'intérêt) forment les plages virales (88;99), qui sont alors repiquées et amplifiées après une seconde ronde de purification par plaque.

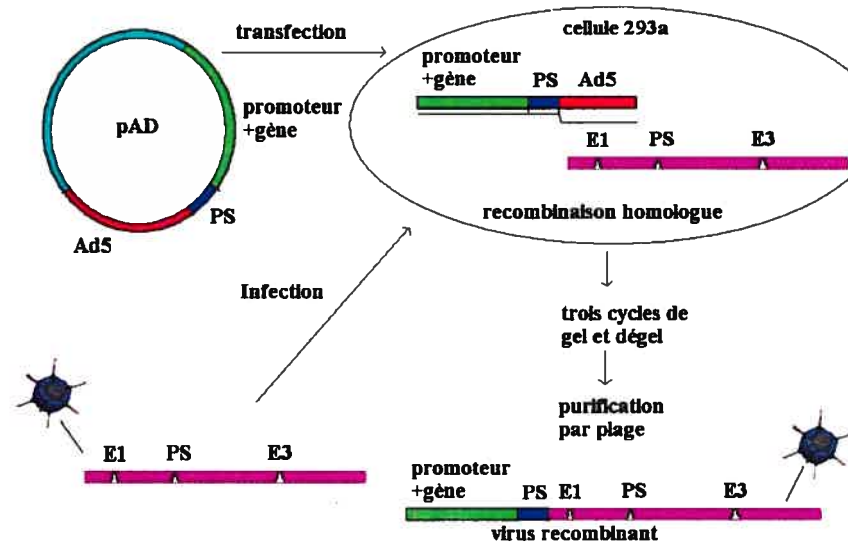


Figure 9 : Production d'adénovirus recombinants par la méthode d'infection/transfection (voir détails dans le texte)

Les Adénovirus CMV5/dsred et CR5/SEAP-IRES-GFP ont été produits par sélection positive à partir de plasmides qui avaient déjà été construits dans notre laboratoire.

L'adénovirus CR5LacZ a été fait par recombinaison homologue classique dans notre laboratoire (93). Les adénovirus CR5GFP et CMV5cTA avaient été préalablement produits par recombinaison homologue selon la méthode AdEasy (Qbiogène-MP biomedicals, É-U) dans des bactéries *E. coli* (BJ5183) entre le vecteur de transfert et un plasmide contenant le génome de l'adénovirus de type 5 délété des gènes E1 et E3. Après la sélection des recombinants, le plasmide a été extrait et introduit dans des bactéries *E. coli*

DH5 α pour amplification. Par la suite, le plasmide a été extrait, linéarisé et introduit dans les cellules 293a pour une ronde de purification par plaque.

2.7 Amplification des virus

Les virus ont été amplifiés sur des cellules 220-8 pour les quatre premiers cycles d'amplification (250 000 cellules, un million de cellules, dix millions de cellules et 30 millions de cellules) afin d'éviter les révertants. Par la suite 40 pétris de 150 mm contenant entre 15 à 20 millions de cellules 293a ont été infectés à une MOI de 10 pendant 72 heures avec chacun des virus. Après l'infection, les 40 pétris ont été récoltés, les cellules ont été centrifugées et concentrées dans un volume final de 10 mL. Trois cycles de gel-dégel ont été réalisés afin de lyser les cellules et libérer les particules virales.

2.8 Purification des virus

Les virus ont ensuite été centrifugés afin de pouvoir garder seulement le surnageant et enlever les débris cellulaires. Un premier gradient discontinu de CsCl (Bishop Canada Inc, ON) a été fait dans un tube de 25 mm X 89 mm en mettant dans l'ordre : 8 mL de CsCl 1.4 (53.0 g CsCl + 87 mL 10 mM Tris pH 7.9 (1211.4 g de Tris dans un litre d'H₂O)) , 6mL de CsCl 1.2 (26.8 g CsCl + 92mL 10 mM Tris pH 7.9) et 22mL de surnageant viral. Le virus a ensuite été centrifugé pendant 90 minutes à 95389 g (Beckman L8-M ultracentrifuge, rotor SW28). La bande virale a été récoltée avec une aiguille de 20G, puis diluée dans un volume final de 10 mL de tampon 10 mM Tris pH 7.9 afin de réduire la concentration de CsCl. Le virus ainsi récupéré a alors été déposé sur un gradient continu de CsCl. Le gradient continu a été fait en utilisant une pompe péristaltique et contient (dans un tube de 25 mm X 89 mm) 12 mL de CsCl 1.4 et 14 mL de CsCl 1.2. Le virus a ensuite été centrifugé pendant 20 heures à 95389 g et la bande virale a été récoltée avec une aiguille de 20G dans un maximum de 2.5 mL. Par la suite, le virus a été purifié sur une colonne NAP25 (Amersham Biosciences, Suède) pour se débarrasser du CsCl. La colonne a d'abord été équilibrée avec 25 mL de tampon de congélation (2.5% de glycérol,

20 mM Tris pH8, 25 mM NaCl), puis le virus (2,5 mL) a été ajouté sur la colonne. 2.5 mL de tampon de congélation ont ensuite été ajoutés à la colonne afin de récupérer le virus. Le virus a été conservé à -80°C.

2.9 Titration des virus

Le titre des virus a été obtenu en infectant en triplicata des cellules 293a (ou 293aCR5GFP pour les virus exprimant le cTA) à confluence dans des pétris de 60 mm avec 1 mL de dilutions en série du virus à titrer durant 4 heures puis en recouvrant les cellules de "Seaplaque GTG Agarose" (Cambrex Bioscience, É-U). Quatorze jours plus tard, les plages ont été comptées sur les pétris comprenant entre 30 et 200 plages. Le titre (en unité formatrice de plages (plaque forming unit ou pfu) a été obtenu en divisant le nombre de plages par la dilution.

2.10 Cytofluorométrie de Flux

Tous les résultats de Cytofluorométrie de flux ont été obtenus à l'aide d'un "Coulter EPICS™ XL flowcytometer" (Beckman-Coulter). Les résultats sont exprimés en index de fluorescence. Ce dernier est défini comme le produit du pourcentage de cellules positives (cellules vertes) multiplié par la fluorescence moyenne des cellules positives.

2.11 Photographies

Les photographies ont été prises avec une caméra Q-imaging Retiga 2000, un microscope à fluorescence Leica DMIL et le logiciel OpenLab.

2.12 Dosage de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline sécrétée (SEAP) est une protéine de 64 kDa dérivée de l'isoforme du placenta humain, elle n'est pas inactivée par la température à 65°C et non inhibée en présence de L-homoarginine, alors que ces conditions inactivent de nombreux isoformes de phosphatases alcalines endogènes.

Pour le dosage enzymatique de la SEAP, 50 µL de surnageant cellulaire ont été placés dans une plaque 96 puits. 50 µL de tampon SEAP 2X (1M diethanolamine pH 9.8, 2 mM MgCl₂, 10 mM L-homoarginine et 20 mM de PNPP) était ajoutés aux échantillons. La cinétique a été réalisée à température pièce sur une durée de 30 min à l'aide d'un lecteur de microplaque Spectro max 250 (Molécular Devices Corp.) et du logiciel Softmax Pro (Molecular Devices Corp.). La lecture était faite à 405nm. La pente de la cinétique a été utilisée afin de comparer l'efficacité des différentes transfections.

2.13 Dosage de la bêta-galactosidase

La bêta-galactosidase est encodée par le gène LacZ de *E.coli*. Elle consiste en quatre sous-unités identiques, d'un poids moléculaire de 116 kDa. Lorsqu'elle est fusionnée à un promoteur de cellules de mammifère, elle peut servir de gène rapporteur et être directement détectée des extraits cellulaires. La bêta-galactosidase a été extraite des cellules et préparée à l'analyse avec le "β-gal reporter gene assay, chemiluminescent" (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Allemagne). L'analyse a ensuite été faite à l'aide du luminomètre "Microtiter plate luminometer" (Dynex, É-U) et du logiciel Revelation MLX (Dynex, É-U).

2.14 Immunomarquage

Les îlots ont été incubés avec de la trypsine 0,05% (Wisent Ca) pour 10 minutes à 37°C avec agitation. Après un lavage au PBS (Wisent, Ca) les cellules ont été déposés sur des lames de microscope et fixées avec du méthanol pour 10 minutes à -20°C. Les lames ont été incubées dans du TBS+0.1% Triton X-100 pour 5 minutes afin de perméabiliser les cellules, et bloquées dans du PBS additionné 10% sérum d'âne à température ambiante pour 30 minutes. Les incubations ont été faites avec une dilution 1 :200 de l'anticorps primaire (anticorps de souris anti-insuline et anti-glucagon (Abcam, Cambridge, É-U), anticorps de lapin anti-somatostatine: (Dako, É-U)) dans du PBS + 10% de sérum d'âne durant toute la nuit à 4°C. Après trois lavages de 5 minutes dans du PBS, les lames ont été incubées avec une dilution 1 :200 de l'anticorps secondaire (anti-souris-FITC et anti-lapin-FITC (Abcam, Cambridge, É-U)) dans du PBS additionné de 10% de sérum d'âne pour une heure à la température ambiante. Après trois autres lavages de cinq minutes dans du PBS, les lames ont été recouvertes avec le milieu de révélation contenant le DAPI. Les lames ont ensuite été examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence, et des cellules ont été comptées visuellement.

Section 3 :

Résultats

3.1 Marquage des cellules d'îlots de langerhans

3.1.1 Construction des vecteurs adénoviraux contenant les promoteurs tissu spécifiques

Comme nous l'avons mentionné dans la section revue de littérature, nous voulions suivre le destin des cellules d'îlots de langerhans lors de leur différenciation en kyste. Pour ce faire, nous voulions marquer les cellules de manière spécifique à l'aide de promoteurs actifs seulement dans un des types de cellule. Nous avons d'abord cherché à obtenir les promoteurs humains dans des laboratoires où ils auraient déjà été clonés, mais sans succès. Nous avons alors décidé d'amplifier les séquences des promoteurs à partir d'ADN génomique de cellules humaines (293a). Pour ce faire, nous avons utilisé les séquences des promoteurs retrouvées dans la banque de données Genbank du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Nous avons par la suite construit des amorces afin d'amplifier les promoteurs par PCR (voir tableau II).

Promoteur	Amorce 5'	Amorce 3'	Région amplifiée	Références
Glucagon	cgg aac tcg aga aac aga aca cat agg ggt	ctg aga tat cct tca ctg tcc gcc aaa c	800 paires de base en amont du site d'initiation	Nucleic Acids Res. 1986 Jun 25;14 (12):4719-30. Structure of the human glucagon gene
Insuline	Ttt ctc gag aca ggg gtg tgg gga cag	Gct ttg ata tcc ctg acg caa agg ccc tg	600 paires de base en amont du site d'initiation	J. Clin. Invest. 89 (5), 1596-1602 (1992) A variant insulin promoter in non-insulin-dependent diabetes mellitus
Polypeptide pancréatique	gcg gcg ggc gga tat cgt ggg aaa tta taa caa tac	ggc gga gat cta gag taa atg ggc act aga ac	1200 paires de bases en amont du site d'initiation	J. Biol. Chem. 260 (24), 13013-13017 (1985) Exons of the human pancreatic polypeptide gene define functional domains of the precursor
Somatostatine	ccg ctc gag gct tcc tga cat aaa act atg c	gct ttg ata tcc ctg acg caa agg ccc tg	1300 paires de bases en amont du site d'initiation	Science 224 (4645), 168-171 (1984) Sequence of the human somatostatin I gene

Tableau II : Clonage des promoteurs tissu spécifiques

Nous avons par la suite cloné ces promoteurs dans un vecteur pAd qui contenait un IRES et le gène de la GFP. Les séquences des promoteurs ont alors été vérifiées par un séquençage effectué par la plateforme de séquençage de l'Université McGill. Par la suite, l'IRES a été enlevé pour les plasmides contenant les promoteurs de l'insuline et du glucagon afin de placer la GFP directement sous le contrôle du promoteur. Ces plasmides ont d'abord été testés dans les cellules 293a, mais ils ne produisaient pas assez de GFP pour que cette dernière atteigne un niveau visible. Nous avons donc pensé mettre le gène du cTA devant l'IRES, afin de produire des plasmides où le cTA est placé sous le contrôle du promoteur tissu spécifique. Le cTA ainsi produit pourra alors activer la production de la GFP placé sous le contrôle du promoteur CR5. Nous avons transfecté les cellules 293aCR5GFP afin de nous assurer que l'utilisation du promoteur CR5 permettait vraiment une meilleure expression du gène rapporteur. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules 293aCR5GFP avec les plasmides pAdGLU/GFP ou pAdGLU/cTA-IRES-GFP. Comme nous pouvons le constater à la figure 10, l'utilisation du promoteur CR5 permet d'optimiser la quantité de protéine produite à partir du promoteur du glucagon. En effet, beaucoup plus de GFP est produite dans la configuration indirecte (GluTA-CR5GFP) que dans la configuration directe (GluGFP) où le niveau de GFP se situe sous le seuil de détection.

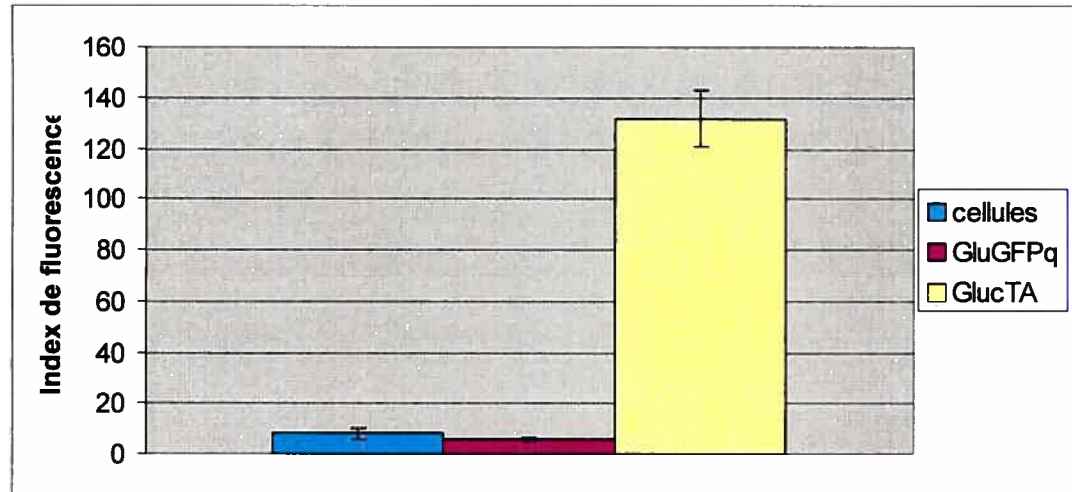


Figure 10: Comparaison de la régulation directe et indirecte de la GFP par le promoteur du glucagon dans les cellules 293CR5GFP

Un million de cellules 293aCR5GFP ont été transfectées au PEI avec 3 µg du plasmide pAdGLU/GFP ou pAdGLU/cTA-IRES-GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata. Les cellules ont été récoltées cinq jours post-transfection et analysées par cytofluorométrie de flux. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

Les plasmides contenant le cTA sous le contrôle des promoteurs tissu spécifiques ont tous été testés par transfection dans les cellules 293a afin de nous assurer que les promoteurs étaient fonctionnels (résultats non montrés).

Nous avons par la suite construit par sélection positive des vecteurs viraux où les promoteurs de l'insuline et du glucagon contrôlaient la production de GFP et un vecteur où le promoteur du glucagon contrôlait la production de cTA.

3.1.2 Marquage des cellules d'îlots à l'aide de promoteurs spécifiques

Le premier promoteur que nous avons testé a été celui de l'insuline. Nous pouvons constater à la figure 11 que le marquage des cellules β avec un adénovirus où la GFP est directement sous le contrôle du promoteur de l'insuline est possible, comme cela avait été montré dans la littérature. Il faut se souvenir que les cellules β , où le promoteur de l'insuline est actif, sont situées au cœur de l'îlot, ce qui rend leur marquage extrêmement difficile.



Figure 11 : Marquage des cellules β avec un vecteur adénovirus INSGFP
 Les îlots ont été infectés avec l'adénovirus AdINS/GFP à une MOI de $2,5 \cdot 10^5$ par îlots. Les photos ont été prises quatre jours post-infection.

Lorsque nous avons tenté la même expérience avec le promoteur du glucagon contrôlant la GFP, afin de marquer les cellules α , qui sont à l'extérieur de l'îlot, donc plus faciles à infecter, pratiquement aucune cellule verte n'était détectable (résultats non montrés).

Ce problème aurait probablement pu être résolu en augmentant la quantité de particules infectieuses par cellule. Cependant, comme nous l'avons mentionné dans la section revue de littérature, une MOI élevée pourrait perturber la physiologie des îlots et leur transformation. En effet, les adénovirus contiennent des gènes qui peuvent initier et moduler la mort cellulaire par l'induction ou la suppression de processus spécifiques dans la cellule hôte, ces effets étant dépendants du génome de l'adénovirus et du type de cellules infectées (58).

Nous avons donc décidé d'essayer d'utiliser le système cumate afin de diminuer la MOI nécessaire au marquage des cellules d'îlots par la GFP, car, comme nous l'avons mentionné plus tôt, le promoteur CR5 s'est montré très puissant dans toutes les cellules où nous l'avons testé et, dans les cellules 293CR5GFP, beaucoup plus de GFP est produite lorsque le promoteur du glucagon contrôle le cTA que lorsqu'il contrôle la GFP.

3.1.3 Efficacité du promoteur CR5 dans des îlots de langerhans humains

Nous avons donc comparé l'efficacité des promoteurs CMV5 et CR5 dans des îlots de langerhans humains. Les deux promoteurs ont été comparés en infectant les îlots avec des adénovirus à différentes MOI. Comme nous pouvons le constater en observant les photos de la figure 12, les cellules semblent beaucoup plus vertes lorsqu'elles sont infectées avec le promoteur CR5 qu'avec le promoteur CMV5, indiquant que le promoteur régulable au cumate est plus puissant que le promoteur CMV5. L'efficacité du promoteur CMV dans les îlots de langerhans avait déjà été prouvée (56). Nous avons donc décidé d'aller de l'avant avec la stratégie de marquage indirect utilisant le promoteur CR5.

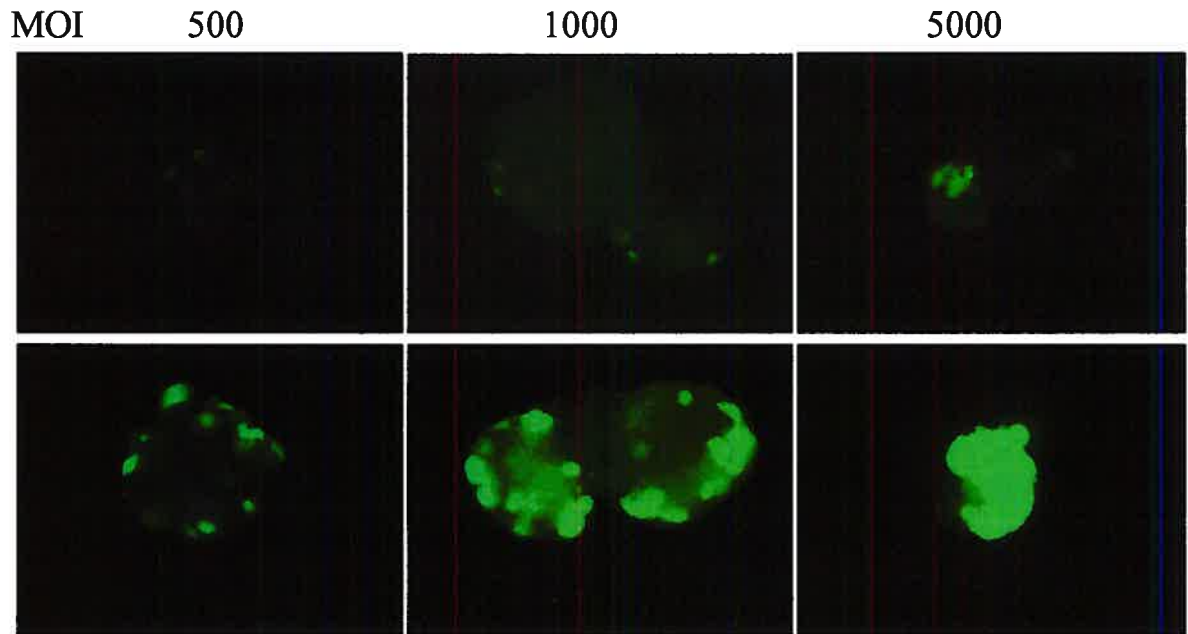


Figure 12: Activité comparée des promoteurs CR5 et CMV5 dans des îlots de langerhans
 200 îlots ont été infectés avec les virus AdCMV5/GFP (photos du haut) ou AdCR5/GFP et AdCMV5/cTA (photos du bas) à différentes multiplicité d'infection. Les multiplicité d'infection sont indiquées en particules infectieuses par îlots. Les photographies ont été prises 48 heures post-infection.

