



Université de Montréal

Développement de procédés efficaces pour la construction et la production  
de vecteurs adénoviraux

par  
David Gagnon

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en virologie et immunologie

Décembre, 2008  
© David Gagnon, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Développement de procédés efficaces pour la construction et la production  
de vecteurs adénoviraux

Présenté par :  
David Gagnon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Lemay  
président-rapporteur

Dr Bernard Massie  
directeur de recherche

Dr Hugo Soudeyns  
membre du jury

Dr Alain Garnier  
examineur externe

Dr George Szatmari  
représentant du doyen de la FES

## RÉSUMÉ

L'adénovirus possède plusieurs caractéristiques faisant de ce virus un candidat de choix pour la construction de vecteurs utiles dans les études de génomique fonctionnelle. Dans la majorité de ces applications, on a recours à un vecteur adénoviral de première génération délété de sa région E1. L'utilisation de vecteurs adénoviraux comprend deux maillons faibles : la construction du vecteur et la production subséquente de ce dernier. Le développement de méthodes alternatives est donc nécessaire pour renforcer ces deux maillons, permettant ainsi une utilisation étendue de ces vecteurs. Ce développement va s'articuler sur deux axes : l'ingénierie du vecteur de transfert pour la construction de l'adénovirus recombinant et l'ingénierie d'une lignée cellulaire pour la production du vecteur.

En utilisant un vecteur de transfert adénoviral co-exprimant, à partir d'un promoteur régulable à la tétracycline, la protéase de l'adénovirus et une protéine de fluorescence verte (GFP) par l'intermédiaire d'un site d'entrée ribosomal interne (IRES), notre groupe a établi que la sélection positive, via l'expression ectopique de la protéase, est un processus efficace pour la création de librairie d'adénovirus recombinants. Par contre, la diversité atteinte dans ce premier système est relativement faible, environ 1 adénovirus recombinant par 1 000 cellules. Le travail effectué dans le cadre de cette thèse vise à construire un nouveau transfert de vecteur dans lequel l'expression de la protéase sera indépendante de celle du transgène permettant ainsi d'optimiser l'expression de la protéase. Ce travail d'optimisation a permis de réduire le phénomène de transcomplémentation du virus parental ce qui a fait grimper la diversité à 1 virus recombinant par 75 cellules. Ce système a été mis à l'épreuve en générant une librairie adénovirale antisens dirigée contre la GFP. La diversité de cette librairie a été suffisante pour sélectionner un antisens réduisant de 75% l'expression de la GFP.

L'amplification de ce vecteur adénoviral de première génération doit se faire dans une lignée cellulaire exprimant la région E1 telle que les cellules 293. Par contre, un adénovirus de première génération se répliquant dans les cellules 293 peut échanger,

par recombinaison homologue, son transgène avec la région E1 de la cellule créant ainsi un adénovirus recombinant répliatif (RCA), compromettant ainsi la pureté des stocks. Notre groupe a déjà breveté une lignée cellulaire A549 (BMADE1) exprimant la région E1, mais qui ne peut pas recombiner avec le transgène du virus. Par contre, le niveau de répliation de l'adénovirus dans les BMADE1 est sous-optimal, à peine 15-30% du niveau obtenu dans les cellules 293. Le travail fait dans le cadre de cette thèse a permis de mettre en évidence qu'une expression insuffisante d'E1B-55K était responsable de la mauvaise répliation du virus dans les BMADE1. Nous avons produit de nouveaux clones à partir de la lignée parentale via une transduction avec un vecteur lentiviral exprimant E1B-55K. Nous avons confirmé que certains clones exprimaient une plus grande quantité d'E1B-55K et que ces clones amplifiaient de manière plus efficace un vecteur adénoviral de première génération. Ce clone a par la suite été adapté à la culture en suspension sans sérum.

Mots clés : vecteurs viraux, adénovirus, sélection positive, librairie, protéase, lignée cellulaire, RCA, E1B-55K.

## ABSTRACT

The adenovirus has numerous interesting characteristics making this particular virus an ideal candidate for the construction of vector for conducting studies in functional genomics. The vast majority of those applications rely on a so-called “first-generation vector” in which the E1 region is replaced by a transgene. Despite all their advantages, there are 2 weak links associated with first-generation vector: the efficient construction of the actual vector and its production. Therefore, the development of alternative methods for construction and production is necessary to ensure their usefulness. The development will involve 2 axes: the reengineering of the transfer vector for the construction of recombinant adenovirus and the reengineering of the cell line capable of producing the vector.

Using a transfer vector co-expressing the adenoviral protease (PS) gene and GFP by using an IRES under the control of a tetracycline-regulated promoter, our laboratory previously established the proof of concept that positive selection of recombinant adenovirus through ectopic expression of the PS gene was an efficient approach to generate adenoviral libraries. However, the diversity achieved was quite low, around 1 recombinant adenovirus per 1,000 cells. The goal of this thesis was to design a new transfer vector in which the PS expression was independent from the expression of the transgene in order to be able to optimize its expression independently. We also improved library diversity by lowering the amount of PS in order to reduce the trans-complementation from the transfer vector. Using this method, at least 1 recombinant adenovirus per 75 cells was generated with 100% of the plaques being recombinant. This system was successfully used to generate an antisense library targeting GFP. The diversity of the library was high enough to allow the selection of an antisense that inhibited 75% of GFP expression.

Amplification of those first-generation recombinant adenoviruses must take place in an E1-expressing cell such as 293 cells. However, when replicating in 293 cells, the

recombinant adenovirus can exchange their transgene with the E1 region of the cell by homologous recombination, which results in the generation of a fully replicative adenovirus (RCA), a situation that compromises the purity of the viral preparation. Our laboratory has previously patented an A549 cell line expressing the E1 region and producing RCA-free recombinant adenovirus (BMAdeE1). However, the replication of E1-deleted adenovirus in BMAdeE1 cells was sub-optimal, in the range of 15-30% the level obtained in 293 cells. The work done in this thesis establishes that the low level of E1B-55K could be responsible for the lower productivity of BMAdeE1 cells. Thus, we have derived new clones following lentiviral transduction in order to increase E1B-55K expression. Western blot confirmed that some clones expressed more E1B-55K than BMAdeE1, and this correlated with a more robust replication of a recombinant adenovirus in those clones. This newly optimized BMAdeE1 cell line was adapted to serum-free suspension culture.

Keywords : viral vector, adenovirus, positive selection, library, protease, cell line, RCA, E1B-55K.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES</b>	xii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	xv
<b>LISTES DES ABRÉVIATIONS</b>	xvi
<b>REMERCIEMENTS</b>	xviii
<b>SECTION 1 : INTRODUCTION</b>	1
1.1 La biologie de l'adénovirus	2
1.1.1 Perspective historique	3
1.1.2 La classification	3
1.1.3 La structure de l'adénovirus	5
1.2.3.1 La structure de la capside	5
1.2.3.2 La structure du noyau	6
1.2.3.3 La structure du génome	7
1.1.4 Le cycle de réplication viral	8
1.1.4.1 L'adsorption et la pénétration du virus	8
1.1.4.2 L'expression des gènes précoces	10
1.1.4.3 La réplication du chromosome viral	11
1.1.4.4 L'expression des gènes tardifs	12
1.1.4.5 L'assemblage des particules virales	13
1.2 Les vecteurs viraux	14
1.2.1 Les vecteurs rétro et lentiviraux	17
1.2.2 Les vecteurs « adeno-associated virus »	18
1.2.3 Les vecteurs adénoviraux	20
1.3 Les vecteurs adénoviraux de 1 <sup>ère</sup> , 2 <sup>e</sup> et 3 <sup>e</sup> génération	25
1.3.1 Utilité et importance des vecteurs de première génération	31
1.3.2 Construction des vecteurs de première génération	37
1.3.3 Production des vecteurs de première génération	40
1.4 La création de libraires d'expression	44
1.4.1 Le besoin d'une nouvelle méthode de création de librairies adénovirales	47
1.4.2 Création de librairies adénovirales par sélection positive	48
1.5 La production de vecteurs adénoviraux à grande échelle	52
1.5.1 Le besoin d'une lignée cellulaire pour la production à grande échelle	56

1.6 Objectifs de la thèse	56
1.6.1 Objectifs liés à la sélection positive	56
1.6.2 Objectifs liés à la construction d'une nouvelle lignée cellulaire	57

## **SECTION 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES** 58

2.1 Construction des plasmides de transfert adénoviraux	59
2.1.1 Construction du vecteur pAdCMV5-IRES-GFP (tk TATA-PS)	60
2.1.2 Construction du vecteur pAdCMV5-IRES-GFP (Hsp70 TATA-PS)	62
2.1.3 La construction du vecteur pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) / avec et sans la séquence codante de Sim1	63
2.1.4 La construction du vecteur pAdCMV5-IRES-dsRED (MLP-PS) / avec et sans l'ARN en épingle à cheveux dirigé contre la protéine Sim1	64
2.2 Construction des vecteurs lentiviraux pRRL.cPPT.CMV-55K.WPRE et pRRL.cPPT.CMV-Protease.WPRE	65
2.3 Production des plasmides	67
2.4 La culture cellulaire	67
2.5 Transfection	69
2.6 Titrage des adénovirus infectieux par « essai de plages de lyse »	69
2.7 Quantification des adénovirus physique par HPLC	69
2.8 Photographies	70
2.9 Cytofluorométrie en flux	70
2.10 Production d'adénovirus recombinants par infection/transfection (sélection positive)	71
2.11 Amplification des virus obtenus par sélection positive	71
2.12 Évaluation de la diversité produite par sélection positive lors de l'infection/transfection	71
2.13 Visualisation de l'effet cytopathique causé par la transcomplémentation	73
2.14 Évaluation quantitative de l'effet de transcomplémentation	73

2.15	Création de la librairie anti-sens contre la GFP	74
2.16	Criblage préliminaire de la librairie anti-sens	76
2.17	Analyse quantitative des anti-sens	76
2.18	Séquençage des anti-sens	77
2.19	Immunobuvardage de type Western	78
2.20	Production du lentivirus recombinant exprimant E1B-55K	80
2.21	Transduction et clonage des cellules BMAdE1	81
2.22	Production adénovirale dans les clones BMAdE1 transduits avec la E1B-55K	82
2.23	Détection de la séquence WPRE dans les clones sélectionnés	82
2.24	Production adénovirale dans les clones adaptés à la culture en suspension sans sérum	83
<b>SECTION 3 : RÉSULTATS</b>		<b>84</b>
3.1	Librairies adénovirales générées par sélection positive	85
3.1.1	Construction des vecteurs de transfert permettant l'expression ectopique de la PS	85
3.1.2	Propriétés répliquatives des adénovirus produits par sélection positive avec les nouveaux plasmides de transfert	90
3.1.3	Diversité théorique des librairies générées avec les plasmides de transfert	97
3.1.4	Visualisation de l'effet cytopathique causé par la transcomplémentation	102
3.1.5	Évaluation quantitative de l'effet de transcomplémentation	104
3.1.6	Création de la librairie anti-sens contre la GFP	108
3.1.7	Criblage préliminaire de la librairie anti-sens	109
3.1.8	Analyse quantitative des anti-sens sélectionnés	111
3.1.9	Vérification des séquences anti-sens	114
3.1.10	Versatilité du système de construction de vecteurs adénoviraux : étude du rôle du gène Sim1 dans le contrôle de la satiété	115
3.2	Optimisation d'une nouvelle lignée cellulaire pour la production de vecteurs adénoviraux délétés E1	118
3.2.1	Problèmes associés à la lignée BMAdE1	118

3.2.2 Transduction des BMAdE1 avec un lentivirus exprimant E1B-55K	120
3.2.3 Criblage des sous-clones	122
3.2.4 Réplication des adénovirus de première génération dans les clones sélectionnés	123
3.2.5 Stabilité des sous-clones de BMAdE1	128
3.2.6 Confirmation de la transduction par le vecteur lentiviral	128
3.2.7 Production d'un adénovirus recombinant exprimant un gène pro-apoptotique	130
3.2.8 Adaptation à la culture en suspension sans sérum	132
3.2.9 Production de vecteurs de première génération en suspension dans un milieu sans sérum	135
3.2.10 Production d'un adénovirus $\Delta$ PS en suspension dans un milieu sans sérum	137
3.2.11 Sous-clonage du clone #5 pour améliorer les niveaux de production de vecteurs de première génération en suspension dans un milieu sans sérum	139
<b>SECTION 4 : DISCUSSION</b>	142
4.1 Nouvelles approches pour une nouvelle ère	143
4.2 Nouvelle approche de construction : la création de bibliothèques adénovirales par sélection positive	143
4.2.1 L'optimisation de l'expression de la PS	144
4.2.2 La diversité de la bibliothèque	146
4.2.3 L'amélioration de la diversité	149
4.2.4 Conclusions	152
4.3 Nouvelle approche de production : création d'une nouvelle lignée cellulaire pour la production de vecteurs adénoviraux de première génération	153
4.3.1 Optimisation de la lignée cellulaire BMAdE1	155
4.3.2 La variation clonale des BMAdE1	156
4.3.3 L'expression d'E1B-55K a été pleinement optimisée	157
4.3.4 Production en suspension dans un milieu sans sérum	157
4.3.5 Comparaison avec les autres lignées de production	159
4.3.6 Conclusions	160
4.4 La construction et la production de vecteurs de première génération : plus efficace que jamais	161
<b>SECTION 5 : BIBLIOGRAPHIE</b>	163

<b>ANNEXE I : Résultats supplémentaires - Développement de procédés efficaces pour la production de vecteur AAV</b>	clxxxviii
<b>ANNEXE II : Séquences des antisens GFP</b>	ccix
<b>ANNEXE III : Séquences de l'antisens REP</b>	ccxii
<b>ANNEXE V : Plasmides, virus et lignées cellulaires utilisées dans cette thèse</b>	ccxiii

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Structure de l'adénovirus.	6
2	Carte génétique de l'adénovirus type 2 représentant les unités de transcriptions.	7
3	Représentation d'un vecteur adénoviral de première génération portant une délétion E1 et E3 permettant l'insertion d'un transgène.	26
4	Vecteurs de thérapie génique utilisés en essai clinique en 2007.	32
5	Représentation de la manière classique pour générer des vecteurs de première génération.	38
6	Représentation du double événement de recombinaison menant à la création d'un RCA dans une cellule 293.	44
7	Cycle réplcatif d'un adénovirus portant une délétion PS et E3.	50
8	Génération de RCA lors de la production de vecteurs adénoviraux dans les cellules 293.	53
9	Vecteur de transfert type utilisé pour la construction d'adénovirus recombinants.	59
10	Stratégie de construction du vecteur pRRL.cPPT.CMV-55K.WPRE.	66
11	Plasmide utilisée pour la construction de la librairie anti-GFP.	75
12	Construction des cassettes d'expression de la PS par PCR de chevauchement.	87
13	Construction des nouveaux vecteurs de transfert permettant une expression indépendante de la PS.	89
14	Génération d'adénovirus recombinants par sélection positive.	91
15	Progéniture virale en fonction de l'expression de la PS.	93
16	Progéniture des adénovirus recombinants ayant perdu ou conservé l'expression de la GFP.	95
17	Schéma expérimental de l'expérience mise au point pour mesurer la diversité.	99
18	Mesure de la diversité générée par les vecteurs de transfert.	100
19	Effet cytopathique créée par la transcomplémentation du virus parental.	103
20	Stratégie de production d'un virus recombinant par sélection positive suite à une infection/transfection.	105
21	Effet de la MOI sur la concentration et la transcomplémentation.	106
22	Digestion de l'anti-sens GFP par l'enzyme ExoIII.	108
23	Criblage préliminaire de la librairie anti-sens.	110
24	Caractérisation des neuf clones viraux sélectionnés suite au criblage préliminaire.	112

25	Inhibition de l'expression de la GFP par les clones viraux.	113
26	Inhibition de l'expression de la GFP dans des cellules A549.	114
27	Répression de l'expression de la protéine <i>Sim1</i> avec un ARN interférence exprimé à partir d'un adénovirus recombinants.	117
28	Expressions des protéines associées à la région E1 chez les 293 et les BMAde1.	119
29	Construction d'une nouvelle lignée cellulaire à partir des BMAde1.	121
30	Niveau d'expression d'E1B-55K dans les différents clones.	122
31	Particules infectieuses produites par une infection avec un adénovirus $\Delta E1\Delta E3$ .	124
32	Particules physiques produites par une infection avec un adénovirus $\Delta E1\Delta E3$ et un adénovirus sauvage (dl309).	125
33	Ratio des particules adéovirales physiques et infectieuses produite lors d'une infection.	126
34	Stabilité des sous-clones BMAde1 transduit avec le vecteur lentiviral E1B-55K.	128
35	PCR pour la détection de la séquence WPRE fait à partir de l'ADN génomique des clones sélectionnés.	130
36	Production de particules physiques suite à une infection avec un adénovirus exprimant le FasL.	131
37	Croissance des cellules 293SF, BMAde1 et du clone #5 en suspension.	134
38	Production de particules physiques dans une culture en suspension suite à une infection par d'un adénovirus $\Delta E1\Delta E3$ .	136
39	Progéniture virale du clone #5, exprimant la PS, produite suite à une infection avec un Ad $\Delta$ PS.	138
40	Progéniture virale produite par les sous-clones du clone #5.	140
41	Production de particules physiques des sous-clone du clone #5 dans une culture en suspension sans sérum suite à une infection par d'un adénovirus $\Delta E1\Delta E3$ .	141
AI-1	Structure du génome de l'AAV et unités transcriptionnelles.	clxxxix
AI-2	Maintien de l'expression du vecteur AAV dans des cellules transduites.	cxc
AI-3	Production de vecteurs AAV à l'aide d'un Ad auxiliaire.	cxc
AI-4	Production de vecteur AAV par tri-transfection.	cxcii
AI-5	Production de vecteur AAV par une simple infection avec un Ad non-répliatif.	cxciii
AI-6	Progéniture virale produite par tri-transfection et par infection avec un virus auxiliaire de type sauvage et $\Delta$ PS.	cxcv
AI-7	Efficacité de l'antisens dirigé contre les protéines Rep.	cxcvi

AI-8	Réplication d'un Ad en présence des protéines Rep et de l'antisens Rep.	cxcviii
AI-9	Plasmide de transfert lentiviral permettant la production d'un lentivirus CMV5-antiRep-IRES-GFP.	cxcix
AI-10	Plasmide exprimant l'antisens Rep et permettant une sélection de clones stables avec le marqueur hygromycine.	cc
AI-11	Effet de l'expression de l'antisens Rep sur le cycle cellulaire.	ccii
AI-12	Effet de la mutation de l'antisens sur la modulation du cycle cellulaire.	cciii
AI-13	Effet de l'expression de l'antisens Rep-IRES/GFP sur le cycle cellulaire.	cciv
AI-14	Promoteur CVM5 inducible au cumate.	cciv
AI-15	Répression de l'expression de l'antisens Rep par le promoteur inducible au cumate.	ccv
AI-16	Effet de la régulation de l'expression de l'antisens Rep sur le cycle cellulaire.	ccvi
AI-17	Efficacité de l'antisens GFP pour réprimer l'expression de l'antisensRep-IRES-GFP.	ccvii
AI-18	Effet sur le cycle cellulaire de la coexpression d'un antisens GFP et d'un antisensRep-IRES-GFP.	ccviii

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Classification des adénovirus humains	4

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

% : pourcentage  
μg : microgramme  
μL : microlitre  
Δ : delta, délétion  
α: anti  
Ad : adénovirus  
ADN : acide désoxyribonucléique  
Adv : vecteur adénoviral  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARN VA : ARN Virus-Associated  
BGH : bovine growth hormone  
CAR : Coxackie and adenovirus receptor  
CMV5: promoteur cytomégalovirus humain  
cTa : transactivateur de l'opéron cumate  
CuO: séquence opératrice cumate  
CymR : répresseur de l'opérateur cumate  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
dsRED : protéine de fluorescence rouge  
*E. coli* : *Escherichia coli*  
Enh: activateur  
FACS : Fluorescent-activated cell sorting  
g : gramme  
GFP: green fluorescent protein, protéine fluorescente verte  
HPLC: High performance liquid chromatography  
HSP70: heat-shock protein 70  
IRES: internal ribosomal entry site  
ITR: Inverted terminal repeat  
Kb : kilobases  
kDa: kilodaltons  
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  
pA : poly-adénylation  
pAd : plasmide de transfert adénoviral  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PEI : polyéthylèneimine  
pH : potentiel Hydrogène  
PS : protéase  
RCA : replication competent Adenovirus

rcTA: transactivateur inverse (reverse) du promoteur régulable au cumate  
RPM : rotation par minute  
rtTA : transactivateur inverse (reverse) du promoteur régulable à la tétracycline  
TATA : boîte TATA  
TK : thymidine kinase  
tp: protéine terminale  
TR5 : promoteur CMV5 régulable à la tétracycline  
TR 6 : promoteur CMV5 avec la boîte TATA du promoteur de la thymidine kinase  
régulable à la tétracycline  
VP16 : domaine transactivateur de la protéine 16 du virus de l'herpes simplex  
WPRE : woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Docteur Bernard Massie, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et supervisé tout au cours de mon doctorat. Vous m'avez donné la chance d'acquérir énormément de connaissances, d'expérience et surtout, j'ai pu travailler dans un environnement stimulant avec des gens extrêmement sympathiques. J'ai aussi une pensée particulière pour Claire Guilbaut, qui a toujours été présente pour me faire bénéficier de son expérience et de ses conseils, le tout avec une infinie patience. Merci également à Lucie Bourget pour son aide indispensable au FACS.

Je m'en voudrais de passer sous silence le soutien indéfectible de mes parents. J'ai toujours pu compter sur vous pour me soutenir et m'encourager, sans vous, rien de tout ceci n'aurait été possible. Vous êtes des parents extraordinaires, vous vous êtes donné sans compter pour que moi et ma sœur puissions faire des études universitaires. Je vous serai éternellement reconnaissant pour les sacrifices que vous avez faits, car vous m'avez fait le plus beau cadeau que des parents peuvent faire à leurs enfants. Merci.

Je voudrais finalement remercier les organismes subventionnaires qui m'ont soutenu : CRSNG, FRSQ, et le CNRC.

**Section 1 :**  
**Introduction**

## 1.1 La biologie de l'adénovirus

L'adénovirus est un virus icosaédrique non enveloppé, appartenant à la famille des *Adenoviridae*, contenant un génome d'ADN double-brin qui est capable d'infecter un large spectre de vertébrés en se répliquant dans les noyaux des cellules infectées. L'adénovirus a évolué conjointement avec ses hôtes vertébrés et, il partage un ancêtre commun avec le *Tectiviridae*, un bactériophage des entérobactéries (37). Pour l'humain seulement, il existe 51 sérotypes différents divisés en six sous-groupes (A à F). Les systèmes respiratoires, gastro-intestinaux, urinaires, de même que l'oeil, sont les principales cibles des infections adénovirales. Chez un individu immunocompétent, ces infections restent habituellement bénignes, par contre, dans de rares cas, celles-ci peuvent dégénérer en s'attaquant au cerveau, au foie, aux reins et au cœur pour causer de graves maladies. Aujourd'hui, l'adénovirus fait l'objet d'une attention particulière en raison de ses propriétés qui en font un vecteur viral de choix pour le transfert de gène.

### 1.1.1 Perspective historique

L'adénovirus a été isolé pour la première fois en 1953 (180) par un groupe de chercheurs voulant identifier un agent causant des infections respiratoires aiguës. L'agent isolé par Rowe et coll. avait la capacité de produire une dégénérescence spontanée de cultures primaires de cellules adénoïdes. En 1954, une deuxième équipe de chercheurs a isolé un agent infectieux présent dans les sécrétions respiratoires qui était capable d'induire un effet cytopathique chez des cellules en culture (92). La même année, un troisième groupe de chercheurs a apporté la preuve que les deux découvertes précédentes correspondaient au même agent infectieux (99). En 1956, cet agent infectieux a été nommé adénovirus en raison du tissu dans lequel il a été isolé pour la première fois (46). Historiquement, la découverte de l'adénovirus a donné un essor considérable à la biologie moléculaire et cellulaire. Les adénovirus humains s'étant révélés capables de transformer des cellules en culture, leur étude s'est révélée capitale dans l'élucidation des mécanismes moléculaires contrôlant la division cellulaire. De

plus, l'adénovirus a aussi permis de caractériser les mécanismes d'épissage des ARN messagers.

### **1.1.2 La classification**

La famille *Adenoviridae*, à laquelle appartiennent les adénovirus, se divise en deux genres, les *Mastadenovirus* et les *Aviadenovirus*. Les *Mastadenovirus* incluent les virus capables d'infecter les humains, singes, bovins, ovins, équidés et les porcs. Les *Aviadenovirus* se limitent aux virus en mesure d'infecter les oiseaux.

Chaque sérotype est défini par sa capacité à être neutralisé par un antisérum spécifique. Le phénomène de neutralisation par un anticorps passe par sa liaison aux épitopes se trouvant sur l'hexon et à l'extrémité de la fibre (212). Les différents sérotypes sont subdivisés en 6 sous-groupes (tableau 1) en fonction de leur hémagglutination et de leur oncogénicité.

Sous-groupe	Héماغلutation	Sérotypes	Oncogénicité	
			Tumeur modèle murin	Transformation culture cellulaire
A	IV (faible)	11, 18, 31	Fort	+
B	I (complète, singe)	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51	Modéré	+
C	III (partielle, rat)	1, 2, 5, 6	Faible ou nul	+
D	II (complète, rat)	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-50	Faible ou nul	+
E	III	4	Faible ou nul	+
F	III	40-41	Inconnu	+

**Tableau I : Classification des adénovirus humains (*Mastadenovirus H*). (133, 182)**

Les sérotypes les plus étudiés appartiennent au groupe C. Ce groupe, non oncogène, contient les sérotypes 2 et 5 (Ad2 et Ad5) qui sont les plus utilisés en thérapie génique en raison de leur faible pathogénicité pour l'homme.

Les différents sous-groupes d'adénovirus ont tous une spécificité pour un tissu particulier. Par exemple, les sérotypes 2 et 5 (sous-groupe C) infectent principalement les voies respiratoires. Par opposition, les sérotypes 40 et 41 (sous-groupe F) sont associés aux infections du système gastro-intestinal alors que les sérotypes 8, 19 et 37 (sous-groupe D) sont reliés à des infections sévères de la conjonctive de l'œil. Il est à noter que si l'adénovirus n'a pas un caractère épidémique, l'augmentation du nombre de personnes immunocompromises depuis quelques années a permis à certains sérotypes d'augmenter leur prévalence. C'est le cas du sérotype 35, rarement détecté dans la population générale, mais qui est fréquemment retrouvé chez les individus immunodéprimés (112).

### **1.1.3 La structure de l'adénovirus**

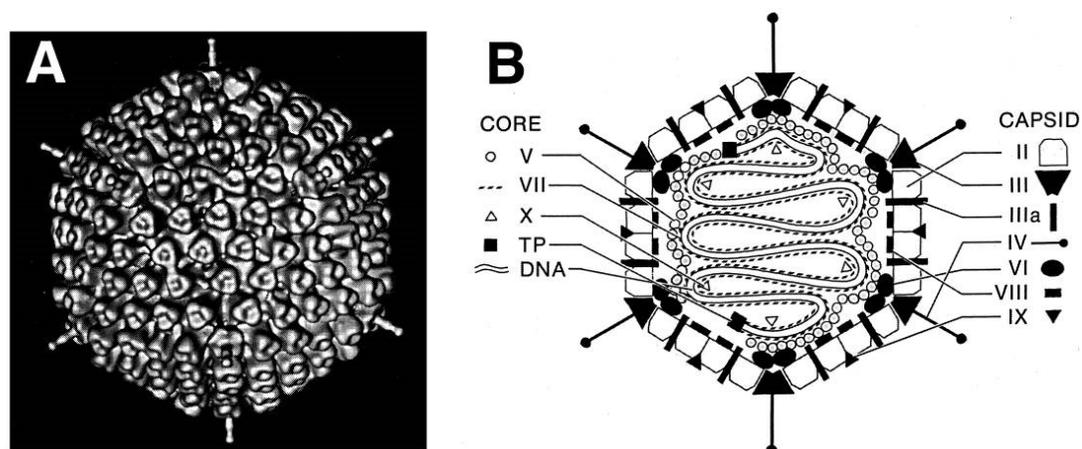
Structuralement, les adénovirus sont des virus non enveloppés avec une capsid de forme icosaédrique. De taille moyenne, avec un diamètre entre 70 et 100 nm (96), l'adénovirus est formé de 20 surfaces triangulaires formant 12 sommets. Le virus est constitué d'une capsid formant une paroi externe et d'un « noyau » contenant le matériel génétique.