Nous devons aussi nous assurer que l'activité basale du promoteur CR5 était faible dans ces cellules, afin d'être certain de ne pas marquer les cellules en absence de cTA, ce qui aurait pu fausser les résultats obtenus lors de la transformation des îlots en kystes. Comme nous pouvons le constater à la figure 13, la production de GFP par le promoteur CR5 en absence de cTA n'est pas détectable au delà du seuil de fluorescence endogène.

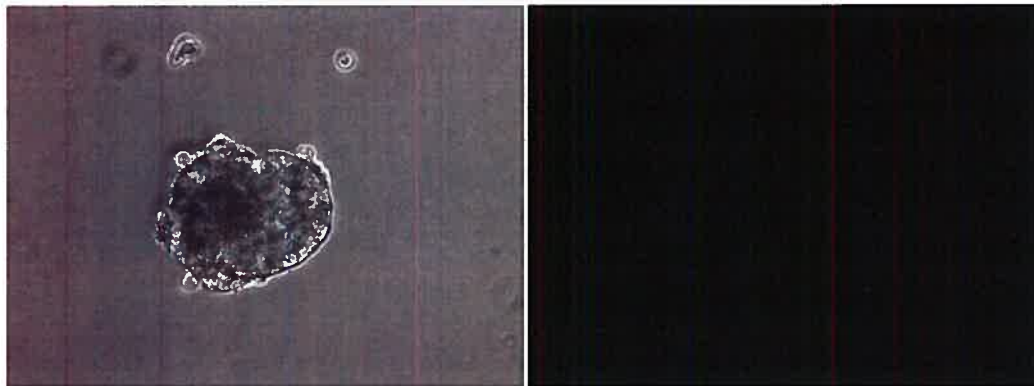


Figure 13 : Activité basale du promoteur CR5 dans les îlots de langerhans
 200 îlots ont été infectés avec l'AdCR5/GFP à une MOI de 5000 par îlot. Les photos ont été prises quatre jours après infection.

Nous avons également voulu vérifier qu'une quantité moindre de cTA pouvait provoquer l'activité du promoteur CR5 dans les îlots. En effet, comme les promoteurs tissu spécifiques ne sont pas très puissants, nous devons nous assurer qu'une petite quantité de transactivateur nous permettrait de détecter la GFP produite par le CR5. Nous avons donc infecté des îlots avec différentes quantités d'un adénovirus codant pour le cTA sous le contrôle du promoteur CMV5 et une quantité constante d'un adénovirus CR5GFP. Comme nous pouvons le voir à la figure 14, même à une MOI de 1000 par îlots, soit environ une particule infectieuse par cellule, la GFP est aisément détectable. Nous pouvons donc croire que les promoteurs tissu spécifiques utilisés dans cette recherche produiront assez de cTA pour permettre la détection de la GFP.

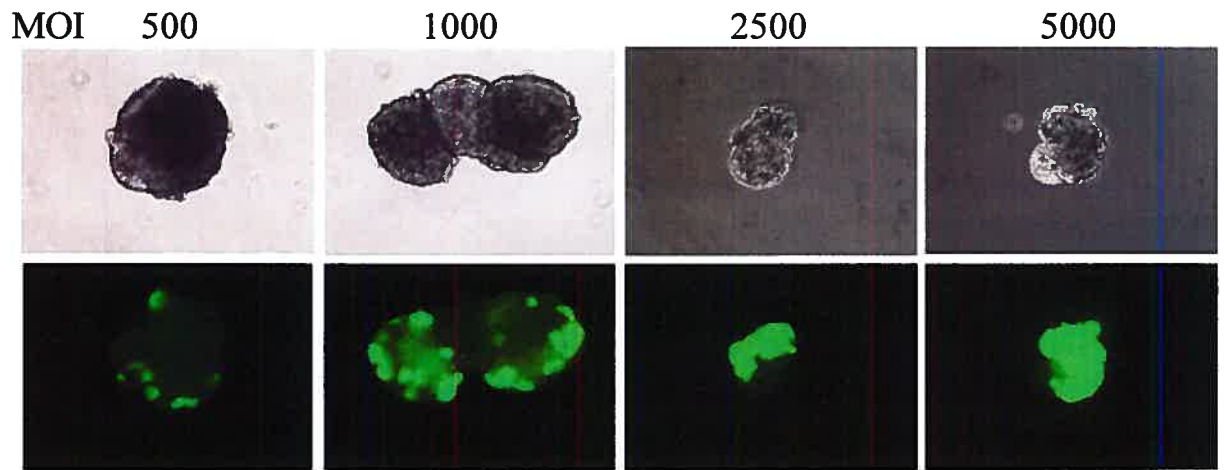


Figure 14 : Activation du CR5 dans les îlots par différentes quantités de cTA
200 îlots ont été infectés avec les virus AdCR5/GFP à une MOI de 5000 et AdCMV5/cTA à différentes multiplicités d'infection. Les multiplicités d'infection sont indiquées en particules infectieuses par îlots. Les photographies ont été prises 48 heures post-infection.

3.1.4 Marquage spécifique des cellules d'îlots à l'aide du promoteur CR5

Nous avons donc fait des co-infections où le cTA était sous le contrôle des promoteurs spécifiques à chaque cellule dans un adénovirus, alors que la GFP était sous le contrôle du promoteur CR5 dans un autre adénovirus. Toutes les cellules sont infectées par

les virus. Cependant, les seules cellules vertes sont celles où le promoteur contrôlant le cTA est actif.

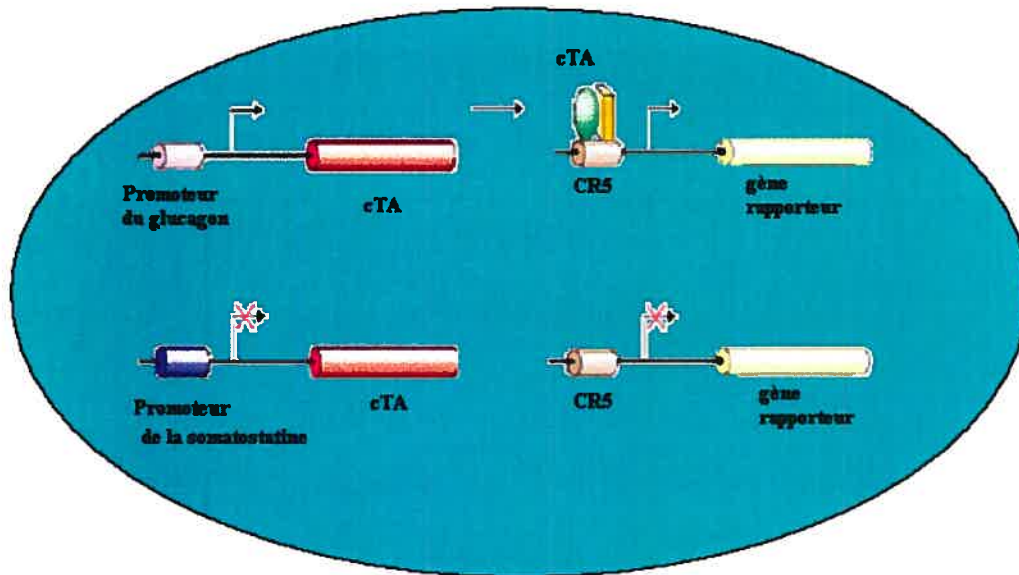


Figure 15: Exemple de co-infection d'une cellule α
(voir détails dans le texte)

Comme la régulation indirecte de la GFP par le promoteur CR5 était beaucoup plus efficace que la régulation directe par le promoteur du glucagon dans les cellules 293a, nous avons décidé de tester cette configuration dans les îlots, toujours en utilisant le promoteur du glucagon. Comme nous pouvons le voir à la figure 16, la configuration indirecte, où nous utilisons le CR5 pour contrôler la GFP et le promoteur du glucagon pour contrôler le cTA, est beaucoup plus efficace pour marquer les cellules α que la configuration directe, où la GFP est sous le contrôle du promoteur du glucagon. En fait, comme nous l'avons mentionné plus tôt, le marquage des cellules α avec cette méthode est presque impossible. Nous devons modifier le contraste et l'intensité de la photographie afin de parvenir à percevoir la fluorescence. Par contre, l'utilisation du promoteur CR5 permet un marquage clair de ces cellules, et permet même l'utilisation d'une MOI beaucoup plus faible que celle utilisée précédemment pour marquer les cellules β avec la GFP directement sous le contrôle du promoteur de l'insuline.

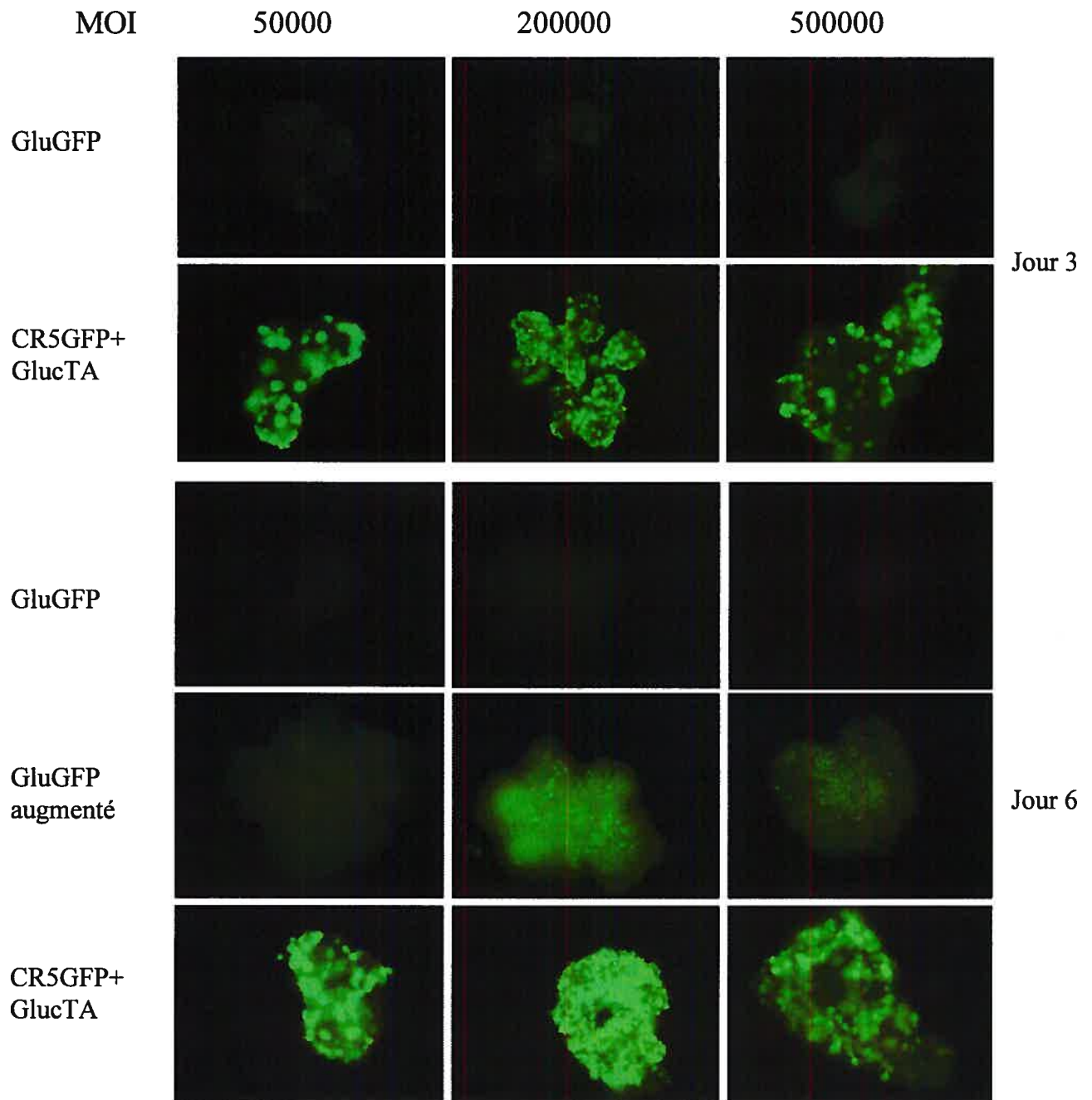


Figure 16 : Comparaison de l'efficacité du marquage d'îlots de langerhans par la GFP régulée de façon directe ou indirecte

Les îlots ont été infectés avec le vecteur AdCR5/GFP à une MOI de 5000 par îlots et le vecteur AdGLU/cTA-IRES-GFP aux MOI (par îlots) indiquées ou avec le vecteur AdGLU/GFP aux MOI (par îlots) indiquées. *Le contraste des photos du jour 6 pour l'infection avec le vecteur AdGLU/GFP a été augmenté afin de percevoir la fluorescence. (GluGFP augmenté)

Comme la régulation indirecte de la GFP par le promoteur CR5 permet une meilleure production de GFP, nous avons décidé d'utiliser cette configuration afin de marquer les cellules d'îlots avec les promoteurs du glucagon et de la somatostatine, avant de procéder à leur transformation en kystes. Comme nous pouvons le voir à la figure 17, le marquage des cellules α (glucagon) et δ (somatostatine) est très efficace lors d'une co-infection CR5GFP-promoteur spécifique cTA.

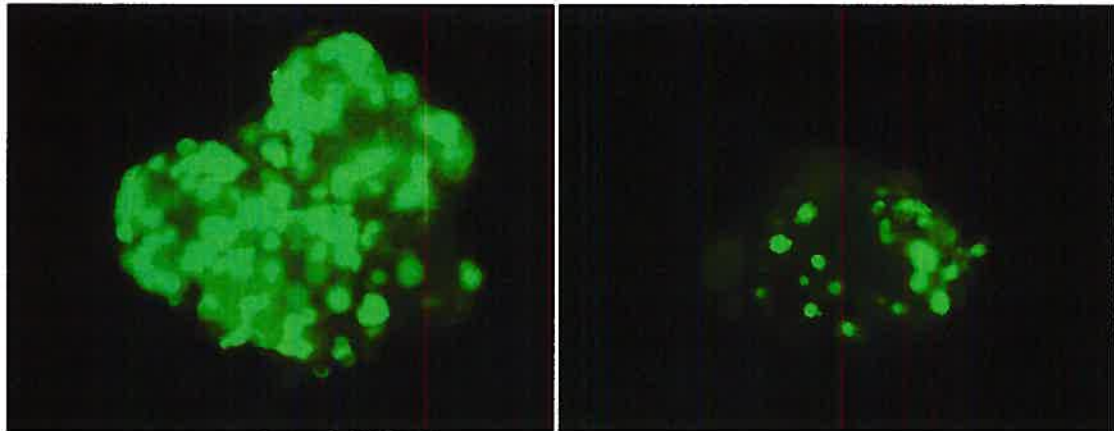


Figure 17 : Marquage des cellules α et δ avec des vecteurs adénovirus

Les îlots ont été infectés avec le vecteur AdCR5/GFP à une MOI de 5000 par îlots et le vecteur AdGLU/cTA-IRES-GFP (à gauche, marque les cellules α) ou AdSOM/cTA-IRES-GFP (à droite, marque les cellules δ) à une MOI de 50 000 par îlots. Les photos ont été prises quatre jours post-infection.

3.1.5 Spécificité du marquage

Nous pouvons observer à la figure 17 que le marquage des cellules d'îlots semble assez spécifique. En effet, les cellules α (à droite), représentent 15% des cellules à l'extérieur de l'îlot, alors que les cellules δ (à gauche), représente de 3 à 10% des cellules externes de l'îlot. Cela semble se refléter dans les photographies de la figure 17, où la proportion de cellules vertes est plus importante pour l'îlot marqué avec le promoteur du glucagon que pour celui marqué avec le promoteur de la somatostatine. Cependant, afin de nous assurer de la spécificité de notre marquage, nous avons marqué les îlots avec une combinaison de vecteurs codant pour la RFP sous le contrôle du promoteur CMV5 (marque toutes les cellules), d'un vecteur codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur CR5 (doit être activé par le cTA) et d'un vecteur exprimant le cTA sous le

contrôle du promoteur du glucagon (actif seulement dans les cellules α). Comme nous pouvons le constater à la figure 18, l'îlot entier semble marqué de façon presque équivalente par la GFP et la RFP (grâce à la superposition des deux images, les cellules sont jaunes). Ceci est tout à fait normal, puisque les îlots sont composés de 15% cellules α , qui produisent du glucagon, et qui sont situées sur le pourtour de l'îlot. Donc presque tout l'extérieur des îlots est composé de cellules α . Par contre, lorsque les îlots sont dispersés en cellules individuelles, puis infectées, nous pouvons voir que la majorité des cellules expriment la RFP, alors que seules quelques cellules expriment la GFP.

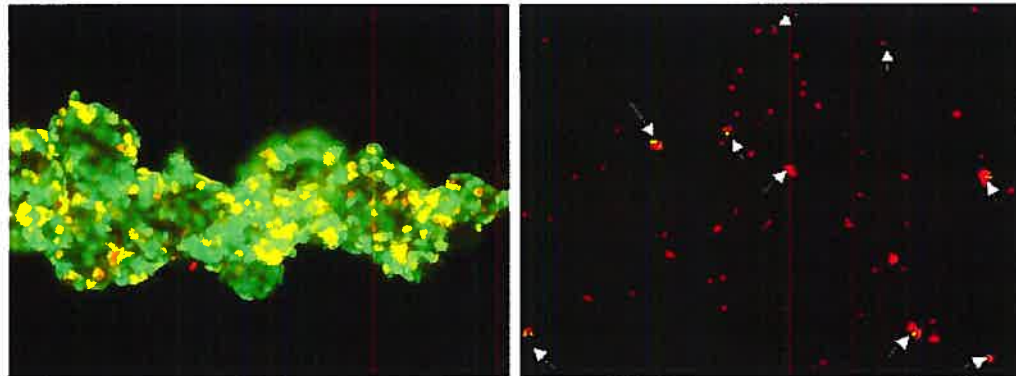


Figure 18: Marquage spécifique des cellules d'îlots avec différents vecteurs adénovirus

Les îlots ont été infectés entier ou après dispersion avec le vecteur AdCR5/GFPp à une MOI de 5 par cellules, le AdCMV5/dsred à une MOI de 5 et le AdGlu/cTA à une MOI de 50. Les photos ont été prises quatre jours post-infection. Nous considérons que les îlots contiennent 1000 cellules. À gauche : îlot entier. À droite : cellules d'îlot dispersées. Le grossissement a été réduit pour les cellules dispersées afin de permettre une meilleure vue d'ensemble.

Finalement nous avons confirmé la spécificité du marquage en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines spécifiques (glucagon-insuline-somatostatine) et des vecteurs adénovirus où le cTA était sous le contrôle des promoteurs de ces protéines et la GFP sous le contrôle du promoteur CR5 ou du promoteur de l'insuline. Comme nous pouvons le constater au tableau III, le marquage est très spécifique. Les cellules vertes sont positives pour la GFP, les rouges sont positives pour la protéine spécifique et les cellules rouges et vertes pour les deux. En bref, les cellules positives pour la GFP sont seulement celles où le promoteur est supposé être actif et la GFP n'est pas produite de manière non-spécifique.