#### **1.1.3.1 La structure de la capsid**

La capsid est faite de sept polypeptides différents formant 252 capsomères : 240 hexons et 12 pentons (figure 1A) (71, 217). L'hexon et le penton sont respectivement constitués de six et cinq sous-unités de polypeptide II et de polypeptide III. Il est à noter que le polypeptide II constitue l'élément le plus abondant du virion. Localisé à la surface de la capsid, ce trimère forme une structure appelée le capsomère d'hexon. Les polypeptides VI, VIII et IX, qui entrent aussi dans la composition du capsomère de l'hexon, servent à stabiliser le capsomère d'hexon. Les pentons forment les 12 sommets de la capsid virale. Chacun de ses sommets, qui sert de base à la fibre, est composé d'une association de cinq copies du polypeptide III (218). La fibre de son côté prend la forme d'une tige composée d'un trimère du polypeptide IV (218) et possède à son extrémité C-terminale un domaine globulaire reconnaissant son récepteur cellulaire. La combinaison de la fibre et de la base penton forme une structure nommée le capsomère de penton. Finalement, les polypeptides IIIa VI VIII et IX, des composants mineurs de la capsid peuvent s'intercaler entre les hexons pour stabiliser la structure de la capsid (figure 1B) (48).

### 1.1.3.2 La structure du noyau

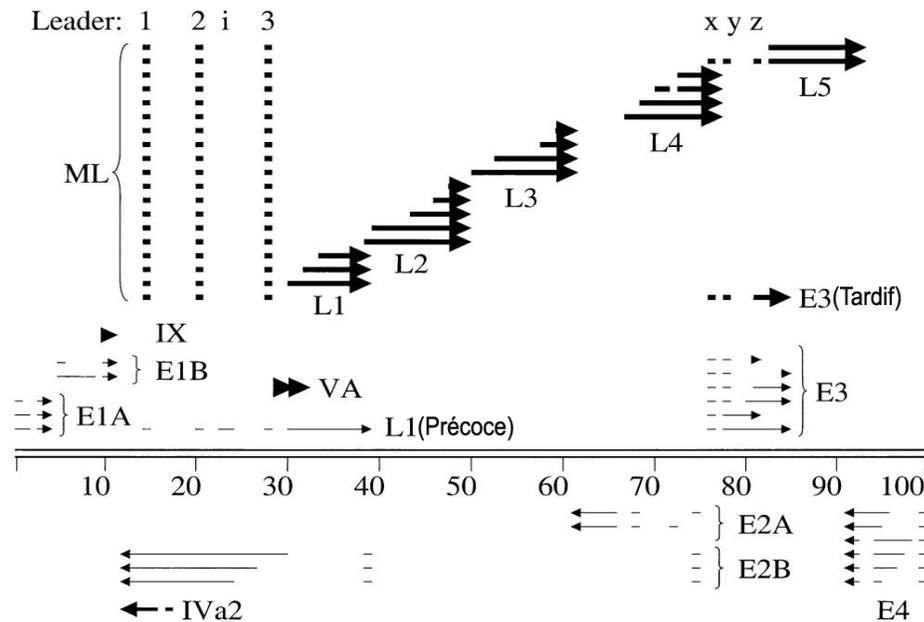
Le noyau comprend les quatre protéines et le génome viral qui sont contenus à l'intérieur de la capsid. Toutes les protéines associées au noyau sont riches en arginine, ce qui leur permettent de se lier directement à l'ADN viral. La protéine la plus abondante du noyau, le polypeptide VII, joue un rôle s'apparentant aux histones en s'associant directement au génome viral pour permettre la formation d'un complexe nucléoprotéique compacte (144). Les polypeptides V et X sont des composants mineurs du noyau qui peuvent aussi interagir avec l'ADN viral. De plus, le polypeptide V peut se lier avec le polypeptide VI du penton, ce qui permet d'assurer une liaison directe entre le noyau et la capsid (48). La quatrième protéine du noyau est la «protéine terminale» (pT) que l'on retrouve attachée par une liaison covalente à chaque extrémité 5' du génome (175). Cette interaction est assurée par un lien phosphodiester avec un résidu sérine de la protéine (200). Cette protéine joue un rôle essentiel dans le mécanisme de réplication de l'ADN viral (208) et dans la translocation du génome viral vers la matrice nucléaire (figure 1b) (59). Bien que ne faisant pas proprement partie du noyau, on y retrouve tout de même 10 copies de L3/p23 protéase (PS) adénovirale associée à l'ADN (5).



**Figure 1 : Structure de l'adénovirus. (A) Structure tridimensionnelle de la capsid icosaédrique de l'Ad. (B) Représentation schématique de la particule adénovirale. (194)**

### 1.1.3.3 La structure du génome

Le génome de l'adénovirus est constitué d'un double-brin d'ADN faisant approximativement 36 000 paires de bases qui a été subdivisé en 100 unités sur les cartes génétiques (figure 2).



**Figure 2 :** Carte génétique de l'adénovirus type 2 représentant les unités de transcription. Les gènes précoces (E), transcrits avant la réplication de l'ADN, sont représentés par les petites flèches. Les gènes tardifs (L), transcrits après la réplication de l'ADN, sont représentés par les grosses flèches. Les gènes tardifs sont transcrits à partir du même promoteur, mais ils sont épissés et polyadénylés de manière différente (voir section 1.2.4.4). Chaque flèche donne le sens de la transcription. Le génome est divisé en 100 unités génétiques (194).

Les gènes adénoviraux sont classés en fonction du moment où ils sont exprimés lors d'une infection. Les gènes transcrits avant que la réplication de l'ADN ait lieu sont qualifiés de précoces (E) et ceux qui suivent la réplication sont qualifiés de tardifs (L). Les 5 régions transcriptionnelles précoces (E1A, E1B, E2, E3 et E4) permettent l'expression des protéines qui vont préparer la réplication de l'ADN viral, inhiber l'apoptose et atténuer la réponse immunitaire de l'hôte. L'unique région tardive, placée sous le contrôle du promoteur MLP, génère 5 transcrits (L1-L5) qui sont associés aux

protéines structurales du virus. À l'exception de l'ARN « virus-associated » (ARN VA), qui est transcrit par l'ARN polymérase III, la transcription du génome viral est effectuée par l'ARN polymérase II (70).

Chaque extrémité du génome est constituée d'une séquence répétée hautement conservée (ITR) dont la taille varie entre 100 et 150 paires de bases en fonction du sérotype. Les deux séquences terminales inversées (ITR) sont des éléments actifs en *cis* essentiels au processus de réplication de l'ADN viral (121). De plus, l'ITR de gauche contient le signal d'encapsidation qui reconnaît les protéines de la capsid au moment de l'assemblage pour permettre l'encapsidation du génome (88).

#### **1.1.4 Le cycle de réplication viral**

L'adénovirus est un virus avec un cycle lytique. Suivant son entrée dans la cellule, il procède à un détournement de la machinerie cellulaire pour, dans un premier temps, assurer la réplication de son génome. Ensuite, le virus utilise la machinerie traductionnelle de la cellule pour procéder à la production de ses différentes protéines structurales. Lors de la phase finale du cycle répliatif, les composants du virion sont assemblés pour former une particule infectieuse qui sera relarguée par la lyse de la cellule. Une infection adénovirale typique dure de 20 à 24 heures et peut produire plus de 30 000 particules infectieuses par cellule (77).

##### **1.1.4.1 L'adsorption et la pénétration du virus**

L'attachement du virus aux cellules cibles est médié par la fibre localisée sur la base penton. Cette dernière, organisée sous forme homotrimérique, possède un domaine globulaire à son extrémité qui peut se lier aux récepteurs cellulaires CAR (coxsackie and adenovirus receptor) (12). Une fois cet attachement complété, un motif RGD situé sur la base penton, prend la relève en générant une interaction avec les intégrines

présentes à la surface de la cellule ( $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ) qui agissent ainsi comme récepteurs secondaires (224). Il est à noter que dans les cultures cellulaires, le motif RGD de la base penton peut participer à l'entrée de la particule virale en médiant une interaction avec l'héparan sulfate (38). De plus, les variations entre sérotypes peuvent affecter le récepteur cellulaire qui sera utilisé. Par exemple, pour l'Ad-37, ce sont les glycoprotéines porteuses d'un groupement sialique qui servent de récepteur (8) alors que l'Ad-3 peut reconnaître les molécules CD80 et CD86 à la surface des cellules dendritiques (198). La liaison aux récepteurs secondaires déclenche un processus d'endocytose qui permet à la particule virale de pénétrer à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire d'un endosome. Le démantèlement de la capsidie débute immédiatement lors de l'endocytose : la liaison de la base penton avec les intégrines induit un changement de conformation du polypeptide III provoquant la perte de la fibre. Par la suite, le contenu acide des endosomes participe au désassemblage des protéines chargées de stabiliser la capsidie (III, IIIa et VIII) (76). De manière simultanée, l'action conjointe de l'acidité de l'endosome et de la base penton permet la migration de ce qu'il reste de la particule virale vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, la capsidie ainsi déstabilisée est prise en charge par le réseau de microtubule qui transportera ce cargo vers le noyau tout en poursuivant le désassemblage de ce dernier. Lors du désassemblage final au niveau du pore nucléaire, l'ADN viral est transloqué à l'intérieur du noyau.

Le transport du génome viral vers le noyau est assuré par une liaison de la capsidie partiellement désassemblée au complexe moteur dynein/dynactine qui permet d'assurer le transport du cargo le long des microtubules vers le complexe CAN/Nup214 qui sert à faire l'arrimage à un pore nucléaire (214). Cette étape est facilitée par une reconnaissance préalable des intégrines par le motif RGD car cette dernière permet d'activer la protéine kinase A, rendant ainsi le transport assuré par le réseau de microtubules, normalement bis-directionnelle, à sens unique vers le noyau (206).

#### 1.1.4.2 L'expression des gènes précoces

Les 6 gènes précoces (E1A, E1B, E2A, E2B E3, E4) sont exprimés dans les étapes qui précèdent la réplication de l'ADN et leurs fonctions principales consistent à moduler précisément l'expression des gènes viraux et cellulaires pour maximiser le nombre de virions produits lors de l'infection.

Le gène E1A étant sous le contrôle d'un promoteur constitutif, sa transcription débute immédiatement après la translocation du génome viral à l'intérieur du noyau. Les protéines produites par la région E1A ont deux fonctions essentielles : premièrement, elles permettent une transactivation des promoteurs des autres gènes précoces et deuxièmement, elles travaillent de concert avec les protéines de la région E1B pour créer un milieu favorable à la réplication de l'ADN viral en forçant la cellule à progresser vers la phase S, phase à l'intérieur de laquelle la réplication du matériel génétique viral sera possible. Pour éviter que la transition vers la phase S soit responsable de déclencher l'apoptose, avortant ainsi le cycle de réplication virale, la région E1B neutralise les effets de p53 et prévient le relargage du cytochrome C (voir section 1.4.3). L'expression de la région E1A est donc cruciale pour initier le cycle réplcatif puisque les protéines associées à cette région pourront transactiver tous les autres promoteurs viraux précoces déclenchant ainsi la cascade qui mettra en branle la réplication du virus.

La synthèse d'une quantité relativement importante de la protéine de liaison à l'ADN (DBP) sera tributaire de la région E2A alors que la région E2B sera responsable de la synthèse de la pT et de l'ADN polymérase virale. En plus d'être impliquées dans l'initiation de la réplication du génome viral de même que son élongation, les protéines de la région E2 seront aussi appelées à jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle et l'assemblage du virus.

La région E3 permet l'expression d'une série de protéines qui seront essentiellement dédiées à la modulation du système immunitaire de l'hôte. Si cette

région est dispensable en culture cellulaire, elle jouera un rôle crucial dans le cadre de l'infection d'un hôte. La protéine E3 gp 19K peut se lier à la chaîne lourde du complexe majeur d'histocompatibilité prévenant ainsi son transport à la surface de la cellule pour empêcher la présentation d'antigènes viraux capables d'induire la différenciation des lymphocytes T dirigés contre l'adénovirus (55). Le complexe E3-RID, composé des protéines membranaires  $RID\alpha$  et  $RID\beta$ , inhibe l'apoptose induite par FasL en internalisant le Fas qui sera dégradé dans les lysosomes. La protéine E3-14.7 kDa est impliquée dans l'inhibition de l'apoptose induite par le TNF en interagissant avec les protéines impliquées dans la voie caspase- TNFR1. La protéine E1B-19K est aussi en mesure de prévenir l'apoptose induite par Fas et le TNF en prévenant l'activation de la caspase 8.

Finalement la région « multi-tache » E4 produira des protéines qui coopéreront avec les autres protéines exprimées dans la phase précoce du cycle d'infection pour : 1-transactiver des promoteurs, 2-assurer la traduction sélective des ARNm viraux et 3-l'arrêt de la synthèse de protéines cellulaires (voir section 1.4.3).

#### **1.1.4.3 La réplication du chromosome viral**

La réplication du génome adénoviral est catalysée par l'ADN polymérase virale et nécessite l'action de la pré-pT qui agira comme une amorce. De plus, pour que la réplication soit efficace, on devra faire appel à trois protéines cellulaires soit les facteurs de transcription nucléaire NFI et NFIII de même qu'une topoisomérase de type I (NFII) qui permettra l'élongation du génome.

Avant le début de la synthèse de l'ADN viral, un complexe de pré-initiation composé des protéines exprimées par la région E2 et par NFI et NFIII s'assemblera au niveau de l'origine de réplication située sur l'ITR. Dans ce complexe, l'interaction entre la pré-pT et la polymérase est stabilisée par NFI et NFIII. La DBP permet aussi de

stabiliser la liaison entre NFI et la séquence reconnue sur le génome viral. Toute cette série d'interaction protéine-protéine et protéine-ADN permet de positionner le complexe pré-pT/Polymérase sur l'origine de réplication. Ensuite, la DBP déstabilise la structure double-brin pour exposer la séquence simple-brin 3'-GTAGTA-5' qui formera un lien covalent avec la sérine à la position 580 de la pré-pT ce qui transformera la pré-pT en amorce et relâchera du même coup la polymérase pour permettre le début de la réplication du génome viral. La DBP participera à l'élongation de l'ADN en stabilisant la structure simple-brin qui sera déplacée par de l'action de la polymérase virale. Le résultat de cette première ronde de réplication produira donc une structure double-brin et une structure simple-brin. Ensuite, le génome simple-brin sera circularisé via un appariement des ITR pour former une structure en « panhandle ». Cette structure sera reconnue par la machinerie de réplication virale et la synthèse d'un brin complémentaire sera effectuée pour générer un second double-brin.

#### **1.1.4.4 L'expression des gènes tardifs**

L'expression des gènes tardifs débute au moment où le chromosome viral est répliqué (213). L'expression des gènes tardifs dépend de la transactivation du promoteur MLP par la protéine virale IVa2. La réplication du génome viral permet l'activation du promoteur MLP en titrant le facteur cellulaire IV<sub>a2</sub>-RF qui, en l'absence de nouveaux génomes résultants de la réplication, est présent en quantité suffisante pour bloquer efficacement le promoteur du gène IVa2 (100).

Tous les gènes tardifs sont exprimés à partir du promoteur MLP sous la forme d'un ARN messager précurseur de 29 000 nucléotides. Cinq sites de polyadénylation et de multiples sites d'épissage permettront par la suite de générer 20 ARN messagers différents à partir de cet unique transcrit. Les transcrits tardifs, utilisant le même site de polyadénylation sont regroupés dans la même famille (L1 à L5) et à l'intérieur d'une même famille, les transcrits diffèrent entre-eux selon un épissage différent. Il est à noter que tous les ARN messagers tardifs possèdent une extrémité 5' commune non

traduite portant le nom de « leader tri-partite » qui permet aux ARN messagers viraux de mieux compétitionner avec les ARN messagers cellulaires lors de la traduction (232).

Lors de la phase tardive, l'adénovirus produit aussi l'ARN VA qui est chargé d'inhiber l'activation de la PKR dans les cellules infectées. Normalement, lors d'une infection virale, la présence d'ARN double-brin peut activer cette kinase qui, en retour, peut inactiver le facteur eIF-2 $\alpha$  en le phosphorylant. Ce facteur étant essentiel à l'initiation de la traduction, l'activation de la PKR stoppe toute synthèse de protéine chez la cellule infectée. Par contre, l'ARN VA de l'adénovirus prévient l'activation de la PRK et donc l'inhibition de la traduction. En antagonisant la PRK, l'ARN VA est aussi en mesure de prévenir la production d'interféron (110).

#### **1.1.4.5 L'assemblage des particules virales**

L'assemblage des particules virales se déroule dans le noyau des cellules infectées une fois que la réplication du génome virale est terminée et qu'une grande quantité de protéines structurales s'y est accumulée. La production de nouvelles particules infectieuses est coordonnée par une série de processus de maturation des protéines précurseurs. Dans les stages finaux de l'assemblage, l'ADN est encapsidé et la PS adénovirale permet la maturation des précurseurs ce qui rend possible la synthèse d'une nouvelle particule infectieuse.

Durant l'assemblage, le génome viral est incorporé de manière sélective dans les capsides naissantes. Cette sélectivité est attribuable à la présence d'un signal d'encapsidation dans l'ITR de gauche de l'ADN viral. Cette région contient sept répétitions de la séquence consensus bipartite 5'-TTTGN<sub>8</sub>CG-3' qui permettent l'encapsidation (162). Le processus d'encapsidation implique une reconnaissance du signal d'encapsidation par le complexe IVa2/L1 52-55kDa (163) et L4 22kDa (161). La portion CG du signal d'encapsidation est reconnue par IVa2 alors que la portion TTTG

est reconnue par L4-22kDa. La liaison de L4-22kDa à la séquence d'encapsidation permet un recrutement plus efficace du complexe IVa2/L1 52-55kDa (49). Une mutation dans l'une ou l'autre des protéines virales impliquées dans la reconnaissance du signal d'encapsidation aboutit à la formation de particule virale ne contenant pas de matériel génétique.

À la toute fin du cycle viral, une fois le génome encapsidé, la protéine E3-11.6 kDa facilitera la lyse de la cellule et donc le relargage des particules virales. La PS, qui est exprimée dans la phase tardive du cycle de réplication, jouera aussi un rôle en clivant la cytot kératine K18, ce qui déstabilisera le cytosquelette et facilitera la lyse de la cellule.

## **1.2 Les vecteurs viraux**

Les virus sont des parasites intracellulaires ayant évolué pour pénétrer à l'intérieur des cellules et détourner la machinerie cellulaire dans le but d'assurer leur réplication. Ce faisant, le virus est en mesure d'exprimer son matériel génétique pour permettre la synthèse des différentes protéines structurales et non structurales et de son génome qui s'assembleront pour permettre la synthèse d'une nouvelle progéniture virale qui pourra à son tour aller infecter de nouvelles cellules. Dès 1972 (60), il a été envisagé qu'il était possible de modifier certains virus de manière à les utiliser comme des vecteurs de thérapie génique.

La thérapie génique repose sur l'introduction de matériel génétique à l'intérieur d'une cellule pour corriger à la source un dysfonctionnement cellulaire. Ceci peut être réalisé en remplaçant ou en inactivant un gène défectueux pour redonner à la cellule un fonctionnement normal (41) ou encore en introduisant un gène qui éliminera une cellule non désirable, une cellule cancéreuse par exemple (16). Le récent séquençage du génome humain (219) a donné à la thérapie génique un essor considérable en mettant à la disposition des chercheurs des milliers de gènes qui pourront désormais être utilisés pour soigner des maladies aiguës ou chroniques.

Il existe 2 méthodes pour assurer la livraison d'un gène thérapeutique chez un patient. Premièrement, le transfert peut se faire *in vivo*, c'est-à-dire que le vecteur de thérapie génique est injecté directement chez l'individu que l'on désire traiter. Cette injection peut être systémique (228) ou cibler spécifiquement la région à traiter (104). Lorsque possible, il est préférable d'éviter les injections systémiques à cause des risques de dissémination du vecteur et de la réponse immunitaire (21). Lorsque l'on désire cibler spécifiquement un type cellulaire, il est possible d'avoir recours à un transfert *ex vivo*. Cette technique consiste à aller prélever chez un patient les cellules que l'on désire traiter, les maintenir en culture pour les transduire avec un vecteur pour ensuite les réintroduire chez l'individu à traiter. Le traitement *ex vivo*, quoique plus complexe que le traitement *in vivo*, permet un meilleur ciblage et une plus grande caractérisation des cellules qui ont été transduites avec le vecteur (23).

Le vecteur viral idéal sera toujours en mesure d'infecter des cellules cibles, mais il minimisera, autant que faire ce peu, l'expression subséquente des gènes viraux associés à la réplication virale, minimisant ainsi sa toxicité et son immunogénicité. De manière générale, le génome des virus contient des éléments régulateurs actifs en *cis* et des séquences codantes. Les séquences codantes sont nécessaires pour l'expression de l'ensemble des protéines structurales et non structurales qui permettront la réplication du virus. Les éléments actifs en *cis*, bien que tout aussi essentiels à la réplication du virus, sont des séquences non codantes intervenant notamment dans la réplication et l'encapsidation du génome viral. Lors de la construction d'un vecteur viral, on gardera les éléments actifs en *cis* et l'on retirera un maximum de gènes associés à la virulence. Ainsi, on aura un virus qui sera toujours capable de transduire les cellules cibles, mais qui ne pourra compléter son cycle répliatif, minimisant ainsi son potentiel immunogène et cytotoxique. De plus, les gènes viraux ainsi retirés permettent d'accommoder l'insertion de transgène thérapeutique de plus grande dimension. Pour produire le vecteur viral ainsi créé, il faudra utiliser une lignée cellulaire exprimant en *trans* les composantes virales qui sont essentielles au cycle de réplication et qui ont été retirées du

virus. Le développement de ces lignées de production est crucial pour permettre une production efficace à grande échelle du vecteur.

Les qualités recherchées chez un vecteur de thérapie génique peuvent différer en fonction de son utilisation, par contre certaines caractéristiques seront toujours désirables et ce peu importe l'usage. Parmi ces caractéristiques, il y a la facilité avec laquelle le vecteur pourra être produit. Un bon vecteur de thérapie génique devra pouvoir être produit efficacement à grande échelle à un coût abordable. De plus, l'usage commercial du vecteur nécessitera aussi la mise au point de méthodes de concentration qui permettront une administration dans de petits volumes. Pour terminer, le vecteur devra pouvoir se conserver efficacement lors de son transport et de sa distribution. La spécificité du tropisme d'un vecteur est une autre caractéristique importante à considérer dans le choix du vecteur. Pouvoir livrer un gène thérapeutique de manière spécifique sera un atout essentiel si l'on désire cibler une population cellulaire disséminée au travers d'un organisme (comme c'est le cas pour les cellules du système hématopoïétique), ou encore si la cellule ciblée fait partie d'une population hétérogène (comme c'est le cas dans le cerveau). Dans la majorité des applications, il sera crucial d'éviter la transduction de certaines cellules bien précises. Par exemple, on cherchera à limiter au maximum la transduction des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes pour minimiser la réponse immunitaire dirigée contre le vecteur. Dans le cas des vecteurs porteurs de « gènes suicides », utilisés pour détruire des cellules cancéreuses, il sera important de limiter la dissémination dans les cellules saines. Un bon vecteur sera aussi capable d'accommoder des gènes thérapeutiques de différentes tailles sans compromettre l'encapsidation du génome lors de la production des particules virales. La taille des gènes thérapeutiques peut être aussi petite que 350 pb dans le cas de l'insuline et grimper jusqu'à 12 000 pb dans le cas de la dystrophine. En plus du gène, il faut aussi prévoir différents éléments qui permettront la régulation de son expression. Finalement, le vecteur viral devra aussi être en mesure de transduire tant des cellules mitotiques que post-mitotiques. En ce qui a trait à l'expression du transgène, elle sera tributaire de l'usage que l'on fait du vecteur. Dans les cas où l'on désire soigner une maladie chronique, on optera pour un vecteur capable d'exprimer le transgène thérapeutique pour

une période de temps prolongée. Mais pour les utilisations qui ne demandent qu'une expression transitoire, comme c'est le cas pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique (c.-à-d. l'élimination de cellules cancéreuses), on préférera plutôt un vecteur qui sera en mesure de fournir une expression soutenue durant une période de temps relativement courte. Il en va de même pour l'immunogénicité du vecteur, celle-ci influençant directement son efficacité à pouvoir maintenir une expression prolongée du transgène (voir la section 1.4 pour les détails de la réponse immunitaire relative aux vecteurs adénoviraux).

### 1.2.1 Les vecteurs rétroviraux et lentiviraux

La biologie très différente de ces deux vecteurs leur confère des usages distincts. Les vecteurs rétroviraux et lentiviraux sont en mesure de s'intégrer de manière stable dans le génome des cellules transduites ce qui permet une expression à long terme du transgène thérapeutique. Cette propriété, combinée au fait que ces vecteurs ne sont pas immunogènes, fait en sorte qu'ils sont donc très appropriés pour le traitement de maladies chroniques. Par contre, ce vecteur étant déléts de ses 3 gènes essentiels *gag* (protéines structurales), *pol* (transcriptase inverse et intégrase) et *env* (protéines de l'enveloppe), la production à grande échelle sera complexifiée par la nécessité d'utiliser des lignées d'encapsidation capables de trans-complémenter efficacement l'expression conjointe de ces 3 protéines pour permettre une production efficace du vecteur (177). Dans la majorité des cas, la protéine *env* est remplacée par la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire, ce qui permet d'étendre le tropisme du vecteur au-delà des cellules T CD4<sup>+</sup>. Il faut aussi prendre en considération que le rétrovirus ne peut pas transduire des cellules quiescentes, un problème qui est résolu par l'utilisation d'un vecteur lentiviral (199). Mais d'un point de vue clinique, le plus grand problème associé à l'usage des vecteurs rétroviraux et lentiviraux réside dans leur potentiel oncogène. En s'insérant dans le génome de la cellule, le vecteur peut activer un oncogène ou inactiver un gène suppresseur de tumeur (13). Ce fut le cas dans un essai clinique dirigé par le docteur Alain Fischer visant à traiter une immunodéficience sévère due à une mutation

dans le gène encodant pour le CD132<sup>+</sup>. Cette déficience a été traitée avec succès en transduisant *ex vivo* des cellules CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse transduite par un vecteur rétroviral (78). Mais dans les 3 années qui ont suivi la thérapie, des cas de leucémies ont été diagnostiqués chez plusieurs patients. Dans les 2 cas, il a été mis en évidence que le vecteur rétroviral, utilisé pour effectuer le transfert de gène, s'était intégré à proximité du promoteur de l'oncogène *LMO2* entraînant ainsi une expression aberrante de ce gène et une division anarchique des cellules CD34<sup>+</sup> (79). Par contre, des travaux récents ont démontré qu'il était possible d'éliminer ce problème en utilisant un vecteur lentiviral pouvait s'auto-inactiver (SIN) et en isolant le promoteur du transgène avec des séquences isolantes (237).

Si les résultats obtenus par l'équipe du docteur Alain Fisher ont laissé présager de nombreuses complications tant qu'à l'utilisation des vecteurs lentiviraux, des résultats très encourageants ont été obtenus dans le traitement de la maladie de Parkinson. Il a été en effet démontré que un modèle animal (singe) de la maladie de Parkinson, il était possible d'augmenter la synthèse de dopamine en transduisant le striatum avec un lentivirus tris-cistronique contenant les 3 enzymes impliquées dans la sythèse de dopamine (103).

### 1.2.2 Les vecteurs « adeno-associated virus »

L'Adeno-Associated Virus (AAV) est un autre vecteur de thérapie génique avec un potentiel certain. L'AAV est un petit virus à ADN simple-brin exprimant seulement 2 gènes, soit le gène *rep* (essentiel à l'intégration du génome viral dans la cellule infectée) et *cap* (qui code pour les protéines de la capsid). Ces 2 gènes sont bordés par des séquences ITR, des éléments actifs en *cis* qui contiennent notamment le signal d'encapsidation du génome et une séquence qui permet une intégration site spécifique dans le chromosome 19. L'AAV se distingue aussi par son incapacité à pouvoir compléter son cycle de répllication de manière autonome. Pour ce faire, une cellule infectée par un AAV doit être co-infectée par un virus auxiliaire tel que l'adénovirus ou

le virus de l'herpès simplex. Seulement dans ces conditions, le génome intégré dans une cellule peut être réactivé pour mener à la production d'une nouvelle progéniture virale. Dans les vecteurs AAV utilisés en thérapie génique, les gènes *rep* & *cap* sont retirés pour permettre l'insertion d'un transgène thérapeutique. Ce faisant, le virus perd sa capacité de pouvoir intégrer spécifiquement son matériel génétique dans le génome de la cellule transduite, mais il a été montré que les ITR, toujours présents dans le vecteur, peuvent former des structures concatémériques qui permettent de maintenir la présence du transgène dans les cellules transduites sur de longues périodes (189). Ce vecteur est aussi peu immunogène et il est facile de modifier son tropisme par pseudotypage (239). Si l'AAV n'est pas plus utilisé en thérapie génique, c'est à cause des problèmes inhérents à sa production. Normalement la délétion du gène *rep* imposerait l'utilisation d'une lignée d'encapsidation capable de trans-complémenter le vecteur viral. Or, il appert que l'expression de *rep* est toxique pour les cellules ce qui rend impossible la création de lignée productrice efficace. Ensuite, il faut aussi prendre en compte que l'AAV est un dépendovirus et qu'il faut, par conséquent, aussi effectuer une trans-complémentation des protéines virales auxiliaires. Encore une fois, il a été impossible de créer des lignées d'encapsidation capables de se suppléer au virus auxiliaire en raison de la cytotoxicité des protéines associées à ces mêmes fonctions auxiliaires. L'AAV est donc produit en transfectant les gènes *rep/cap*, le génome (transgène bordé par les ITR) et les fonctions adénovirales auxiliaires. Cette tri-transfection ne permet pas une production efficace du vecteur à grande échelle ce qui limite grandement l'utilisation clinique des vecteurs AAV. Il est possible d'augmenter la production du vecteur en substituant la transfection des fonctions adénovirales auxiliaires par une véritable infection adénovirale, mais cette stratégie implique que les stocks de vecteurs AAV seront contaminés par l'adénovirus ce qui limite grandement l'utilisation que l'on peut faire du vecteur ainsi produit puisque les organismes de réglementation limitent l'utilisation de ces stocks en raison de l'immunogénicité de l'adénovirus.

L'utilisation la plus prometteuse associée aux vecteurs AAV concerne le traitement de la maladie de Leber. Cette maladie infantile entraîne une dégénérescence de la rétine ce qui se solde par une cécité complète. Or il a été démontré qu'un vecteur

AAV pouvait transduire de manière sécuritaire les cellules de la rétine avec le gène RPE65, qui fait défaut chez les patients à traiter (136).

### 1.2.3 Les vecteurs adénoviraux

Les vecteurs adénoviraux sont devenus des outils de choix pour le transfert de gènes dans les cellules de mammifères. Ils sont capables de transduire des cellules mitotiques et post-mitotiques et ils ne peuvent pas intégrer leur matériel génétique dans les chromosomes de la cellule infectée ce qui assure une expression sans risque d'activation d'oncogènes. Ils possèdent aussi un tropisme très large leur conférant une efficacité de transduction de 100% dans de nombreuses lignées cellulaires. De plus, ils sont faciles à amplifier (jusqu'à  $10^{10}$  particules infectieuses par ml) et ils peuvent accommoder des transgènes de taille importante. La compréhension du cycle réplcatif de l'adénovirus et de la structure de leur génome ont permis la création de vecteurs dérivés principalement des adénovirus des sérotypes 2 et 5, ces derniers n'étant pas associés à des pathologies majeures chez l'humain. Par contre, le vecteur adénoviral est le plus immunogène de tous les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique, un élément qui pourra s'avérer un avantage dans certaines circonstances et un inconvénient dans d'autres (voir la section 1.4).

C'est par accident qu'on a découvert à la fin des années 50 que l'adénovirus pouvait être utilisé comme un vecteur capable d'exprimer des protéines hétérologues. À l'époque, l'adénovirus était amplifié avec des cellules rénales de singe. Rapidement, on a découvert que les stocks d'adénovirus ainsi produits étaient contaminés par le virus SV40. En poussant plus loin leur recherche, il a été mis en évidence que l'amplification de l'adénovirus sur des cellules de singe provoquait une sélection d'un hybride adénovirus/SV40 responsable de la présence d'antigènes SV40 dans les préparations adénovirales. La sélection de ce virus hybride a été fortement favorisée par le fait que l'antigène grand-T du SV40 permet de lever le blocage de la traduction des ARNm adénoviraux tardifs dans les cellules de singe. Deux types d'adénovirus hybrides ont pu

être identifiés : 1-les hybrides réplcatifs ayant intégré une portion de petite taille du génome du SV40 sans affecter le génome de l'adénovirus et 2-les hybrides non réplcatifs pour lesquels il y a eu recombinaison entre l'adénovirus et le SV40 permettant ainsi la substitution de gène adénoviraux par de grandes portions du génome de SV40. Dans le cas des hybrides non réplcatifs, leur propagation était assurée par la présence d'un virus de type sauvage jouant le rôle de virus auxiliaire. L'analyse des hybrides adénovirus/SV40 s'est révélée cruciale pour le développement des vecteurs adénoviraux, car elle a permis de démontrer que : 1-il était possible d'introduire de petits segments d'ADN dans le génome adénoviral sans pour autant affecter la réplication ou l'encapsidation du génome, 2-il était possible de substituer un gène par un fragment d'ADN hétérologue si la propagation du virus est faite dans des conditions où l'on peut trans-complémenter le gène adénoviral qui a été perdu.

Le vecteur adénoviral le plus simple dans sa structure n'aura subi aucune délétion. Un pareil vecteur sera pleinement réplcatif et, sachant qu'un adénovirus peut accommoder un génome faisant 105% de sa taille, il permettra l'insertion d'un transgène de 2 Kb (14). L'insertion de transgènes de plus grande taille demandera la délétion de la région E3, ce qui fera passer la capacité du vecteur à 4.7 Kb. La région E3, qui est non essentielle à la réplication, contient des gènes servant à inhiber la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection. Le principal avantage d'un vecteur réplcatif vient de sa capacité à répliquer son ADN : lors d'une infection, le vecteur pourra donc générer jusqu'à 100 000 copies (194) de son génome à l'intérieur de la cellule infectée, ce qui permettra de décupler l'expression du transgène. L'utilisation de ce type de vecteur reste toutefois très limitée à cause de la taille restreinte des transgènes pouvant être utilisés et de la forte réponse immunitaire dirigée contre le virus. Cette réponse immunitaire, en plus d'incommoder le sujet traité, fait en sorte que le vecteur et les cellules transduites sont rapidement éliminés de l'organisme. L'expression du transgène porté par le vecteur est donc essentiellement transitoire. De plus, ces vecteurs réplcatifs sont inutilisables pour la production de protéines ou pour des études fonctionnelles. La production de protéines effectuée avec un vecteur de type réplcatif entraînerait une contamination des stocks de protéines par l'adénovirus, compliquant ainsi les étapes

subséquentes de purification. Dans les études fonctionnelles, la réplication du vecteur est associée à un fort niveau de cytotoxicité et, dans la plupart des cas, la réplication du vecteur va tuer les cellules avant que l'on puisse observer le phénotype recherché.

Pour être en mesure d'insérer des transgènes de plus grandes tailles et pour éviter les problèmes de toxicité, d'immunogénicité et de réplication du vecteur, on doit passer par la délétion de gènes qui rendront le vecteur adénoviral non répliatif.

Les adénovirus à réplication conditionnelle (AdRC) ont pris de plus en plus de place dans le domaine de la thérapie génique depuis quelques années en raison de leurs propriétés oncolytiques. Un virus oncolytique possède la capacité de se répliquer spécifiquement dans les cellules cancéreuses tout en minimisant les effets cytopathiques sur les cellules normales. En se répliquant conditionnellement dans une cellule cancéreuse, le virus est donc amplifié et les virions relargués lors de la lyse cellulaire pourront infecter les autres cellules tumorales se trouvant dans le voisinage de la tumeur. Les cycles d'infection, de réplication et de lyse pourront donc propager le virus à l'intérieur de la tumeur tout en évitant d'infecter les cellules normales. De plus, la réplication virale à l'intérieur de la tumeur permettra de mobiliser le système immunitaire en induisant la production de cytokine en facilitant la présentation des antigènes tumoraux (169). Les virus oncolytiques utilisés dans les essais cliniques s'articulent autour de 2 grands axes: 1-les virus qui se répliquent naturellement dans les cellules cancéreuses, tels que le réovirus (58), le Newcastle Disease Virus (6) et 2-les virus qui ont gagné leur capacité de réplication sélective par diverses manipulations génétiques tels que le virus de l'herpès simplex et l'adénovirus (166). La construction d'un AdRC peut se faire de 2 manières différentes. Premièrement, il est possible de construire un AdRC en remplaçant le promoteur d'un gène essentiel à la réplication par un promoteur tumeur/tissu spécifique. Par exemple, il a été montré qu'un adénovirus dont l'expression de la région E1 était sous le contrôle du promoteur de la midkine ou de la cyclooxygénase-2, des promoteurs très actifs dans les cellules tumorales du système gastrique, peut être utilisé comme un agent oncolytique (159). Deuxièmement, il est possible d'amputer le génome de l'adénovirus d'un gène qui sera essentiel à la

réplication virale. Le virus ainsi construit ne pourra donc pas se répliquer dans une cellule normale, mais la réplication sera possible dans une cellule cancéreuse capable de compléter la délétion introduite dans le génome viral. L'adénovirus dl1520 fait partie de cette catégorie.

L'un des AdRC les plus utilisés comme agent oncolytique est le dl1520, aussi connu sous le nom d'ONYX-015 (15). Le virus dl1520 a été construit en délétant 827pb dans la région E1B du génome viral suivit de l'introduction d'un codon « stop » qui prévient l'expression d'une forme tronquée de la protéine E1B-55k, responsable de la neutralisation de p53, une étape essentielle à la réplication virale. Le virus dl1520 pourra donc se répliquer uniquement dans les cellules incapables d'exprimer correctement le gène p53, ce qui est le cas dans un grand nombre de cancers. Par contre, contrairement à ce qui était initialement supposé, si la réplication du dl1520 est impossible dans une cellule normale, ce n'est pas à cause de l'incapacité du virus à provoquer l'entrée de la cellule en phase S en inhibant l'apoptose induite par p53, mais plutôt par son incapacité à inhiber la traduction des ARNm cellulaires en modulant leur exportation du noyau (156). Quoiqu'utilisé beaucoup moins fréquemment que le dl1520, le  $\Delta 24$  est un autre AdRC avec des capacités oncolytiques. Le  $\Delta 24$  possède une délétion de 24pb dans la région E1A empêchant ainsi la liaison et la dégradation de la protéine du rétinoblastome favorisant ainsi la réplication virale à l'intérieur des cellules cancéreuses (31).

C'est le groupe Onyx Pharmaceutical de Frank McCormick qui a été le premier à proposer l'utilisation du virus dl1520 pour détruire les tumeurs possédant une mutation au niveau du gène p53 (15). Les essais cliniques de phase I avec le virus dl1520 ont débuté au Royaume-Uni en 1996 sur des patients avec une tumeur « tête et cou » (63) pour être rapidement suivi d'essais de phase II aux États-Unis (152), dans ces 2 cas les résultats ont été mitigés. Depuis, près d'une vingtaine d'essais cliniques se sont succédés et en l'absence de traitement connexe de chimiothérapie les résultats se sont révélés décevants. Au milieu des années 2000, les droits d'utilisation de l'ONYX-015

ont été vendus à « Sunway », une compagnie chinoise qui a entrepris une étude clinique de phase III en conjugaison avec un traitement de chimiothérapie. Sur les 123 patients traités, 72,7% ont réagi positivement au traitement (contre 40,4% pour le groupe de chimiothérapie seulement) (231). En 2005, les autorités réglementaires chinoises ont approuvé l'utilisation de l'ONYX-015, rebaptisé H101, en conjonction avec la chimiothérapie pour traiter les cancers nasopharyngiens (67).

Bien qu'il ait été démontré que le virus dl1520 pouvait être utilisé de manière sécuritaire, cet agent thérapeutique s'est montré incapable d'altérer significativement la progression des tumeurs. Pour augmenter le potentiel thérapeutique des AdCR, il est possible de les modifier pour qu'ils puissent exprimer un transgène qui augmentera leur potentiel anti-tumoral. Les transgènes utilisés dans cette optique peuvent être classés dans l'une des catégories suivantes : 1-ceux qui facilitent la mort de la cellule infectée, 2-ceux qui modulent l'environnement immédiat de la tumeur, et 3-ceux qui stimulent la réponse du système immunitaire contre la tumeur.

L'insertion d'un transgène capable de provoquer la mort cellulaire, indépendamment de l'infection virale, est l'une des avenues les plus utilisées pour augmenter le potentiel oncolytique des AdRC. Les transgènes utilisés peuvent interférer avec le cycle cellulaire. Par exemple, le potentiel oncolytique d'un adénovirus portant une délétion partielle dans la région E1, lui conférant ainsi une répllication tumeur-spécifique, a été augmenté par l'insertion d'une séquence permettant l'expression d'un ARN antisens dirigé contre *chk1* prévenant ainsi la mitose des cellules (66). Dans un modèle murin de carcinome hépatocellulaire, ce traitement a connu un taux de succès de 80%. Il est aussi possible de tuer les cellules en stimulant l'apoptose. Un AdCR exprimant le *SOCS3* peut prévenir la phosphorylation de *STAT3* dans les cellules tumorales ce qui déclenche la mort cellulaire (35). Mais la voie la plus prometteuse consiste à provoquer la mort de la cellule en exprimant un « gène suicide » qui fera la conversion d'une pro-drogue en agent cytotoxique. (129). Cette dernière approche offre l'avantage de pouvoir éliminer les cellules cancéreuses qui n'auront pas été infectées

grâce à un « effet collatéral » de l'agent cytotoxique qui pourra diffuser d'une cellule infectée vers les cellules avoisinantes qui auraient pu échapper à l'infection.

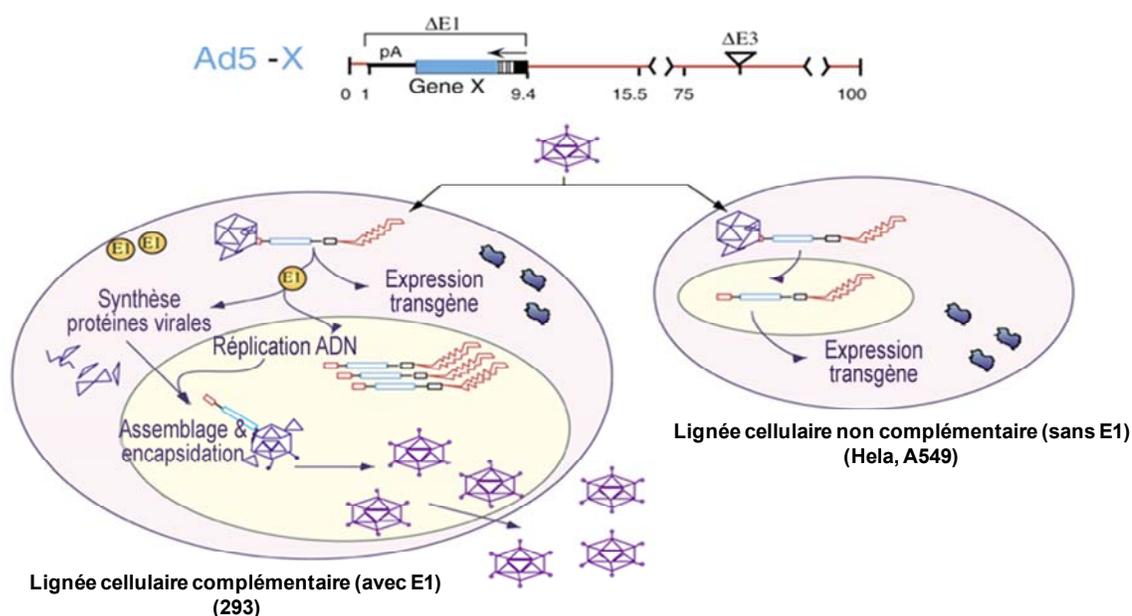
Il sera aussi possible d'utiliser un AdCR capable d'interférer avec l'environnement immédiat de la tumeur. Par exemple, il est possible de bloquer le processus d'angiogenèse par l'expression d'un ARN avec une structure d'épingle à cheveux capable de réprimer l'expression de l'interleukine-8 (230). On pourra aussi potentialiser l'action d'un adénovirus oncolytique par l'expression de la relaxine, une protéine qui va entraîner un relâchement dans la structure de la matrice extracellulaire et qui facilitera l'infection virale (107).

Finalement, la 3<sup>e</sup> classe de transgène pouvant être introduit dans un AdRC permettra de recruter le système immunitaire au site d'infection. La réaction immunitaire ainsi générée pourra non seulement détruire la tumeur primaire, mais aussi cibler les métastases qui auraient été générées à partir de ce site. Les transgènes utilisés à cette fin recruteront le système immunitaire directement en exprimant des cytokines (29) ou indirectement en exprimant des facteurs qui favoriseront la présentation d'antigènes tumoraux par le CMH de classe I (183).

### **1.3 Les vecteurs adénoviraux de première, deuxième et troisième génération**

La majorité des vecteurs adénoviraux utilisés pour le transfert de gènes sont dits de première génération, c'est-à-dire qu'ils sont délétés dans la région E1. L'expression de cette région étant essentielle pour transactiver les promoteurs des gènes viraux précoces, sa délétion rend donc impossible le déclenchement de la cascade qui permet la réplication du virus (80). L'amplification des vecteurs de première génération doit donc se faire dans des lignées cellulaires exprimant en *trans* les protéines de la région E1, comme les cellules 293 (73). Les vecteurs de première génération ont aussi une délétion de leur région E3. Cette dernière étant entièrement dévolue à moduler la réponse immunitaire de l'hôte, elle est non essentielle pour la propagation du virus en culture

cellulaire. L'addition de ces deux délétions permet au vecteur d'accueillir des transgènes pouvant aller jusqu'à 8 Kb (figure 3).



**Figure 3 : Représentation d'un vecteur adénoviral de première génération portant une délétion E1 et E3 permettant l'insertion d'un transgène. Pour se répliquer, le virus doit infecter une cellule exprimant les protéines de la région E1. Dans le cas où l'infection est réalisée dans une lignée cellulaire ne pouvant compléter la réplication ne peut avoir lieu et aucune particule virale n'est produite.**

Le système immunitaire se pose comme un obstacle majeur pour l'utilisation de l'adénovirus comme vecteur de thérapie génique puisque celui-ci a évolué pour reconnaître efficacement et rapidement, de manière innée et acquise, l'adénovirus comme étant un pathogène (124). La réponse immunitaire innée est déclenchée dans les premières minutes/heures de l'infection par une reconnaissance de l'ADN et de la capsid virale via différents senseurs, tout particulièrement le récepteur « toll like 9 » (238), « toll like 2 » (7) et les inflammosomes (149). Ensuite, le début du cycle de réplication permet la synthèse de protéines adénovirales qui seront présentées sur les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II. La présentation des antigènes permet à la réponse acquise de s'enclencher en assurant un recrutement de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dirigées contre l'adénovirus (89). Les lymphocytes T cytotoxiques vont reconnaître principalement les épitopes conservés des exons de la

capside pour tuer les cellules infectées, avant qu'il puisse y avoir assemblage de nouvelles particules virales, via le relargage de perforine, Fas-L et TNF- $\alpha$  (123). Finalement, il y aura production d'anticorps neutralisants qui seront spécifiques au sérotype de l'adénovirus responsable de l'infection. La présence de ces anticorps neutralisants sera utile pour prévenir une autre infection causée par ce sérotype.

Avec les vecteurs de première génération, il y aura une réponse innée associée à la reconnaissance des éléments de la capsid et du génome, mais contrairement à ce qui était attendu, la délétion de la région E1 ne sera pas suffisante pour prévenir la réponse acquise puisque certaines cellules seront capables d'exprimer des protéines analogues à celles de la région E1 qui pourront transactiver la région E2 ce qui se traduira par un faible niveau de réplication du vecteur (17). Ce phénomène est tout particulièrement présent dans les cellules présentatrices d'antigènes. Dans ces cellules, cette « pseudo activité » E1 permet la synthèse des protéines virales associée à la réplication de l'adénovirus de telle sorte que des antigènes adénoviraux sont présentés à la surface de la cellule par le CMH (187). L'activation de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> permet par la suite une élimination des cellules qui ont été transduites par le vecteur et la production d'anticorps neutralisants qui vont rendre inefficace la réinjection du vecteur. De manière générale, la réponse immunitaire fait en sorte que l'expression d'un transgène porté par un vecteur de première génération est perdue dans les 2 à 3 semaines suivant son administration. En conclusion, l'immunogénicité des vecteurs de première génération rend impossible l'utilisation de ce vecteur pour le traitement de conditions chroniques. La diminution de la réponse immunitaire engendrée par les vecteurs adénoviraux de première génération a été un axe important de recherche en thérapie génique. C'est l'utilisation d'un vecteur de première génération portant une mutation rendant le gène E2A (DBP) thermosensible qui a offert une avenue permettant de progresser dans cette direction. À 37 °C dans les études *in vivo*, on a remarqué que l'inactivation de cette protéine permettait une expression tout aussi efficace du transgène, mais une diminution de la réponse inflammatoire mesurée par l'infiltration

des cellules T CD8<sup>+</sup> (47). Ce résultat a ainsi fourni une preuve de concept démontrant que la délétion de gènes précoces pouvait réduire l'immunogénécité du vecteur.

La stratégie adoptée pour réduire la réponse immunitaire des vecteurs adénoviraux a donc consisté à augmenter le nombre de délétions de gènes précoces basées sur la prémisse que leur retrait allait minimiser l'expression de protéines virales. On a ainsi été créé les vecteurs de deuxième génération. Ces vecteurs, en plus de porter les délétions des régions E1 et E3 portent une autre délétion soit dans la région E2 (DBP, ADN polymérase, pT) ou E4 et il a été démontré que ces vecteurs réduisaient considérablement l'expression de protéines virales pouvant être reconnues par le système immunitaire (4, 39, 72). De plus, la délétion de gènes supplémentaires permet d'accommoder un transgène de plus grande taille. Par contre, cette stratégie n'est pas sans inconvénient : chaque gène viral ainsi délété doit être incorporé dans la lignée cellulaire productrice pour assurer la trans-complémentation du vecteur. Or, les gènes associés à la région E2 et E4 sont relativement toxiques ce qui rend obligatoire l'utilisation de promoteur inductible pour contrôler leur expression. Il en découle une expression des protéines virales qui n'est pas aussi bien coordonnée que lors d'une infection « naturelle », rendant ainsi la production des vecteurs de deuxième génération beaucoup plus laborieuse que la production des vecteurs de première génération. Un adénovirus de seconde génération (délétions E1, E3 et E4) exprimant le facteur  $\alpha$  de nécrose des tumeurs (TNFerade) a été l'objet d'une étude clinique de phase III pour traiter des tumeurs pancréatiques, mais malgré des résultats prometteurs en phase I et II, aucun effet bénéfique important n'a été mesuré lors des essais de phase III (135). Un autre vecteur de deuxième génération a aussi déjà été utilisé pour corriger une expression déficiente de l'ornithine transcarbamylyase, une maladie qui empêche de métaboliser l'ammoniac. Malheureusement, l'injection du vecteur a provoqué une réaction inflammatoire très sévère qui s'est soldée par la mort du patient (226). Somme toute, les vecteurs adénoviraux de deuxième génération ne permettent pas de médier une expression à long terme de leur transgène de telle sorte à pouvoir traiter une condition chronique. Bien que légèrement moins immunogène que les vecteurs de première

génération (30, 134), le seul moyen de minimiser au maximum l'immunogénicité du vecteur requiert la délétion de l'ensemble des gènes viraux.

Les seuls éléments adénoviraux conservés dans un vecteur de troisième génération sont les séquences actives en *cis*, soit les deux ITR, retrouvés aux extrémités du génome. Celles-ci permettent la répllication et l'encapsidation du génome viral, qui se limite désormais uniquement au transgène que l'on désire exprimer. La délétion de l'ensemble des gènes viraux permet l'expression de transgène pouvant faire jusqu'à 37 kb et exception faite de la réponse immunitaire pouvant être dirigée contre le transgène, désormais la seule réponse immunitaire possible est celle de type inné puisque le vecteur n'exprime plus de protéines virales (142). Notez aussi que l'expression de promoteur tissu spécifique est beaucoup plus stringente dans un vecteur de troisième génération que dans un vecteur de première génération, un phénomène explicable par le fait que les protéines virales exprimées par le vecteur de première génération peuvent interférer avec la régulation de ce genre de promoteur (195). Par contre, les vecteurs de troisième génération nécessitent un système de production capable de produire en *trans* l'ensemble des protéines virales nécessaires à la répllication du virus. La construction d'une lignée de production capable d'exprimer l'ensemble de ses gènes est une tâche pratiquement impossible vu le nombre de protéines potentiellement toxiques qu'il faudrait exprimer de manière régulée et coordonnée. Pour cette raison, la production de ce vecteur passe par l'utilisation d'un virus auxiliaire de première génération. Le génome du vecteur de troisième génération est donc transfecté dans la lignée cellulaire 293 qui est par la suite infectée par un adénovirus délété de sa région E1. Le virus auxiliaire permet d'exprimer l'ensemble des protéines nécessaires à la production de nouvelles particules virales qui pourront encapsider le génome du vecteur de troisième génération. L'utilisation de cette méthode aura le désavantage d'entraîner un haut niveau de contamination par le vecteur auxiliaire de première génération, son génome pouvant lui aussi être encapsidé. Le seul moyen permettant une purification, bien qu'imparfaite, de ces 2 particules virales repose sur une ultracentrifugation basée sur le fait que le vecteur et les virus auxiliaires sédimenteront séparément. Pour garantir la pureté des stocks de vecteurs de troisième génération, on a désormais recours à un virus auxiliaire dont la séquence

d'encapsidation, contenu dans l'ITR de gauche, est bordée de sites qui permettent son excision par une recombinaison qui sera exprimée de manière stable par la lignée productrice. La perte du signal d'encapsidation par le virus auxiliaire fait en sorte que son génome ne peut plus être encapsidé sans pour autant compromettre l'expression des gènes viraux qui sont essentiels pour la production du vecteur. Cette stratégie a été mise en pratique via l'utilisation du système de recombinaison *Cre/loxP* (3) ou *FLP/frt* (171). L'utilisation du système de recombinaison permet de réduire la contamination du virus auxiliaire à 0,04-0,05% ce qui permet une purification subséquente par chromatographie pour se débarrasser définitivement du virus auxiliaire. Les vecteurs de troisième génération ont démontré qu'ils pouvaient être utilisés pour traiter des conditions chroniques : d'une expression de 2-3 semaines pour le vecteur de première génération, on peut désormais maintenir l'expression durant une période de 2-3 ans (118, 158). Ce type de vecteur est actuellement testé pour corriger des conditions chroniques aussi diverses que l'hémophilie (25), l'hypercholestérolémie (83) ou le diabète (235). Si le vecteur de troisième génération a une sécurité et une durabilité supérieure au vecteur de première génération, dû à sa plus faible immunogénicité, la production de ce vecteur reste quand même beaucoup plus complexe. De plus, l'immunogénicité des vecteurs de première génération peut être mise à profit dans l'élaboration de vecteur de vaccination prophylactique et thérapeutique, chose plus difficilement réalisable avec le vecteur de troisième génération.

Le développement des différentes générations de vecteurs adénoviraux suit toujours le même axe : réduire la toxicité et l'immunogénicité du vecteur pour optimiser l'expression du transgène. Par contre, malgré les problèmes de toxicité associés à l'utilisation des vecteurs de première génération, ils restent tout de même très utilisés, principalement parce qu'ils sont plus faciles à construire et produire que les vecteurs de deuxième ou de troisième génération.

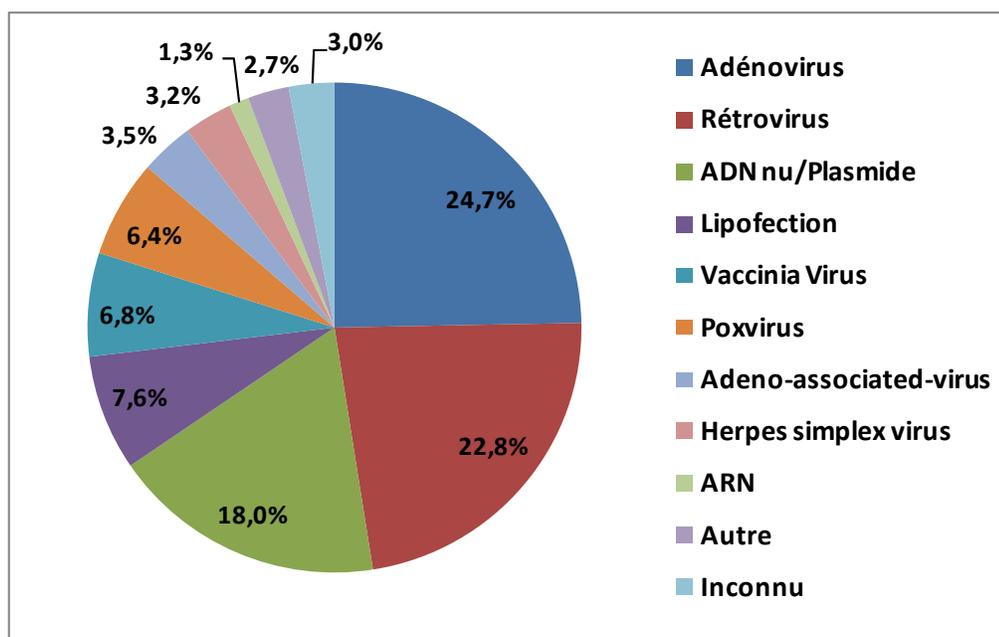
### 1.3.1 Utilité et importance des vecteurs de première génération

Si les vecteurs adénoviraux se sont révélés si utiles, c'est principalement à cause de leur grande versatilité. Lorsqu'une cassette d'expression est insérée à l'intérieur d'un vecteur de première génération, celui-ci peut être utilisé pour la production de protéines recombinantes ou pour transduire *in vitro* ou *in vivo* une grande variété de cellules de mammifère.