Cellules		Fluorescence				Total
Vert	Rouge	Non-marquée	rouge	rouge et verte	Verte	
AdCMV5cTA	Glucagon	112	73	27	73	285
AdCMV5cTA	Insuline	99	104	21	30	254
AdCMV5cTA	Somatostatine	114	2	3	117	236
AdSomcTA	Glucagon	502	103	0	48	653
AdSomcTA	Insuline	495	335	0	50	880
AdSomcTA	Somatostatine	567	36	31	0	634
controle	Glucagon	212	78	0	0	290
controle	Insuline	190	105	0	0	295
controle	Somatostatine	171	16	0	0	187
AdGlucTA	Glucagon	194	26	26	0	246
AdGlucTA	Insuline	245	72	0	13	330
AdGlucTA	Somatostatine	253	14	0	47	314
AdInscTA	Glucagon	258	32	0	142	432
AdInsGFP	Insuline	270	124	84	3	481
AdInsGFP	Somatostatine	-	-	-	-	-

Tableau III : Spécificité du marquage des îlots de langerhans

Les îlots ont été infectés avec le vecteur AdINS/GFP (marque les cellules β) à une MOI de 250 000 par îlots ou avec le vecteur AdCR5/GFP à une MOI de 5000 par îlots et le vecteur AdGLU/cTA-IRES-GFP (marque les cellules α) à une MOI de 50 000 par îlots ou avec le vecteur AdCR5/GFP à une MOI de 5000 par îlots et le vecteur AdSOM/cTA-IRES-GFP (marque les cellules δ) à une MOI de 50 000 par îlots. Des îlots non-infectés et des îlots infectés avec le vecteur AdCMV5/cTA à une MOI de 5000 par îlot (actif dans toutes les cellules) servaient de contrôle. Trois jours plus tard, les îlots ont été dispersés en cellules individuelles. Ces cellules ont été fixées au méthanol sur une lame, puis perméabilisées. Elles ont ensuite été marquées avec des anticorps contre les protéines spécifiques (glucagon, insuline, somatostatine) couplés à un fluorochrome rouge. Les lames ont ensuite été observées afin de compter le nombre de cellules vertes (positives pour la GFP), rouges (positives pour la protéine concernée) ou rouges et vertes.

3.1.6 Transformation en kyste des îlots de langerhans marqués spécifiquement

Finalement nous avons marqué les îlots de langerhans de manière à suivre leur transformation en cellules de kyste (figures 19-20). Comme nous pouvons voir à la figure 19, les cellules β ne semblent pas participer à la formation de l'îlot. En effet, les kystes produits à partir des îlots où les cellules β sont marquées ne présentent pas de cellules vertes. Par contre, la figure 20 nous montre que les cellules α et δ participent à la formation du kyste, puisque des cellules vertes sont présentes dans les nouvelles structures kystiques.

Les cellules qui semblent contribuer le plus à la formation du kyste sont les cellules δ , mais les cellules α semblent participer aussi, bien que leur apport paraisse moins important.

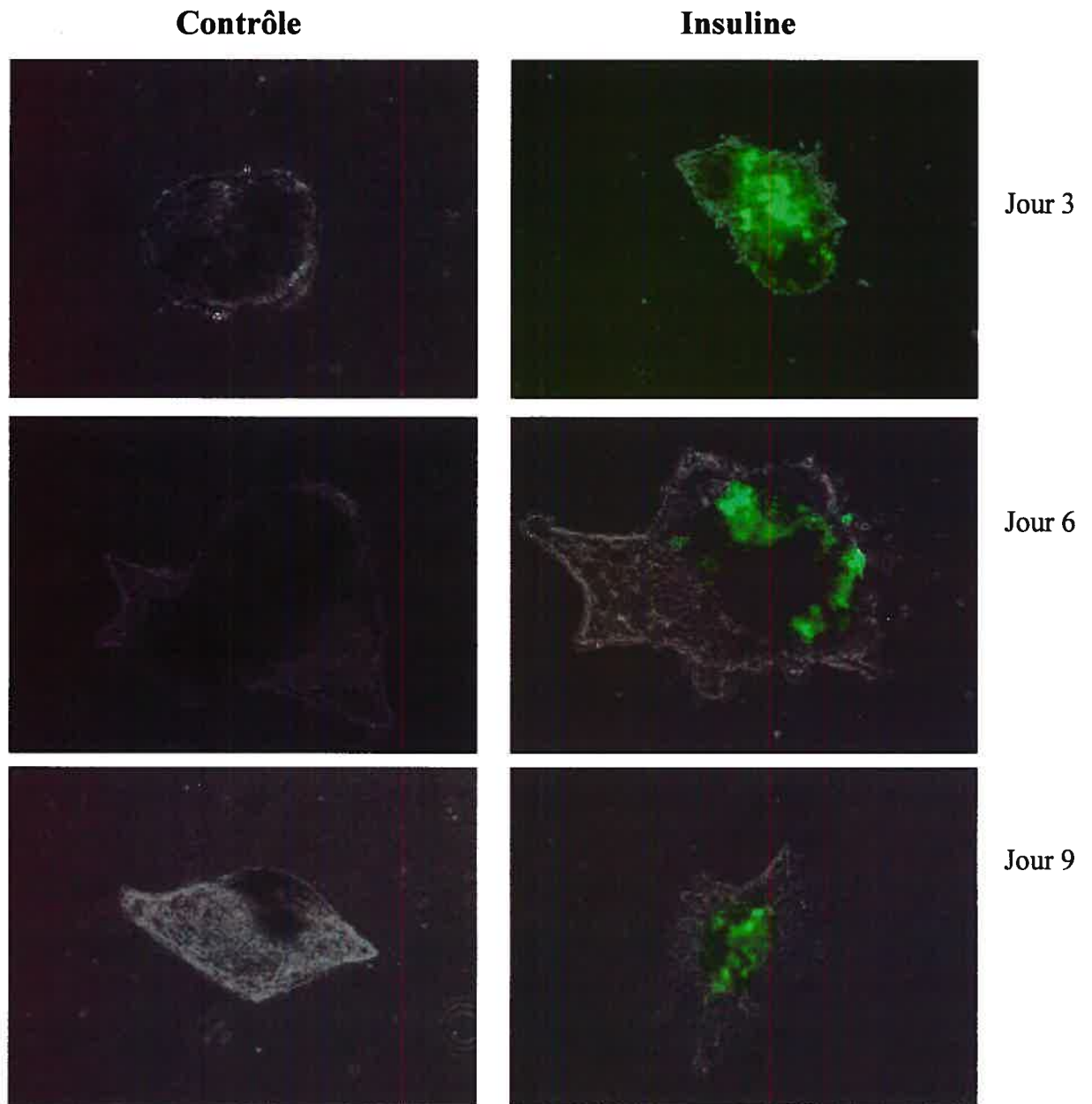


Figure 19 : Transformation d'îlots de langerhans humains en kyste (contrôle et insuline)

Les îlots ont été infectés avec le vecteur AdINS/GFP (marque les cellules β) à une MOI de 250 000 par îlots. Des îlots non-infectés servent de contrôle. Trois jours plus tard, les îlots ont été placés dans une matrice de collagène (jour0) afin de provoquer leur transformation en kyste.

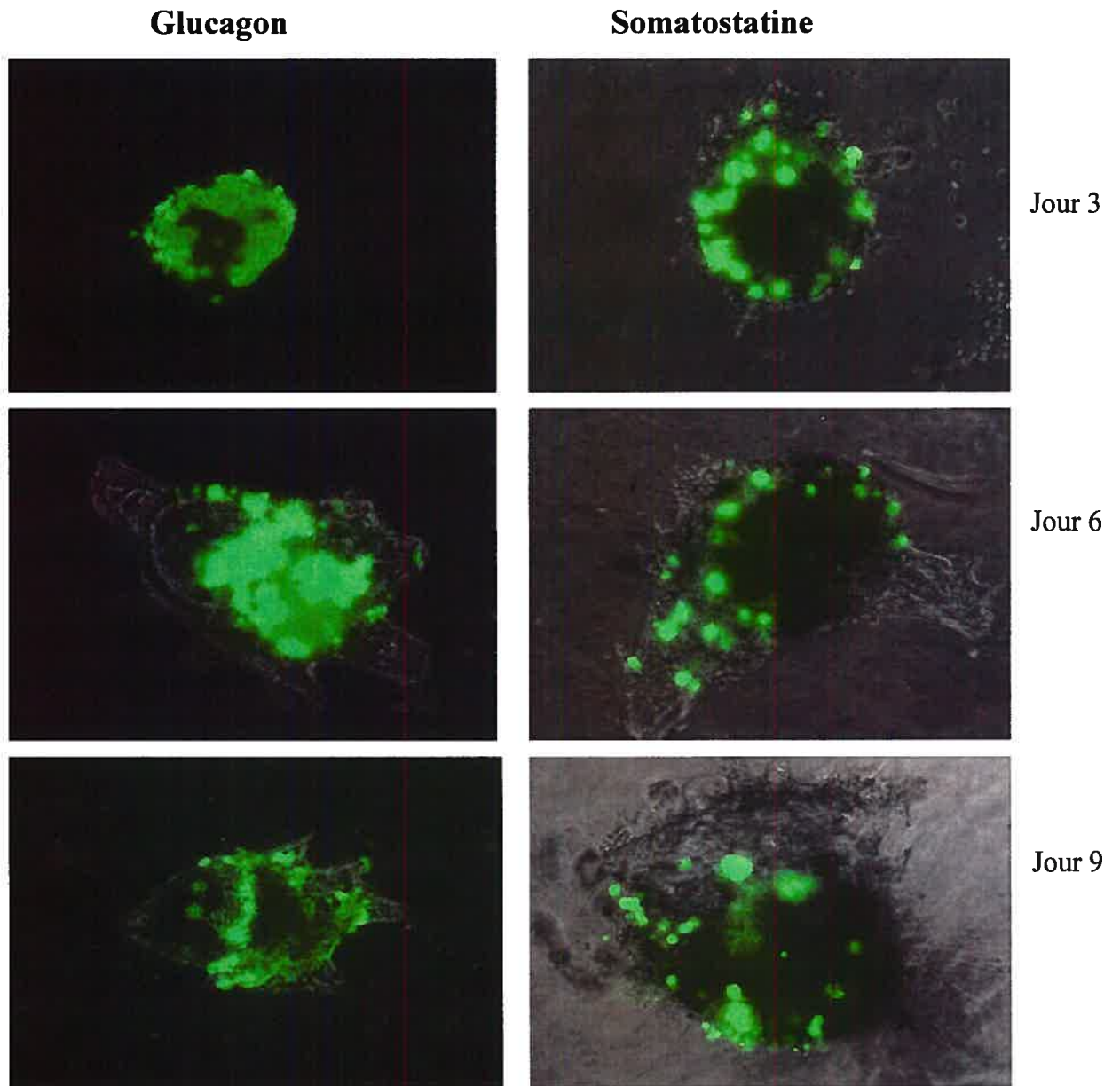


Figure 20 : Transformation d'îlots de langerhans humains en kyste (glucagon et somatostatine)

Les îlots ont été infectés avec le vecteur AdCR5/GFP à une MOI de 5000 par îlots et le vecteur AdGLU/cTA-IRES-GFP (marque les cellules α) ou AdSOM/cTA-IRES-GFP (marque les cellules δ) à une MOI de 50 000 par îlots. Trois jours plus tard, les îlots ont été placés dans une matrice de collagène (jour0) afin de provoquer leur transformation en kyste.

3.1.7 Influence de l'infection adénovirale sur la transformation des îlots en kystes

Finalelement, nous avons voulu vérifier l'influence de l'infection adénovirale sur la transformation des îlots. Pour ce faire, nous avons pris trois groupes de 5000 îlots, que nous avons infectés, puis fait se transformer en kystes. Le premier groupe, servant de contrôle, n'a pas été infecté. Le second groupe a été infecté avec l'AdGLU/cTA-IRES-GFP à une MOI de 50 000 par îlot et une MOI de 5000 par îlot de l'AdCR5GFP et le troisième groupe a été infecté avec une MOI de 250000 par îlot de l'AdInsGFP. Comme nous pouvons le voir au tableau IV, le pourcentage de cellules kystiques des trois groupes ne varie pas. L'infection par un vecteur adénovirus aux MOI que nous avons utilisé ne semble donc pas avoir modifié la capacité des îlots à se transformer.

	îlots	îlots-kystes	kystes	% de cellules kystiques
contrôle	98	50	17	25.4
AdGlu/cTA+AdCR5/GFP	83	56	36	36.6
AdIns/GFP	79	51	14	27.4

Tableau IV: Influence de l'infection adénovirale sur la transformation des îlots en kystes

5000 îlots ont été placés dans les conditions favorisant la différenciation des îlots en kystes. Le premier groupe (contrôle) n'a pas été infecté, le deuxième (AdGlu/cTA+AdCR5/GFP) a été infecté à une MOI de 50 000 par îlot de l'AdGLU/cTA-IRES-GFP et une MOI de 5000 par îlot de l'AdCR5/GFP et le troisième groupe (AdInsGFP) a été infecté avec une MOI de 250 000 par îlot de l'AdIns/GFP. 150 îlots de chaque groupe choisis au hasard ont été analysés au jour 9 pour la transformation kystique. Ils ont été séparés en trois catégories : 1) îlots pour les îlots ne présentant pas de cellules kystiques, 2) îlots-kystes pour les îlots à moitié transformés et 3) kystes pour les structures entièrement kystiques. Le pourcentage de cellules kystiques a été obtenu en additionnant la quantité de kyste et 50% de la quantité d'îlots-kystes et en divisant le total obtenu par le nombre total d'îlots. Exemple (contrôle): $(50 / 2 + 17) / (98 + 50 + 17) = 25.4\%$.

3.2 Efficacité du promoteur CR5 dans les cellules C2C12

Certaines études fonctionnelles impliquant le passage de cellules d'un phénotype à un autre nécessitent des promoteurs actifs dans tous les états de différenciation afin de pouvoir suivre le destin des cellules (100-103). Des études faites avec des cellules souches montrent que divers promoteurs ont des degrés différents d'activité selon les types cellulaires. Par exemple les promoteurs CMV, EF1 (elongation factor 1) et RSV (Rous sarcoma virus) ont des activités variant considérablement dans les types cellulaires rencontrés au cours de la différenciation de cellules souches embryonnaires de souris jusqu'aux neurones dopaminergiques. En fait ces promoteurs passent de l'inactivité complète à une très haute activité en passant par différents degrés de puissance selon les types cellulaires (104). Évidemment, ces différences dans l'efficacité du promoteur selon le phénotype rendent difficile le suivi du destin de chaque lignée cellulaire. Par contre, le promoteur CR5 s'est montré très puissant dans tous les types de cellules transformées où nous l'avons testé. Il pourrait donc être extrêmement utile lors d'études de différenciation cellulaire. De plus, le fait que l'activité de ce promoteur puisse être régulée amène un avantage dans les situations où une production du gène rapporteur pourrait interférer avec la biologie normale de la cellule.

Les îlots avec lesquels nous travaillons sont des cellules humaines qui étaient destinées à être greffées. Ils sont par conséquent extrêmement difficiles à obtenir. Nous avons donc décidé de travailler avec les cellules C2C12 afin de poursuivre la caractérisation du promoteur inductible au cumate. Comme nous l'avons mentionné plus tôt, les cellules C2C12 sont une lignée de cellules murines avec un phénotype de myoblastes et qui peuvent être différenciées en myotubes. Ces cellules sont donc un bon modèle de différenciation cellulaire. Nous y avons testé le promoteur CR5 en comparaison avec les promoteurs CB et CMV5. Les comparaisons ont été faites en infectant les cellules avec des vecteurs adénovirus. Le promoteur CB est constitué du promoteur de la β -actine fusionné avec la région régulatrice activatrice (enhancer) du promoteur CMV. Quant au promoteur CMV5, qui est un promoteur amélioré dérivé du promoteur du cytomégalovirus, il a été décrit dans la section Revue de littérature. Comme nous pouvons le voir à la figure

21, le promoteur CR5 est onze fois plus puissant que le promoteur CB dans les cellules C2C12 sous forme de myoblastes. De plus, l'activité du promoteur γ est bien régulée (7.5 fois) par l'ajout de cumate. Finalement, le niveau basal du CR5 en absence de cTA dans ces cellules est extrêmement bas, se situant au niveau des cellules non-infectées.

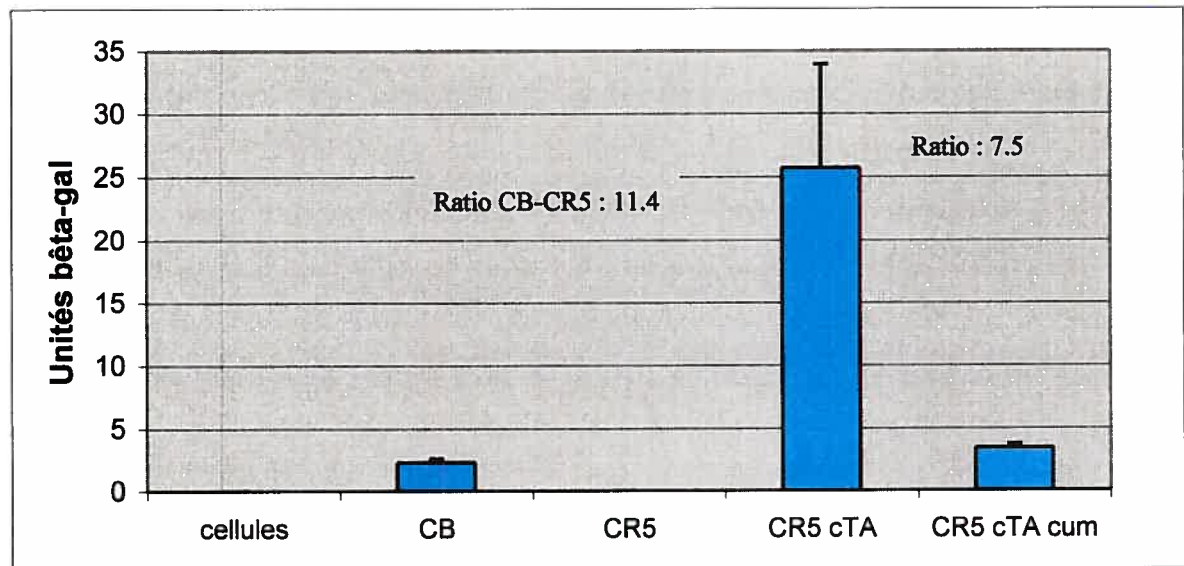


Figure 21: Activité comparée des promoteurs CR5 et CB dans les cellules C2C12 (myoblastes)
 60 000 cellules C2C12 ont été infectées avec les virus AdCB/LacZ ou AdCR5/LacZ ou AdCR5/LacZ et AdCMV5/cTA à une multiplicité d'infection de 100 de chaque virus par cellule. Les infections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumate pour les infections avec le AdCMV5/cTA. Les extraits cellulaires ont été récoltés trois jours post-infection et la β -galactosidase a été quantifiée comme décrit dans la section matériel et méthode. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

Nous avons également comparé les promoteurs CB et CR5 dans des cellules C2C12 ayant le phénotype de myotubes. Dans ces cellules, l'activité du promoteur CB est équivalente à celle du promoteur CR5. Le promoteur CR5 est toujours régulé par l'ajout de cumate, quoique son facteur d'induction soit plus faible (3.9 fois), et son activité basale en absence de cTA est quasiment nulle (figure 22).