Les cassettes d'expression ayant été optimisées par l'ajout d'un activateur, de sites d'épissages et de sites de polyadénylation, les vecteurs adénoviraux permettent un très haut niveau d'expression de protéines recombinantes suite à une infection (68, 140, 141). Il a été démontré que l'expression de protéines recombinantes avec un vecteur adénoviral pouvait surpasser la production du système baculovirus (141). En fait, un vecteur de première génération infectant des cellules permissives 293, qui permettent la réplication du virus, peut produire jusqu'à 90 mg de protéine par litre de culture, ce qui représente 10-20% des protéines cellulaires totales. De plus, si l'infection est faite sur des cellules Hela, non permissives, on évite l'expression des protéines virales tardives et on peut amener la production de la protéine recombinante à 35% des protéines cellulaires totales (138). Cette caractéristique unique permet de simplifier grandement les étapes de purifications subséquentes (117, 120). La grande versatilité des vecteurs adénoviraux de première génération a aussi permis la production de protéines recombinantes à partir de cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) (62). Ces cellules ont été modifiées pour exprimer le CAR, permettant d'augmenter l'efficacité de transduction du vecteur, ce qui permet la production de 63 mg de protéine recombinante par litre de culture en suspension dans un milieu sans sérum. La production de protéines recombinantes représente un secteur en pleine expansion dans l'industrie des biothérapeutiques. Les vecteurs adénoviraux seront donc un outil dont le développement sera essentiel à l'industrie pharmaceutique.

Étant donné le large tropisme de l'adénovirus et sa capacité à exprimer efficacement un transgène tant dans des cellules mitotiques que post-mitotiques, on a

rapidement considéré les vecteurs adénoviraux pour la thérapie génique. Aujourd'hui, l'adénovirus est le vecteur viral le plus utilisé en thérapie génique : en 2007, près de 25% des essais cliniques étaient réalisés avec ce vecteur (figure 4).



**Figure 4 : Vecteurs de thérapie génique utilisés en essai clinique en 2007. (43)**

Par contre, l'utilisation des vecteurs adénoviraux pour la thérapie génique, spécialement ceux de première génération, sera toujours soumise aux impératifs de la réponse immunitaire que ces derniers provoqueront chez les individus traités.

Dans les cas où on désire soigner une condition chronique, on voudra un vecteur le moins immunogène possible ce qui préviendra l'élimination des cellules transduites par le système immunitaire (44). Dans les cas où le vecteur sera utilisé pour faire de la vaccination, la modulation d'une réponse immunitaire sera bénéfique pour potentialiser l'action du vecteur le transformant ainsi en adjuvant. L'infection virale permettra le relargage d'antigènes spécifiques aux tumeurs qui seront présentés par les cellules dendritiques. De plus, la réponse innée et acquise déclenchée par l'adénovirus peut créer un environnement pro-inflammatoire à l'intérieur de la tumeur qui favorisera l'activation de cellules T capables de reconnaître les antigènes tumoraux. La résultante

de l'infection virale permettra donc non seulement une réponse dirigée contre le virus, mais aussi contre les cellules cancéreuses (216).

Cette réponse immunitaire, dirigée contre le vecteur et les cellules transduites par ce dernier, fait en sorte que l'expression du transgène sera transitoire. De ce fait, l'utilisation de vecteur de première génération pour la thérapie génique ne visera pas à traiter des maladies génétiques où une expression du transgène sur de longues périodes est requise. L'utilisation de ces vecteurs sera plutôt réservée au cas où une expression transitoire serait demandée, comme c'est le cas avec le cancer ou la vaccination.

Initialement, les vecteurs adénoviraux ont été utilisés comme des réactifs de vaccination dans les années 50 et 60 sur des recrues de l'armée américaine, avec les adénovirus de types 4 et 7, pour prévenir la propagation d'infections respiratoires aiguës. L'adénovirus pouvant facilement déclencher une réponse immunitaire suite à une simple administration orale ou nasale, il a été rapidement considéré comme un outil de vaccination efficace (190). De plus, la possibilité pour un vecteur adénoviral d'être modifié pour exprimer virtuellement n'importe quel antigène en fait un outil d'une extraordinaire polyvalence. Donc, non seulement n'importe quel antigène peut être introduit dans un vecteur adénoviral, mais l'efficacité de transduction du vecteur jumelée à une expression robuste de l'antigène et à une réponse immunitaire induite par le vecteur seront généralement suffisantes pour immuniser le sujet traité. Aujourd'hui, de nombreux essais de vaccination avec des vecteurs adénoviraux de première génération ont démontré l'utilité du système (181). La facilité avec laquelle il est possible de modifier la structure de l'adénovirus a aussi permis de rendre le système plus robuste. Par exemple, les vaccins développés à partir des adénovirus de type 5 se sont montrés peu efficaces à cause de la grande prévalence d'individus possédant des anticorps neutralisants contre ce sérotype de virus (205). Il a été démontré que ces anticorps ciblaient l'hexon et qu'une substitution de cette partie de la capsid pour l'hexon du sérotype 48, beaucoup moins prévalant dans la population, prévenait la neutralisation du vaccin (176).

Présentement, des plateformes de vaccination utilisant l'adénovirus sont en cours de développement pour plusieurs maladies infectieuses telles que la malaria (125) et l'influenza (113). Par contre, c'est le développement d'un vaccin dirigé contre le VIH qui a été l'objet des études les plus poussées dans ce domaine, notamment avec la mise en place d'un essai clinique « STEP » de la compagnie Merck.

Le développement d'un vaccin contre le VIH représente la meilleure avenue disponible pour contrôler la pandémie de SIDA qui déferle sur le monde (53). Malgré l'urgence, peu de vaccins contre le VIH ont été développés depuis la découverte de ce virus. Le tout premier vaccin misait sur l'utilisation de la protéine gp120 de l'enveloppe pour provoquer une réponse humorale chez les personnes qui étaient inoculées. La compagnie « VaxGen » a mené 2 essais cliniques de phase III avec ce vaccin, mais aucune protection immunitaire n'a été induite chez les sujets qui ont été traités (57, 168). L'absence de protection indique que le développement d'anticorps dirigé contre l'enveloppe du VIH n'est pas suffisant à lui seul pour conférer une protection efficace.

La réponse humorale étant insuffisante pour conférer une immunité protectrice, la stratégie de vaccination a donc été ré-orientée pour privilégier la réponse immunitaire cellulaire. Dans cette optique, l'utilisation d'un vecteur adénoviral (type 5), capable de stimuler une réponse immunitaire des cellules T était tout indiquée. Le vecteur utilisé était délété de sa région E1, donc incapable de se répliquer, et exprimait les protéines Gag, Pol et Nef du VIH. Les premiers essais cliniques ont démontré que le vecteur était capable de stimuler une réponse immunitaire cellulaire chez une majorité de patients, bien que ceux possédant une immunité préalable contre l'adénovirus de type 5 développaient une réponse moins forte (170). Sachant que de 30-40% des Américains et des Européens occidentaux et que de 80-90% des Africains sub-sahariens possèdent des anticorps neutralisant contre l'adénovirus de type 5 (1, 210), ce résultat laissait présager que l'utilisation de ce vaccin ne se ferait pas sans heurts. Les essais de phase II, qui ont été pris en charge par la compagnie Merck et le « National Institutes of Health » ont connu une fin prématurée lorsque des résultats préliminaires ont montré que non seulement la vaccination ne conférait aucune protection ni ne diminuait la charge virale,

mais que la vaccination chez les patients possédant une immunité contre l'adénovirus de type 5 facilitait la réplication du VIH (54). Ce résultat inattendu peut s'expliquer par la présence conjointe du virus et d'anticorps qui favoriserait l'activation des cellules T fournissant du même coup un environnement favorable à la réplication du VIH. Il reste à déterminer si cet échec est imputable au vaccin adénoviral Gag/Pol/Nef ou à la stratégie de vaccination par l'activation des cellules T.

Si le vaccin thérapeutique contre le VIH s'est révélé un échec, d'autres résultats néanmoins encourageants ont été obtenus avec les vecteurs de première génération, notamment pour le traitement du cancer de la prostate. Dans un essai clinique de phase I, un adénovirus de première génération a été utilisé pour exprimer « l'antigène spécifique de la prostate » (PSA) pour induire une réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses de la prostate. Chez 34% des 32 patients traités il y a eu une production d'anticorps contre le PSA et pour 68% des sujets il y a eu une activation de cellules T dirigées contre le PSA (132). L'activation conjointe de la réponse immunitaire humorale et cellulaire a permis de prolonger la survie de 55% des patients. Ce résultat semble aussi démontrer que, contrairement à ce que les résultats de l'essai « STEP » laissaient voir, la vaccination par une activation des cellules T est réalisable. Le vecteur utilisé dans cette étude est maintenant utilisé dans des essais de phase III.

Les vecteurs de première génération peuvent aussi être utilisés pour une vaccination prophylactique. Dans le but d'endiguer les épidémies d'ébola, un vecteur adénoviral de première génération exprimant la glycoprotéine et la nucléoprotéine de ce virus a été construit et on a testé chez les singes la capacité de cet adénovirus recombinant à conférer une immunité protectrice. Chez tous les animaux ayant reçu le vaccin, il a été possible de détecter la présence d'anticorps dirigés contre le virus de l'ébola et aucun cas de mortalité suivant une exposition au virus n'a été enregistré (204). Ce vaccin fait maintenant l'objet d'une étude clinique de phase I.

L'un des succès les plus probants quant à l'utilisation des vecteurs adénoviraux de première génération revient sans doute au « Gendicine ». Ce vecteur, exprimant p53

dans sa région E1, est devenu le tout premier adénovirus recombinant à être approuvé pour la thérapie génique (225). Actuellement commercialisé en Chine, le « Gendicine » a été utilisé sur plus de 4 000 patients et il s'est révélé particulièrement efficace pour traiter les tumeurs « tête et cou » lorsqu'utilisé conjointement avec la radiothérapie ou la chimiothérapie (109). Les adénovirus de première génération peuvent aussi être utilisés pour exprimer des gènes suicides. Par exemple dans un essai clinique de phase I/II, un vecteur adénoviral exprimant la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la prostate, a été utilisé avec succès sur 6 patients aux prises avec un cancer de la prostate réfractaire aux traitements hormonaux (197).

Une des utilisations émergentes des vecteurs adénoviraux est leur emploi comme outil pour la caractérisation de gènes nouvellement découverts ou pour revisiter la fonction de gènes déjà caractérisés. Les études de génomique fonctionnelle réalisées avec l'adénovirus se basent sur une sur-expression ou une sous-expression d'un gène dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* et la caractérisation du phénotype provoqué par ce dernier. Le knock-out d'un gène aux fonctions inconnues peut se faire par un vecteur adénoviral exprimant un ARN antisens (116), un petit ARN formant des structures en épingles à cheveux (shRNA) (98), un ribozyme (227), un dominant négatif (106) ou par l'expression intracellulaire d'un anticorps capable de neutraliser une protéine cellulaire (221). Le principal avantage relié à l'utilisation de vecteur adénoviraux repose sur la capacité de générer rapidement et simplement un adénovirus recombinant de manière à permettre la caractérisation de gènes dans un contexte *in vivo* de manière analogue à la caractérisation faite *in vitro* par transfection. Avec les méthodes classiques, pour étudier le knock-out d'un gène dans un modèle animal, on construit généralement une souris transgénique. Ce processus long et fastidieux ne peut être réalisé avec des gènes essentiels au développement embryonnaire. Ces limitations sont adressées par l'utilisation de vecteurs adénoviraux. La capacité des vecteurs adénoviraux à pouvoir transduire plusieurs types de cellules, incluant les cellules primaires (188), permet la caractérisation plus fine d'un gène étant donné que l'activité de ce dernier peut-être modulée dans plusieurs tissus différents. Grâce aux vecteurs adénoviraux, il est maintenant possible de déconstruire une voie de signalisation cellulaire, dans un modèle

*in vivo*, en opérant des knock-outs, individuels ou combinés, de chacune des protéines impliquées dans cette voie. Un tel travail est à toute fin impossible en ayant recours aux techniques classiques de construction d'animaux transgéniques. De manière analogue, on peut aussi caractériser un gène en étudiant le phénotype engendré par sa sur-expression.

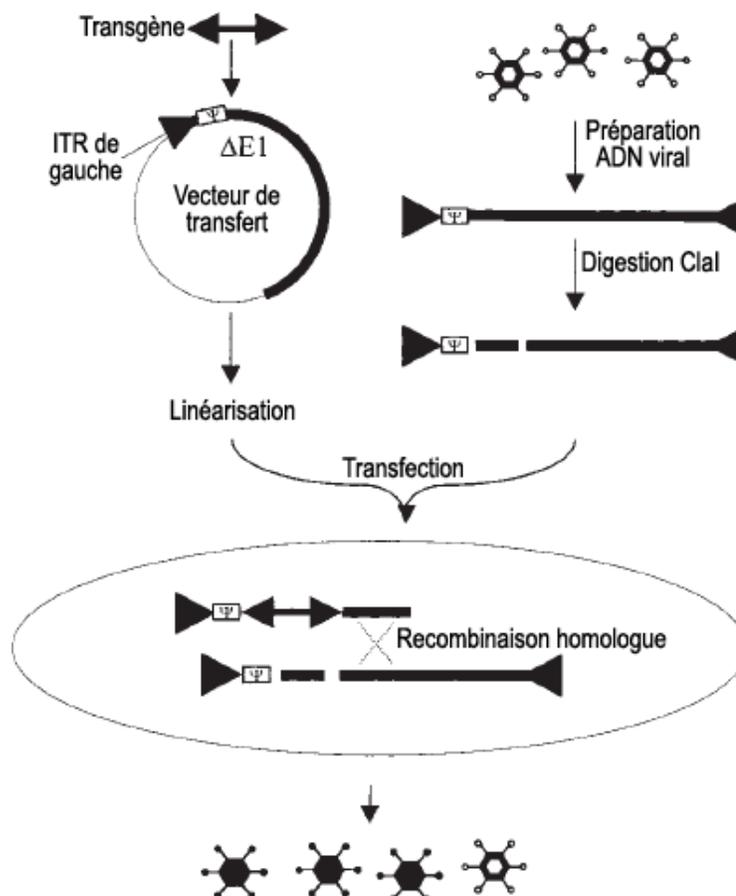
De plus, si l'utilisation de souris transgéniques s'avère nécessaire pour la conduite d'une étude, les vecteurs adénoviraux ont montré un potentiel certain pour la livraison d'un transgène *in utero*. Si un adénovirus recombinant s'intègre à une très faible fréquence dans les cellules somatiques, il a été démontré que la transduction d'ovule de souris permet une intégration d'une copie du vecteur et une expression stable du transgène chez 10% des embryons fécondés (215). La possibilité d'introduire de manière simple et efficace une copie d'un transgène dans un animal transgénique permet de réduire les phénotypes en mosaïque.

La réponse immunitaire et la toxicité provoquées par les vecteurs adénoviraux de première génération représentent des obstacles majeurs à l'utilisation de ces derniers pour la thérapie génique. Par contre, leurs caractéristiques uniques en font des outils de premier plan dans le champ de la génomique fonctionnelle. Considérant la masse de gènes à caractériser depuis le séquençage du génome humain, nul doute que le futur des vecteurs adénoviraux de première génération se trouve dans ce champ d'application.

### **1.3.2 Construction des vecteurs de première génération**

De manière classique, les vecteurs adénoviraux de premières générations sont produits par recombinaison homologue entre un génome adénoviral inactivé par une digestion avec l'enzyme ClaI et un vecteur de transfert linéarisé. Cette recombinaison sera effectuée en transfectant le vecteur de transfert et le génome viral dans des cellules de mammifères permissives, généralement des cellules 293. Le plasmide de transfert contient une cassette d'expression permettant l'expression d'un transgène et une région

homologue avec la portion gauche du génome adénoviral, la gauche étant définie par l'ITR contenant le signal d'encapsidation (figure 5). Cette procédure, bien que très simple, est aussi très inefficace. La fréquence de recombinaison entre le vecteur et le génome viral est faible et une digestion incomplète de l'ADN viral signifie que le virus recombinant produit sera contaminé par le virus parental.



**Figure 5 : Représentation de la manière classique pour générer des vecteurs de première génération. Un vecteur de transfert portant le transgène et une séquence d'homologie avec l'adénovirus est transfecté de concert avec un génome adénoviral préalablement digéré avec ClaI. Les séquences homologues permettent une recombinaison entre les deux segments d'ADN générant ainsi un adénovirus recombinant. Par contre, la digestion incomplète de l'ADN viral signifie que le virus recombinant sera contaminé par le virus parental.**

Pour se débarrasser de cette contamination, on doit avoir recours à plusieurs rondes de purification en isolant des plages de lyse produites par le virus sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose. Cette purification sera d'autant plus fastidieuse si le transgène

présent dans l'adénovirus recombinant confère un désavantage répliatif par rapport au virus parental. Des méthodes alternatives ont été développées pour minimiser la contamination du virus parental. Par exemple, l'insertion de la  $\beta$ -galactosidase d'*E.coli* (185) ou d'une protéine de fluorescence verte (36) dans la région E1 du virus parental permet d'effectuer une sélection négative de ce dernier lorsque le produit de la recombinaison est utilisé pour générer des plages de lyse sur un tapis cellulaire. Bien qu'utiles, ces approches restent difficilement utilisables, car elles impliquent toujours une purification du virus recombinant. Une tâche qui sera particulièrement ardue si le virus recombinant se réplique moins bien que le virus parental. Somme toute, la construction d'adénovirus recombinants avec ces méthodes représente un travail laborieux qui s'échelonne sur plusieurs semaines.

Pour éviter la contamination du virus recombinant par le virus parental, diverses techniques ont été élaborées (27, 34, 69, 87, 105, 147). Le génome adénoviral recombinant peut être construit de plusieurs manières : 1-en sous-clonant directement le transgène à l'intérieur d'un plasmide ou d'un cosmide contenant le génome viral, 2-en utilisant le système de recombinaison Cre/LoxP pour faciliter le transfert spécifique et efficace d'un transgène dans un vecteur contenant le génome viral et 3-en effectuant une recombinaison homologe chez *E.coli* entre un plasmide portant le génome viral et un plasmide de transfert contenant le transgène. Ces systèmes permettent une sélection stricte du virus recombinant étant donné qu'ils ne requièrent pas la transfection d'un génome infectieux. C'est le génome recombinant qui sera directement transfecté dans les cellules permissives. Ces méthodes permettent donc de générer des adénovirus recombinants tout en évitant la contamination par le virus parental. Par contre, les génomes adénoviraux recombinants créés avec ces approches sont peu infectieux : la transfection d'un microgramme d'ADN recombinant permet de générer, dans le meilleur des cas, 50 particules virales recombinantes. D'autre part, la transfection d'un ADN viral complexé aux pT est en mesure de multiplier par 100 l'infectivité d'un ADN recombinant par rapport à la transfection d'un ADN nu (146). Cette observation s'explique par le fait que la pT protège les extrémités de l'ADN transfecté tout en

permettant sa translocation à l'intérieur du noyau grâce à un signal de localisation nucléaire retrouvé sur cette dernière (74). De plus, une fois l'ADN viral à l'intérieur du noyau, la pT est en mesure d'associer le chromosome viral à la matrice nucléaire ce qui permet de stimuler la transcription des gènes précoces (184).

### 1.3.3 Production des vecteurs de première génération

Une fois l'adénovirus recombinant construit, reste le problème de sa production. Comme expliqués précédemment, les vecteurs adénoviraux de première génération doivent être amplifiés dans une lignée cellulaire capable de compléter en *trans* les protéines codées par la région E1. L'adénovirus infectant majoritairement des cellules quiescentes, l'expression des protéines E1A est essentielle pour créer un environnement qui sera optimum à la réplication du virus. E1B, de son côté, sera nécessaire pour prévenir le mécanisme d'apoptose déclenché par l'infection et pour permettre une traduction efficace des ARNm viraux.

La transcription du gène E1A permet de générer deux ARN messagers. Ces ARN messagers ont la même extrémité 5' et 3' mais leurs séquences différeront à cause d'un site d'épissage alternatif qui permettra la traduction du polypeptide 12S et 13S. La protéine 13S diffère uniquement de la protéine 12S par une séquence de 46 acides aminés.

Les protéines 12S et 13S ont pour première tâche d'assurer la transactivation des gènes précoces. Les protéines E1A sont incapables de se lier directement sur les promoteurs des gènes précoces pour activer leur transcription. E1A va activer la transcription en *trans* par l'intermédiaire d'une multitude d'interactions avec des facteurs de transcription cellulaire. Cette transactivation aura pour conséquence non seulement d'activer les promoteurs adénoviraux, mais aussi les promoteurs cellulaires. Par exemple, E1A peut activer la transcription des promoteurs avec une boîte TATA en libérant la TBP (TATA Binding Protein) séquestrée par Dr1 et p53 (95, 114).

Normalement, la TBP est inactive lorsque liée à ces deux protéines. E1A peut aussi activer la transcription en se liant directement à certains facteurs cellulaires comme ATF-2 (127) ou en séquestrant des facteurs réprimant la transcription comme YY1 (196).

Le second rôle des protéines 12S et 13S sera de faire entrer la cellule en phase S. La protéine de rétinoblastome (pRb) est un suppresseur de tumeur qui maintient les cellules en phase G1 et qui prévient l'entrée en phase S (223). Dans une cellule quiescente, pRb séquestre sous une forme inactive le facteur de transcription EF2. EF2 est une protéine pouvant se lier à l'ADN et qui est chargée de stimuler les promoteurs des gènes qui sont impliqués dans l'entrée en phase S et dans la réplication de l'ADN (236). L'activité de pRB est contrôlée par sa phosphorylation : lorsque phosphorylée par les cyclines kinases D, la pRB est inactivée et se dissocie d'E2F. Inversement, si pRb est déphosphorylée, E2F est séquestrée par pRb et n'est plus disponible pour stimuler la transcription des gènes impliqués dans la division cellulaire. Les protéines 12S et 13S sont en mesure de s'associer au complexe pRb-E2F ce qui provoque la dissociation d'E2F. En libérant E2F, E1A peut donc provoquer l'entrée de cellules quiescentes en phase S.

E1A peut aussi forcer l'entrée de la cellule en phase S par une voie alternative impliquant le complexe p300/CBP. Ce complexe est un coactivateur de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose (26). Les protéines p300 et CBP possèdent une activité acétyltransférase et sont capables de s'associer avec PCAF, une autre acétyltransférase. Ce complexe entraîne donc une décondensation de la chromatine, permettant un plus grand accès de la machinerie transcriptionnelle au nucléosome. L'activité transcriptionnelle accrue, causée par cette décondensation de l'ADN, permet l'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et le maintien en phase G0. La liaison de 12S et 13S au complexe p300/CBP permet de déplacer PCAF et d'inhiber l'activité acétyltransférase de p300/CBP. Résultat, l'ADN se retrouve donc dans un état plus condensé ce qui réduit la transcription de certains gènes, dont p53. La protéine p53 est un activateur de

transcription capable de stopper la division cellulaire. En inhibant l'activité de p300/CBP, on prévient l'activité de p53 ce qui contribue à la progression du cycle cellulaire vers la phase S.

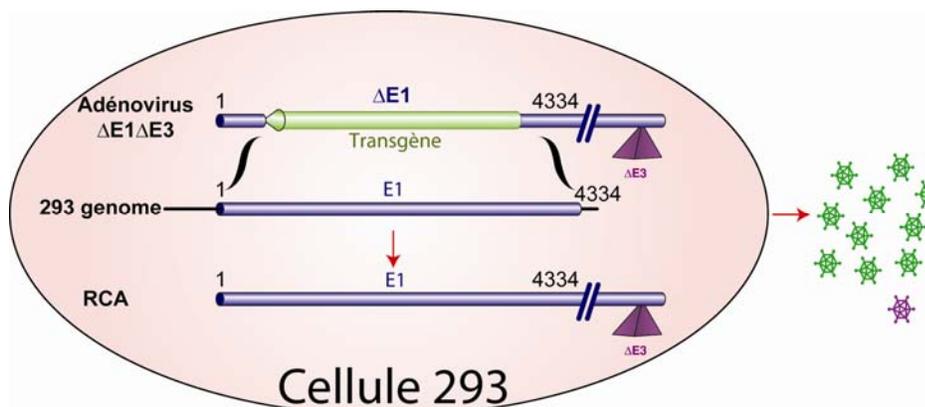
Au moment où la transcription des ARN messagers tardifs débute, le transport des ARN messagers viraux est favorisé au détriment des ARN messagers cellulaires par les protéines E1B-55K et E4-34K (9). Ces deux protéines permettent au virus de monopoliser la machinerie traductionnelle de la cellule. Pour ce faire, le complexe E1B-55K/E4-34K est en mesure de séquestrer les différents facteurs cellulaires impliqués dans l'exportation des ARN messagers à l'intérieur de centres répliatifs et transcriptionnels présents dans le noyau (160). La monopolisation de ces facteurs cellulaires dans un environnement riche en ARN messagers viraux permet d'assurer leur exportation dans le cytoplasme. Les ARN messagers cellulaires, qui n'ont plus accès à la machinerie d'exportation, sont donc retenus dans le noyau.

De plus, une fois acheminés au cytoplasme, les ARN messagers viraux sont aussi traduits en priorité lors de la phase tardive. Pour que la traduction des ARN messagers avec une coiffe puisse avoir lieu, le facteur d'initiation cellulaire eIF-4F doit être phosphorylé. Il a été proposé qu'E1B-55K puisse jouer un rôle dans la déphosphorylation d'eIF-4F, inhibant ainsi la traduction des ARN messagers cellulaires portant une coiffe (82). Chez les ARN messagers viraux, la séquence « leader tripartite » remplace la coiffe. Le facteur eIF-4F n'est donc pas nécessaire à leur traduction. Conséquemment, un adénovirus n'exprimant pas assez d'E1B-55K aura une plus faible expression de ses gènes tardifs et donc une répliation sous-optimale (10).

Les protéines E1B ont pour tâche de neutraliser l'action de p53 pour prévenir l'apoptose. La région E1B code pour les protéines E1B-55K et E1B-19K à partir d'un transcrite unique subissant un épissage alternatif. La protéine E1B-55K peut se lier directement à p53 pour contrecarrer son activité transcriptionnelle. Pour ce faire, E1B-55K peut masquer le site de liaison à l'ADN de p53, mais, de manière plus importante, E1B-55K possède aussi un domaine qui permet de réprimer sa transactivation.

Autrement dit, un mutant d'E1B-55K ne cachant plus le domaine de liaison à l'ADN de p53 sera toujours en mesure de réprimer efficacement son activité transcriptionnelle (229). E1B-55K transforme ni plus ni moins p53 en répresseur transcriptionnel. Étant donné que le mécanisme d'action de p53 sur l'arrêt du cycle cellulaire et sur l'induction de l'apoptose passe par son habilité à pouvoir activer la transcription de certains gènes clés, il va sans dire qu'E1B-55K jouera donc un rôle essentiel dans la neutralisation des effets indésirables de p53 pour la réplication de l'adénovirus. Il est à noter que E4orf6 peut aussi se lier à E1B-55K pour entraîner ainsi la dégradation de p53 par le protéasome (172). L'infection adénovirale provoque une augmentation de la transcription des gènes pro-apoptotiques Bax et Bak. Ces deux protéines peuvent former un homodimère capable de se lier à la membrane de la mitochondrie pour provoquer le relargage du cytochrome C, déclenchant ainsi l'apoptose par l'activation de caspase 9. E1B-19K fonctionne de manière analogue à Bcl-2 : en se liant à Bax et Bak, elle prévient leur homodimérisation et leur insertion dans la membrane mitochondriale et donc le relargage du cytochrome C (81).

La lignée cellulaire 293 a été construite en transfectant des cellules embryonnaires de rein avec un segment du génome d'un adénovirus de type-5 (73). Suite à cette transfection, un segment du génome adénoviral correspondant à la totalité de la région E1, allant des nucléotides 1 à 4 344, a été retrouvé dans les cellules 293, à la position q13.2 du chromosome 19 (131). Les cellules 293 sont probablement les plus utilisées dans la production de vecteurs adénoviraux en raison des excellentes concentrations qu'elles peuvent générer (139). Par contre, la délétion E1 retrouvée dans la majorité des vecteurs adénoviraux de première génération s'étend du nucléotide 400 à 3 500, créant ainsi deux régions homologues avec le segment E1 intégré dans les 293. Ces séquences peuvent être la cible d'une recombinaison homologue où le transgène du vecteur sera échangé avec la région E1 de la cellule, créant ainsi un RCA (Replication Competent Adenovirus) se comportant exactement comme un virus sauvage (130) (figure 6).



**Figure 6 : Représentation du double événement de recombinaison menant à la création d'un RCA dans une cellule 293. En vert, les adénovirus recombinants et en mauve le RCA.**

Suivant une injection systémique, les vecteurs adénoviraux peuvent s'accumuler dans le foie où les RCA seront en mesure de se répliquer (179). Les RCA pourront par la suite causer une forte réponse immunitaire inflammatoire (91) et servir de virus auxiliaire au vecteur qui sera en mesure de se disséminer à l'extérieur du lieu d'injection (101). La présence de RCA dans un stock aura aussi pour conséquence de masquer l'effet d'un virus recombinant, c.-à-d. que le RCA est pris en compte lors de la détermination de la concentration d'un stock et comme le RCA n'exprime aucun transgène, il ne provoquera aucun effet spécifique chez le sujet traité. En utilisant un stock fortement contaminé par un RCA, on pourrait être amené à conclure, de manière erronée, à l'inefficacité de l'expression du transgène simplement parce qu'il n'a pas été administré à la dose prévue. Il va sans dire que tous ces événements ont des effets délétères très importants qui peuvent compromettre les études chez les animaux et la sécurité des patients traités lors d'essais cliniques.