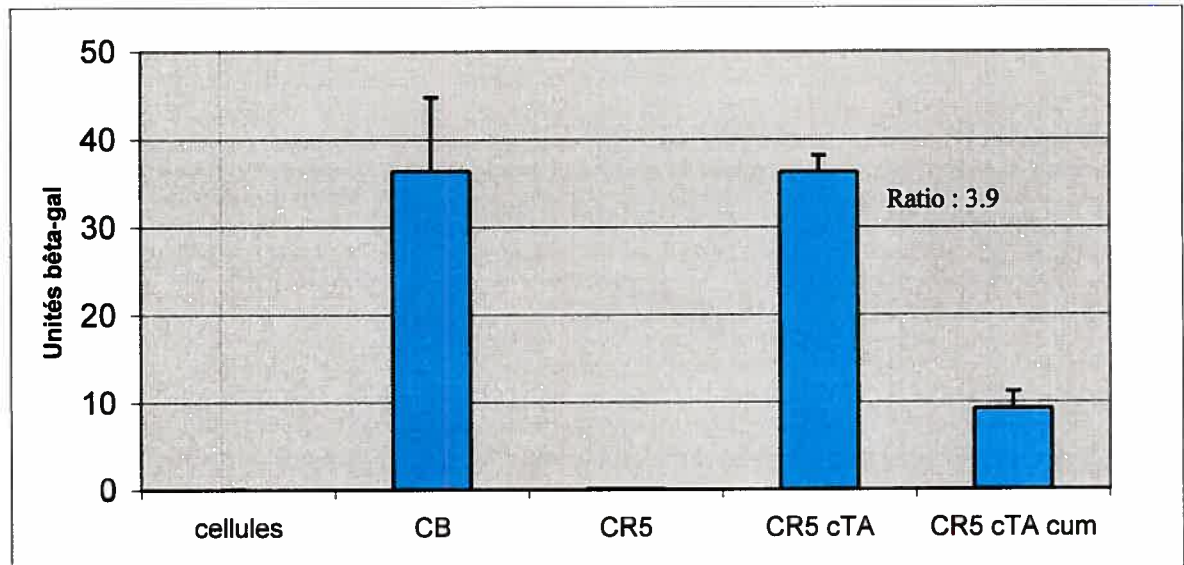


Figure 22: Activité comparée des promoteurs CR5 et CB dans les cellules C2C12 (myotubes)
600 000 cellules C2C12 transformées en myotubes ont été infectées avec les virus AdCB/LacZ ou AdCR5/LacZ ou AdCR5/LacZ et AdCMV5/cTA à une multiplicité d'infection de 400 par cellule. Les infections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumate pour les infections avec le AdCMV5/cTA. Les extraits cellulaires ont été récoltés cinq jours post-infection et la β -galactosidase a été quantifiée comme décrit dans la section matériel et méthode. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

Finalement, nous avons comparé l'activité des promoteurs CMV5 et CR5 dans des C2C12 sous forme de myoblastes. Cette comparaison a été faite avec des adénovirus codant pour la GFP. Par la suite, les cellules ont été analysées par cytofluorométrie de flux. Comme les myotubes sont des cellules qui fusionnent, ils ne peuvent pas être analysés par cytofluorométrie de flux. Il nous a été impossible de comparer ces deux promoteurs dans les myotubes. Les résultats de la figure 23 montrent que tout comme le promoteur CB, le promoteur CMV5 est beaucoup moins puissant que le promoteur CR5 dans les myoblastes.

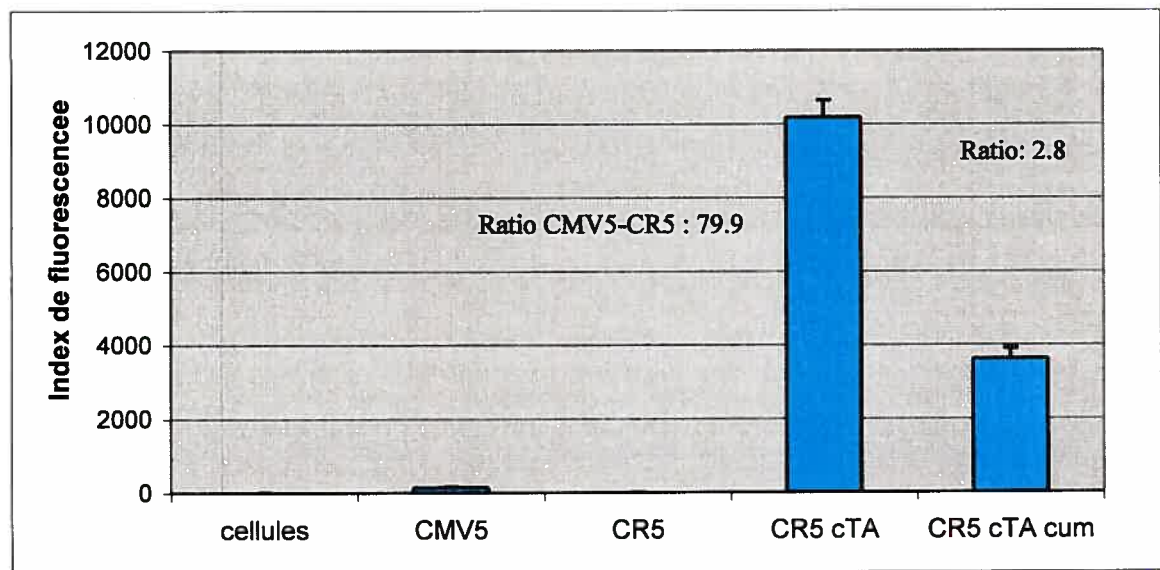


Figure 23: Activité comparée des promoteurs CR5 et CMV5 dans les cellules C2C12 (myoblastes)

60 000 cellules C2C12 ont été infectées avec les virus AdCMV5/GFP ou AdCR5/GFP ou AdCR5/GFP et AdCMV5/cTA à une multiplicité d'infection de 100 par cellule. Les infections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 µg/mL de cumate pour les infections avec le AdCMV5cTA. Les extraits cellulaires ont été récoltés trois jours post-infection et la β-galactosidase a été quantifiée comme décrit dans la section matériel et méthode. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

Comme la régulation de l'activité du promoteur CR5 dans les cellules C2C12 semble moins efficace que dans les cellules 293a (résultats non-montrés), nous avons tenté de diminuer la quantité de cTA dans ces cellules avec l'espoir d'augmenter ainsi le ratio allumé/éteint. Comme nous pouvons le constater aux figures 24 et 25, la quantité de protéine produite augmente avec l'apport de cTA dans les deux phénotypes des cellules C2C12. Par contre, le ratio allumé/éteint ne change pratiquement pas.

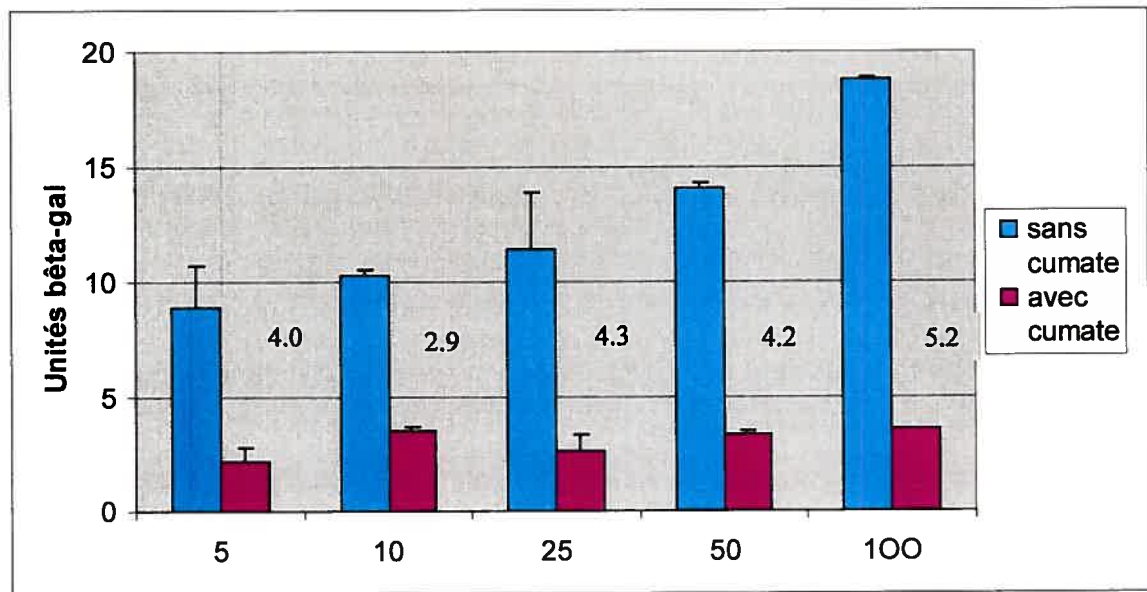


Figure 24: Effet de la quantité de cTA sur la régulation du CR5 dans les cellules C2C12 (myoblastes)

60 000 cellules C2C12 ont été infectées avec les virus AdCR5/LacZ à une multiplicité d'infection de 100 par cellule et AdCMV5/cTA à différentes multiplicités d'infection (voir légende). Les infections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 µg/mL de cumate. Les extraits cellulaires ont été récoltés trois jours post-infection et la β-galactosidase a été quantifiée comme décrit dans la section matériel et méthode. Les barres d'erreurs sont les écarts type. Les chiffres sur le graphique représentent le ratio allumé/éteint.

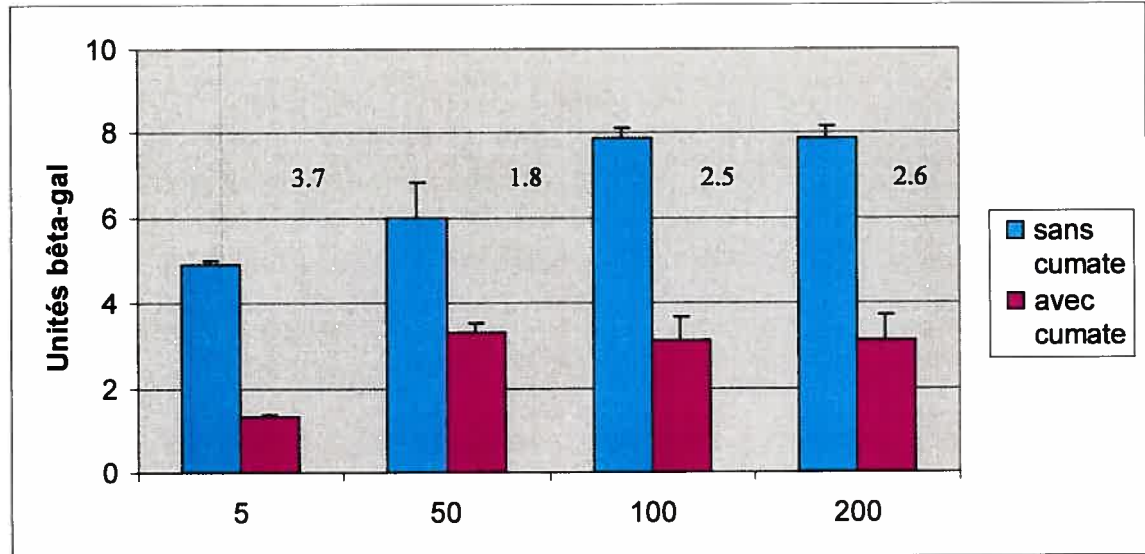


Figure 25: Effet de la quantité de cTA sur la régulation du CR5 dans les cellules C2C12 (myotubes)

600 000 cellules C2C12 transformées en myotubes ont été infectées avec les virus AdCR5/LacZ à une MOI de 400 et AdCMV5/cTA à différentes multiplicités d'infection (voir légende). Les infections ont été réalisées en triplicate, et en absence ou en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumate. Les extraits cellulaires ont été récoltés cinq jours post-infection et la β -galactosidase a été quantifiée comme décrit dans la section matériel et méthode. Les barres d'erreurs sont les écarts type. Les chiffres sur le graphique représentent le ratio allumé/éteint.

3.3 Caractérisation des promoteurs CR5 modifiés

Nous avons pu constater que le promoteur CR5 était très puissant, dans les îlots de langerhans comme dans les cellules C2C12. Cependant une amélioration de sa performance permettrait peut-être de diminuer la MOI nécessaire au marquage des îlots car une moins grande quantité de cTA serait nécessaire et réduirait ainsi l'effet des virus sur les cellules. De plus, le ratio allumé/éteint induit par le cumate n'est pas très bon dans les cellules C2C12 et est presque absent dans les îlots (résultats non montrés). Nous avons donc décidé d'apporter au promoteur CR5 les modifications que le groupe de Lotze avait faites sur le promoteur inductible à la tétracycline afin de tenter d'améliorer sa performance ainsi que sa régulation.

3.3.1 Caractérisation du promoteur CR5 modifié

La première modification apportée au promoteur CR5 consistait en un changement du nombre de paires de bases séparant deux séquences CuO. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le CR5 original comprend six séquences CuO répétitives, chacune étant espacées de 32 paires de bases, alors que le CR5 modifié a 36 paires de bases qui séparent chacune de ses six séquences CuO. Ce nouveau promoteur (CR5mod) a été commandé à la compagnie GeneArt, puis cloné dans le plasmide pLCR5mod/GFP. Des cellules 293a ayant intégré de façon stable le transgène CMVcTA (293acTA) ont ensuite été transfectées avec ce plasmide et un plasmide presque identique contenant la séquence du CR5 original afin de caractériser la puissance et la capacité de régulation du nouveau promoteur. Comme nous pouvons le constater à la figure 26, le nouveau promoteur ne semble pas avoir une meilleure activité que le promoteur original. En fait, les cellules transfectées avec ce nouveau promoteur produisent un niveau de protéines à peu près équivalent au niveau éteint du promoteur CR5 original. De plus, la régulation allumé/éteint du CR5mod n'est pas statistiquement valide selon un test de Student.

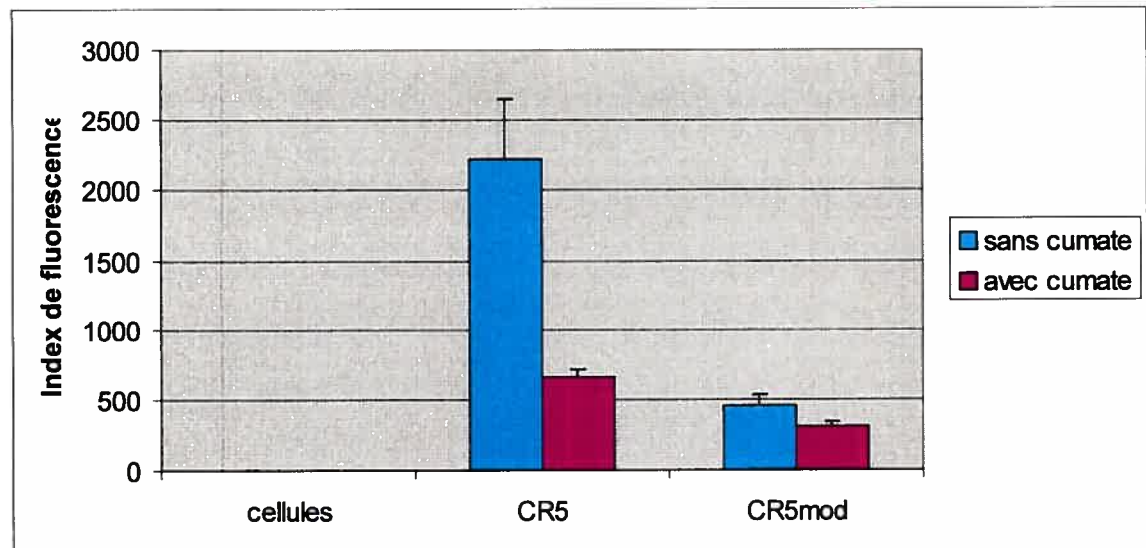


Figure 26: Activité comparée des promoteurs CR5 original et modifié dans les cellules 293acTA

Un million de cellules 293acTA ont été transfectées au PEI avec 3 μg du plasmide pLCR5/GFP ou pLCR5mod/GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumate. Les cellules ont été récoltées deux jours post-transfection et analysées par cytofluorométrie de flux. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

3.3.2 Caractérisation du promoteur CR5 Δ

La deuxième modification apportée au promoteur CR5 consistait quant à elle à rapprocher la séquence activatrice minimale (boîte TATA) du dernier CuO afin d'essayer de minimiser l'activité basale du promoteur et ainsi augmenter le ratio allumé/éteint. Il y avait 39 paires de bases entre le dernier CuO et la séquence activatrice minimale du promoteur CR5 original. Nous avons modifié cette distance de manière à ne laisser qu'un espacement de 10 paires de bases entre les deux séquences. Ce nouveau promoteur a été appelé CR5delta. Nous avons testé ce promoteur de la même manière que le promoteur CR5mod. Nous pouvons constater à la figure 27 que le CR5delta ne semble pas avoir une meilleure régulation que le CR5 original. De plus, nous pouvons constater à la figure 28 que cette nouvelle configuration du promoteur semble avoir une activité minime par rapport au promoteur CR5, bien en dessous du niveau éteint de ce dernier.

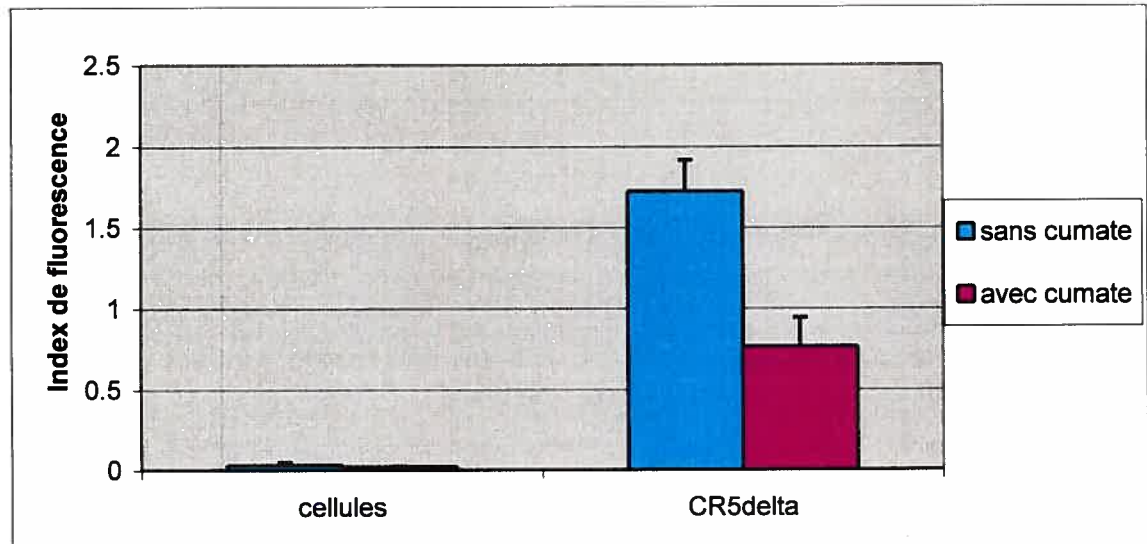


Figure 27 : Activité du promoteur CR5delta dans les cellules 293acTA

Un million de cellules 293acTA ont été transfectées au PEI avec 3 µg du plasmide pLCR5Δ/GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 µg/mL de cumate. Les cellules ont été récoltées sept jours post-transfection et analysées par cytofluorométrie de flux. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

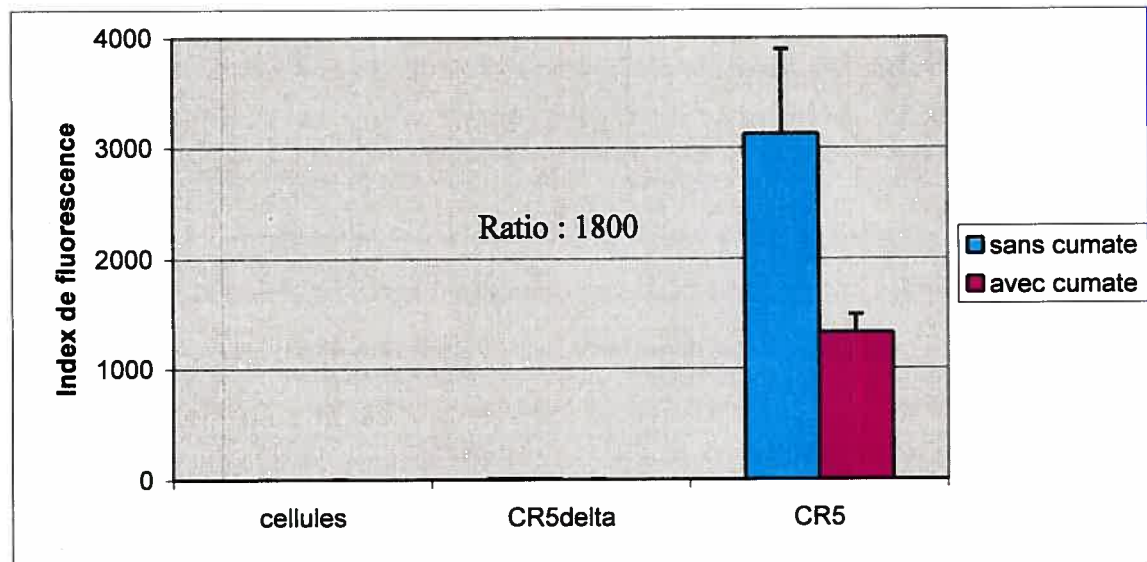


Figure 28: Activité comparée des promoteurs CR5 original et CR5delta dans les cellules 293acTA

Un million de cellules 293acTA ont été transfectées au PEI avec 3 µg du plasmide pLCR5/GFP ou pLCR5Δ/GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 µg/mL de cumate. Les cellules ont été récoltées sept jours post-transfection et analysées par cytofluorométrie de flux. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

3.4 Caractérisation du transactivateur inverse

Une librairie de mutants a été créée à partir du CymR original afin de rechercher une nouvelle molécule qui lierait l'opérateur cumate en présence de cumate ou de cymène, plutôt que l'inverse. Un tel répresseur a été trouvé, puis fusionné avec le VP16 afin de créer un transactivateur, appelé le cTA inverse (rcTA), qui sera utilisé pour caractériser la nouvelle molécule. La séquence d'ADN codant pour ce répresseur présente trois modifications (aux positions 125, 142 et 144) qui la distingue de la séquence originale (87). Les caractéristiques d'activation du CR5 par les deux transactivateurs ne seront donc peut-être pas les mêmes. En effet, il peut y avoir des différences dans le degré d'activation, ainsi que dans le ratio allumé/éteint du promoteur. Nous avons donc voulu caractériser ce nouveau transactivateur.

3.4.1 Comparaison de l'efficacité du rcTA par rapport au cTA original

Nous avons premièrement évalué l'intensité de l'activation du promoteur CR5 par les deux transactivateurs ainsi que leur efficacité dans la régulation de ce dernier lors de l'ajout de cumate. Les différences entre les deux transactivateurs ont été analysées par transfection transitoire des plasmides pAdCMV5/cTA-IRES-GFP ou pADENOCMV5/rcTA dans des cellules 293a ayant intégrées de façon stable le transgène CR5LacZ (293aCR5LacZ). Toutes les expériences de transfection transitoire ont été faites en triplicata. De plus, un contrôle interne de transfection, le pAdCMV5/Seap-IRES-GFP, a également été utilisé pour chaque expérience. Comme nous pouvons le constater à la figure 29, environ 2,5 fois plus de β -galactosidase est produite lorsque le CR5 est en présence du cTA que lorsque le rcTA est présent. De plus, le ratio allumé/éteint du promoteur est de plus de 50 fois avec le transactivateur original, alors que nous n'obtenons qu'un ratio de 5 fois avec le rcTA.

Afin de distinguer si la différence d'expression du gène rapporteur était due à une mauvaise expression du rcTA ou à une différence dans l'activité intrinsèque des deux transactivateurs, d'autres cellules 293aCR5LacZ ont également été transfectées au même

moment avec le même mélange de transfection afin de quantifier l'expression des molécules transactivatrices dans les cellules 293aCR5LacZ par immunobuvardage (figure 30).

Comme nous pouvons le voir à la figure 30, le niveau d'expression ne semble pas être le même pour les deux transactivateurs. En fait, l'efficacité de l'activation du CR5 par le rcTA semble être 40% de celle du cTA. Nous avons voulu savoir si cela pouvait s'expliquer par une expression différente des transactivateurs dans les cellules. Comme nous pouvons le voir à la figure 30, les deux transactivateurs ne semblent pas être produits de la même façon dans les cellules. Afin de quantifier cette différence, nous avons chargé sur gel différentes quantités d'un des échantillons de cTA (la quantité de protéine a été gardée constante en ajustant avec le contrôle négatif, soit les cellules qui n'avaient pas été transfectées avec un plasmide codant pour un transactivateur) et deux échantillons de rcTA. La quantification du rcTA a été faite à l'aide du logiciel imageQuant de Amersham Biosciences. L'expression du rcTA semble être 55% de celle du cTA dans les cellules 293aCR5LacZ (figure 31). Nous pouvons donc conclure que l'activité intrinsèque des deux transactivateurs est semblable, et que la baisse de la production du gène rapporteur était due à un manque de transactivateur.

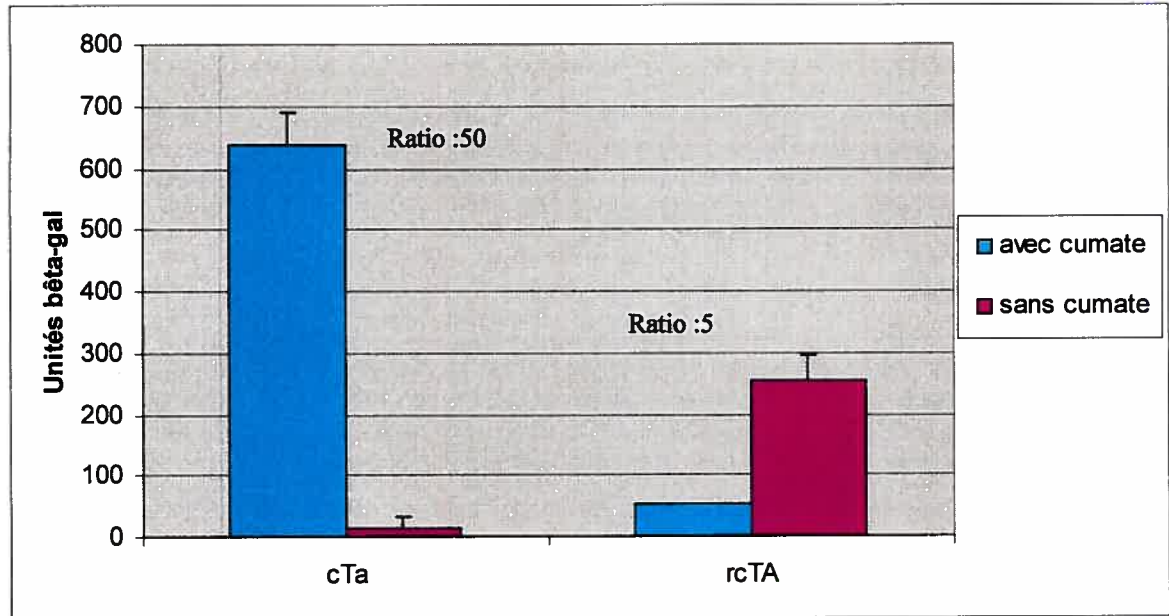


Figure 29: Activité comparée des deux transactivateurs dans les cellules 293aCR5LacZ

Un million de cellules 293aCR5LacZ ont été transfectées à la lipofectamine avec 1 μg d'un plasmide codant pour le cTA original ou le nouveau rcTA et 1 μg du pAdCMV5/SeapIRES-GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumate. Le surnageant et les extraits cellulaire ont été récoltés deux jours post-transfection. Les quantifications de la β -galactosidase et de la SEAP ont été faites comme décrit dans la section matériel et méthode. Les résultats montrés sont obtenus en divisant les unités de β -galactosidase par la pente du dosage de la SEAP. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

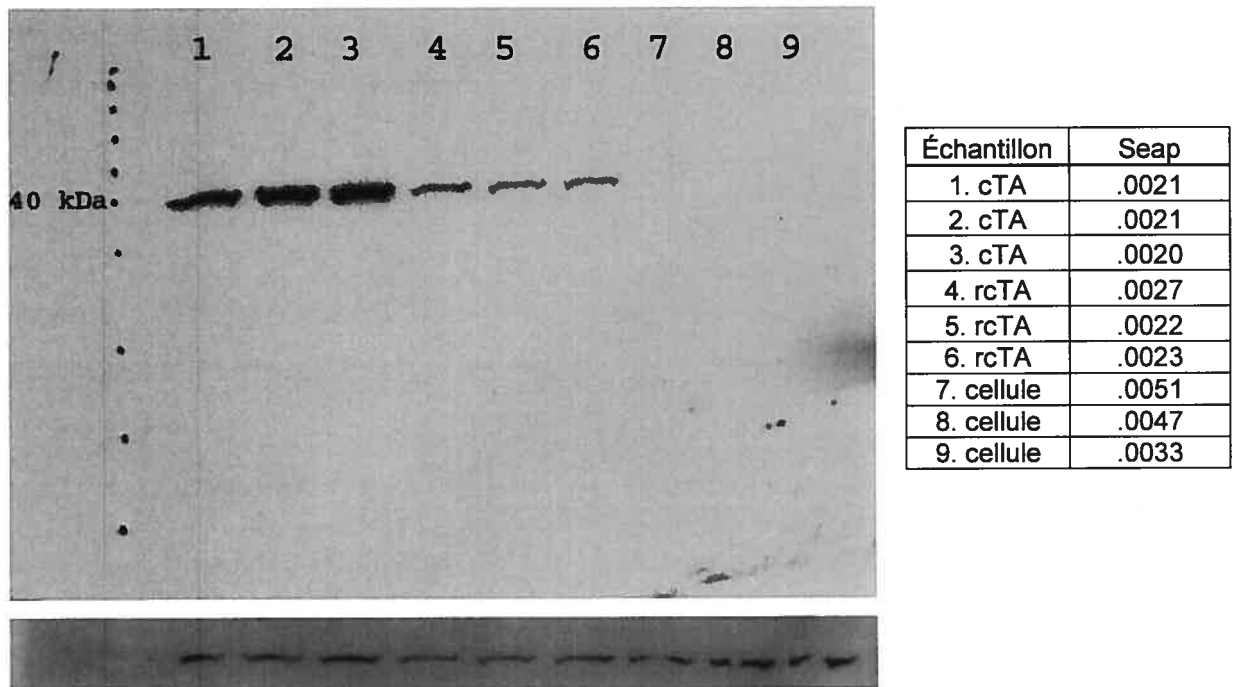


Figure 30 : Expression des deux transactivateurs dans les cellules 293aCR5LacZ

Un million de cellules 293aCR5LacZ ont été transfectées à la lipofectamine (même mélange de transfection que pour la figure 29) avec 1 µg d'un plasmide codant pour le cTA original, le nouveau rcTA ou un plasmide codant pour la GFP (contrôle négatif) et 1 µg du pAdCMV5/Seap-IRES-GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 µg/mL de cumate. Le surnageant et les extraits cellulaires ont été récoltés deux jours post-transfection. La quantification de la SEAP et les Western Blot ont été faits comme décrit dans la section matériel et méthode. Le premier western a été hybridé avec l'anti-VP16 et le deuxième avec l'anti-actine.

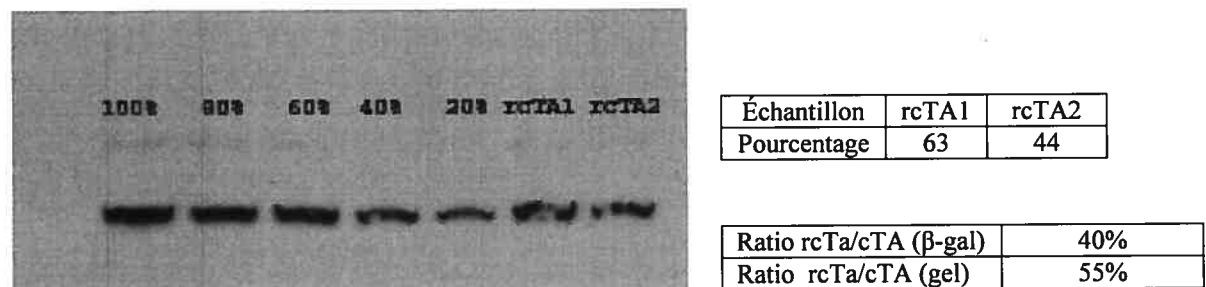


Figure 31 : Quantification de la quantité de cTA et de rcTA dans les cellules 293aCR5LacZ

Les échantillons utilisés sont les mêmes que pour la figure 29. L'échantillon cTA 1 a été chargé à différentes concentrations (la quantité de protéine finale a été normalisée à 20 µg avec l'échantillon de cellule 1). 100% correspond à 20 µg de l'échantillon cTA1. 20 µg de deux échantillons de rcTA ont aussi été chargé sur le gel. Le Western Blot a été hybridé avec l'anticorps anti-VP16 comme décrit dans la section matériel et méthode. La quantification des protéines a été faite avec le logiciel ImageQuant d'Amersham Biosciences.

3.4.2 Régulation de la quantité de rcTA par l'ajout de CymR

Ces premières expériences nous ont également permis de constater que la régulation du CR5 par le rcTA était moins efficace que la régulation par le cTA. Ceci pourrait être dû au fait que la liaison du rcTA à l'ADN est moins bien contrôlée par l'ajout de cumate. Une baisse dans la quantité de transactivateur permettrait peut-être d'obtenir une meilleure régulation. Nous avons donc tenté de réguler la quantité de rcTA produite dans la cellule en plaçant ce dernier sous le contrôle du promoteur CMV5CuO et en introduisant du CymR dans les cellules. Théoriquement, dans cette configuration appelée double régulée, le CymR bloque la transcription du rcTA et ce dernier n'active pas le promoteur CR5 en absence de cumate. Par contre, en présence de cumate, du rcTA est produit car le CymR libère la séquence CuO, et le transactivateur ainsi créé peut aller activer la transcription du gène qui se trouve sous le contrôle du CR5 (figure 32).

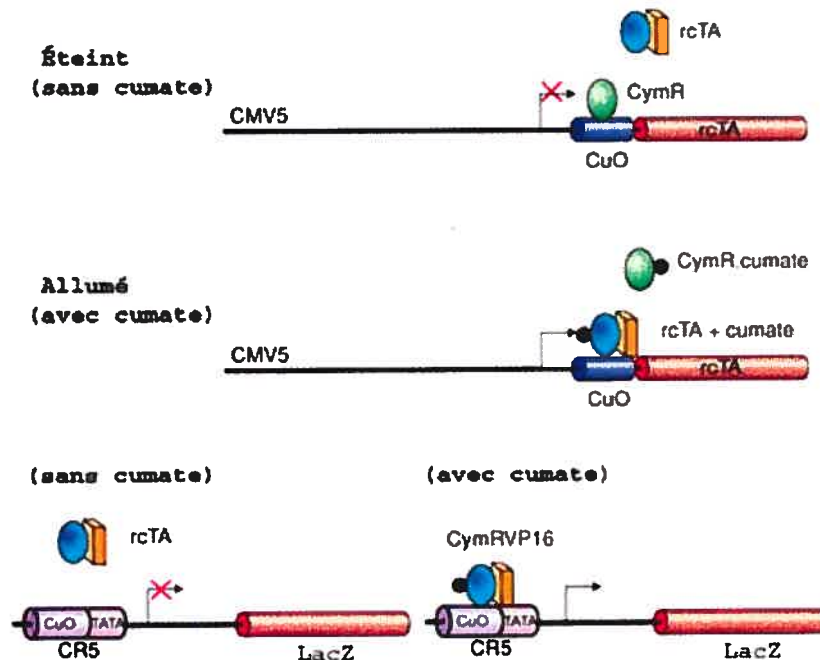


Figure 32: Le promoteur CR5 dans la configuration double régulée
(voir explications dans le texte)

Nous avons donc testé cette configuration par transfection du plasmide pAdCMV5CuO/rcTA-IRES-GFP et de différentes quantités du plasmide pADENOCMV/CymR dans les cellules 293aCR5LacZ. Comme on peut le constater à la figure 33, une trop grande quantité de CymR semble éteindre totalement l'activité du promoteur CR5. Ceci peut s'expliquer par le fait que le CymR peut lui aussi se lier aux séquences CuO. Le CymR compétitionne donc avec le rcTA pour les sites de liaison, ce qui explique qu'une trop grande quantité de CymR puisse éteindre l'activité. De plus, nous n'avons pas réussi à augmenter l'expression même en transfectant de très faibles quantités de CymR.

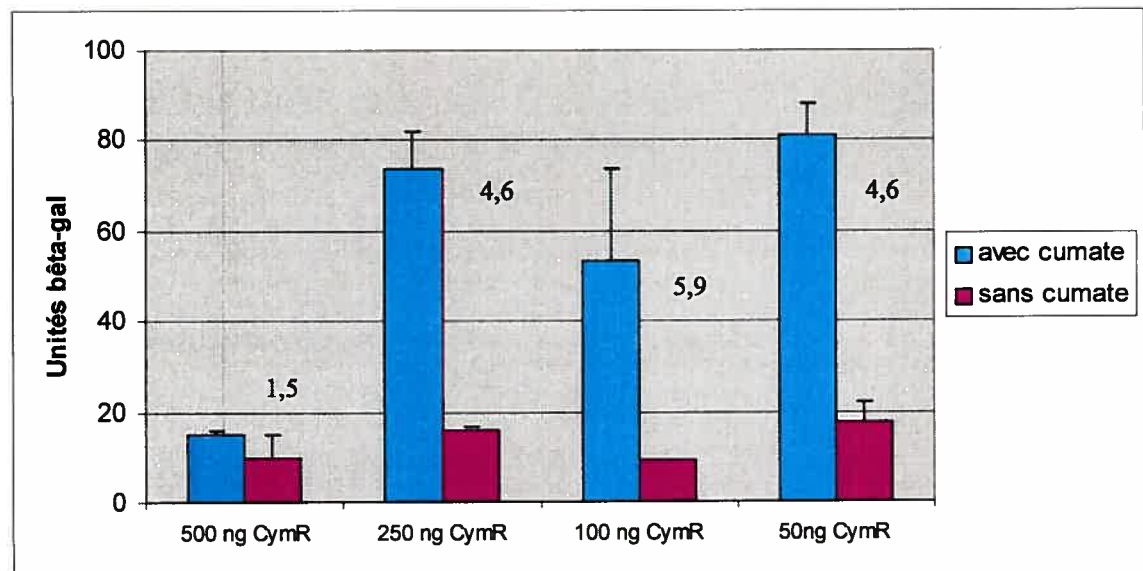


Figure 33: La double régulation du promoteur CR5 dans les cellules 293aCR5LacZ

Un million de cellules 293aCR5LacZ ont été transfectées au PEI avec 1 μ g du plasmide codant pour le rcTA sous le contrôle du promoteur CMV5CuO. Les cellules ont également été transfectées avec différentes quantités du plasmide CMVCymR, 1 μ g du pAdCMV5/Seap-IRES-GFP ainsi qu'avec la quantité nécessaire du plasmide pAdCMV5/IRES-GFP pour obtenir 3 μ g d'ADN au total. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 μ g/mL de cumate. Le surnageant et les extraits cellulaires ont été récoltés deux jours post-transfection. Les quantifications de la β -galactosidase et de la SEAP ont été faites comme décrit dans la section matériel et méthode. Les résultats montrés sont obtenus en divisant les unités de β -galactosidase par la pente du dosage de la seap. Les barres d'erreurs sont les écarts type. Les chiffres sur le graphique représentent le ratio allumé/éteint.

Nous avons donc cherché un moyen de réduire encore la quantité de CymR. Une lignée stable de cellules 293a ayant intégré le transgène CMVCymR (293aCymR) existait déjà dans notre laboratoire (63). Nous avons transfecté ces cellules avec le pAdCMV5CuO/rcTA-IRES-GFP et le pADENOCR5/LacZ afin de vérifier si une quantité plus faible de CymR pouvait permettre la régulation du promoteur CR5 sans éteindre son activité. Comme nous pouvons le constater à la figure 34, dans les cellules 293aCymR, l'activité du CR5 semble bien régulée. En fait, le ratio allumé/éteint obtenu est aussi bon celui obtenu avec le cTA.