#### 1.4 La création de bibliothèques d'expression

Avec le séquençage récent du génome de plusieurs organismes, la communauté scientifique a désormais accès à une quantité incroyable de gènes dont la plupart ont une

fonction inconnue. Il apparaît donc de plus en plus évident que la caractérisation de cette masse de gènes nécessitera l'utilisation de puissants outils qui vont permettre, entre autres, la création de manière simple et rapide de bibliothèques d'expression. De telles bibliothèques seront aussi utiles pour faciliter le criblage par la création de mutants.

La création de bibliothèques de plasmides a été la première méthode qui a permis de caractériser la fonction de différents gènes. Par exemple, une bibliothèque d'expression d'ADNc construite à partir de cellules permissives aux infections réovirales a mené à la découverte du récepteur cellulaire du réovirus (11). Bien que faciles à construire et capables d'une grande diversité, c.-à-d. qu'elles sont en mesure de représenter un grand nombre de gènes différents, les bibliothèques de plasmides sont associées à des inconvénients majeurs qui rendent leur utilisation peu pratique. Premièrement, ces bibliothèques ont recours à la transfection pour pouvoir livrer leur transgène dans les cellules qui serviront au criblage. À cet égard, toute cellule réfractaire à la transfection posera problème. De plus, même si la transfection s'avère efficace, le niveau d'expression des différents éléments de la bibliothèque peut s'avérer insuffisant pour générer le phénotype recherché.

Les rétrovirus ont aussi été utilisés dans la construction de bibliothèque d'expression. Leur principal avantage réside dans le fait que ces derniers sont en mesure de générer des cellules exprimant de manière stable les différents éléments constituant la bibliothèque (203). L'incapacité des rétrovirus à infecter des cellules quiescentes peut être surmontée en utilisant un vecteur lentiviral (24, 28). Ces deux types de bibliothèques sont générés en transfectant une bibliothèque de plasmides construite dans un vecteur de transfert dans une lignée d'encapsulation (19). Par contre, les bibliothèques lentivirales et rétrovirales auront une diversité moindre que les bibliothèques de plasmides, donc moins d'éléments représentés que dans cette dernière. Ceci tient du fait que la création de bibliothèques lentivirales et rétrovirales passe d'abord par la création d'une bibliothèque de plasmide qui sera ensuite convertie en bibliothèque virale par transfection dans la lignée d'encapsulation. De manière plus concrète, une transfection utilisant le polyéthylèneimine (technique utilisée, voir matériel et méthodes) peut livrer près de 1000 copies d'un plasmide dans le noyau d'une

cellule (22), chacune de ces copies représente un élément potentiellement différent de la librairie. Par contre, une lignée d'encapsidation lentivirale produit environ 100 particules par cellule (19). Donc, lors de l'étape de conversion, des éléments de la librairie seront nécessairement perdus à cause de l'incapacité d'une cellule à générer un virus à partir de tous les plasmides qui l'auront transfecté. Autre facteur d'importance, la diversité sera aussi affectée par le fait que certains éléments de la librairie seront toxiques pour le lentivirus ou le rétrovirus : ces éléments ne pourront pas être convertis en vecteur viral. Cette susceptibilité des vecteurs lentiviraux et rétroviraux à être incapable de se répliquer à cause d'un transgène est assez fréquente. Dans notre laboratoire, il nous a été impossible, à quelques reprises, de construire un lentivirus recombinant avec un transgène donné.

L'utilisation des librairies de plasmides, rétrovirales et lentivirales est sévèrement limitée à cause du manque de versatilité des méthodes de criblage pouvant être employées sur ces dernières. Si les librairies peuvent être utilisées pour exprimer toute une panoplie de cDNA, d'antisens, de ribozymes ou de mutants, le défi restera de trouver dans toute cette masse d'éléments différents celui qui cause le phénotype recherché. Pour ce faire, la méthode de criblage utilisée devra permettre un enrichissement des éléments associés au phénotype recherché et le seul phénotype qui rend possible un tel enrichissement est celui relié à la survie cellulaire. Par exemple, il sera possible de cribler une librairie en recherchant des éléments qui préviennent l'apoptose. Si une cellule, grâce à la transduction par un élément d'une librairie, n'entre pas en apoptose alors qu'elle le devrait, alors cet élément de la librairie sera enrichi et on aura la possibilité de l'identifier. En génomique fonctionnelle, l'utilisation d'une librairie est toujours limitée par la capacité de pouvoir faire un criblage efficace. Par conséquent, toutes librairies dont les méthodes de criblages sont restreintes, comme c'est le cas ici, auront un désavantage énorme.

### 1.4.1 Le besoin pour une nouvelle méthode de création de bibliothèques adénovirales

L'utilisation de vecteurs adénoviraux pour la construction de bibliothèques d'expression est un moyen qui permet de passer outre les limitations associées aux bibliothèques de plasmides, de lentivirus et de rétrovirus. Premièrement, le large tropisme des vecteurs adénoviraux permet une expression robuste de leur transgène dans la majorité des cellules, un avantage important par rapport aux bibliothèques de plasmides qui doivent être transfectées. De plus, les vecteurs adénoviraux de première génération peuvent transduire des cellules post-mitotiques (165), ce qui est impossible avec un vecteur rétroviral. Ensuite, contrairement aux vecteurs rétroviraux et lentiviraux, les adénovirus recombinants sont faciles à produire : une cellule 293 peut produire jusqu'à 20 000 particules infectieuses par cellule (139). La diversité théorique des bibliothèques adénovirales s'avère donc très élevée : jusqu'à 20 000 éléments différents par cellule, comparativement à 100 pour un lentivirus. Autrement dit, parmi les milliers de plasmides de transfert qui se rendent au noyau lors d'une transfection, un plus grand nombre peut être converti en adénovirus recombinants qu'en lentivirus recombinants. Un autre avantage des vecteurs adénoviraux dans la construction de bibliothèques réside dans le fait que, contrairement aux rétrovirus et aux lentivirus, l'expression régulée d'un transgène est rarement délétère pour la réplication du vecteur. Ceci assure une meilleure représentation des éléments de la bibliothèque. Mais l'atout majeur des bibliothèques adénovirales réside dans le fait que chacun des éléments de la bibliothèque peut facilement être purifié en isolant des plages de lyse produit sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose pour isoler des clones viraux. Autrement dit, avec une bibliothèque adénovirale, il est possible d'isoler et de cribler séparément chacun des éléments de la bibliothèque. Cette caractéristique cruciale donne aux bibliothèques adénovirales une facilité de criblage supérieure aux bibliothèques de plasmides. Le criblage d'une bibliothèque adénovirale n'implique pas un enrichissement d'un élément via un phénotype de meilleure survie puisque le criblage se fait avec un élément défini. Par conséquent, il est facile d'identifier l'élément de la bibliothèque qui est responsable d'un phénotype donné. Par exemple, avec une bibliothèque adénovirale, on peut tester individuellement toute une série de clones viraux pour trouver un élément qui peut déclencher l'apoptose d'une cellule,

chose impossible avec les autres librairies. Somme toute, l'utilisation d'une librairie adénovirale permet de cribler pour autre chose que la survie cellulaire, conférant ainsi au système une grande flexibilité au niveau des phénotypes recherchés lors du criblage.

#### **1.4.2 Création de librairies adénovirales par sélection positive**

Si sur papier les librairies adénovirales montrent un grand potentiel pour les applications de génomique fonctionnelle, leur utilisation reste très limitée à cause de la difficulté de construire ces dernières avec les techniques actuellement existantes. La méthode idéale pour la construction de librairie adénovirale doit faire en sorte que : 1- seulement le virus recombinant soit sélectionné et 2- un grand nombre d'adénovirus recombinants soit produit suivant la transfection de cellules permissives, autrement dit que la diversité sera grande.

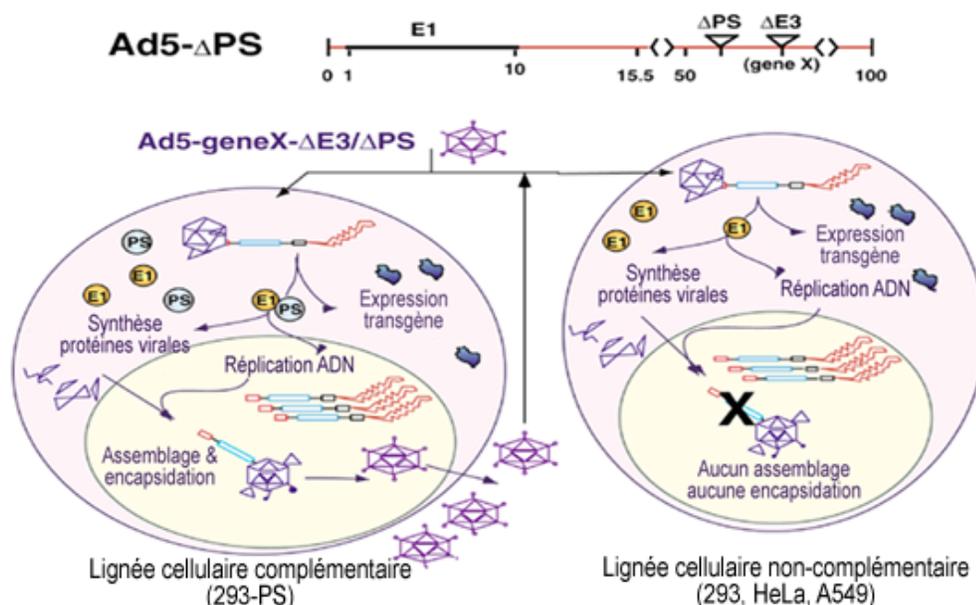
La méthode classique de construction de vecteurs de première génération, impliquant la transfection d'un plasmide de transfert et d'un génome adénoviral, est inutilisable à cause de la contamination du stock de virus recombinant par le virus parental. Dans le contexte d'une librairie, cela implique que chacun des clones viraux devrait subir de nombreuses rondes de purification par plages de lyse, ce qui représente un travail considérable. Bref, l'incapacité à se débarrasser du virus parental rend pratiquement inutilisable cette méthode dans la construction de librairie.

La deuxième technique utilisée dans la construction de vecteurs de première génération, basée sur la construction d'un génome adénoviral recombinant *in vitro* ou *in vivo*, permet d'éviter la contamination par le virus parental. Par contre, la diversité des librairies générées avec ces méthodes est nettement insuffisante. Comme expliqué précédemment, dans le meilleur des cas, on génère à peine 50 virus recombinants par  $\mu\text{g}$  d'ADN transfecté. Avec ces méthodes, la création d'une librairie d'ADNc comprenant  $3 \times 10^4$  éléments nécessiterait la transfection de 600  $\mu\text{g}$  d'ADN, ce qui est impraticable.

Une autre avenue qui s'avère prometteuse pour la création de bibliothèques adénovirales pourrait utiliser le principe de sélection positive. Cette approche consiste à déléter un gène essentiel au cycle de réplication dans le virus parental pour le ré-exprimer de manière ectopique chez les adénovirus recombinants. De manière pratique cette méthode serait mise en œuvre en infectant les cellules avec un adénovirus parental incapable de se répliquer et en transfectant un plasmide de transfert qui exprime le gène permettant la réplication. Une recombinaison homologe entre le vecteur et le virus permet de générer un adénovirus recombinant répliquatif. Avec cette méthode, le virus parental est éliminé dû à son incapacité à se répliquer et le virus recombinant aurait un cycle de réplication normal. Dans cette optique, le gène de la PS s'avère un candidat intéressant.

La PS a plusieurs rôles lors de l'infection adénovirale. Au tout début de l'infection, la PS qui a été encapsidée dans le virion, est nécessaire à la décapsidation du virus au niveau du cytoplasme. Lors de l'assemblage de la particule virale, la PS est exposée à un milieu oxydatif produit par la lyse cellulaire qui a pour effet d'inactiver cette dernière en formant des liens disulphures. Lors de la pénétration de la particule virale dans une cellule, le relargage de la fibre induit un changement de conformation dans la base penton qui a pour effet de modifier la conformation de la protéine VI, exposant ainsi des sites qui peuvent être clivés par la PS. De manière concomitante, la protéase est réactivée par le milieu réducteur présent dans la cellule nouvellement infectée. Ces événements mènent donc au clivage de la protéine VI par la PS. La protéine VI étant responsable d'attacher le génome viral aux hexons, la dégradation de cette dernière permettra donc la libération de l'ADN du virus qui était jusque-là retenu sur la surface interne de la capsid (75). Lors de la phase finale du cycle, la PS sera chargée de cliver les différents précurseurs polypeptidiques pour générer les protéines VI, VII et VIII sous leur forme mature, ce qui permet de finaliser l'assemblage de la capsid. La PS assurera aussi la maturation du précurseur de la pT.

Un adénovirus délété de sa protéase (Ad $\Delta$ PS) et ayant été produit dans une lignée cellulaire non complémentaire sera en mesure d'accomplir toutes les étapes précoces de son cycle réplcatif, incluant la réplcation de son ADN. Mais en l'absence de PS, la maturation des composants de la capsid ne pourra pas avoir lieu : aucune particule virale ne sera donc assemblée (figure 7).



**Figure 7 : Cycle réplcatif d'un adénovirus portant une délétion PS et E3. Dans une lignée cellulaire exprimant la PS, le virus aura un cycle réplcatif identique à un virus sauvage, la PS exprimée par la cellule permettant la maturation des polypeptides de la capsid. Dans une lignée non complémentaire, toutes les étapes précoces du cycle peuvent avoir lieu, mais aucune particule virale ne sera produite.**

Notre groupe a publié une preuve de principe démontrant qu'il était possible d'utiliser la sélection positive avec PS pour générer des adénovirus recombinants (45). Avec cette méthode, l'adénovirus recombinant est produit en infectant des cellules 293 avec un Ad $\Delta$ PS, puis en transfectant un plasmide de transfert linéarisé exprimant la PS et la GFP à partir d'une cassette d'expression discistronique. Comme le vecteur de transfert contient aussi une région homologue au génome viral, une recombinaison peut avoir lieu entre le vecteur et l'Ad $\Delta$ PS. Les adénovirus recombinants résultants de cette recombinaison exprimeront la PS de manière ectopique et seront donc réplcatifs. À l'opposé, le virus parental n'ayant pas recombiné son génome avec le vecteur de

transfert restera  $\Delta PS$ , donc non répliatif. Il est à noter que la capacité de l'Ad $\Delta PS$  à répliquer son ADN joue un rôle important. Les nombreuses structures simple-brins produites lors de la répliation de l'ADN viral augmentent la fréquence de recombinaison entre régions homologues et donc la probabilité de générer un adénovirus recombinant (56). Dans l'optique de la création d'une librairie, cela signifie que la librairie de plasmide de transfert est convertie plus efficacement en librairie adénovirale.

Même si nos travaux précédents démontrent qu'il est possible de générer des librairies adénovirales par sélection positive, le système n'est pas encore au point. Premièrement, il faut séparer l'expression du transgène présent dans le plasmide de transfert de l'expression de la PS. Le vecteur de transfert utilisé pour démontrer la fonctionnalité de la sélection positive a une configuration telle que le transgène et la PS sont exprimés de manière concomitante via une cassette d'expression dicistronique, c.-à-d. que l'expression du transgène et de la PS est dépendante l'une de l'autre. Dans cette configuration, il serait impossible d'exprimer un transgène toxique, car pour contourner la toxicité de ce dernier il faudrait utiliser un promoteur inductible alors que la PS requiert une expression constitutive. La première tâche consistera donc à créer une nouvelle cassette d'expression du gène de la PS pour découpler son expression de celle du transgène. Deuxièmement, il faut augmenter la diversité de la librairie. Dans nos travaux précédents, il fallait infecter/transfecter près de 1 000 cellules pour être en mesure de générer un adénovirus recombinant. Bien que ce nombre soit compatible avec la création de librairies adénovirales, une diversité aussi faible n'en reste pas moins un obstacle majeur limitant l'utilisation du système.

Nous avons posé l'hypothèse que l'optimisation de l'expression ectopique de la PS par le vecteur de transfert pourrait régler ce problème. Une forte expression de la PS par le vecteur de transfert pourrait provoquer un phénomène de transcomplémentation. Ici, il faut réaliser que la cassette d'expression PS du plasmide de transfert sera active au moment de la transfection et que la PS produite par cette cassette pourra transcomplémenter directement l'Ad $\Delta PS$  et permettre sa répliation sans qu'il y ait eu

recombinaison. Même si le virus parental généré ainsi est toujours non répliatif et qu'il sera éliminé lors de la purification par plages de lyse, ce phénomène pourrait nuire grandement à la diversité en entraînant une prolifération du virus parental au détriment du virus recombinant. Sachant qu'un niveau d'expression de la PS de 10% par rapport à une infection par un virus sauvage est suffisant pour permettre une répliation normale de l'adénovirus (45), nous avons décidé de construire des plasmides de transfert avec une cassette d'expression exprimant moins de PS que ceux utilisés dans les travaux de la preuve de principe. Ainsi, on espère qu'en minimisant l'expression de la PS on diminuera la transcomplémentation et qu'on maximisera la diversité.

### **1.5 La production de vecteurs adénoviraux à grande échelle**

Une fois l'adénovirus recombinant construit, il restera toujours le problème de sa production, surtout si l'on prévoit une utilisation intensive du vecteur. En pareil cas, il faudra que le vecteur soit produit à grande échelle. Le défi principal pour la production à grande échelle des vecteurs adénoviraux est double. Premièrement, les vecteurs doivent être produits au plus haut niveau possible, idéalement au même niveau qu'un virus sauvage. Cette contrainte est dictée par des considérations logistiques et économiques. Par exemple, une simple amélioration de la production volumétrique par un facteur deux, permet de faire passer une production qui requerrait 100 litres de milieu à 50 litres de milieu. Une telle réduction diminue substantiellement les coûts de production et de purification du vecteur. Deuxièmement, le procédé de culture doit être simple et économique. Ceci exige la production dans des milieux de culture exempts de sérum et, idéalement, de tous produits d'origine animale.

Comme expliquée précédemment, la production de vecteur adénoviral de première génération via la lignée cellulaire 293 implique la génération de RCA par recombinaison homologue entre le vecteur et la cellule. La fréquence de recombinaison étant faible, généralement 1 RCA pour l'infection de  $10^6$  cellules, la présence de RCA n'est pas gênante dans les stocks de virus produits et utilisés à petite échelle. Par contre, la

transduction de cellules en bioréacteur pour la production de protéines recombinantes ou les expériences chez les animaux et les humains requerra une quantité importante de vecteurs. À titre indicatif, s'il est possible de transduire 80% des fibres musculaires du tibialis antérieur d'une souris en injectant  $2 \times 10^9$  particules virales, un essai analogue chez l'humain nécessiterait 2 500 fois plus de matériel, soit  $5 \times 10^{12}$  particules virales. Devant des besoins aussi considérables, il apparaît donc évident que la production à grande échelle de vecteurs adénoviraux de première génération est un enjeu capital. Cette production à grande échelle passe par une série de cycles d'amplification qui permettent d'augmenter graduellement la concentration du vecteur produit en augmentant la quantité de cellules infectées. À cause de la faible fréquence de cet événement de recombinaison, les RCA sont retrouvés en très faibles quantités lors des premières rondes d'amplification. Par contre, cette population augmente de manière dramatique et peut éventuellement supplanter le vecteur adénoviral lors des nombreuses rondes d'amplification nécessaires pour la production à grande échelle (130) (figure 8).

<b>Amplification &amp; production</b>	<b>Vecteurs adénoviraux/RCA (particule infectieuse/ml)</b>	<b>Passage #</b>
Élution d'une plaque	$10^3$ - $10^4$ /0	0
↓ 200 µl		
Infecter $10^5$ cellules dans 1 ml	$5 \times 10^8$ /0.005- $5 \times 10^2$	1
↓ 600 µl		
Infecter $3 \times 10^7$ cellules dans 75 ml	$1.5 \times 10^{11}$ /0.0015- $1.5 \times 10^5$	2
↓ 5 ml		
Infecter $5 \times 10^8$ cellules dans 1 L	$2.5 \times 10^{12}$ /0.0025- $2.5 \times 10^6$	3
↓ 1 à 5 ml		
Infecter $3 \times 10^9$ cellule dans 2.4 L	$1.5 \times 10^{13}$ /0.0015- $1.5 \times 10^7$	4
↓ 4 à 20 ml		
Infecter $20 \times 10^9$ cellule dans 20 L	$1 \times 10^{14}$ /0.001- $1 \times 10^8$	5

**Figure 8 : Génération de RCA lors de la production de vecteurs adénoviraux dans les cellules 293. Au fur et à mesure que les passages s'accroissent pour faire la production à grande échelle, la quantité de RCA augmente.**

L'utilisation d'un stock de vecteurs adénoviraux avec une contamination de 1 RCA par  $10^8$  adénovirus recombinants implique l'injection de  $10^2$ - $10^3$  RCA lorsque l'on

traite un humain. La limite de 1 RCA par  $1 \times 10^{10}$  adénovirus recombinants, imposée par les organismes de réglementation, fait en sorte que l'utilisation des 293 pour la préparation de matériel destiné aux essais cliniques est chose impossible (2). Si le vecteur produit est destiné à la production de protéines recombinantes, la transduction de cellules par un stock d'adénovirus recombinants contaminé de manière importante par des RCA aura pour effet d'affecter de manière considérable la production de protéines recombinantes tout en contaminant le stock de protéines avec un adénovirus répliquatif. De manière analogue, des essais *in vivo* réalisés avec un stock de vecteurs contaminé par des RCA pourraient fausser les résultats.

Deux types de stratégies ont été utilisés pour prévenir l'apparition des RCA : des modifications du génome des vecteurs et/ou la construction de nouvelles lignées de complémentation. En délétant la région E1B codant pour la protéine pIX, l'homologie est sensiblement réduite et la fréquence des RCA est réduite (90). Même si un tel vecteur adénoviral est viable, la plus grande fragilité de sa capsid le rend instable. Il est donc préférable de ré-exprimer le gène pIX soit en le positionnant ailleurs dans le génome viral ou encore dans les cellules 293. Une autre approche consiste à déléter un second gène essentiel, tel que E2A ou E4, pour ensuite faire la complémentation dans les cellules 293 (39, 115, 134). Même si ces vecteurs peuvent toujours échanger leur gène thérapeutique pour la région E1, ils ne seront pas répliquatifs à cause de leur seconde délétion. Par contre, la production de ces lignées est moindre. La méthode la plus sûre pour prévenir la création de RCA reste la construction de nouvelles lignées cellulaires pouvant compléter la délétion E1 tout en minimisant les homologies avec le vecteur (50, 51, 65, 102, 108, 186). Si toutes ces lignées cellulaires se sont montrées capables de réduire la fréquence des RCA, seulement la lignée PER.C6©, pouvant être cultivée dans un milieu sans sérum, a été en mesure de se tailler une position dans la production de vecteurs à grande échelle (151). La lignée PER.C6© a été construite en produisant des clones stables à partir de cellules embryonnaires rétinienne exprimant la région E1 à partir d'un promoteur PGK. La région E1 retrouvée dans les PER.C6© ne contient aucune région homologue avec le génome de l'Ad ce qui permet d'éviter la production de RCA. En bioréacteur, ces cellules peuvent atteindre une densité de  $3 \times 10^6$  cellules/ml

et produire jusqu'à 36 000 particules physiques par cellule (128). Dans tous les processus de production à grande échelle, il est important d'éliminer les composants non définis comme le sérum. Différents lots de sérum pourront avoir des effets différents sur le milieu de culture utilisé, ce qui peut affecter la reproductibilité des lots de production. De plus, la possible contamination du sérum, par des virus ou des prions, représente un risque difficilement acceptable lors de la production d'un composé biothérapeutique, sans compter que la présence de sérum dans le milieu de production complique les étapes subséquentes de purification. Autre avantage non négligeable, l'utilisation de milieu sans sérum réduit aussi de manière significative le coût des milieux de culture. Par contre, si les PER.C6© répondent à tous ces impératifs de production, ces cellules sont protégées par un brevet et sont uniquement disponibles par l'achat d'une licence d'exploitation, ce qui limite leur utilisation de manière draconienne.

### **1.5.1 Le besoin pour une lignée cellulaire pour la production à grande échelle**

La production à grande échelle étant impensable dans les cellules 293 à cause des RCA et difficilement réalisable dans les PERC.6© à cause des restrictions liées à leur utilisation, la nécessité de développer une nouvelle lignée cellulaire permettant la production d'adénovirus de première génération apparaît comme essentielle. Sachant qu'un adénovirus de type sauvage pouvait se répliquer au même niveau dans des cellules 293 et A549 (cellules épithéliales d'un adénocarcinome du poumon), notre groupe a construit et breveté une lignée cellulaire A549 capable de répliquer les vecteurs adénoviraux de première génération (BMAde1) (137). Cette nouvelle lignée cellulaire contient la région E1 de l'Ad de type-5 où le gène E1A est sous le contrôle d'un promoteur constitutif  $\beta$ -actine et le gène E1B sous le contrôle de son promoteur naturel.

Cependant, contrairement aux cellules 293, la région E1 présente chez les BMAde1 contient seulement 200 nucléotides d'homologie avec les vecteurs de première génération. Par contre, ces 200 nucléotides d'homologie ne sont pas présents dans les

plus récents vecteurs de transfert (87), si bien que toute recombinaison pouvant générer un RCA est impossible. Il a été démontré que les BMAde1 génèrent moins de 1 RCA par  $3 \times 10^{10}$  particules virales, un standard qui satisfait les exigences de la FDA (61). Par contre, les BMAde1 ne sont pas très efficaces pour répliquer les adénovirus de première génération : seulement 15-30% du niveau de production des 293 peut être atteint dans les BMAde1.

## **1.7 Objectifs de la thèse**

Cette thèse porte sur le développement d'une plate-forme de production de vecteurs adénoviraux de première génération. Elle aborde dans un premier temps la construction d'un vecteur de transfert pour lequel l'expression de la protéase adénovirale a été optimisée de manière à permettre une sélection positive des adénovirus recombinants. Dans un deuxième temps, une nouvelle lignée cellulaire a été construite pour permettre une amplification efficace de vecteur de première génération tout en évitant la production de virus répliquatif. Cette lignée cellulaire a été adaptée à la culture en suspension sans sérum pour permettre la production à grande échelle.

### **1.6.1 : Objectifs liés à la sélection positive**

Le premier des objectifs de cette thèse sera de construire une série de vecteurs de transfert adénovirale contenant une cassette d'expression indépendante de la PS permettant une expression minimale de la protéase. Ce travail d'optimisation de l'expression de la PS fera en sorte que, l'Ad recombinant construit à partir de ce vecteur de transfert, pourra être sélectionné par sélection positive via une expression ectopique de la PS. Pour que le vecteur de transfert construit soit compatible avec la création de librairie adénovirale, la cassette d'expression de la PS qui sera construite devra : 1- exprimer suffisamment de PS pour permettre une répllication robuste de l'Ad recombinant et 2- exprimer une quantité suffisamment faible de PS pour minimiser le phénomène de

transcomplémentation du virus parental dans le but de maximiser la diversité d'une librairie adénovirale construite avec ce plasmide. Une fois le travail d'optimisation du vecteur de transfert réalisé, l'efficacité réelle de ce dernier sera mise à l'épreuve en construisant une librairie d'ARN antisens dirigée contre la GFP.

### **1.6.2 : Objectifs liés à la construction d'une nouvelle lignée cellulaire**

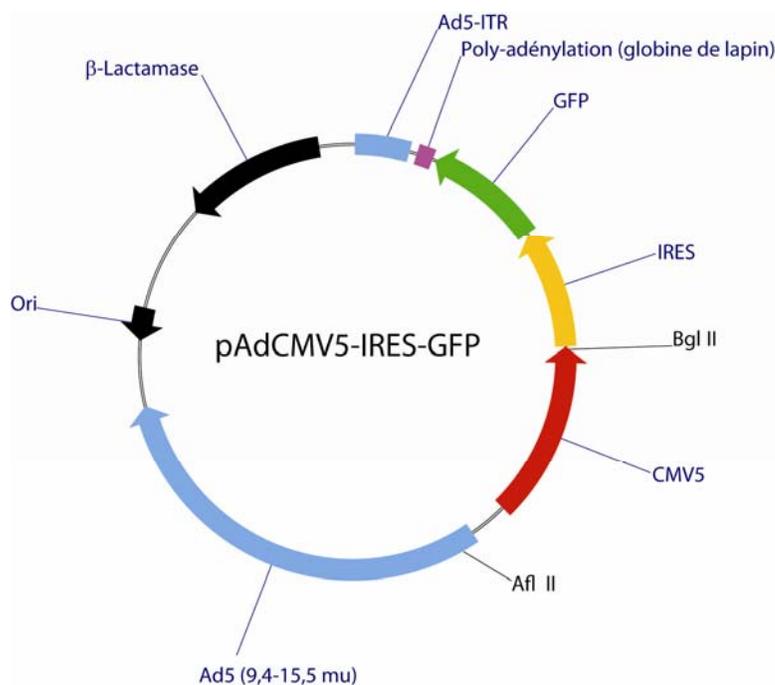
Le second des objectifs de cette thèse sera de construire une lignée cellulaire capable de produire à grande échelle des vecteurs adénoviraux de première génération tout en évitant de générer des RCA. Pour ce faire, nous analyseront le profil d'expression des protéines de la région E1 exprimées par les BMADE1 afin de déterminer si une mauvaise expression de cette région pourrait causer une mauvaise répllication des vecteurs. Le cas échéant, on voudra corriger ce défaut pour ensuite être en mesure d'adapter la lignée cellulaire pour la culture en suspension sans sérum. Ultiment, nous désirons obtenir une lignée cellulaire du calibre des 293, capable de croître en suspension sans sérum, et ne générant pas de RCA.