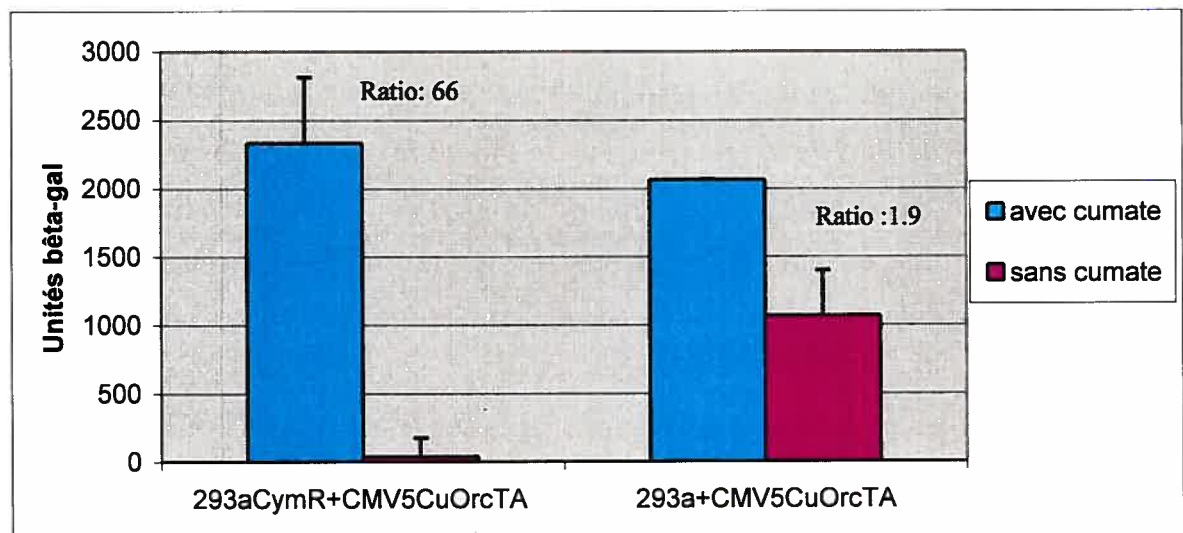


Figure 34: Régulation du CR5 par le rcTA dans les cellules 293a et 293aCymR

Un million de cellules 293a ou 293a CymR ont été transfectées au PEI avec 1 µg du plasmide codant pour le pADENOCMV5CuO/rcTA-IRES-GFP, 1 µg du pADENOCMV/LacZ et 1 µg du pAdCMV5/Seap-IRES-GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 µg/mL de cumate. Le surnageant et les extraits cellulaires ont été récoltés deux jours post-transfection. Les quantifications de la β-galactosidase et de la SEAP ont été faites comme décrit dans la section matériel et méthode. Les résultats montrés sont obtenus en divisant les unités de β-galactosidase par la pente du dosage de la seap. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

3.4.3 Régulation de la quantité de transactivateur par le promoteur CR5

Comme une quantité moindre de rcTA semblait augmenter l'efficacité de la régulation du CR5, nous avons pensé mettre le rcTA sous le contrôle du CR5, dans une configuration que nous avons appelée auto-régulation. Dans cette configuration, le rcTA active sa propre transcription en se liant au CR5. Comme le CR5 a une activité basale sans la présence du transactivateur, une petite quantité de rcTA est produite même sans l'apport externe de transactivateur. Le rcTA ainsi produit devait théoriquement être suffisant pour activer sa propre transcription en présence de cumate. Par contre, en absence de cumate, comme le rcTA est présent en quantité minimale, il ne devrait pas y avoir d'activation du CR5, augmentant ainsi le ratio allumé/éteint du promoteur. Ceci pourrait aussi être valable pour le cTA, avec bien sur l'activation du promoteur CR5 en absence de cumate (Figure 35).

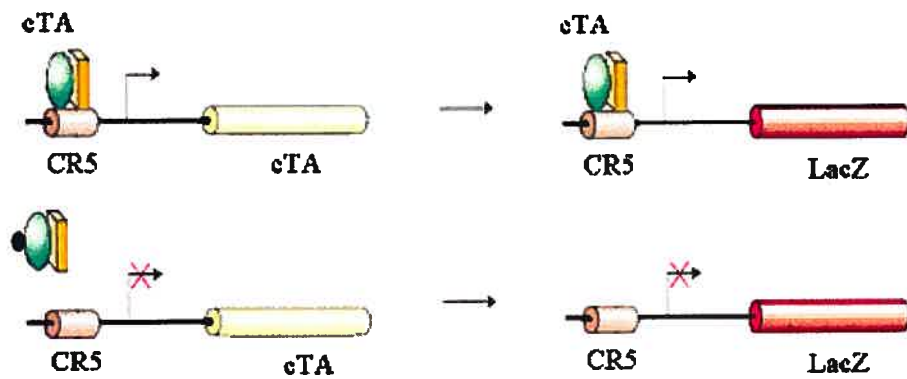


Figure 35 : Le promoteur CR5 dans la configuration auto-régulée
(avec activation par le cTA, voir explications dans le texte)

Comme nous pouvons le constater aux figures 36 et 37, le fait de placer le cTA et le rcTA sous le contrôle du promoteur régulable au cumate ne semble pas apporter un meilleur contrôle de la production des gènes placés sous le contrôle du CR5. En fait, il ne semble pas y avoir de différence significative dans l'expression ou la régulation des gènes placés sous le contrôle du CR5, que les transactivateurs soient sous le contrôle du CR5 ou du CMV5.

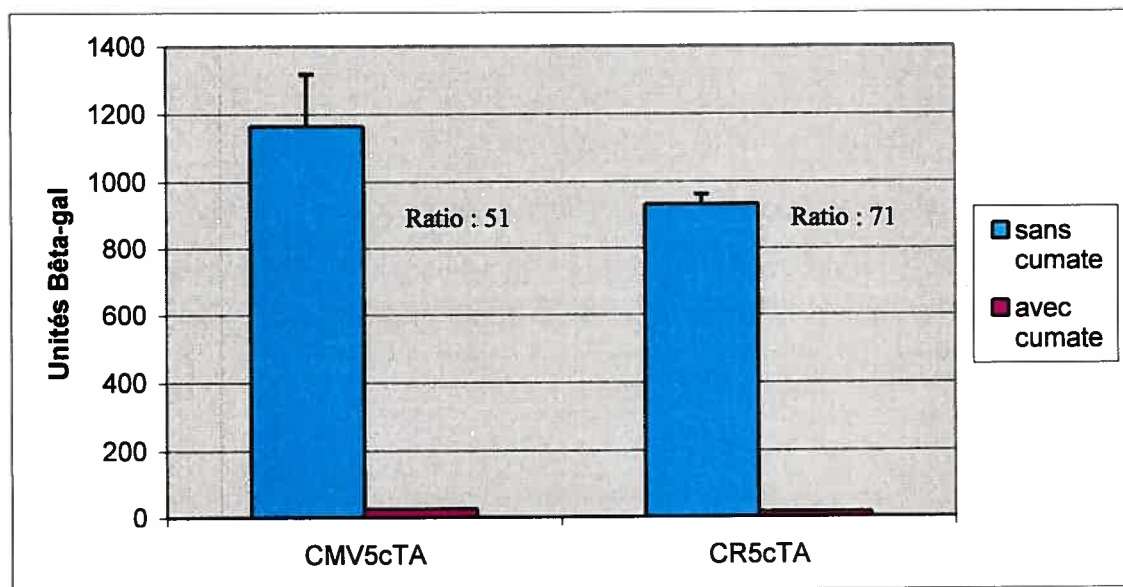


Figure 36 : Auto-régulation du cTa dans les cellules 293aCR5LacZ

Un million de cellules 293aCR5LacZ ont été transfectées au PEI avec 1 μg du plasmide pAdCR5/cTA-IRES-GFP ou pAdCMV5/cTA-IRES-GFP et 2 μg du pAdCMV5/Seap-IRES-GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumate. Le surnageant et les extraits cellulaires ont été récoltés deux jours post-transfection. Les quantifications de la β -galactosidase et de la SEAP ont été faites comme décrit dans la section matériel et méthode. Les résultats montrés sont obtenus en divisant les unités de β -galactosidase par la pente du dosage de la seap. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

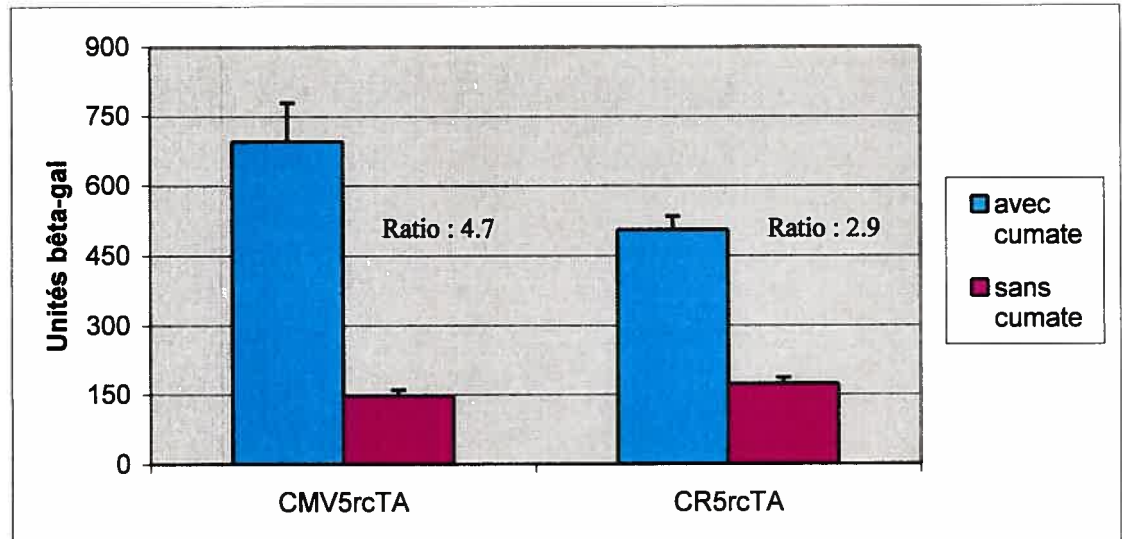


Figure 37: Auto-régulation du rcTA dans les cellules 293aCR5LacZ

Un million de cellules 293aCR5LacZ ont été transfectées au PEI avec 1 μ g du plasmide pAdCR5/rcTA-IRES-GFP ou pADENOCMV5/rcTA et 2 μ g du pAdCMV5/Seap-IRES-GFP. Les transfections ont été réalisées en triplicata, et en absence ou en présence de 200 μ g/mL de cumate. Le surnageant et les extraits cellulaires ont été récoltés deux jours post-transfection. Les quantifications de la β -galactosidase et de la SEAP ont été faites comme décrit dans la section matériel et méthode. Les résultats montrés sont obtenus en divisant les unités de β -galactosidase par la pente du dosage de la seap. Les barres d'erreurs sont les écarts type.

Section 4 : Discussion

4.1 Marquage spécifique des cellules d'îlots de langerhans

L'objectif global de ce travail de maîtrise était de bâtir des vecteurs viraux efficaces pour la transduction de cellules transformées et de cellules primaires avec le minimum d'interférence sur leur physiologie.

La majeure partie de ce travail a été consacrée au marquage spécifique des quatre types de cellules constituant les îlots de langerhans humains afin de suivre leur cheminement lors de leur transformation en kyste. Pour ce faire, nous avons construit des vecteurs contenant les promoteurs d'une protéine spécifique à chacun de ces types cellulaires. Nous avons obtenu ces promoteurs par PCR sur de l'ADN génomique provenant de cellules 293a (tableau 2). Nous avons d'abord marqué les cellules β d'îlots de langerhans humains à l'aide d'un vecteur adénovirus exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de l'insuline. Nous avons préféré utiliser les vecteurs adénovirus, car comme nous l'avons mentionné dans la section revue de littérature, ils produisent une expression forte et rapide du gène rapporteur. De plus les vecteurs adénovirus peuvent être produits à des titres élevés (105) et ne s'intègrent pas dans le génome (106), ce qui élimine la possibilité de mutations qui pourraient favoriser ou défavoriser la division cellulaire et ainsi fausser les résultats. Les vecteurs lentivirus pourraient éventuellement être utilisés dans le cas d'études futures, car bien qu'ils montrent une expression du gène rapporteur moins élevée, ils s'intègrent dans la cellule, et permettent donc une expression stable du gène rapporteur. Cela pourra être utile dans le cas d'études à plus long terme où les îlots sont transformés en kystes puis les kystes retransformés en structures ressemblant à des îlots.

Comme nous pouvons le voir à la figure 11, ce marquage était suffisant pour rendre les cellules β vertes et ainsi observer leur destin lors de la transformation des îlots en kystes. Le marquage peut sembler incomplet, cependant, comme nous l'avons mentionné dans la section revue de littérature, le marquage des cellules β par l'infection d'îlots entiers est ardu à réaliser, car les cellules β sont situées au centre des îlots, où les adénovirus pénètrent difficilement. Le marquage a été réalisé à une MOI de 250 par cellule, ce qui

selon la littérature est une MOI assez faible pour ne pas provoquer d'apoptose dans les cellules d'îlots.

Le promoteur de l'insuline est relativement puissant et permet un marquage des cellules de façon directe. Cependant, lorsque la même expérience a été tentée avec le promoteur du glucagon, le marquage des cellules s'est avéré quasi impossible à moins d'augmenter de façon considérable la MOI. Par contre, comme nous pouvons le voir à la figure 12, le promoteur CR5, qui s'était montré très puissant dans toutes les cellules où nous l'avions testé, est également très puissant dans les cellules d'îlots de langerhans humains, et possède une forte efficacité même en présence de peu de transactivateur (figure 14) tout en ayant peu ou pas d'activité basale en l'absence de transactivateur (figure 13). Nous avons donc voulu utiliser ces caractéristiques afin de diminuer la MOI nécessaire au marquage des cellules d'îlots.

Nous avons d'abord testé cette configuration indirecte dans les cellules 293aCR5GFP afin de nous assurer que cette façon de marquer les cellules était vraiment plus efficace que la manière directe. Nous avons transfecté ces cellules avec des plasmides codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur du glucagon ou pour le cTA sous le contrôle du même promoteur. Cette expérience nous a montré que la façon indirecte de réguler la GFP par le CR5 était beaucoup plus efficace que la façon directe par le promoteur du glucagon, du moins dans les cellules 293a (figure 10). Nous avons donc infecté les îlots avec une combinaison de vecteurs adénovirus exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur CR5 et le cTA sous le contrôle du promoteur du glucagon ou avec un vecteur exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du glucagon. Comme nous pouvons le voir à la figure 16, cette façon indirecte de marquer les cellules est beaucoup plus efficace que le marquage direct. En effet, en utilisant une MOI cinq fois plus faible que celle utilisée pour marquer les cellules β avec la GFP directement sous le contrôle du promoteur de l'insuline, nous parvenons à marquer les cellules α en utilisant le promoteur CR5, alors que même avec une très forte MOI du vecteur où la GFP est sous le contrôle du promoteur du glucagon, nous ne sommes pas arrivés à marquer les cellules de façon à suivre le cheminement de leur transformation en kystes. En fait le marquage était tellement

faible que le contraste de la photographie a du être augmenté pour percevoir la fluorescence. Nous avons donc décidé de marquer les cellules d'îlots à l'aide du promoteur CR5 pour les promoteurs du glucagon et de la somatostatine.

Avant de procéder à la transformation des îlots en kystes, nous voulions nous assurer de la spécificité du marquage des cellules afin d'être certain de suivre le destin des bonnes cellules. En effet, comme le promoteur CR5 est extrêmement puissant, nous voulions éviter qu'une faible activité des promoteurs spécifiques dans les autres types de cellules puisse produire assez de cTA pour rendre toutes les cellules fluorescentes. Pour nous assurer du contraire, nous avons marqué des îlots entiers ou dispersés avec un vecteur codant pour une protéine fluorescente rouge de façon ubiquiste dans toutes les cellules, ou une combinaison de vecteurs devant marquer spécifiquement les cellules α en vert. Comme nous pouvons le voir à la figure 18, le marquage semble être spécifique. En effet, les cellules en périphérie de l'îlot, qui sont principalement des cellules α , semblent marquées par les deux vecteurs. Par contre les cellules dispersées, comprenant environ 15% de cellules α , sont entièrement rouges mais seule une faible part expriment également la GFP. Des résultats plus précis sont présentés dans le tableau 3. Des expériences d'immunomarquage pour les protéines spécifiques (glucagon, insuline et somatostatine) sur des cellules d'îlots marquées par les vecteurs viraux ont en effet démontré que le marquage était extrêmement précis. En effet, les seules cellules vertes (positives pour la GFP) étaient celles où le promoteur contrôlant le cTA était supposé être actif. Par exemple, la GFP sous le contrôle du promoteur du glucagon est colocalisée avec la protéine glucagon mais pas avec la somatostatine.

Après avoir prouvé la spécificité du marquage, nous avons suivi la transformation des îlots en kystes (figures 19 et 20). Les cellules qui contribuent le plus à la formation du kyste sont les cellules δ , mais les cellules α semblent participer aussi, bien que leur apport paraisse moins important. En effet, pour les cellules δ , qui sont moins nombreuses que les cellules α , nous observons beaucoup de cellules vertes dans les nouvelles structures kystiques. Par contre, les kystes provenant d'îlots où les cellules α ont été marquées présentent quelques cellules vertes, mais en moins grande quantité que les kystes où les

cellules δ ont été marquées. Quant aux kystes où les cellules β ont été préalablement marquées, nous n'y observons aucune cellule verte après transformation. Nous observons beaucoup de cellules vertes dans l'ancien emplacement de l'îlot après la transformation. Cela peut s'expliquer par le fait que la GFP est une protéine qui possède une très longue demi-vie et il est normal de continuer à observer de la fluorescence même si les cellules se sont transformées (donc ne produisent plus de protéine à partir du gène rapporteur) ou sont mortes (107).

Ces résultats sont cohérents avec les hypothèses que l'équipe du Dr Rosenberg avait formulées suite aux résultats obtenus lors des expériences de co-immunoprécipitation, où l'on voyait que le glucagon et la somatostatine étaient colocalisés avec le CK-19, un marqueur des cellules canalaire, tandis que l'insuline ne colocalisait pas avec ce dernier. Des travaux sont actuellement en cours dans notre laboratoire afin de construire un vecteur où la protéine dsRed (une protéine fluorescente rouge) sera sous le contrôle du promoteur du CK-19, afin de prouver que les cellules vertes observés sont bien des cellules kystiques et non pas des cellules endocrines qui auraient été entraînées par les cellules en division.

Cependant, nous pouvons observer que ce ne sont pas toutes les cellules de kystes qui sont fluorescentes. En fait, seul un faible pourcentage des nouvelles cellules est vert et ce pour tous les types de vecteurs utilisés. Même en combinant les divers marquages, la quantité de cellules kystiques fluorescentes demeure minime. Nous aurions pu faire du co-immunomarquage pour la GFP et le CK19 (marqueur des cellules canalaire) sur les cellules de kystes. Nous aurions ainsi pu vérifier la présence de GFP dans les cellules kystiques de façon précise et connaître plus exactement la participation de chaque type cellulaire. Cependant, nous aurions eu besoin de davantage de cellules pour réussir une telle expérience. Nous travaillions avec des cellules humaines destinées à être greffées, il nous était donc très difficile de les obtenir.

Comme toutes les cellules kystiques ne semblent pas positives pour la GFP, il se pourrait qu'un autre type de cellule participe à la formation du kyste. Les cellules PP

pourraient être impliquées dans cette formation. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir d'adénovirus où le promoteur du polypeptide pancréatique contrôlerait le cTA. Cela aurait pu être intéressant de marquer ces cellules, afin de connaître leur destin lors de la transformation des îlots. Toutefois, comme ces cellules ne représentent qu'un pour cent de la population d'un îlot, soit environ dix cellules sur mille, il aurait été extrêmement difficile de suivre leur destin simplement en les marquant avec un gène rapporteur tel que la GFP. Nous pourrions donc conclure d'un résultat positif que ces cellules participent à la formation du kyste, mais un résultat négatif (pas de cellule verte dans le kyste) ne nous permettrait pas de conclure à l'absence de participation des cellules PP.

Des cellules souches réparties dans l'îlot pourraient également être impliquées dans la formation du kyste. Des évidences de l'existence de ces cellules ont déjà été rapportées (1;2). Nous avons présenté des hypothèses tentant d'expliquer la formation de kyste à partir d'îlots dans la section revue de littérature (figure 1). L'hypothèse correcte de la formation des kystes serait soit que les cellules en division proviennent des cellules en périphérie, soit qu'elles proviennent à la fois des cellules à la périphérie de l'îlot et de cellules progénitrices (figure 38 a,c ou d).

Finalement, il pourrait être intéressant de remplacer la séquence d'ADN codant pour le cTA par un autre gène, qui empêcherait la division des cellules ou les détruirait de façon ciblée. En empêchant la division cellulaire, nous pourrions prouver que ce sont bien les cellules bloquées qui forment les structures kystiques. Nous pourrions également vérifier quelles cellules sont essentielles à la formation du kyste. Une telle déplétion spécifique des cellules α , β ou PP a déjà été faite chez des souris transgéniques avec le gène de la toxine diphtérique A afin d'étudier la formation du pancréas dans l'embryogenèse (108).

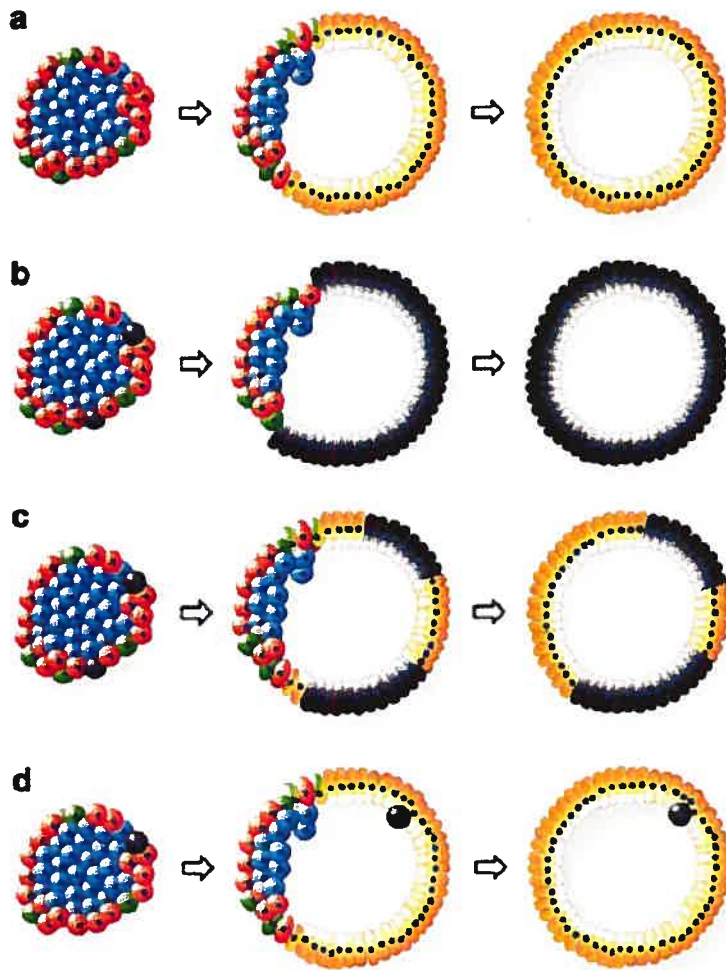


Figure 38: Mécanismes proposés du passage de la structure tridimensionnelle et fixe des îlots à une monocouche de cellules en division.

- a. Des cellules endocrines en périphérie se transforment, avec une perte des cellules β internes et aucune participation de cellules souches.
- b. Quelques cellules souches réparties dans l'îlot forment toutes les cellules kystiques, sans participation des cellules endocrines.
- c. Les cellules kystiques proviennent à la fois de cellules endocrines en périphérie et de cellules souches.
- d. Les cellules kystiques proviennent des cellules en périphérie, mais des cellules souches restent associées à la structure kystique, sans participer à la formation du kyste.

Cellules bleues : cellules β

Cellules rouges : cellules α

Cellules vertes : cellules δ

Cellules noires : cellules souches

Nous avons également voulu vérifier l'influence de l'infection par un adénovirus sur la capacité des îlots à se transformer. Comme nous pouvons le voir au tableau 4, l'infection adénovirale, jusqu'à une MOI de 250 000 par îlots, ne semble pas avoir d'influence sur la capacité des îlots à se transformer. Un test d'analyse de variance (ANOVA) a montré que la différence de transformation entre les îlots non infectés ou infectés à différentes MOI n'était pas significative.

Bien que la MOI utilisée ne semble pas perturber la différenciation des cellules d'îlots, nous pourrions peut-être la diminuer encore en utilisant des vecteurs adénoviraux dont la fibre (protéine qui détermine la spécificité de l'attachement des adénovirus à la cellule) serait modifiée. Des études ont déjà démontrés que de tels vecteurs sont beaucoup plus efficaces à basse MOI pour l'infection de cellules endocrines du pancréas que les vecteurs adénovirus non-modifiés (26).

4.2 Utilisation du système cumate dans les cellules C2C12

Les îlots avec lesquels nous travaillions sont des cellules humaines qui étaient destinées à être greffées. Ils sont par conséquent extrêmement difficiles à obtenir. Nous avons donc décidé de travailler avec les cellules C2C12 afin de poursuivre la caractérisation du promoteur inductible au cumate. Comme nous l'avons mentionné plus tôt, les cellules de la lignée de myoblastes murins C2C12, bien qu'elles soient des cellules transformées, présentent un certain potentiel de plasticité et sont donc un bon modèle pour étudier la force des promoteurs selon le degré de différenciation des cellules. Comme nous pouvons le voir aux figures 21 et 22, le promoteur CB, qui est reconnu pour être très actif dans les cellules musculaires et a été utilisé dans de nombreuses études, (109;110) se montre puissant dans les myotubes mais non dans les myoblastes. Quant au promoteur CR5, il est aussi puissant que le promoteur CB dans les myotubes, mais il garde son efficacité dans les myoblastes. Le promoteur CMV5, qui contient le même «enhancer» que le promoteur CB, mais qui est identique au promoteur CR5 à partir de la boîte TATA, est lui aussi beaucoup plus faible que le promoteur CR5 dans les myoblastes. Le promoteur CR5 pourrait donc être un bon outil pour les études dans ces cellules, puisqu'il maintient

son efficacité quel que soit leur état de différenciation. En fait, ce promoteur pourrait sûrement s'avérer un outil très utile dans les études de différenciation cellulaire en général, puisqu'il s'est montré puissant dans toutes les cellules où nous l'avons testé.

Le ratio allumé/éteint du promoteur CR5 a été mesuré dans les myoblastes et les myotubes. Bien que l'activité du promoteur soit régulée par l'ajout de cumate dans ces cellules (avec un ratio de 3.9 pour les myoblastes et de 3 pour les myotubes) la régulation est moins efficace que pour les cellules 293a. Nous avons pensé qu'une trop grande quantité de cTA pourrait être à l'origine de cette baisse du niveau de la régulation, comme une trop grande quantité de rcTA semble diminuer le ratio allumé/éteint dans les cellules 293a. Pour tester cette hypothèse, nous avons fait des infections dans lesquelles la quantité de vecteur adénovirus CR5LacZ était constante, mais où nous faisons varier la quantité du vecteur CMV5cTA. Comme nous pouvons le voir aux figures 24 et 25, la diminution de l'apport de cTA n'augmente pas de façon significative le ratio allumé/éteint du CR5 dans les deux états de différenciation de ces cellules. En effet, si l'activation du CR5 augmente avec l'accroissement de la quantité de transactivateur, le niveau basal augmente également, et le niveau de régulation demeure sensiblement le même. D'autres études avaient déjà démontré que le niveau de régulation de différents promoteurs inductibles varie considérablement selon le type de cellule (111).

4.3 Optimisation du système cumate

Comme nous avons pu le constater, le ratio allumé/éteint du promoteur CR5 n'était pas très élevé dans les cellules C2C12 et aucune régulation du promoteur CR5 n'a pu être obtenue lors d'expériences faites sur les îlots humains (résultats non montrés). Nous avons donc apporté certaines modifications au promoteur CR5 dans l'espoir d'améliorer son efficacité et sa régulation. Même si le promoteur CR5 s'est montré très puissant dans tous les types de cellules où nous l'avons testé, il serait utile d'améliorer l'efficacité de sa régulation afin de pouvoir diminuer la MOI nécessaire au marquage des cellules.

Nous avons premièrement modifié le nombre de paires de bases entre deux séquences opératrices de ce promoteur afin d'optimiser la synergie entre deux transactivateurs. Comme nous pouvons le voir à la figure 26, ce changement n'a pas eu l'effet escompté. Contrairement au promoteur tétracycline, où cette modification avait augmenté la puissance du promoteur, le promoteur cumate a perdu presque toute efficacité. Le promoteur ne présente même plus d'induction significative en absence de cumate (82).

Le promoteur inductible à la tétracycline a été étudié depuis longtemps par de nombreux groupes et sa caractérisation est presque parfaite. Par contre, le promoteur inductible au cumate n'est pas très connu, et les éléments qui sont importants pour son efficacité et sa régulation, ainsi que la séquence exacte du site de liaison du cTA restent à découvrir. Les modifications que nous avons apportées à ce promoteur n'étaient donc peut-être pas optimales, compte tenu du fait que nous ne connaissions pas avec certitude le site de liaison du transactivateur. En effet, le site utilisé pour la construction du promoteur est une double répétition retrouvée dans l'opéron bactérien. Comme ce n'est peut-être pas toute la séquence qui est essentielle, en choisissant le nouvel emplacement des sites CuO nous n'avons peut-être pas utilisé le véritable centre de la séquence essentielle à la liaison du cTA, diminuant ainsi l'efficacité du promoteur.

Une autre explication à la baisse d'efficacité du promoteur pourrait être l'effet différent de la liaison du transactivateur sur la structure de l'ADN. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, la meilleure synergie entre deux molécules de VP16 se produit lorsque ces dernières se retrouvent sur le même côté de la double hélice. Le modèle de Lederer propose un relâchement de 0,4 tour d'hélice lors de la liaison TetR-TetO, ce qui place les transactivateurs sur le même côté de la double hélice lorsque les opérateurs sont séparés par 36 paires de bases (trois tours et demi). Il est possible que la liaison CymR-CuO ne produise pas le même relâchement, et qu'ainsi la distance de 36 paires de bases entre deux opérateurs ne soit pas optimale pour la synergie des VP16, mais que la distance de 32 paires de bases (trois tours) que l'on trouve dans le promoteur original soit préférable.

Nous avons également modifié le promoteur CR5 en rapprochant le promoteur minimal de la dernière séquence CuO. Lorsqu'il a été appliqué au promoteur tétracycline, ce changement a permis de diminuer le niveau d'expression basal sous la barre de détection d'un ELISA, et malgré une diminution de trois fois dans la production de protéine par le promoteur, le ratio allumé/éteint a été augmenté jusqu'à 100000 fois (82).

La distance séparant la dernière séquence opératrice de la boîte TATA est la même (36 paires de bases) pour les promoteurs tétracycline et cumate originaux. Nous aurions donc pu penser que cette modification appliquée au promoteur CR5 aurait apporté les mêmes résultats que pour le promoteur tétracycline. Cette hypothèse s'est avérée fausse. En effet, le niveau basal a bien été diminué, mais l'activité du promoteur également. Cependant, le ratio allumé/éteint est demeuré sensiblement le même (figure 28). Comme les molécules transactivatrices des promoteurs tétracycline et cumate sont différentes, bien qu'elles soient de taille très semblable (41 versus 42 kDa) il se peut que la liaison du transactivateur cumate requière davantage d'espace et que le fait que la boîte TATA soit placée près de la dernière séquence opératrice nuise à l'activité du promoteur. De plus, comme nous ne connaissons pas précisément la séquence opératrice du promoteur cumate, nous ne pouvons être certains d'avoir placé la boîte TATA à exactement dix paires de bases (un tour) de cette dernière. Bref, la distance séparant la boîte TATA du dernier CuO pourrait probablement être améliorée, mais la distance de dix paires de bases n'est pas optimale, du moins pour la séquence opératrice que nous connaissons présentement.

Nous avons également caractérisé une nouvelle molécule transactivatrice inverse (rcTA) en la comparant avec la molécule transactivatrice originale (cTA). La production de protéine par le CR5 semble moins efficace lorsque le promoteur est activé par le rcTa que par le cTA (figure 29). Par contre, comme nous l'avons montré par des expériences d'immunobavardage, ceci peut être expliqué par la moins bonne expression du rcTA dans les cellules 293aCR5LacZ (figure 30-31). L'expression de plus de rcTA devrait permettre d'obtenir des niveaux d'activation du CR5 équivalents à ceux obtenus avec le cTA. Cependant, le ratio allumé/éteint obtenu lorsque le CR5 est activé par le rcTA est beaucoup

moins efficace que celui obtenu lorsque le promoteur est activé par le transactivateur original.

Le ratio allumé/éteint du promoteur CR5 activé par le rcTA a pu être amélioré. La quantité de transactivateur produite semble avoir un effet sur la régulation du promoteur. Nous avons pu constater que la stratégie de double régulation, où le rcTA est placé sous le contrôle du promoteur CMV5CuO et où il y a production de CymR dans la cellule, permet de réguler la quantité de transactivateur en plus de son attachement à l'ADN et augmente la régulation à des niveaux aussi bons que ceux obtenus avec le cTA. Par contre, une trop grande quantité de CymR semble éteindre totalement l'activité (figures 33 et 34). Comme le CymR et le rcTA sont en compétition pour la liaison au CR5, une trop grande quantité de CymR empêche probablement le rcTA d'activer le promoteur en bloquant les sites de liaison, alors que lorsque la quantité de CymR est très réduite, le promoteur n'est pas saturé par le répresseur.

Nous avons espéré pouvoir arriver aux mêmes résultats en plaçant le transactivateur sous le contrôle du promoteur CR5 (figure 35) afin de créer une boucle d'auto-régulation qui aurait permis de diminuer la quantité de transactivateur présente dans la cellule en condition de non-induction, mais sans avoir à apporter le gène codant pour le CymR dans la cellule. Cependant, cette configuration n'a pas apporté les résultats escomptés. En effet, la régulation n'est pas meilleure dans cette disposition. Le niveau basal demeure le même. Ceci pourrait être causé par le fait que l'activité basale du CR5 est passablement élevée et qu'elle suffit à produire du transactivateur même dans les conditions où le promoteur ne devrait pas être activé. De plus, le niveau d'activation semble être légèrement inférieur lorsque le transactivateur est sous le contrôle du CR5. Cependant, un test de student bilatéral nous apprend que la différence n'est pas significative à un seuil d'erreur de 5% pour le rcTA ($p=0,059$) ni pour le cTA ($p=0,061$).

Des résultats obtenus dans notre laboratoire montrent qu'un ratio allumé/éteint de plus de 600 fois peut être obtenu si tous les éléments de la double régulation (CymR+rcTA) sont intégrés de façon stable dans le génome de la cellule. Ceci est cohérent

avec des résultats obtenus pour le promoteur inductible à la tétracycline, qui montraient qu'un meilleur ratio était obtenu lorsque les éléments de régulation sont exprimés par la cellule plutôt qu'apportés en *trans* (112).

Le premier transactivateur inverse utilisé pour la régulation du promoteur régulable à la tétracycline avait une affinité résiduelle pour la séquence tetO en absence de doxycycline. Cela provoquait un niveau d'activité basale élevée, qui variait selon la quantité de transactivateur présente dans la cellule (113). Des mutations additionnelles ont par la suite été apportées à ce transactivateur afin de diminuer le niveau basal (114). La mauvaise régulation du CR5 par le rcTA pourrait probablement être améliorée également. Des travaux sont actuellement en cours dans notre laboratoire afin de modifier la séquence du rcTA et ainsi augmenter sa régulation et peut-être son efficacité dans l'activation du CR5.

4.4 Conclusion

En conclusion, nous avons réussi à marquer les cellules d'îlots de langerhans de manière spécifique et à suivre leur différenciation en kystes. Nous avons découvert que les cellules α et δ participent à la formation du kyste, alors que les cellules β ne se divisent pas. Nous croyons qu'un autre type cellulaire participe également à la formation du kyste, car les cellules kystiques ne sont pas toutes positives pour la GFP. Le promoteur CR5 s'est avéré très puissant dans cette étude, et nous avons montré que ce promoteur était également plus efficace dans les cellules C2C12 que deux promoteurs très utilisés à ce jour pour les études dans ces cellules. Nous pensons donc que le promoteur CR5 pourrait s'avérer un outil puissant dans les études de différenciation cellulaire. Nous avons tenté d'apporter des modifications à ce promoteur afin d'améliorer son efficacité et sa régulation, mais elles n'ont pas eu les effets escomptés. Nous avons également fait des études préliminaires sur une nouvelle application du système régulable au cumate, afin de caractériser une molécule transactivatrice dont l'activité est inversée par rapport au transactivateur original. Nous avons trouvé que cette nouvelle molécule n'est pas optimale. En effet, la régulation du promoteur CR5 est beaucoup plus faible avec le rcTA qu'avec le cTA original. Par contre, une quantité équivalente de transactivateur semble apporter la même activation du CR5.

References

1. Lechner, A. and Habener, J. F. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284: E259-E266, 2003.
2. Seaberg, R. M., Smukler, S. R., Kieffer, T. J., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, M. B., Korbitt, G., and van der, K. D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*, 22: 1115-1124, 2004.
3. Ju, Q., Edelstein, D., Brendel, M. D., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Bretzel, R. G., and Brownlee, M. Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998.
4. Arias, A. E. and Bendayan, M. Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro. *Lab Invest*, 69: 518-530, 1993.
5. Hall, P. A. and Lemoine, N. R. Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas. *J Pathol*, 166: 97-103, 1992.
6. Scarpelli, D. G. and Rao, M. S. Differentiation of regenerating pancreatic cells into hepatocyte-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 2577-2581, 1981.
7. Kerr-Conte, J., Pattou, F., Lecomte-Houcke, M., Xia, Y., Boilly, B., Proye, C., and Lefebvre, J. Ductal cyst formation in collagen-embedded adult human islet preparations. A means to the reproduction of nesidioblastosis in vitro. *Diabetes*, 45: 1108-1114, 1996.
8. Schmied, B. M., Ulrich, A., Matsuzaki, H., Li, C. H., and Pour, P. M. In vitro pancreatic carcinogenesis. *Ann Oncol*, 10 Suppl 4: 41-45, 1999.
9. Yuan, S., Rosenberg, L., Paraskevas, S., Agapitos, D., and Duguid, W. P. Transdifferentiation of human islets to pancreatic ductal cells in collagen matrix culture. *Differentiation*, 61: 67-75, 1996.
10. Jamal, A. M., Lipsett, M., Hazrati, A., Paraskevas, S., Agapitos, D., Maysinger, D., and Rosenberg, L. Signals for death and differentiation: a two-step mechanism for in vitro transformation of adult islets of Langerhans to duct epithelial structures. *Cell Death Differ*, 10: 987-996, 2003.
11. Wang, R. N. and Rosenberg, L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol*, 163: 181-190, 1999.
12. Pour, P. M., Pandey, K. K., and Batra, S. K. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma? *Mol Cancer*, 2: 13, 2003.