**Section 2 :**  
**Matériel et méthodes**

## 2.1 Construction des plasmides de transfert adénoviraux

Sauf indication contraire, toutes les enzymes utilisées proviennent de « New England Biolabs » et le séquençage a été réalisé par le service offert par l'Université McGill.

Les plasmides portant le suffixe « pAd » correspondent à des vecteurs de transfert adénoviraux et possèdent tous la même structure : (a) une région homologe avec l'adénovirus type-5 (couvrant les unités génétiques 9,4 et 15,5) ; (b) l'ITR de gauche ; (c) une cassette d'expression IRES-GFP qui permet l'expression conjointe d'un transgène et de la GFP ; (d) une origine de réplication bactérienne (Ori) ; et (e) un gène de résistance à l'ampicilline ( $\beta$ -lactamase). Le plasmide qui sera utilisé pour la construction des différents vecteurs avec une expression ectopique de la PS est le pAdCMV5-IRES-GFP (138) (figure 9). Tous les clonages se feront dans le site AflII.



**Figure 9 : Vecteur de transfert type utilisé pour la construction d'adénovirus recombinants. CMV5 représente le promoteur et l'IRES est une séquence qui peut recruter directement la sous-unité 40S du ribosome pour l'initiation de la traduction. L'IRES permet la co-expression de la GFP et du transgène cloné dans le site Bgl II.**

### 2.1.1 Construction du vecteur pAdCMV5-IRES-GFP (tk TATA-PS)

Une cassette d'expression contenant la PS sous le contrôle de la boîte TATA du promoteur de la thymidine kinase (fragment -46 à +31) (tk TATA) et avec le site de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGHpolyA), a été construite pour être clonée dans le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP. Cette cassette d'expression a été assemblée par une stratégie de PCR de chevauchement.

**PCR #1** : Dans un premier temps, la séquence tk TATA a été amplifiée par PCR avec une amorce 5' contenant un site AflII et une amorce 3' contenant une séquence homologue avec l'extrémité 5' du gène de la PS.

Amorce 5' : TTTGGGTGTCTTAAGTTCGAGGCCACACGCGTCACCTTA

Amorce 3' : TCCTGCTCACTGGAGCCCATCGAATTCGAACACGCAGATGCAG

Le PCR a été effectué en utilisant la trousse « PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads » (Amersham Biosciences, États-Unis) à partir du vecteur pAdTR5-PS-IRES-GFP (45). Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 1- 5 minutes à 95°C
  - 2- 60 secondes à 95°C
  - 3- 60 secondes à 48°C
  - 4- 90 secondes à 72°C
  - 5- 7 minutes à 72°C
  - 6- ∞ à 4°C
- } Répété 30 fois

**PCR #2** : Ensuite, la séquence PS a été amplifiée par PCR avec une amorce 5' contenant une séquence homologue avec l'extrémité 3' du promoteur tk TATA et une amorce 3' contenant une séquence homologue avec l'extrémité 5' du BGHpolyA. Le

plasmide utilisé pour le PCR est encore le pAdTR5-PS-IRES-GFP (45) et les conditions sont les mêmes que celles décrites précédemment.

Amorce 5' : CATCTGCGTGTTTCGAATTCGATGGGCTCCAGTGAGCAGGAACTG

Amorce 3' : CTAGAAGGCACAGTCGAGGCTTACATGTTTTTCAAGTGACAAAA

**PCR #3** : Finalement, la séquence BHGpolyA a été amplifiée par PCR avec une amorce 5' contenant une séquence homologue avec l'extrémité 3' de la PS et avec une amorce 3' contenant un site AflII. Le plasmide utilisé pour le PCR est pVax (Invitrogen, États-Unis) et les conditions sont les mêmes que celles décrites précédemment.

Amorce 5' : GTCACCTGAAAAACATGTAAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC

Amorce 3' : TTTGGGTGTCTTAAGTCCCCACCATGCCTGCTATTGTC

Chacun des produits de PCR a été purifié avec la trousse « PCR purification kit » (Qiagen).

**PCR #4** : Les produits des PCR #1 et #2 ont été utilisés dans une nouvelle réaction de PCR en utilisant les amorces externes. Le produit de ce PCR correspond à une fusion des séquences tk TATA et PS.

**PCR #5** : Pour terminer, les produits du PCR #3 et #4 ont été utilisés dans une nouvelle réaction de PCR en utilisant les amorces externes. Le produit de ce PCR correspond à une fusion des séquences tk TATA-PS-BGHpolyA.

Le vecteur pAdCMV5-IRES-GFP a été digéré avec l'enzyme AflII et déphosphorylé avec l'enzyme alcaline phosphatase. Le fragment correspondant au vecteur a été purifié sur un gel d'agarose. Le produit de PCR #5 a lui aussi été digéré avec AflII et purifié sur gel de la même manière que le vecteur. La ligation entre le vecteur et le produit de PCR s'est faite avec le « Quick Ligation Kit ».

Le produit de la ligation a été transformé dans des bactéries *E.coli* compétentes DH5 $\alpha$ . Brièvement, 100  $\mu$ l de bactéries sont décongelées sur glace et mélangées à 5  $\mu$ l du produit de ligation. On fait ensuite subir aux bactéries un choc thermique de 60 secondes à 42°C après quoi on ajoute 900  $\mu$ l de milieu Luria-Bertani (LB) et l'on incube à 37°C pendant 60 minutes. Pour terminer, 300  $\mu$ l de bactérie ont été étalés sur des pétris LB-agar contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline (Sigma-Aldrich, États-Unis) et incubés à 37°C pendant 18 heures. Des colonies furent ensuite amplifiées et leur plasmide extrait. La présence et l'orientation de l'insert ont été vérifiées avec les enzymes AflII et KpnI et les produits de digestion ont été analysés sur un gel d'agarose avec l'appareil fluorimager 595 (Molecular Dynamics, États-Unis). L'insert a été séquencé par le service de séquençage de l'Université McGill.

### 2.1.2 Construction du vecteur pAdCMV5-IRES-GFP (Hsp70 TATA-PS)

Une cassette d'expression contenant la PS sous le contrôle de la boîte TATA du promoteur de la « heat-shock protein 70 » (fragment -49 à +1) (Hsp70 TATA) et avec le site de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGHpolyA), a été construite pour être clonée dans le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP.

Le promoteur Hsp70 TATA a été assemblé en hybridant 2 oligonucléotides. À l'extrémité 5' un site AflII et XbaI ont été créés et à l'extrémité 3' un site AscI a été créé.

Oligonucléotide #1 :

TTAAGTCTAGATCATGGGAGCTGGCGGCCTCATATTTATCTCCGCGAAGCAG  
ATGCCTCGG

Oligonucléotide #2 :

GAGATCTAGTACCCTCGACCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACG  
GAGCCGCGC

L'hybridation s'est faite avec 100 pmol de chaque oligonucléotide. Le mélange a été chauffé à 100<sup>0</sup>C durant 2 minutes et refroidi à la température de la pièce. L'ADN double-brin ainsi généré a été phosphorylé avec la T4 kinase.

Le segment PS-BGHpolyA a été amplifié par PCR avec une amorce 5' contenant un site AscI et avec une amorce 3' contenant un site AflII. Le plasmide utilisé pour le PCR est celui obtenu à la section 2.1.1 et les conditions sont les mêmes que celles décrites précédemment.

Amorce 5' : TTTGGCGCGCCATGGGCTCCAGTGAGCAGGAA

Amorce 3' : TCCTTCTTAAGTCCCCAGCATGCCTG

Le produit de PCR a été digéré avec l'enzyme AscI et purifié sur un gel d'agarose. Le produit de cette digestion a par la suite été ligaturé avec le produit de l'hybridation. Le produit de cette ligation a été digéré avec l'enzyme AflII et purifié sur un gel d'agarose. Finalement, le produit de cette digestion a été ligaturé dans le vecteur pAdCMV5-IRES-GFP qui avait préalablement été digéré AflII, déphosphorylé et purifié sur gel (section 2.1.1). Le produit de ligation a été transformé et la présence de l'insert vérifiée comme décrit précédemment dans la section 2.1.1. L'insert a été séquencé par le service de séquençage de l'Université McGill.

### **2.1.3 La construction du vecteur pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) / avec et sans la séquence codante de *Sim1***

Une cassette d'expression contenant la PS sous le contrôle du promoteur MLP (fragment -217 à +33) et avec le site de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGHpolyA) a été construite en remplaçant le promoteur Hsp70 TATA de la construction obtenue dans la section 2.1.2. Lors de la construction du plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (Hsp70 TATA-PS), des sites XbaI et AscI ont été ajoutés de part et d'autre du promoteur Hsp70 TATA de manière à pouvoir le remplacer facilement.

Le promoteur MLP a été amplifié par PCR avec une amorce 5' possédant un site XbaI et une amorce 3' possédant site AscI. Le plasmide utilisé pour le PCR est pAdBM5 (141) et les conditions sont les mêmes que celles décrites précédemment.

Amorce 5' : TTTTATAGAGATCTGGGTCCTCCTCGTAT

Amorce 3' : GGCGCGCCAGGACGAACGCGCCCCCACCC

Le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (Hsp70 TATA-PS) et le produit de PCR ont été digérés avec les enzymes XbaI et AscI, purifiés sur un gel d'agarose et ligaturé. Le produit de ligation a été transformé et la présence de l'insert vérifiée avec une digestion XbaI et AscI. L'insert a ensuite été séquencé. Ce vecteur a aussi été utilisé pour construire le plasmide de transfert exprimant conjointement la protéine *Sim1* et la GFP par un IRES. Pour ce faire la séquence codante de Sim1 a été clonée dans le site *BglIII* du vecteur.

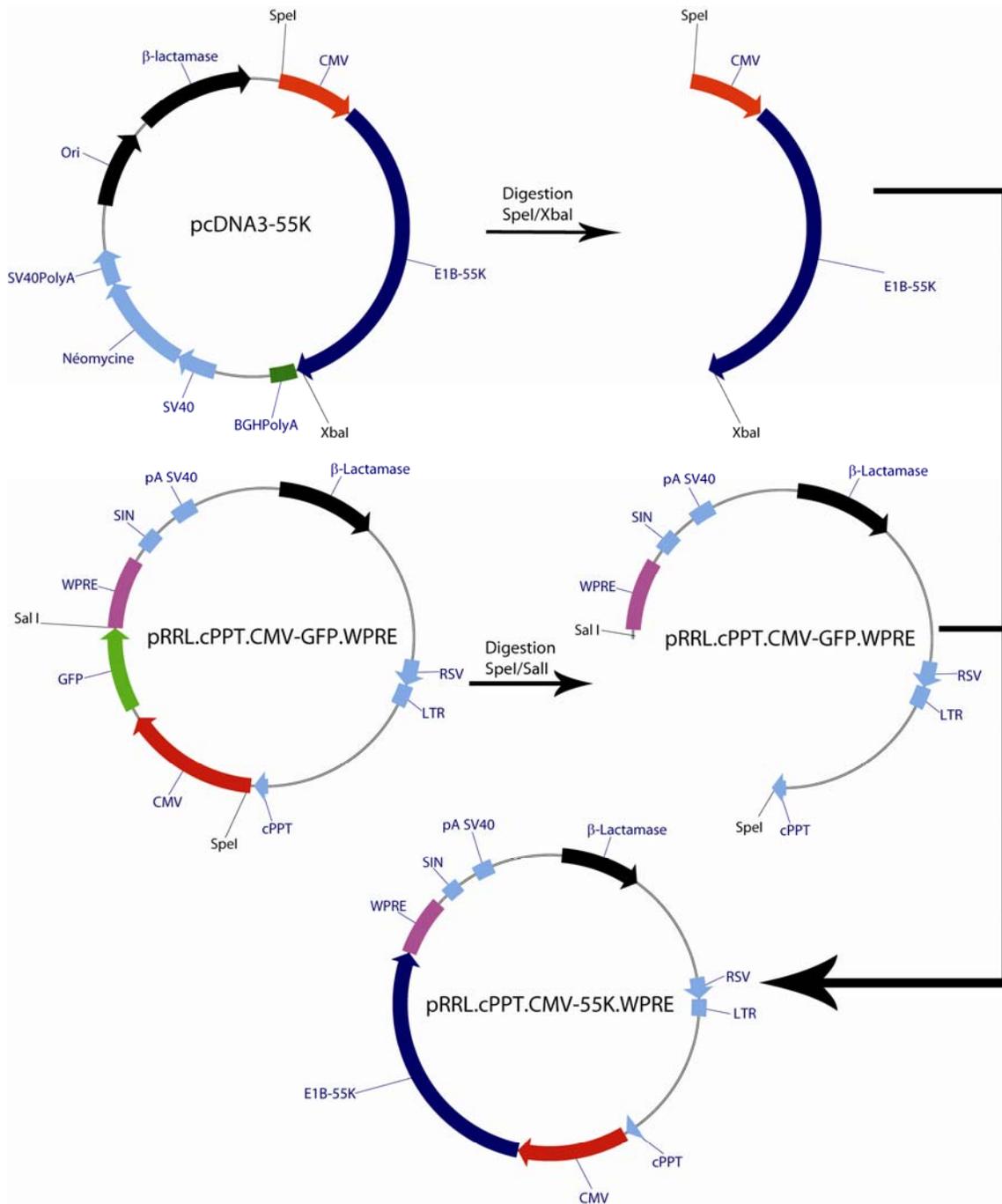
#### **2.1.4 La construction du vecteur pAdCMV5-IRES-dsRED (MLP-PS) / avec et sans l'ARN en épingle à cheveux dirigé contre la protéine *Sim1***

Un vecteur exprimant la protéine de fluorescence rouge (dsRed) a été construit en remplaçant la GFP du plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS). Pour ce faire. Le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) a été digéré avec BamHI pour sortir la séquence correspondante à la GFP. Le vecteur a ensuite été purifié sur un gel d'agarose et les extrémités ont été rendues franches avec la klenow. La dsRed a été obtenue en digérant le vecteur pCMV-DsRed-Express (Clontech, États-Unis) avec les enzymes NheI et NotI. Le fragment correspondant à la dsRed a été purifié sur un gel d'agarose et les extrémités ont été rendues franches avec la klenow. Le produit de ligation a été transformé, la présence et l'orientation de l'insert ont vérifiées avec une digestion PstI et PacI. Ce vecteur a aussi été utilisé pour construire le plasmide de transfert exprimant l'ARN en épingle à cheveux dirigé contre la protéine *Sim1*. Pour ce faire la séquence

codante de l'ARN en l'épingle à cheveu de même que le promoteur H1 de la polymérase III ont été cloné dans le site *AflIII* du vecteur.

## **2.2 Construction du vecteur lentiviral pRRL.cPPT.CMV-55K.WPRE et pRRL.cPPT.CMV-Protease.WPRE**

Un plasmide de transfert lentiviral exprimant la protéine E1B-55K a été construit pour être en mesure de produire un lentivirus recombinant exprimant la protéine E1B-55K. Pour ce faire, le plasmide pcDNA3-55K (cadeau du Dr. Phil Branton, Université McGill) a été digéré avec l'enzyme XbaI et les extrémités rendues franches avec la klenow. Ensuite le même plasmide a été digéré avec SpeI pour sortir le fragment correspondant au CMV/E1B-55K qui a été purifié sur un gel d'agarose. Le plasmide lentiviral pRRL.CPPT.CMV-GFP.WPRE (déjà construit) a été digéré avec l'enzyme Sall et les extrémités ont été rendues franches avec la klenow. Ensuite le même plasmide a été digéré avec SpeI pour faire sortir le fragment correspondant CMV-GFP. Le vecteur a été purifié sur un gel d'agarose. Finalement, le fragment CMV/E1B-55K a été ligaturé dans le vecteur lentiviral, remplaçant ainsi le CMV-GFP (figure 10). Le produit de ligation a été transformé et la présence de l'insert vérifiée avec une digestion Sall et XhoI. Le lentivirus permettant la transduction de la protéase adénovirale a été construit de la même manière.



**Figure 10 : Stratégie de construction du vecteur pRRL.cPPT.CMV-55K.WPRE. Le Fragment CMV-GFP du vecteur pRRL.cPPT.CMV-GFP.WPRE a été remplacé par le segment CMV-55K.**

### 2.3 Production des plasmides

Les plasmides construits ont été produits en ensemençant 200 ml de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma-Aldrich) avec 200 µl d'une culture bactérienne qui a testé positif pour la présence du plasmide recherché. La culture a été incubée durant environ 18 heures à 37<sup>0</sup>C sous agitation constante. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait en utilisant le « Plasmid Maxi kit » (Qiagen). Le plasmide récolté a été dosé par absorbance à 260 nm/280 nm avec le spectrophotomètre Genova (Jenway, Angleterre).

### 2.4 La culture cellulaire

Toutes les cellules sont maintenues en culture dans un incubateur à 37<sup>0</sup>C dans une atmosphère avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules 293 (décrite dans la section 1.7.1) sont cultivées dans le milieu « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM) additionné de 5% de sérum de veau fœtal (HyClone, États-Unis) et de 2mM de L-glutamine (DMEM Complet). Ces cellules sont utilisées pour la production des adénovirus de première génération. Les cellules 293CymR-CMV5-CuO-GFP (148) sont des 293 qui expriment la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible au cumate. Elles sont cultivées de la même manière que les cellules 293. Les cellules 293SF-PacLV (20) sont des cellules 293 transduites de manière stable avec les gènes lentiviraux gag-pol, rev et avec la glycoprotéine du virus de la stomatis vésiculaire. Cette lignée est utilisée pour la production de vecteur lentiviraux et elle est maintenue en culture dans un milieu « Low-Calcium Hybridoma Serum-Free Medium » (LC-HSFM) (Gibco, États-Unis) (33) additionné de 1% de sérum de veau fœtal et de 2 mM de L-glutamine.

Les cellules A549, dérivées de cellules épithéliales d'un adénocarcinome du poumon, sont cultivées de la même manière que les cellules 293. Les cellules BMAdE1 (décrites à la section 1.7.1), de même que leurs sous-clones cultivés en condition adhérente, sont cultivées dans le milieu LC-HSFM additionné de 5% de sérum de veau foetal et de 2 mM de L-glutamine.

Les sous-clones dérivés des BMAdE1 et les 293SF, cultivés en suspension sans sérum, sont maintenus en culture sur un agitateur orbital à 100 rpm dans le milieu LC-HSFM additionné de 2 mM de L-glutamine, de 50 ug/ml de dextran sulfate (Amersham Bioscience) et 0,5% pluronic (Wisent).

L'adaptation des sous-clones de BMAdE1 à la culture en suspension sans sérum s'est faite en deux temps. Premièrement, les clones sélectionnés ont été mis en culture durant deux semaines sur un agitateur orbital à 80 rpm dans un flacon de 125 ml avec 30 ml de milieu LC-HSFM additionné de 5% de sérum de veau foetal et de 2mM de L-glutamine. Une fois cette période écoulée, la vitesse de l'agitateur orbitale a été augmentée à 100 rpm et la concentration de sérum diminuée à 2,5% durant deux autres semaines. Ensuite, la concentration de sérum a été abaissée à 1% pour deux nouvelles semaines et finalement ramenée à 0% en présence de milieu conditionné durant 2 mois. Il est à noter que le milieu sans sérum a été additionné de 50 ug/ml de dextran sulfate 0,5% pluronic pour prévenir l'agrégation des cellules. Tout au long du processus, les cellules ont été maintenues à une densité entre  $5 \times 10^5$  et  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml.

Les comptes cellulaires pour les courbes de croissance ont été effectués en triplicata avec un hémacytomètre (Hausser Scientific, États-Unis) et la viabilité des cellules a été déterminée par une coloration d'exclusion avec l'érythrosine B (Sigma-Aldrich).

## 2.5 Transfection

Sauf indication contraire, les transfections décrites sont toujours faites sur  $1 \times 10^6$  cellules dans une plaque 6 puits en utilisant le réactif Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Brièvement, 4  $\mu\text{g}$  de plasmide est mélangé à 250  $\mu\text{l}$  de DMEM et 10  $\mu\text{l}$  de lipofectamine 2000 est mélangé à 250  $\mu\text{l}$  de DMEM complet. Après une incubation de cinq minutes, l'ADN est mélangé à la lipofectamine et incubé 20 minutes. Le mélange est ensuite ajouté sur les cellules qui sont maintenues en culture dans 2 ml de DMEM complet.

## 2.6 Quantification des adénovirus infectieux par « essai de plages de lyse »

La journée avant le titrage,  $3 \times 10^5$  cellules 293 sontensemencées dans une plaque 6 puits dans 1 ml de milieu. Le jour suivant, chaque puits est infecté avec 1 ml de dilutions en série ( $10^{-4}$  à  $10^{-10}$ ) du virus durant 18 heures. Chaque dilution est faite en triplicata. Par la suite, le milieu contenant le virus est retiré et remplacé par 3 ml de milieu DMEM complet contenant 1% "Seaplaque GTG Agarose" (Cambrex Bioscience, États-Unis). Trois semaines plus tard, les plages de lyse sont comptées dans les puits contenant entre 20 et 60 plages de lyse. La concentration, en particules infectieuses produites par cellule, est obtenue avec la formule suivante :

(Nombre de plages x le volume de la production virale) / (le nombre de cellules infectées lors de la production x la dilution comptée) = particules infectieuses / cellule

## 2.7 Quantification des adénovirus physiques par HPLC

Le virus est centrifugé et passé dans un filtre de 45  $\mu\text{m}$  (Millipore, États-Unis) pour le débarrasser l'échantillon de tout débris cellulaire. Par la suite, 25  $\mu\text{l}$  de l'échantillon est dosé par HPLC selon la méthode décrite par Klyushnichenko et coll.

(111). Brièvement, le HPCL (Hewlett-Packard 1090 HPLC system, États-Unis) passe l'échantillon sur une colonne UNO Q (Bio-Rad, États-Unis) et l'adénovirus est élué avec une solution 50 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7,5). Un système de photo-diode à la sortie de l'appareil mesure l'absorbance à 260 nm/280 nm, La concentration, en particules physiques par ml, est déterminée en comparant avec un standard d'adénovirus type-5 (ATCC, États-Unis). Ce matériel sert de référence lors de la quantification des échantillons sur HPLC. L'utilisation d'un standard unique permet une normalisation des résultats qui peuvent être plus aisément comparés. Le nombre de particules physiques produites par cellule est déterminé avec la formule suivante :

(Nombre de particules physique par ml x le volume de la production virale) / (le nombre de cellules infectées lors de la production) = particules physiques / cellule

## **2.8 Photographies**

Les photographies ont été prises avec une caméra Q-imaging Retiga 2000 (Optical Analysis Corporation, États-Unis), un microscope à fluorescence (Leica DMIL, Allemagne) et le logiciel OpenLab (Improvision, États-Unis).

## **2.9 Cytofluorométrie en Flux**

Les résultats de cytofluorométrie de flux ont été obtenus à l'aide d'un « Coulter EPICS™ XL flowcytometer » (Beckman-Coulter, États-Unis) équipé d'un laser à l'argon de 15mW. La GFP est détectée à la longueur d'onde 525 nm et la dsRed à la longueur d'onde 550 nm.

### **2.10 Production d'adénovirus recombinants par infection/transfection (sélection positive)**

La journée avant l'infection transfection,  $5 \times 10^5$  cellules 293 sontensemencées dans une plaque 6 puits dans 2 ml de DMEM complet. Le jour suivant, le milieu est retiré et les cellules sont infectées avec un Ad $\Delta$ PS (164) à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,3 dans 0,5 ml de milieu DMEM complet. Cinq heures après l'infection, le milieu est retiré et remplacé avec 2 ml de DMEM complet. Ensuite, 4  $\mu$ g de vecteur de transfert, linéarisé avec l'enzyme PacI et purifié au phénol/chloroforme, est transfecté avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Après 3 jours, le virus est récolté par trois cycles de gel/dégel.

### **2.11 Amplification des virus obtenus par sélection positive**

La journée avant l'amplification,  $5 \times 10^5$  cellules 293 sontensemencées dans une plaque 6 puits dans 2 ml de DMEM complet. La journée suivante, le milieu est retiré et remplacé par 1 ml de virus obtenu par sélection positive avec les plasmides de transfert pAdCMV5-IRES-GFP ( tk TATA-PS), pAdCMV5-IRES-GFP ( Hsp70 TATA-PS) et pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) (décrit dans la section 2.1). Six heures après l'infection, le virus est retiré, les cellules lavées avec 5 ml de PBS et 2 ml de milieu DMEM complet sont ajoutés. Lorsque toutes les cellules montrent un effet cytopathique, le virus est récolté par trois cycles de gel-dégel et sa concentration déterminée par un « essai de plages de lyse ».

### **2.12 Évaluation de la diversité produite par sélection positive lors de l'infection/transfection**

La journée précédant l'expérience, des dilutions en série de cellules 293 sontensemencées dans une plaque de 96 puits dans 100  $\mu$ l de DMEM complet. Pour chacune des dilutions (5000 cellules, 2500 cellules, 625 cellules, 312 cellules, 150

cellules, 75 cellules, 35 cellules), 10 puits sontensemencés. Le jour suivant, les cellules sont infectées avec 50  $\mu$ l d'un Ad $\Delta$ PS à une MOI de 0,3. Cinq heures après l'infection, les cellules sont transfectées au calcium-phosphate avec les plasmides linéarisés et purifiés au phénol/chloroforme. Les plasmides utilisés sont pAdCMV5-IRES-GFP (tk TATA-PS), pAdCMV5-IRES-GFP (Hsp70 TATA-PS), pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) (décrits dans la section 2.1) et pAdTR6-PS-IRES-GFP (45). Brièvement, la transfection au calcium phosphate a été réalisée en mélangeant 169  $\mu$ l d'eau à 5  $\mu$ l d'une solution de CaCl<sub>2</sub> 2M. À ce mélange, 6  $\mu$ g de plasmide (50  $\mu$ l) a été ajouté goutte à goutte et un 26  $\mu$ l additionnel de CaCl<sub>2</sub> 2 M a été ajouté. Dans un second tube, on a mis 250  $\mu$ l de solution HBS 2X (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES, pH 7.5). La préparation d'ADN est ajoutée goutte à goutte en faisant des bulles au tube contenant la solution d'HBS 2X pour ensuite être incubée 10 minutes. Le volume du précipité d'ADN est ensuite complété à 2,5 ml avec du DMEM complet et 25  $\mu$ l est utilisé pour transfecter chaque puits. Après cinq jours, le virus est récolté avec un cycle de gel-dégel.

La détection des virus recombinants se fait en ensemençant 5 000 cellules dans une plaque 96 puits dans 100  $\mu$ l de DMEM complet. Ensuite 70  $\mu$ l de production virale provenant chacun des puits de la plaque soumise au gel-dégel est ajoutés dans les puits de la nouvelle plaque. Tous les virus recombinants produits exprimant la GFP, 14 jours après l'infection il est possible de déterminer si pour une dilution cellulaire précise, il y a eu production d'adénovirus recombinants lors de l'infection/transfection en vérifiant la présence de cellules vertes. Conformément à la loi de distribution de poisson, on considère qu'une dilution cellulaire donnée est en mesure de générer un adénovirus recombinant si au moins une cellule verte est observable dans 6 des 10 puits.

### **2.13 Visualisation de l'effet cytopathique causé par la transcomplémentation**

La transcomplémentation est la complémentation de l'Ad $\Delta$ PS par la protéase exprimée à partir du plasmide de transfert sans qu'il y ait au pour autant de recombinaison (expliqué dans la section 1.5.2). Pour visualiser l'importance de ce phénomène, la journée avant l'infection,  $5 \times 10^5$  cellules 293 sont ensemencées dans une plaque 6 puits dans 2 ml de milieu DMEM complet. Le jour suivant, le milieu est retiré et les cellules sont infectées dans 1 ml de DMEM complet à une MOI de 0,1 avec le virus produit par infection/transfection avec les plasmides pAdCMV5-IRES-GFP (tk TATA-PS), pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) (décrit dans la section 2.1), pAdTR5-PS-IRES-GFP (45) et pAdTR6-PS-IRES-GFP (45). Cinq heures après l'infection, le milieu contenant le virus est retiré et remplacé avec 2 ml de milieu DMEM complet. Finalement, 48 heures après l'infection les cellules sont photographiées (tel que décrit dans la section 2.9) pour vérifier si l'effet cytopathique est supérieur à la MOI de 0,1 utilisée pour l'infection. Tout effet cytopathique supérieur peut-être attribué à la présence du virus parental produit par transcomplémentation\*.

\* La concentration des virus est évaluée sur des cellules 293 par un « essai de plages de lyse ». Donc le virus parental, délété de sa protéase, ne peut pas produire de plages de lyse.

### **2.14 Évaluation quantitative de l'effet de transcomplémentation**

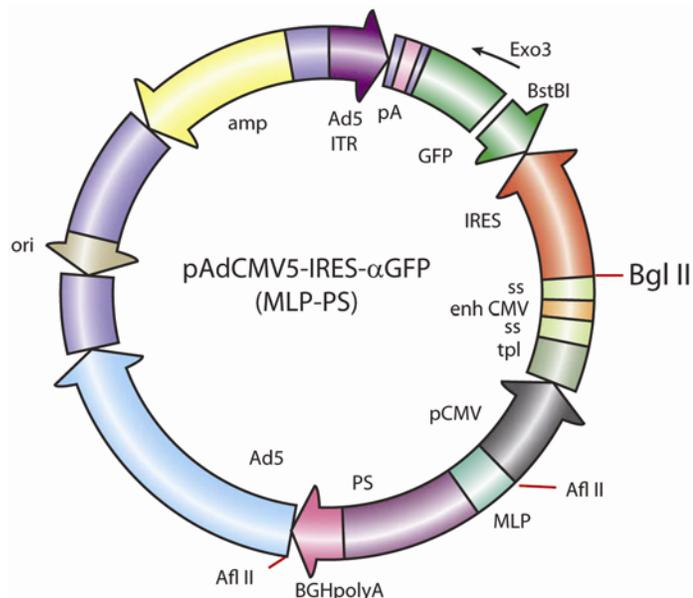
Un adénovirus recombinant est construit par sélection positive de la manière décrite dans la section 2.11. Le plasmide utilisé pour cette expérience est le pAdCMV5-IRES-dsRED (MLP-PS) alors que l'Ad $\Delta$ PS utilisé possède une GFP cloné dans la région E4 (virus déjà construit dans notre laboratoire). L'infection/transfection est réalisée avec six MOI différentes (3/1/0,3/0,1/0,03/0,01). L'adénovirus recombinant ainsi généré exprimera la dsRed dans la région E1 et la GFP dans la région E4. Par

conséquent, les cellules infectées par ce virus seront à la fois vertes et rouges alors que l'infection par le virus parental produira des cellules vertes.

Les virus sont récoltés par trois cycles de gel-dégel et, pour chaque MOI utilisée, la concentration du virus produit est déterminée par un « essai de plages de lyse ». La contamination par le virus parental est déterminée en infectant  $1 \times 10^6$  cellules 293 avec une MOI de 0,1. 48 heures après l'infection, les cellules sont récoltées, fixées dans 2% de paraformaldéhyde et analysées par cytofluorométrie en flux pour vérifier leur expression de GFP et dsRed. Les cellules qui expriment la dsRed et la GFP sont considérées comme étant infectées par le virus recombinant et les cellules n'exprimant que la GFP sont considérées comme infectées par le virus parental produit par transcomplémentation. Le ratio entre  $dsRed^+/GFP^+$  et  $dsRed^-/GFP^+$  nous donne le pourcentage de contamination du virus parental.

### **2.15 Création de la librairie anti-sens contre la GFP**

Le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) (décrit dans la section 2.1.4) a été digéré avec BamHI pour sortir la séquence codante pour la GFP. L'insert et le vecteur ont été purifiés simultanément au phénol/chloroforme et ligaturés. Le produit de ligation a été transformé comme décrit à la section 2.1.1 et l'orientation de l'insert a été déterminée avec une digestion HpaI et PacI pour trouver un plasmide où la GFP a été clonée en orientation antisens. Cette construction a été digérée avec l'enzyme BstBI et une librairie de délétion antisens a été générée avec la trousse « Erase-a-Base » (Promega, États-Unis) (figure 11).



**Figure 11 : Plasmide utilisé pour la construction de la librairie anti-GFP. Plasmide dans lequel la GFP a été re-clonée en orientation antisens. La digestion BstBI permet de donner un substrat à l'enzyme ExoIII, utilisée dans la trousse « Erase-a-Base » pour faire les délétions partielles.**

Brièvement, 5 µg de plasmide digéré avec BstBI a été mis en présence de l'enzyme ExoIII durant 210 secondes, des aliquots sont prélevés toutes les 30 secondes. Les différentes digestions sont par la suite poolées, traitées à la nucléase S1 pour créer des extrémités franches et les plasmides recircularisés avec la T4 ligase. Cette librairie de plasmide a ensuite été utilisée pour créer la librairie adénovirale selon la méthode d'infection/transfection décrite à la section 2.11.

La sélection des adénovirus recombinants de la librairie a été faite en générant des plages de lyse sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose dans un pétri de 100 mm. Pour le faire, la journée avant l'infection  $3 \times 10^6$  cellules ont étéensemencées dans un pétri de 100 mm dans 10 ml de DMEM complet. Le jour suivant, le milieu a été retiré et les cellules ont été infectées avec la librairie adénovirale durant 5 heures diluées 100 fois de manière à avoir environ 50 plages de lyse par pétri. En tout, 5 pétris ont été infectés. Le virus a ensuite été retiré et 10 ml de milieu DMEM complet contenant 1% "Seaplaque GTG Agarose" (Cambrex Bioscience). Deux semaines plus tard, 192 plages

de lyse ont été récoltées et éluées dans 1 ml de milieu DMEM complet dans une plaque 24 puits. Chacun des 192 clones a par la suite été amplifié en infectant  $1 \times 10^5$  cellules 293 dans une plaque 24 puits avec 1 ml d'éluotion virale.

### **2.16 Criblage préliminaire de la librairie anti-sens**

Le criblage préliminaire s'est fait en utilisant la lignée cellulaire 293CymR-CMV5-CuO-GFP (148). Ces cellules expriment de manière stable la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible au cumate. La journée avant l'infection, 5 000 cellules sontensemencées dans une plaque de 96 puits dans 100  $\mu$ l de milieu DMEM complet. Le jour suivant, les cellules sont infectées avec 5  $\mu$ l de l'un des 192 clones viraux amplifiés, à cette étape on assume que tous les clones ont une concentration similaire. 18 heures après l'infection, la GFP est induite par l'ajout de 50  $\mu$ l de cumate (Sigma-Aldrich) pour avoir une concentration finale de 200  $\mu$ g/ml. Vingt-quatre heures plus tard, l'intensité de la GFP est mesurée dans un lecteur multiplaque cytofluor (PerSeptive Biosystems, États-Unis).

### **2.17 Analyse quantitative des anti-sens**

Pour une analyse plus précise des propriétés antisens, 9 clones ont été sélectionnés à partir du criblage préliminaire et la concentration déterminée par un « essai de plages de lyse ».

La première analyse a été faite dans les cellules 293CymR-CMV5-CuO-GFP (148). La journée précédant l'infection,  $5 \times 10^5$  cellules ont étéensemencées dans une plaque 6 puits dans 2 ml de DMEM complet. Le jour suivant, les cellules ont été infectées avec les clones viraux sélectionnés à une MOI de 5 dans 1 ml de DMEM complet. Dix-huit heures plus tard, le virus a été retiré et 2 ml de DMEM complet

additionnés de 200 µg/ml de cumate pour induire l'expression de la GFP. Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules sont récoltées, fixées dans 2% de paraformaldéhyde et analysées par cytofluorométrie en flux pour vérifier l'expression de GFP. En plus des clones, un contrôle non infecté, un contrôle infecté avec un virus  $\Delta E1\Delta E3$  et un contrôle infecté avec un virus portant un antisens « pleine longueur » ont été ajoutés à l'expérience qui a été faite en triplicata.

La deuxième analyse a été faite dans des cellules A549, ces dernières ne permettant pas la réplication de l'adénovirus on peut donc contrôler de manière précise le nombre de copies du gène sens et antisens. La journée avant l'infection,  $5 \times 10^5$  cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits dans 2 ml de milieu DMEM complet. Le lendemain, le milieu a été retiré et les cellules ont été infectées dans 1 ml avec une MOI de 1000, 500, 250, 125, 62, 30, 15 ou 0 avec le clone antisens 109, un virus vide  $\Delta E1\Delta E3$  et un virus portant un antisens « pleine longueur ». Dix-huit heures après l'infection, le virus est retiré et les cellules sont infectées avec un adénovirus exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur CMV5 (déjà construit) à une MOI de 200 dans 1 ml de DMEM complet. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont récoltées, fixées dans 2% de paraformaldéhyde et analysées par cytofluorométrie en flux pour vérifier l'expression de GFP. L'expérience a été faite en triplicata.

## **2.18 Séquencage des anti-sens**

En vue d'obtenir la séquence des différents antisens présents dans notre librairie, l'ADN viral de différent clone a été extrait avec la méthode HIRT (93, 220). La journée avant l'infection  $5 \times 10^5$  cellules ont étéensemencées dans une plaque 6 puits dans 2 ml de DMEM complet. La journée suivante, les cellules ont été infectées avec une MOI de 5 avec les clones viraux dont on désirait extraire l'ADN. Trois jours plus tard, les cellules ont été récoltées avec une centrifugation de trois minutes à 3 000 rpm. Le culot a été resuspendu dans 500 µl de PBS et le tampon de lyse ajouté (0,6% SDS, 10

mM EDTA, 200 µg/ml protéinase K). Après une incubation de 3 heures, l'ADN génomique a été précipité en ajoutant une solution de NaCl pour avoir une concentration finale de 1M. Après 2 heures d'incubation sur glace, une centrifugation de cinq minutes à 13 000 rpm a permis de sédimenter l'ADN génomique. Le surnageant contenant l'ADN viral a été récolté et l'ADN s'y trouvant purifié par une extraction phénol/chloroforme. Les antisens sont ensuite séquencés.

### **2.19 Immunobuvardage de type Western**

Les cellules utilisées pour les différents Immunobuvardage de type western ont été récoltées et lavées deux fois dans 5 ml de PBS. Le culot a ensuite été resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse Laemmli (10 mM Tris- HCl, pH 7,4, + 150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0,25% SDS, 1 mM EDTA). Le lysat cellulaire a ensuite été soniqué (Heat system ultrasonic, États-Unis) pour éliminer la viscosité du lysat en fragmentant l'ADN de haut poids moléculaire. Les protéines ont été dosées en utilisant la trousse « Bio-Rad Dc Ki » (Hercules, États-Unis). L'absorbance a été mesurée en utilisant le lecteur de micro plaques MR 5000 (Dynatech, États-Unis) à une longueur d'onde de 590 nm. La concentration des protéines a été obtenue en comparant l'absorbance des lysats à une courbe standard de BSA. Les échantillons ont été dilués un tampon Laemmli réducteur (120 mM Tris- HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glycérol, 10% mercaptoethanol, 0,01% bleu de bromophenol) pour avoir une concentration finale de 25 µg de protéines dans 20 µl. Les protéines ont ensuite été dénaturées en chauffant à 95°C durant 3 minutes. Par la suite, les échantillons ont été chargés sur un gel d'électrophorèse sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) 12% « acrylamide Tris- glycine gel » (NOVEX) et la migration a été effectuée à 125 volts durant 3 heures dans le tampon d'électrophorèse (15g/l Tris, 72g/l glycine, 5g/l SDS). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose « Trans- Blot membrane » (Bio-Rad Laboratories) en utilisant « Trans-Blot SD cell » (Bio-Rad). Le transfert a été fait à 25 volts durant 30 minutes dans le tampon Bjerrum & Schafer-Nielson (48 mM Tris, 39 mM glycine, 1,3

mM SDS, 20% méthanol, pH 9,2). La membrane a été bloquée durant 18 heures à 4<sup>0</sup>C dans une solution de PBS-T (PBS, 0,1% de Tween20) avec 5% de lait. La membrane a ensuite été lavée deux fois avec 5 ml de PBS-T.

Pour les immunobuvardages contre la PS, 1x10<sup>6</sup> cellules 293 ont été infectés à une MOI de 5 pendant 48 heures pour ensuite être récoltées. L'anticorps de lapin anti-PS (222), a été incubé 18 heures avec la membrane à 4<sup>0</sup>C avec une dilution de 1/20 000 dans du PBS-T. Ensuite, la membrane a été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T, puis incubée une heure avec agitation à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin (Amersham Bioscience) dilué 1/10 000 dans du PBS-T. La membrane a par la suite été lavée cinq fois 15 minutes avec 10 ml de PBS-T.

Pour les immunobuvardages utilisant l'anticorps de lapin anti-E1B55K et anti-E1B19K (cadeau du Dr. Phil Branton, Université McGill), la membrane a été incubée 1 heure avec agitation à 4<sup>0</sup>C avec une dilution de 1/3 000 dans du PBS-T. La membrane a ensuite été lavée et incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin comme décrit précédemment.

Pour les immunobuvardages utilisant l'anticorps de lapin anti-E1B19K (cadeau du Dr. Phil Branton, Université McGill), la membrane a été incubée 1 heure avec agitation à 4<sup>0</sup>C avec une dilution de 1/2 000 dans du PBS-T. La membrane a ensuite été lavée et incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin comme décrit précédemment.

Pour les immunobuvardages utilisant l'anticorps de souris anti-actine (MP Biomedicals, États-Unis), la membrane a été incubée 1 heure avec agitation à 4<sup>0</sup>C avec une dilution de 1/30 000 dans du PBS-T. Ensuite, la membrane a été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T, puis incubée une heure avec agitation à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-souris (Amersham Bioscience) dilué 1/10 000 dans du PBS-T. La membrane a par la suite été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T.

Pour les immunobuvardages utilisant l'anticorps de souris anti-Hsp70 (Stressgen, Canada), la membrane a été incubée 1 heure avec agitation à 4<sup>0</sup>C à une dilution de 1/2 000 dans du PBS-T. Ensuite, la membrane a été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T, puis incubée une heure avec agitation à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin (Amersham Bioscience) dilué 1/10 000 dans du PBS-T. La membrane a par la suite été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T.

Pour les immunobuvardages utilisant l'anticorps de souris anti-GFP (Roche, États-Unis), la membrane a été incubée 1 heure avec agitation à 4<sup>0</sup>C à une dilution de 1/5 000 dans du PBS-T. Ensuite, la membrane a été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T, puis incubée une heure avec agitation à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-souris (Amersham Bioscience) dilué 1/10 000 dans du PBS-T. La membrane a par la suite été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T.

Pour les immunobuvardages utilisant l'anticorps de chèvre anti-Sim1 (Santa Cruz Biotechnology, États-Unis), la membrane a été incubée 1 heure avec agitation à 4<sup>0</sup>C à une dilution de 1/10 000 dans du PBS-T. Ensuite, la membrane a été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T, puis incubée une heure avec agitation à température pièce avec l'anticorps secondaire anti-chèvre (Amersham Bioscience) dilué 1/10 000 dans du PBS-T. La membrane a par la suite été lavée cinq fois pendant 15 minutes avec 10 ml de PBS-T.

Les membranes ont été révélées en utilisant la trousse « ECL chimioluminescent detection » (Amersham Bioscience) et les films Kodak BIOMAX MR (Eastem Kodak Rochester, États-Unis) ont été utilisés pour enregistrer le signal.

## **2.20 Production du lentivirus recombinant exprimant E1B-55K**

Le vecteur lentiviral est produit en transfectant le plasmide pRRL.cPPT.CMV-55K.WPRE (décrit à la section 2.2) dans la lignée de production 293SF-PacLV (20). La

journée avant la transfection,  $10 \times 10^6$  cellules sontensemencées dans un pétri de 150 mm dans 30 ml de LC-HSFM additionnés de 1% de sérum de veau fœtal (HyClone) et de 2mM de L-glutamine. Le jour suivant, 1 heure avant la transfection, le milieu est retiré et 18 ml de milieu frais sont ajoutés. La transfection du plasmide est réalisée en utilisant polyéthylèneimine linéaire 25kDa (Sigma-Aldrich) (PEI):

40 µg de plasmide	} Incubé 10 minutes et ajouté sur les cellules
1,5 ml de LC-HSFM	
100 µg de PEI	

Après 4 heures, le milieu est changé pour 25 ml de LC-HSFM additionnés de 1% de sérum de veau fœtal, de 2mM de L-glutamine, 1 µg/ml doxycycline (Sigma-Aldrich) et 100 ug/ml de cumate. Le milieu contenant le vecteur lentiviral est récolté après 48 heures et passé sur un filtre de 45 µm (Millipore) pour éliminer les débris cellulaires.

## 2.21 Transduction et clonage des cellules BMAdE1

Le jour précédant la transduction, 3 puits d'une plaque de 24 puits sontensemencés avec  $4 \times 10^4$  cellules BMAdE1 (décrite à la section 1.7.1) dans 500 µl de LC-HSFM additionné de 5% de sérum de veau fœtal et de 2 mM de L-glutamine. Le jour suivant, le vecteur lentiviral est préparé pour la transduction de la manière suivante :

1,2 ml du milieu contenant le lentivirus E1B-55K	} Incubé 30 minutes à 37 °C
60 µl de sérum de veau fœtal (HyClone, États-Unis)	
6 µg/µl de polybrene (Sigma-Aldrich, États-Unis)	

Le milieu est aspiré de la plaque 24 puits et 200 µl de préparation lentiviral est ajoutée et incubée durant 18 heures. Ce processus est répété 2 autres fois.

Après les 3 rondes de transduction, les cellules BMAdE1 sont poolées dans un pétri de 60 mm dans 5 ml de milieu LC-HSFM additionné de 5% de sérum de veau fœtal et de 2mM de L-glutamine pour qu'un micromanipulateur (Quixell-FP System, États-Unis) puisse faire la sélection des clones. Quarante-huit clones ont été sélectionnés et ensemencés dans une plaque 96 puits selon les conditions de culture habituelle. Par la suite, les clones viables ont été amplifiés et maintenus en culture pour les manipulations visant à les caractériser.

## **2.22 Production adénovirale dans les clones BMAdE1 transduits avec E1B-55K**

La journée avant l'infection, les clones sélectionnés ont été ensemencés à  $5 \times 10^5$  cellules dans une plaque 6 puits dans 2 ml de LC-HSFM additionnés de 5% de sérum de veau fœtal et de 2mM de L-glutamine. Le jour suivant les cellules sont comptées et infectées à une MOI de 5 avec un Ad $\Delta$ E1 $\Delta$ E3, Ad dl309 ou un adénovirus exprimant le FasL (119). L'infection se fait durant 4 heures dans 1 ml de milieu. Une fois l'infection complétée, le virus est retiré, les cellules lavées avec 5 ml de PBS et 2 ml de milieu frais sont ajoutés. Trois jours plus tard, le virus est récolté par 3 cycles de gel/dégel et la concentration est déterminée par un « essai de plages de lyse » et HPLC.

## **2.23 Détection de la séquence WPRE dans les clones sélectionnés**

Pour vérifier que les clones ont bien été transduits avec le lentivirus E1B-55K, leur ADN génomique a été extrait et la présence de la séquence lentivirale WPRE a été détectée par PCR. L'extraction a été faite avec la trousse « DNeasy tissue kit » (Qiagen), le PCR visant à amplifier le WPRE a été fait avec 300 ng d'ADN génomique. Les amorces utilisées sont :

Amorce 5' : TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAG

Amorce 3' : AAGGGACGTAGCAGAAGGAC

Le PCR a été effectué en utilisant la trousse « PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads » avec les paramètres suivants :

- 1- 5 minutes à 95°C
  - 2- 60 secondes à 95°C
  - 3- 60 secondes à 55°C
  - 4- 90 secondes à 72°C
  - 5- 7 minutes à 72°C
  - 6- ∞ à 4°C
- } Répété 40 fois

Le produit de PCR correspondant au WPRE (470 pb) a été visualisé sur un gel d'agarose 0,8% et analysé avec l'appareil fluorimager 595 (Molecular Dynamics).

## **2.24 Production adénovirale dans les clones adaptés à la culture en suspension sans sérum**

La journée avant l'infection,  $15 \times 10^6$  cellules ont étéensemencées dans un flacon de 125 ml dans 30 ml de milieu LC-HSFM additionné de 2mM de L-glutamine et de 50 ug/ml de dextran sulphate pour les clones cultivés sans sérum et avec 5% de sérum de veau fœtal pour les clones cultivés avec sérum. Le jour suivant les cellules sont centrifugées à 1 000 rpm pendant 5 minutes et resuspendues dans 3 ml de milieu et infectées avec le virus Ad $\Delta$ E1 $\Delta$ E3 à une MOI de 10. Quatre heures après l'infection, les cellules sont lavées avec 10 ml de PBS et resuspendues dans 30 ml de milieu. Trois jours plus tard, le virus est récolté avec un cycle gel/dégel et le titrage est réalisé par HPLC.

# **Section 3 :**

## **Résultats**

### **3.1 Librairies adénovirales générées par sélection positive**

L'adénovirus est un outil de choix pour décoder le fonctionnement de différents processus cellulaires. Par contre, la production d'adénovirus recombinants reste une tâche laborieuse qui limite son utilisation. Clairement, une méthode alternative pour la production d'adénovirus recombinants est nécessaire pour satisfaire les besoins toujours croissants de la communauté scientifique.

#### **3.1.1 Construction des vecteurs de transfert permettant l'expression ectopique de la PS**

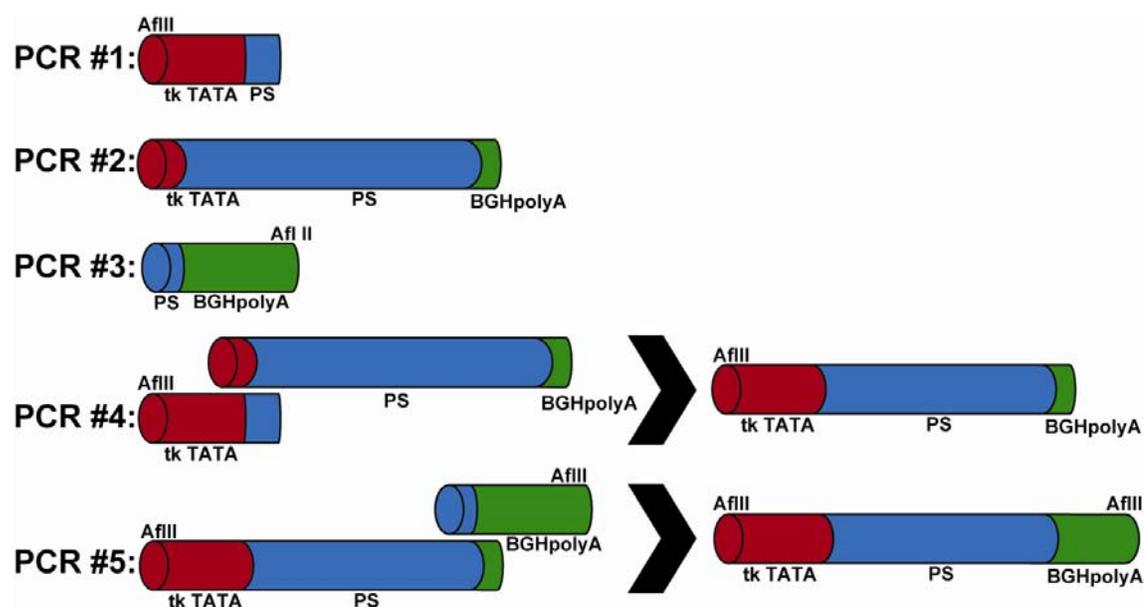
Notre groupe a déjà prouvé qu'il était possible de construire un adénovirus recombinant par sélection positive via une expression ectopique du gène de la PS. Par contre, le système développé pour démontrer la viabilité de ce concept nécessite deux améliorations si l'on veut rendre le système fonctionnel. Premièrement, les travaux précédents ont été réalisés avec un vecteur où l'expression de la PS et du transgène était réalisée à partir du même promoteur grâce à un site d'entrée ribosomal (IRES). L'utilisation d'un même promoteur pour exprimer la PS et le transgène limite grandement la versatilité du système, car elle ne permet pas de faire une optimisation indépendante de l'expression de la PS et du transgène à exprimer. Il a donc fallu reconstruire une cassette d'expression où l'expression de la PS et du transgène était réalisée à partir de 2 cassettes d'expression distinctes. Dans cette configuration il est possible, par exemple, d'exprimer un transgène toxique avec un promoteur inductible tout en ayant une expression optimale et constitutive de la PS. Deuxièmement, il est aussi nécessaire de procéder à l'optimisation de l'expression de la PS, pour être en mesure d'augmenter la diversité de la librairie qui ne s'élève qu'à 1 événement de recombinaison par 1 000 cellules avec la première version du vecteur. Nous avons émis l'hypothèse qu'une expression trop forte de la PS par le plasmide de transfert peut entraîner une transcomplémentation du virus parental qui peut nuire à la diversité. Dans la publication de la preuve de principe (45), la PS était exprimée à partir de promoteurs

relativement puissants : TR5 et TR6. Notre objectif a donc été de construire des plasmides de transfert où la PS était sous le contrôle de promoteurs plus faibles que ceux utilisés précédemment en espérant ainsi diminuer l'importance de la transcomplémentation.

Le promoteur TR5, utilisé dans les travaux précédents pour exprimer PS a été modifié pour être inductible à la tétracycline. De ce promoteur on a dérivé le promoteur TR6, dans lequel la boîte TATA du promoteur CMV a été remplacée par la boîte TATA du promoteur de la thymidine kinase. Il est à noter que ces 2 promoteurs n'étaient pas complètement « étanches », même en condition de non-induction, ils produisaient assez de PS pour permettre la réplication du virus (45). Dans ces deux constructions, l'expression du transgène dépendait de l'expression de la PS ce qui rendait impossible l'utilisation d'un promoteur inductible ne permettant pas une expression suffisante de la PS en condition non-inductible. Cette dépendance entre l'expression de la PS et du transgène limite la versatilité du système en rendant impossible l'utilisation de promoteurs inductibles « étanches », qui sont nécessaires pour la construction de vecteurs adénoviraux exprimant un transgène toxique pour la réplication de l'adénovirus. Trois nouveaux vecteurs de transfert, utilisant chacun un promoteur différent pour l'expression de la PS, ont été construits pour être clonés dans le vecteur de transfert de manière à permettre une expression indépendante du transgène. Comme point de départ, nous avons utilisé le promoteur minimal de la thymidine kinase (tk TATA). Ce promoteur extrêmement faible devrait être moins puissant que le promoteur TR6 en condition non-induite. Mais en minimisant l'expression de la PS, il se peut que le virus recombinant n'exprime plus assez de PS pour avoir un cycle de réplication efficace. C'est pourquoi deux autres cassettes d'expression, avec des promoteurs plus puissants que tk TATA, ont été construites. Le promoteur MLP de l'adénovirus, de même que le promoteur de la boîte TATA de la « heat-shock protein 70 » (Hsp70 TATA), ont été utilisés à cet effet. Dans le contexte d'une infection adénovirale, le promoteur MLP permettra une expression soutenue, mais seulement dans la phase tardive. On présume que le promoteur Hsp70 TATA aura une force intermédiaire entre tk TATA et MLP. Avec cet éventail de promoteurs, on espère trouver celui qui

permettra de diminuer la transcomplémentation tout en permettant une réplication normale du virus recombinant. Au promoteur et à la PS, on a ajouté le site de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine à nos cassettes d'expression, ce qui permet une expression complètement indépendante de la PS.