13. Rutzky, L. P., Bilinski, S., Kloc, M., Phan, T., Zhang, H., Katz, S. M., and Stepkowski, S. M. Microgravity culture condition reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets¹. *Transplantation*, *74*: 13-21, 2002.
14. Skau, M., Pakkenberg, B., Buschard, K., and Bock, T. Linear correlation between the total islet mass and the volume-weighted mean islet volume. *Diabetes*, *50*: 1763-1770, 2001.
15. Rosenberg, L., Lipsett, M., Yoon, J. W., Prentki, M., Wang, R., Jun, H. S., Pittenger, G. L., Taylor-Fishwick, D., and Vinik, A. I. A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J mice. *Ann Surg*, *240*: 875-884, 2004.
16. Jamal, A. M., Lipsett, M., Sladek, R., Laganriere, S., Hanley, S., and Rosenberg, L. Morphogenetic plasticity of adult human pancreatic islets of Langerhans. *Cell Death Differ*, 2005.
17. Streuli, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol*, *11*: 634-640, 1999.
18. Miettinen, P. J., Huotari, M., Koivisto, T., Ustinov, J., Palgi, J., Rasilainen, S., Lehtonen, E., Keski-Oja, J., and Otonkoski, T. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development*, *127*: 2617-2627, 2000.
19. Miralles, F., Battelino, T., Czernichow, P., and Scharfmann, R. TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. *J Cell Biol*, *143*: 827-836, 1998.
20. Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B. Z., and Steller, H. Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell*, *2*: 159-170, 2002.
21. Lee, S. E., Woo, K. M., Kim, S. Y., Kim, H. M., Kwack, K., Lee, Z. H., and Kim, H. H. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone*, *30*: 71-77, 2002.
22. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, *111*: 229-233, 1992.
23. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*: 802-805, 1994.
24. Baulcombe, D. C., Chapman, S., and Santa, C. S. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J*, *7*: 1045-1053, 1995.

25. Oualikene, W. Adenovirus vectors in functional genomics. *In* Al-Rubeai (ed.), *Cell engineering*, pp. 80-154. Luwer Academic, 2000.
26. Bilbao, G., Contreras, J. L., Dmitriev, I., Smyth, C. A., Jenkins, S., Eckhoff, D., Thomas, F., Thomas, J., and Curiel, D. T. Genetically modified adenovirus vector containing an RGD peptide in the HI loop of the fiber knob improves gene transfer to nonhuman primate isolated pancreatic islets. *Am J Transplant*, 2: 237-243, 2002.
27. Reynolds, P. N., Feng, M., and Curiel, D. T. Chimeric viral vectors--the best of both worlds? *Mol Med Today*, 5: 25-31, 1999.
28. Feng, M., Jackson, W. H., Jr., Goldman, C. K., Rancourt, C., Wang, M., Dusing, S. K., Siegal, G., and Curiel, D. T. Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat Biotechnol*, 15: 866-870, 1997.
29. Fisher, K. J., Kelley, W. M., Burda, J. F., and Wilson, J. M. A novel adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the AAV genome. *Hum Gene Ther*, 7: 2079-2087, 1996.
30. Recchia, A., Parks, R. J., Lamartina, S., Toniatti, C., Pieroni, L., Palombo, F., Ciliberto, G., Graham, F. L., Cortese, R., La, M. N., and Colloca, S. Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adenovirus-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 2615-2620, 1999.
31. Yant, S. R., Ehrhardt, A., Mikkelsen, J. G., Meuse, L., Pham, T., and Kay, M. A. Transposition from a gutless adeno-transposon vector stabilizes transgene expression in vivo. *Nat Biotechnol*, 20: 999-1005, 2002.
32. Leblois, H., Roche, C., Di, F. N., Orsini, C., Yeh, P., and Perricaudet, M. Stable transduction of actively dividing cells via a novel adenoviral/episomal vector. *Mol Ther*, 1: 314-322, 2000.
33. Tan, B. T., Wu, L., and Berk, A. J. An adenovirus-Epstein-Barr virus hybrid vector that stably transforms cultured cells with high efficiency. *J Virol*, 73: 7582-7589, 1999.
34. Romano, G. Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect*, 18: 128-134, 2005.
35. Curran, M. A., Ochoa, M. S., Molano, R. D., Pileggi, A., Inverardi, L., Kenyon, N. S., Nolan, G. P., Ricordi, C., and Fenjves, E. S. Efficient transduction of pancreatic islets by feline immunodeficiency virus vectors¹. *Transplantation*, 74: 299-306, 2002.
36. Kobinger, G. P., Deng, S., Louboutin, J. P., Vatamaniuk, M., Matschinsky, F., Markmann, J. F., Raper, S. E., and Wilson, J. M. Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 15: 211-219, 2004.

37. Leibowitz, G., Beattie, G. M., Kafri, T., Cirulli, V., Lopez, A. D., Hayek, A., and Levine, F. Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes*, 48: 745-753, 1999.
38. Narushima, M., Okitsu, T., Miki, A., Yong, C., Kobayashi, K., Yonekawa, Y., Tanaka, K., Ikeda, H., Matsumoto, S., Tanaka, N., and Kobayashi, N. Adenovirus mediated gene transduction of primarily isolated mouse islets. *ASAIO J*, 50: 586-590, 2004.
39. Kobayashi, N., Arata, T., Okitsu, T., Ikeda, H., Kobayashi, K., Kosaka, Y., Narushima, M., Tanaka, N., and Lakey, J. R. Transduction of human islets with the lentiviral vector. *Transplant Proc*, 36: 2203-2204, 2004.
40. Giannoukakis, N., Mi, Z., Gambotto, A., Eramo, A., Ricordi, C., Trucco, M., and Robbins, P. Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther*, 6: 1545-1551, 1999.
41. Kapturczak, M. H., Flotte, T., and Atkinson, M. A. Adeno-associated virus (AAV) as a vehicle for therapeutic gene delivery: improvements in vector design and viral production enhance potential to prolong graft survival in pancreatic islet cell transplantation for the reversal of type 1 diabetes. *Curr Mol Med*, 1: 245-258, 2001.
42. Yang, Y. W. and Kotin, R. M. Glucose-responsive gene delivery in pancreatic Islet cells via recombinant adeno-associated viral vectors. *Pharm Res*, 17: 1056-1061, 2000.
43. Prasad, K. M., Yang, Z., Bleich, D., and Nadler, J. L. Adeno-associated virus vector mediated gene transfer to pancreatic beta cells. *Gene Ther*, 7: 1553-1561, 2000.
44. Wang, A. Y., Peng, P. D., Ehrhardt, A., Storm, T. A., and Kay, M. A. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther*, 15: 405-413, 2004.
45. Flotte, T., Agarwal, A., Wang, J., Song, S., Fenjves, E. S., Inverardi, L., Chesnut, K., Afione, S., Loiler, S., Wasserfall, C., Kapturczak, M., Ellis, T., Nick, H., and Atkinson, M. Efficient ex vivo transduction of pancreatic islet cells with recombinant adeno-associated virus vectors. *Diabetes*, 50: 515-520, 2001.
46. Merten, O. W., Geny-Fiamma, C., and Douar, A. M. Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther*, 12 *Suppl 1*: S51-S61, 2005.
47. Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J. M. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 11854-11859, 2002.

48. Rehman, K. K., Wang, Z., Bottino, R., Balamurugan, A. N., Trucco, M., Li, J., Xiao, X., and Robbins, P. D. Efficient gene delivery to human and rodent islets with double-stranded (ds) AAV-based vectors. *Gene Ther*, *12*: 1313-1323, 2005.
49. Liu, Y., Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W., Mukherjee, B., Brownlee, M., Edelstein, D., and Federoff, H. J. Expression of the bcl-2 gene from a defective HSV-1 amplicon vector protects pancreatic beta-cells from apoptosis. *Hum Gene Ther*, *7*: 1719-1726, 1996.
50. Wang, Z., Ma, H. I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*, *10*: 2105-2111, 2003.
51. Ma, L., Tamarina, N., Wang, Y., Kuznetsov, A., Patel, N., Kending, C., Hering, B. J., and Philipson, L. H. Baculovirus-mediated gene transfer into pancreatic islet cells. *Diabetes*, *49*: 1986-1991, 2000.
52. Narang, A. S., Cheng, K., Henry, J., Zhang, C., Sabek, O., Fraga, D., Kotb, M., Gaber, A. O., and Mahato, R. I. Vascular endothelial growth factor gene delivery for revascularization in transplanted human islets. *Pharm Res*, *21*: 15-25, 2004.
53. Mahato, R. I., Henry, J., Narang, A. S., Sabek, O., Fraga, D., Kotb, M., and Gaber, A. O. Cationic lipid and polymer-based gene delivery to human pancreatic islets. *Mol Ther*, *7*: 89-100, 2003.
54. Gainer, A. L., Korbitt, G. S., Rajotte, R. V., Warnock, G. L., and Elliott, J. F. Successful biolistic transformation of mouse pancreatic islets while preserving cellular function. *Transplantation*, *61*: 1567-1571, 1996.
55. de Vargas, L. M., Sobolewski, J., Siegel, R., and Moss, L. G. Individual beta cells within the intact islet differentially respond to glucose. *J Biol Chem*, *272*: 26573-26577, 1997.
56. Meyer, K., Irminger, J. C., Moss, L. G., de Vargas, L. M., Oberholzer, J., Bosco, D., Morel, P., and Halban, P. A. Sorting human beta-cells consequent to targeted expression of green fluorescent protein. *Diabetes*, *47*: 1974-1977, 1998.
57. Csete, M. E., Benhamou, P. Y., Drazan, K. E., Wu, L., McIntee, D. F., Afra, R., Mullen, Y., Busuttil, R. W., and Shaked, A. Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation*, *59*: 263-268, 1995.
58. Braithwaite, A. W. and Russell, I. A. Induction of cell death by adenoviruses. *Apoptosis*, *6*: 359-370, 2001.
59. Barbu, A. R., Akusjarvi, G., and Welsh, N. Adenoviral-mediated transduction of human pancreatic islets: importance of adenoviral genome for cell viability and association with a deficient antiviral response. *Endocrinology*, *146*: 2406-2414, 2005.

60. Barbu, A. R., Akusjarvi, G., and Welsh, N. Adenoviral-induced islet cell cytotoxicity is not counteracted by Bcl-2 overexpression. *Mol Med*, 8: 733-741, 2002.
61. Neddermann, P., Gargioli, C., Muraglia, E., Sambucini, S., Bonelli, F., De, F. R., and Cortese, R. A novel, inducible, eukaryotic gene expression system based on the quorum-sensing transcription factor TraR. *EMBO Rep*, 4: 159-165, 2003.
62. Senner, V., Sotoodeh, A., and Paulus, W. Regulated gene expression in glioma cells: a comparison of three inducible systems. *Neurochem Res*, 26: 521-524, 2001.
63. Schena, M., Lloyd, A. M., and Davis, R. W. A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10421-10425, 1991.
64. No, D., Yao, T. P., and Evans, R. M. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 3346-3351, 1996.
65. Zhao, H. F., Boyd, J., Jolicoeur, N., and Shen, S. H. A coumermycin/novobiocin-regulated gene expression system. *Hum Gene Ther*, 14: 1619-1629, 2003.
66. Tascou, S., Sorensen, T. K., Glenat, V., Wang, M., Lakich, M. M., Dartel, R., Vigne, E., and Thuillier, V. Stringent rosiglitazone-dependent gene switch in muscle cells without effect on myogenic differentiation. *Mol Ther*, 9: 637-649, 2004.
67. Weber, W., Rimann, M., Spielmann, M., Keller, B., oud-El, B. M., Aubel, D., Weber, C. C., and Fussenegger, M. Gas-inducible transgene expression in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol*, 22: 1440-1444, 2004.
68. Fussenegger, M. The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol Prog*, 17: 1-51, 2001.
69. Gossen, M. and Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 5547-5551, 1992.
70. Mullick, A., koshini, Y., Lau, P., and Massie, B. A cumate-inducible system for regulated expression in mammalian cells. 2001.
Ref Type: Patent
71. Eaton, R. W. p-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of p-cymene to p-cumate. *J Bacteriol*, 179: 3171-3180, 1997.

72. Eaton, R. W. p-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* Fl: cloning and characterization of DNA carrying the cmt operon. *J Bacteriol*, 178: 1351-1362, 1996.
73. Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D. D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F., and Langelier, Y. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol*, 72: 2289-2296, 1998.
74. Marshall, E. Gene therapy's growing pains. *Science*, 269: 1050, 1052-1050, 1055, 1995.
75. Wilson, J. M. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med*, 334: 1185-1187, 1996.
76. Zhang, W. W., Alemany, R., Wang, J., Koch, P. E., Ordonez, N. G., and Roth, J. A. Safety evaluation of Ad5CMV-p53 in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*, 6: 155-164, 1995.
77. Lottmann, H., Vanselow, J., Hessabi, B., and Walther, R. The Tet-On system in transgenic mice: inhibition of the mouse pdx-1 gene activity by antisense RNA expression in pancreatic beta-cells. *J Mol Med*, 79: 321-328, 2001.
78. Milo-Landesman, D., Surana, M., Berkovich, I., Compagni, A., Christofori, G., Fleischer, N., and Efrat, S. Correction of hyperglycemia in diabetic mice transplanted with reversibly immortalized pancreatic beta cells controlled by the tet-on regulatory system. *Cell Transplant*, 10: 645-650, 2001.
79. Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N., and Hillen, W. Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 27: 708-710, 1999.
80. Fechner, H., Wang, X., Srour, M., Siemetzki, U., Seltmann, H., Sutter, A. P., Scherubl, H., Zouboulis, C. C., Schwaab, R., Hillen, W., Schultheiss, H. P., and Poller, W. A novel tetracycline-controlled transactivator-transrepressor system enables external control of oncolytic adenovirus replication. *Gene Ther*, 10: 1680-1690, 2003.
81. Wells, K. D., Foster, J. A., Moore, K., Pursel, V. G., and Wall, R. J. Codon optimization, genetic insulation, and an rtTA reporter improve performance of the tetracycline switch. *Transgenic Res*, 8: 371-381, 1999.
82. gha-Mohammadi, S., O'Malley, M., Etemad, A., Wang, Z., Xiao, X., and Lotze, M. T. Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med*, 6: 817-828, 2004.

83. Fussenegger, M., Morris, R. P., Fux, C., Rimann, M., von, S. B., Thompson, C. J., and Bailey, J. E. Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 18: 1203-1208, 2000.
84. Weber, W., Fux, C., oud-El, B. M., Keller, B., Weber, C. C., Kramer, B. P., Heinzen, C., Aubel, D., Bailey, J. E., and Fussenegger, M. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol*, 20: 901-907, 2002.
85. Chi, T., Lieberman, P., Ellwood, K., and Carey, M. A general mechanism for transcriptional synergy by eukaryotic activators. *Nature*, 377: 254-257, 1995.
86. Lederer, H., Tovar, K., Baer, G., May, R. P., Hillen, W., and Heumann, H. The quaternary structure of Tet repressors bound to the Tn10-encoded tet gene control region determined by neutron solution scattering. *EMBO J*, 8: 1257-1263, 1989.
87. Xu, Y., Mullick, A., and Massie, B. Development of a reverse Cumate transactivator (rcTA): application for protein production in CHO cells. 2005. Ref Type: Patent
88. Ogorelkova, M., Elahi, S. M., Gagnon, D., and Massie, B. DNA delivery to cells in culture: generation of adenoviral libraries for high-throughput functional screening. *Methods Mol Biol*, 246: 15-27, 2004.
89. Massie, B., Mosser, D. D., Koutroumanis, M., Vitté-Mony, I., Lamoureux, L., Couture, F., Paquet, L., Guilbault, C., Dionne, J., Chala, D., Jolicoeur, P., and Langelier, Y. New adenovirus vectors for protein production and gene transfert. *Cytotechnology*, 28: 53-64, 1998.
90. Vigna, E. and Naldini, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med*, 2: 308-316, 2000.
91. Donello, J. E., Loeb, J. E., and Hope, T. J. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*, 72: 5085-5092, 1998.
92. Charneau, P. and Clavel, F. A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *J Virol*, 65: 2415-2421, 1991.
93. Massie, B., Dionne, J., Lamarche, N., Fleurent, J., and Langelier, Y. Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Biotechnology (N Y)*, 13: 602-608, 1995.
94. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36: 59-74, 1977.
95. Massie, B. BMAde1, a new complementing cell line for the large scale production of E1-deleted Adenovirus (Ad) vectors devoided of RCA (replication competent

Ad). [5,891,6690]. 1999.

Ref Type: Patent

96. Yaffe, D. and Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270: 725-727, 1977.
97. Durocher, Y., Perret, S., and Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res*, 30: E9, 2002.
98. Oualikene, W., Lamoureux, L., Weber, J. M., and Massie, B. Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum Gene Ther*, 11: 1341-1353, 2000.
99. Elahi, S. M., Oualikene, W., Naghdi, L., O'Connor-McCourt, M., and Massie, B. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. *Gene Ther*, 9: 1238-1246, 2002.
100. Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H., and Weissman, I. L. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 14720-14725, 2000.
101. Evans, J. T., Kelly, P. F., O'Neill, E., and Garcia, J. V. Human cord blood CD34+. *Hum Gene Ther*, 10: 1479-1489, 1999.
102. Piacibello, W., Bruno, S., Sanavio, F., Droetto, S., Gunetti, M., Ailles, L., Santoni de, S. F., Viale, A., Gammaitoni, L., Lombardo, A., Naldini, L., and Aglietta, M. Lentiviral gene transfer and ex vivo expansion of human primitive stem cells capable of primary, secondary, and tertiary multilineage repopulation in NOD/SCID mice. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient. *Blood*, 100: 4391-4400, 2002.
103. Buchet, D., Serguera, C., Zennou, V., Charneau, P., and Mallet, J. Long-term expression of beta-glucuronidase by genetically modified human neural progenitor cells grafted into the mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci*, 19: 389-401, 2002.
104. Zeng, X., Chen, J., Sanchez, J. F., Coggiano, M., Ilon-Carter, O., Petersen, J., and Freed, W. J. Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells*, 21: 647-653, 2003.
105. Michou, A. I., Santoro, L., Christ, M., Julliard, V., Pavirani, A., and Mehtali, M. Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther*, 4: 473-482, 1997.

106. Gerard, R. D. and Chan, L. Adenovirus-mediated gene transfer: strategies and applications in lipoprotein research. *Curr Opin Lipidol*, 7: 105-111, 1996.
107. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802-805, 1994.
108. Herrera, P. L., Huarte, J., Zufferey, R., Nichols, A., Mermillod, B., Philippe, J., Muniesa, P., Sanvito, F., Orci, L., and Vassalli, J. D. Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 12999-13003, 1994.
109. Dudley, R. W., Lu, Y., Gilbert, R., Matecki, S., Nalbantoglu, J., Petrof, B. J., and Karpati, G. Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, 15: 145-156, 2004.
110. Ishii, A., Hagiwara, Y., Saito, Y., Yamamoto, K., Yuasa, K., Sato, Y., Arahata, K., Shoji, S., Nonaka, I., Saito, I., Nabeshima, Y., and Takeda, S. Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 22: 592-599, 1999.
111. Imhof, M. O., Chatellard, P., and Mermod, N. Comparative study and identification of potent eukaryotic transcriptional repressors in gene switch systems. *J Biotechnol*, 97: 275-285, 2002.
112. Baron, U. and Bujard, H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol*, 327: 401-421, 2000.
113. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268: 1766-1769, 1995.
114. Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., and Hillen, W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 7963-7968, 2000.

ANNEXE I: PLASMIDES UTILISES DANS CE MEMOIRE

Nom du plasmide	Provenance
pAdCMV/cTA-IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 63
pAdCMV/rcTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, réf 82
pAdCMV5/cTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, réf 82
pAdCMV5/IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 82
pAdCMV5/SEAP-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, réf 82
pAdCMV5CuO/IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 63
pAdCMV5CuO/rcTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, réf 83
pAdCR5/cTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdCR5/IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 63
pAdCR5/rcTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdCR5/SEAP-IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, non-publié
pADENOCMV/CymR	Fait dans ce laboratoire, réf 63
pADENOCMV5/rcTA-CMV-BFPq	Fait dans ce laboratoire, réf 80
pADENOCR5/LacZ	Fait dans ce laboratoire, réf 63
pAdGLU/cTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdGLU/IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdGLU/GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdINS/cTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdINS/IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdINS/GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdPP/cTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdPP/IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdSOM/cTA-IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pAdSOM/IRES-GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pCymR-tk-neo	Fait dans ce laboratoire, réf 65
pLCMV5/GFP	Fait dans ce laboratoire, non-publié
pLCR5/GFP	Fait dans ce laboratoire, non-publié
pLCR5mod/GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié
pLCR5Δ/GFP	Fait dans le cadre de ce mémoire, non-publié