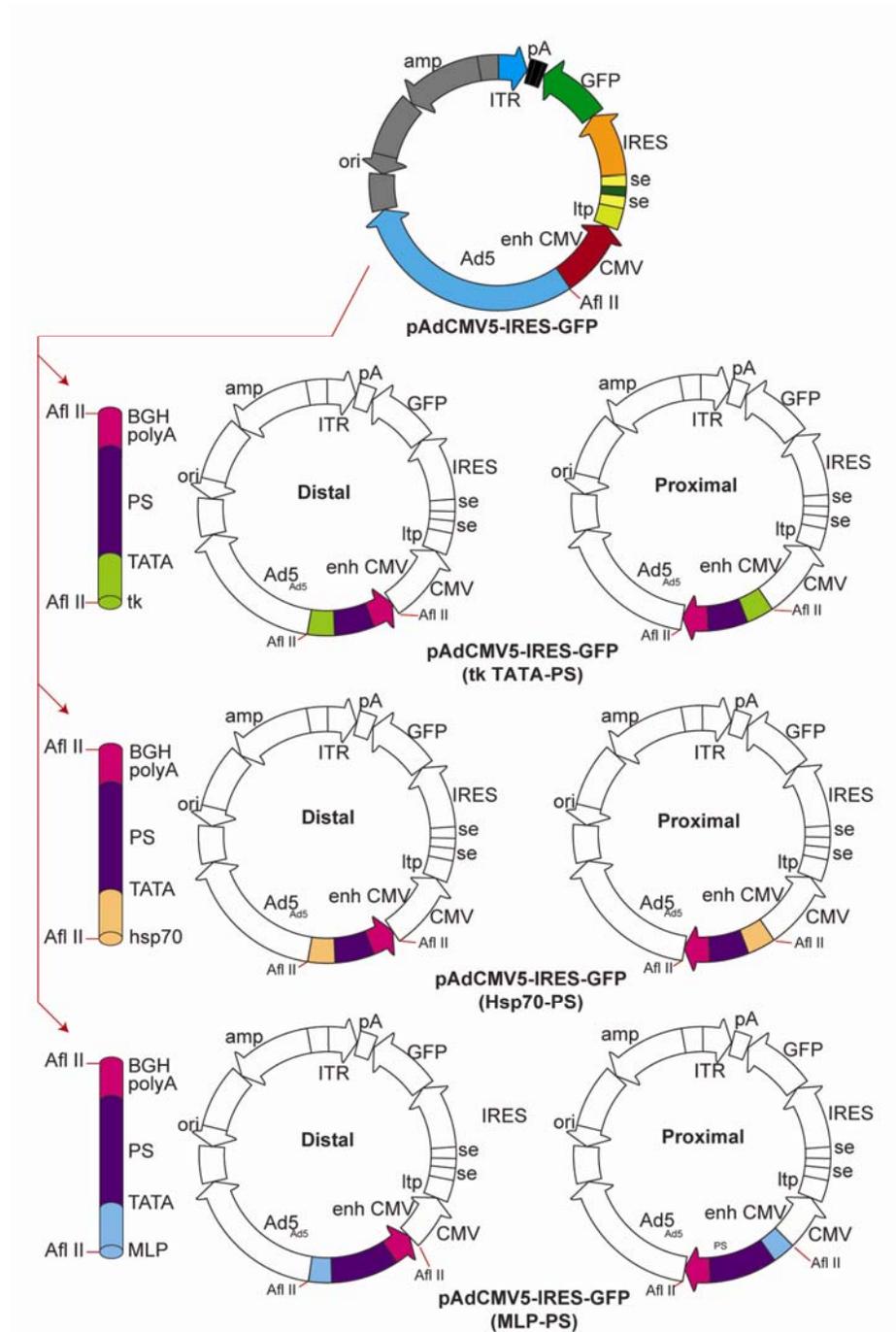
La cassette d'expression tk TATA-PS a été construite par PCR de chevauchement (stratégie résumée à la figure 12).



**Figure 12 : Construction des cassettes d'expression de la PS par PCR de chevauchement. La séquence promotrice (PCR#1), la PS (PCR #2) et la séquence de polyadénylation (PCR #3) ont été amplifiées par PCR en ajoutant des régions homologues à leur extrémité 5' et/ou 3'. Ces régions homologues ont ensuite permis de faire une fusion de ces différents produits de PCR en réalisant un PCR de chevauchement (PCR #4 et PCR #5).**

Dans un premier temps, la séquence promotrice a été amplifiée par PCR en ajoutant à son extrémité 3' une séquence d'homologie de la PS. Ensuite la PS a été amplifiée en ajoutant en 5' une séquence homologue au promoteur et en 3' une séquence homologue au site de polyadénylation. Finalement, la séquence de polyadénylation a été amplifiée avec une région homologue à la PS en 3'. Ensuite, les produits de PCR de la séquence promotrice et PS ont été utilisés comme matrice dans une nouvelle réaction de PCR et le produit de cette réaction a été utilisé comme matrice avec le produit de PCR

de la séquence de polyadénylation pour obtenir la cassette d'expression complète. La cassette d'expression Hsp70 TATA-PS a été assemblée de manière analogue, mais en incluant des sites de restriction de part et d'autre du promoteur. La cassette MLP-PS a donc pu être construite en utilisant ces sites de restriction pour échanger les séquences promotrices. Toutes ces cassettes ont été clonées dans le site AflII du vecteur de transfert pAdCMV5-IRES-GFP. Le site AflII est situé à l'extrémité de la région homologue Ad5, près du promoteur CMV5 (figure 13).

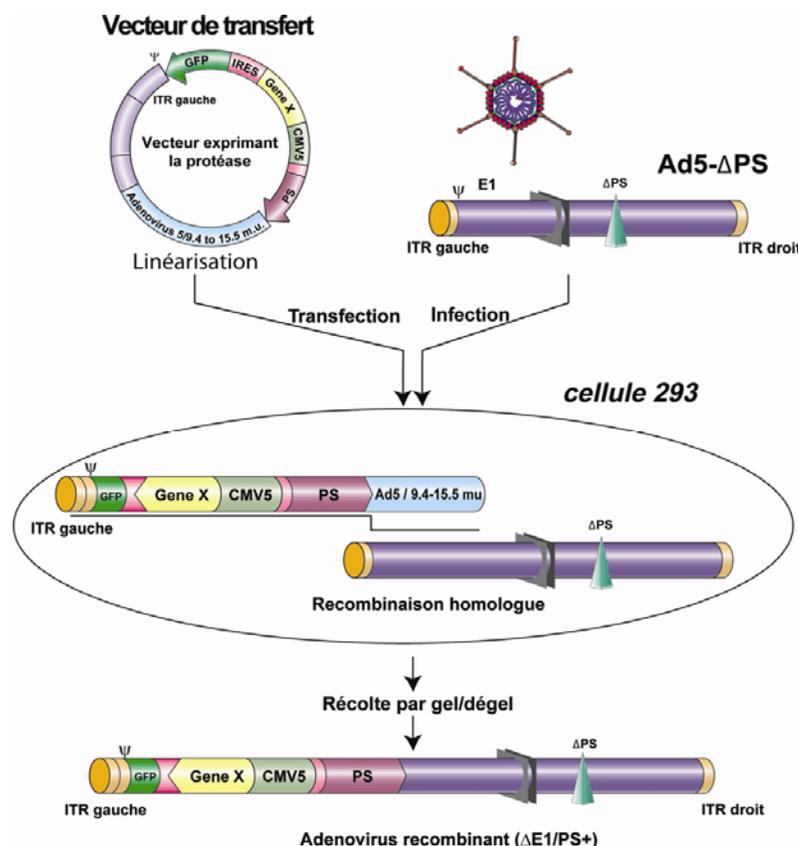


**Figure 13 : Construction des nouveaux vecteurs de transfert permettant une expression indépendante de la PS. Toutes les cassettes ont été clonées dans le site AflII dans les 2 orientations possibles. L'orientation distale correspond à celle où le promoteur de la PS est en position éloigné de l'activateur du promoteur CMV (enh CMV) et l'orientation proximale est définie par la plus grande proximité entre le promoteur de la PS et l'enh CMV. L'association du « leader tri-partite » (ltp) et des 2 sites d'épissage (se) permet d'augmenter l'expression du promoteur CMV. Cet ensemble constitue le promoteur CMV5.**

Le promoteur CMV5 utilisé dans nos plasmides de transfert comprend trois éléments : le promoteur CMV, une région contenant le « leader tri-partite » et site d'épissage. Étant donné que l'activateur du promoteur CMV peut transactiver les promoteurs environnants, le clonage dans le site AflII s'est fait dans deux orientations différentes : celle où le promoteur de la PS est éloigné de l'activateur du promoteur CMV, l'orientation distale, et celle où le promoteur de la PS est situé à proximité de l'activateur du promoteur CMV, la position proximale. On suppose que dans la configuration proximale, la plus faible distance entre le promoteur de la PS et l'activateur du promoteur CMV signifiera une plus grande transactivation du promoteur de la PS. Le clonage de la cassette d'expression dans le site AflII nous donne une configuration où l'expression de la PS est indépendante de l'expression du transgène, ce qui rend le système beaucoup plus versatile.

### **3.1.2 Propriétés répliquatives des adénovirus produits par sélection positive avec les nouveaux plasmides de transfert**

Chacun des plasmides de transfert construit a été utilisé pour générer, par sélection positive, un adénovirus recombinant en utilisant la méthode d'infection/transfection (figure 14).

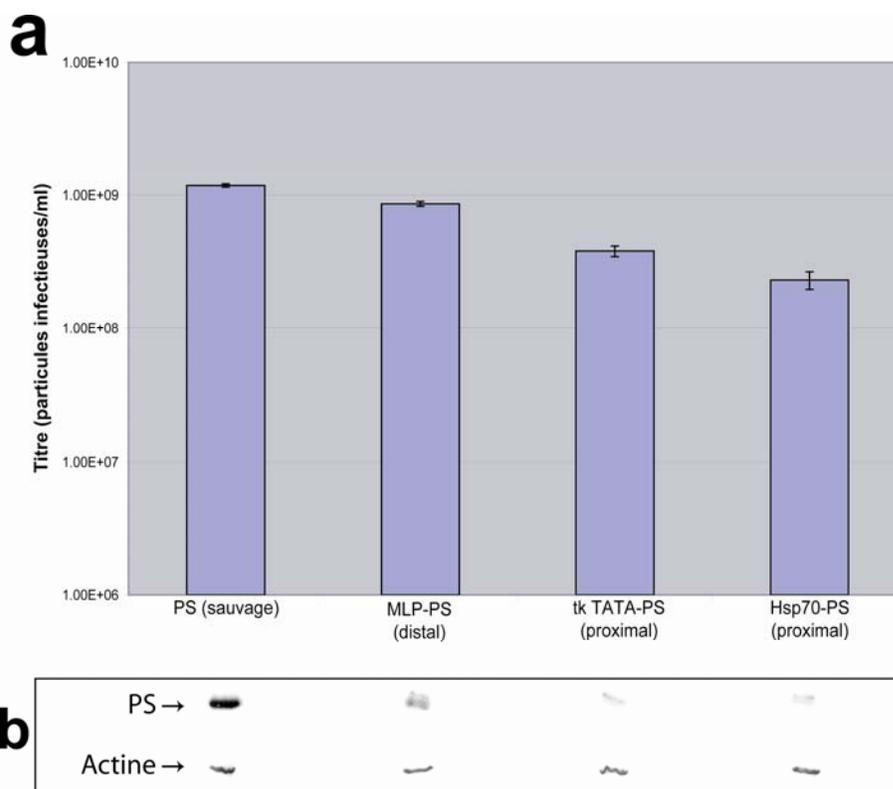


**Figure 14 : Génération d'adénovirus recombinants par sélection positive.** La transfection d'un vecteur de transfert linéarisé exprimant la GFP et la PS, et l'infection par un Ad $\Delta$ PS permet une recombinaison entre le vecteur de transfert et l'Ad $\Delta$ PS ce qui permet de générer un virus recombinant exprimant la GFP et la PS de manière ectopique. Le virus parental, toujours  $\Delta$ PS ne pourra pas se répliquer.

Tous ces adénovirus recombinants expriment désormais leur PS sous le contrôle du promoteur tk TATA, Hsp70 TATA ou MLP. La toute première question à se poser est de savoir si les virus recombinants exprimant la PS de manière ectopique sous le contrôle de différents promoteurs ont une répllication normale. Si la quantité de PS exprimée est trop faible pour produire une progéniture virale comparable à un virus sauvage, le plasmide de transfert ayant servi à la construction sera rejeté. Il est inutile de construire un Ad recombinant si son amplification n'est pas efficace.

Le premier résultat marquant au niveau de la répllication des virus générés par sélection positive est l'extrême importance de l'orientation de la cassette d'expression PS pour les promoteurs tk TATA et Hsp70 TATA. Pour la construction tk TATA en

configuration distale, aucune progéniture virale n'est produite. Avec le promoteur Hsp70 dans la même orientation, après un mois, de petites plages de lyse peuvent être observées sur les cellules ayant servi au titrage par plages de lyse. Mais leur développement extrêmement lent suggère un défaut prononcé de réplication. Dans l'orientation proximale, les virus recombinants utilisant les promoteurs tk TATA et Hsp70 TATA peuvent être amplifiés de manière beaucoup plus efficace (figure 15a) confirmant ainsi que l'activateur du promoteur CMV présent dans le promoteur CMV5 était bel et bien capable de transactiver les promoteurs environnants. Ces résultats nous indiquent aussi que les promoteurs tk TATA et Hsp70 TATA n'étaient pas assez puissants par eux-mêmes pour exprimer une quantité suffisante de PS permettant une réplication normale de l'adénovirus recombinant. Ces deux promoteurs ont absolument besoin d'être en position proximale pour être stimulés par l'activateur du promoteur CMV. Mais même dans ces conditions, la réplication reste de 5 à 8 fois en deçà de celle d'un adénovirus sauvage ce qui représente une différence statistiquement significative (test de Student, valeur de  $p$  0.05).



**Figure 15 : Progéniture virale en fonction de l'expression de la PS. (A) progéniture virale produite par les virus générés par sélection positive et ayant une expression ectopique de la PS. Le contrôle est le virus PS (sauvage), un virus  $\Delta E1\Delta E3$  mais qui exprime son gène PS de manière normale. Si le virus MLP-PS (distal) a une réplication normale, les virus tk TATA-PS (proximal) et Hsp70 TATA-PS (proximal) montrent un défaut prononcé de réplication, soit de 5 à 8 fois en deçà du virus sauvage (notez que l'échelle de l'axe des Y est logarithmique). (B) Immunobavardage de type western contre la protéase. Les extraits cellulaires ont été faits avec des cellules infectées par les différents virus pour comparer la quantité de PS produite au moment de l'infection. Le contrôle actine est utilisé pour vérifier que la même quantité de protéine a été mise sur le gel.**

Le promoteur MLP, plus puissant que les promoteurs tk TATA et Hsp70 TATA, permet une réplication normale du virus, et ce, même en orientation distale. Autrement dit, ce promoteur est assez puissant et il n'a pas besoin d'être stimulé par l'activateur du promoteur CMV pour exprimer suffisamment de PS. En orientation proximale, la progéniture virale est la même qu'en orientation distale (figure 16, Ad GFP<sup>+</sup>) indiquant que l'expression d'une plus grande quantité de PS ne permet pas d'augmenter la réplication du virus. Il est important que le promoteur exprimant la PS ne soit pas dépendant de l'activateur du promoteur CMV présent dans le promoteur CMV5 parce

qu'il pourrait arriver qu'un promoteur autre que CMV5 soit utilisé pour exprimer un transgène.

Ce résultat est confirmé par un immunobavardage de type western contre la PS réalisé avec des cellules infectées par les différents virus générés par sélection positive (figure 15b). Le niveau de PS retrouvé dans une infection avec les virus tk TATA-PS et Hsp70 TATA-PS est beaucoup plus faible que lors d'une infection avec le virus sauvage ou avec le virus MLP-PS. Par contre, le niveau de PS du virus MLP-PS reste beaucoup plus faible que le niveau du virus sauvage malgré une réplication semblable. Ce résultat confirme une observation faite précédemment, à savoir que de 10% de l'expression de la PS par rapport à un virus sauvage est suffisante à la réplication de l'adénovirus (45).

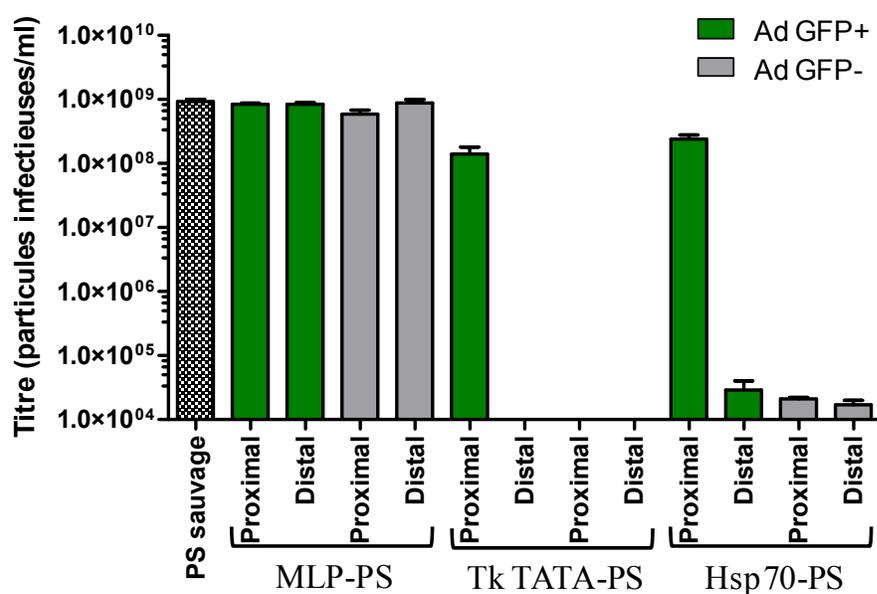
Bref, si tous les promoteurs que nous avons utilisés pour exprimer la PS sont plus faibles que ceux utilisés dans les travaux précédents, seule la cassette MLP-PS permet une réplication normale du virus.

La construction des différents vecteurs de transfert s'est avérée particulièrement problématique. Les résultats présentés précédemment concernent la version définitive du vecteur de transfert, mais avant d'arriver à ce résultat, une première série de vecteurs de transfert, pour laquelle l'expression du transgène GFP s'est avérée instable, avait été construite.

Le site AflII, utilisé pour faire le clonage des cassettes d'expression de la PS, se situe 200 nucléotides avant la fin de la région d'homologie adénovirale utilisée pour faire la recombinaison entre le vecteur et l'Ad. Le clonage d'une cassette d'expression à cet endroit ne devait pas en théorie affecter la production d'Ad recombinants puisqu'il avait déjà été montré que des vecteurs délétés de ces 200 nucléotides étaient toujours aussi efficaces pour produire un vecteur adénoviral (87). Dans la première version construite, la cassette d'expression de la PS était donc flanquée en amont de la région adénovirale servant à faire la recombinaison et en aval par les 200 nucléotides restants de cette même région. Lorsque le vecteur de transfert MLP-PS a été utilisé pour générer

un Ad recombinant par infection/transfection, un nombre anormalement élevé de virus recombinants, n'exprimant plus la GFP, a été observé sur des plages de lyse. Ce résultat était complètement inattendu puisqu'en principe tous les virus recombinants, exprimant désormais la protéase, devaient aussi exprimer le transgène, la GFP dans le cas présent. Pour quantifier ce phénomène, la résultante des différentes infections/transfections effectuées avec ces vecteurs a été utilisée pour former des plages de lyse sur un tapis cellulaire, par la suite le nombre de plages de lyse n'exprimant plus la GFP a été comparé au nombre de plages de lyse total et on a pu établir que 10%-15% des virus produits avec les différents vecteurs de transfert n'exprimaient plus la GFP.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, on a procédé à la caractérisation des virus recombinants ayant perdu la capacité d'exprimer la GFP. Dans un premier temps, on a analysé le pouvoir réplcatif de ces Ad recombinants (figure 16).



**Figure 16 : Progéniture des adénovirus recombinants ayant perdu ou conservé l'expression de la GFP. Le contrôle est le virus PS (sauvage), un virus  $\Delta E1\Delta E3$  mais qui exprime son gène PS de manière normale. Si les virus MLP-PS ont une réplcation normale en toute circonstance, le virus tk TATA-PS et Hsp70 TATA-PS montrent un défaut prononcé de réplcation et ce peu importe l'orientation de la cassette d'expression lorsque l'expression de la GFP est perdue. La concentration de la progéniture a été déterminée en comptant les plages de lyse produites au bout de 4 semaines sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose.**

Dans un premier temps, on a remarqué que les Ad recombinants utilisant la cassette MLP-PS et ayant perdu l'expression de la GFP se répliquent aussi bien que leur équivalent GFP<sup>+</sup>. Ensuite, la cassette tk TATA-PS produit une progéniture virale GFP<sup>+</sup> en position proximale, mais aucune en position distale (comme observé précédemment). Toujours avec cette cassette, aucun virus GFP<sup>-</sup> n'a pu être observé pour les orientations proximales et distales. Pour ce qui est de la cassette Hsp70-PS, la progéniture virale produite par les virus GFP<sup>-</sup> est comparable à la progéniture des virus GFP<sup>+</sup> en position distale. En résumé, pour les cassettes TATA-PS et Hsp70-PS, les Ad GFP<sup>+</sup> sont répliatifs en position proximale alors que le virus GFP<sup>-</sup>, dans la même orientation, ne peuvent se répliquer normalement. Sachant que les virus recombinants ayant conservé l'expression de la GFP et exprimant la PS à partir des promoteurs tk TATA-PS et Hsp70-PS avait une répliation plus élevée en position proximale grâce à la stimulation du promoteur CMV5 et que dans les virus ayant perdu l'expression de la GFP, le défaut de répliation se retrouve dans les orientations distales et proximales, on a posé comme hypothèse que chez les Ad GFP<sup>-</sup>, la cassette d'expression du transgène a été perdue suite à un événement de recombinaison. La perte de la cassette signifie que le promoteur CMV5 n'est plus présent pour stimuler l'expression de la PS en position proximale, ce qui ramène la répliation du virus au même niveau que la position distale. Dans le cas du promoteur MLP, celui-ci étant indépendant de la présence du promoteur CMV5, la perte de celui-ci via un événement de recombinaison n'a pas d'impact sur la répliation du virus.

Pour expliquer cet événement de recombinaison inattendu, on a posé comme hypothèse que les 200 nucléotides résiduels en aval de la cassette d'expression de la PS étaient suffisants pour générer un événement de recombinaison responsable de la perte de la cassette d'expression du transgène. Pour vérifier si tel était bien le cas, les Ad recombinants générés à partir des différentes cassettes PS et ayant perdu l'expression de la GFP ont été amplifiés et leur génome a été purifié puis séquencé pour confirmer la nature de la délétion. Dans toutes les séquences, on a trouvé la cassette d'expression de la PS était intacte, mais que le promoteur CMV5 était perdu confirmant ainsi que le virus était bien de nature recombinante, mais la l'expression du transgène était perdue.

Devant ce résultat, nous avons décidé de reconstruire tous les plasmides de transfert (MLP-PS, tk TATA-PS et MLP-PS en orientation proximal et distal) en délétant la région de 200 nucléotides que l'on suspectait être responsable de l'événement de recombinaison. Comme prévu, dans la nouvelle version des plasmides de transfert, aucun virus recombinant ayant perdu l'expression de la GFP n'a pu être observé. Les résultats présentés au début de cette section ont été générés avec ces nouveaux vecteurs de transfert.

### **3.1.3 Diversité théorique des bibliothèques générées avec les plasmides de transfert**

La construction MLP-PS était celle qui exprime le plus de PS et c'était aussi la seule qui a permis de générer des virus recombinants capables de se répliquer efficacement. On s'est donc demandé si le haut niveau de PS exprimé par ce plasmide de transfert permettait de générer une bonne diversité en évitant la transcomplémentation du virus parental. On se rappelle qu'une expression trop soutenue de la PS par le plasmide de transfert peut aller compléter directement l'Ad $\Delta$ PS sans qu'il y ait eu recombinaison, un événement que nous croyons capable d'affecter la diversité.

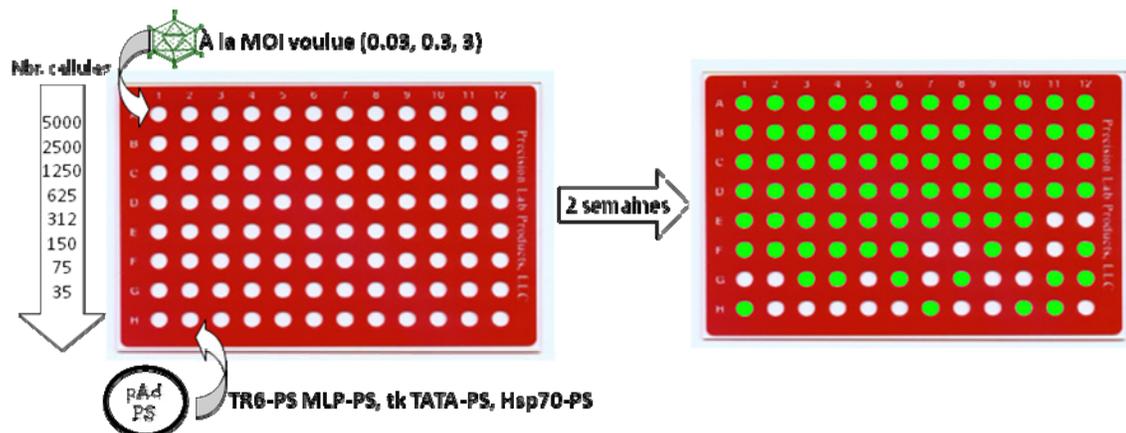
La diversité théorique représente le nombre de cellules qu'il faut infecter/transfecter pour générer un événement de recombinaison entre le plasmide de transfert et l'Ad $\Delta$ PS, autrement dit le nombre de cellules nécessaires pour générer un adénovirus recombinant. Pour évaluer cette diversité, on effectue des infections/transfections avec une quantité décroissante de cellules. Pour chaque quantité de cellules utilisée, 10 infections/transfections produisant un adénovirus recombinant exprimant la GFP sont réalisées et une réaction d'infection/transfection est considérée positive si des cellules infectées avec le lysat cellulaire de l'infection/transfection génèrent au moins une cellule verte. La plus petite dilution cellulaire capable de générer un adénovirus recombinant 6 fois sur 10 nous donne le nombre de cellules nécessaires pour la production d'un adénovirus recombinant. Le seuil de 6/10 est fixé par la loi de

distribution de Poisson. Cette expérience nous a permis de déterminer le nombre de cellules nécessaires pour générer un événement de recombinaison capable de produire un adénovirus recombinant. À titre d'exemple, si 10 infections/transfections réalisées avec 50 cellules génèrent 7 événements positifs alors que 10 infections/transfections réalisées avec 25 cellules génèrent 4 événements positifs, il faudra conclure qu'il faut infecter/transfecter 50 cellules pour générer un Ad recombinant.

Il va sans dire que l'efficacité de transfection est un élément critique dans cette expérience, si la transfection n'est pas parfaitement optimisée on risque de conclure à une absence de diversité alors que ce résultat serait le fruit d'une mauvaise efficacité de transfection. Donc, avant de procéder à cette expérience, différentes méthodes de transfection ont été testées pour trouver laquelle était la plus efficace et reproductible. Les méthodes testées ont été la transfection par la lipofectamine 2000, le PEI et le calcium-phosphate. La lipofectamine 2000, quoique très efficace, a été rejetée à cause de son niveau de toxicité relativement élevé. Même en utilisant différents ratios lipofectamine/ADN, on retrouvait au minimum plus de 30% de mortalité cellulaire. La méthode avec le PEI a permis d'éliminer les problèmes de mortalité cellulaire, mais l'efficacité de transfection était très aléatoire. D'une expérience à l'autre, pour un même ratio PEI/ADN, l'efficacité pouvait varier entre 70% et 30% de cellules transfectées. Même en variant ce ratio PEI/ADN, il nous a été impossible de trouver des conditions dans lesquelles la méthode était reproductible. Finalement, c'est la méthode de transfection par calcium-phosphate qui s'est avérée la plus utilisable pour réaliser cette expérience. Après une optimisation des différents ratios de réactifs et temps d'incubation, nous avons pu mettre au point un protocole qui permettait de transfecter sur une base régulière de 50%-60% des cellules tout en éliminant les problèmes liés à la mortalité cellulaire.

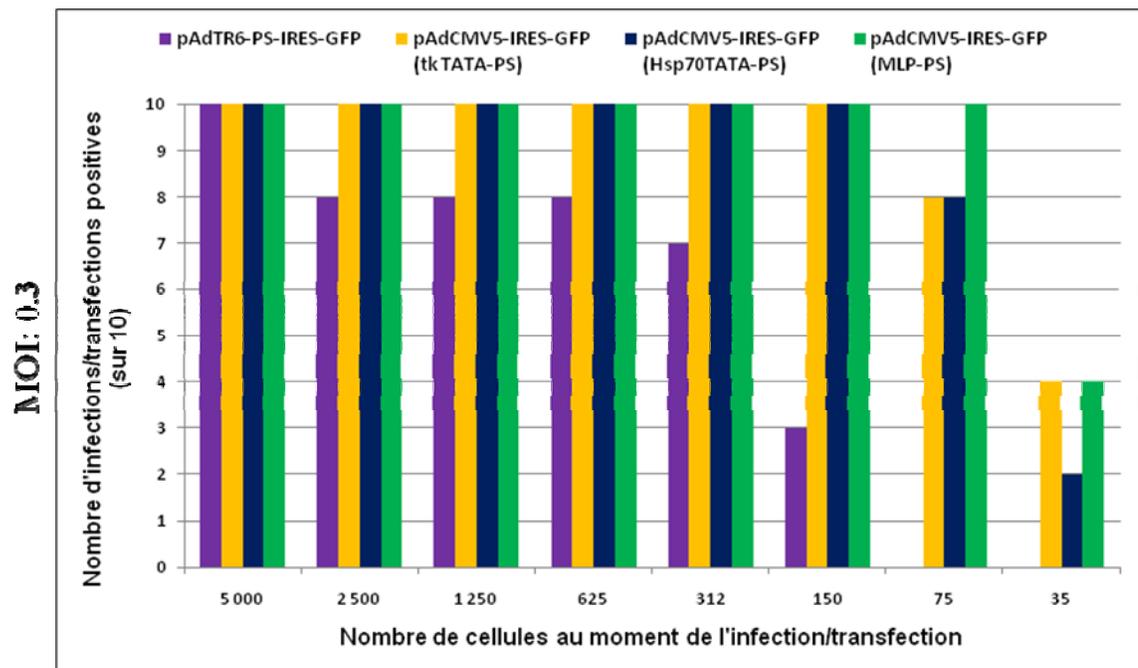
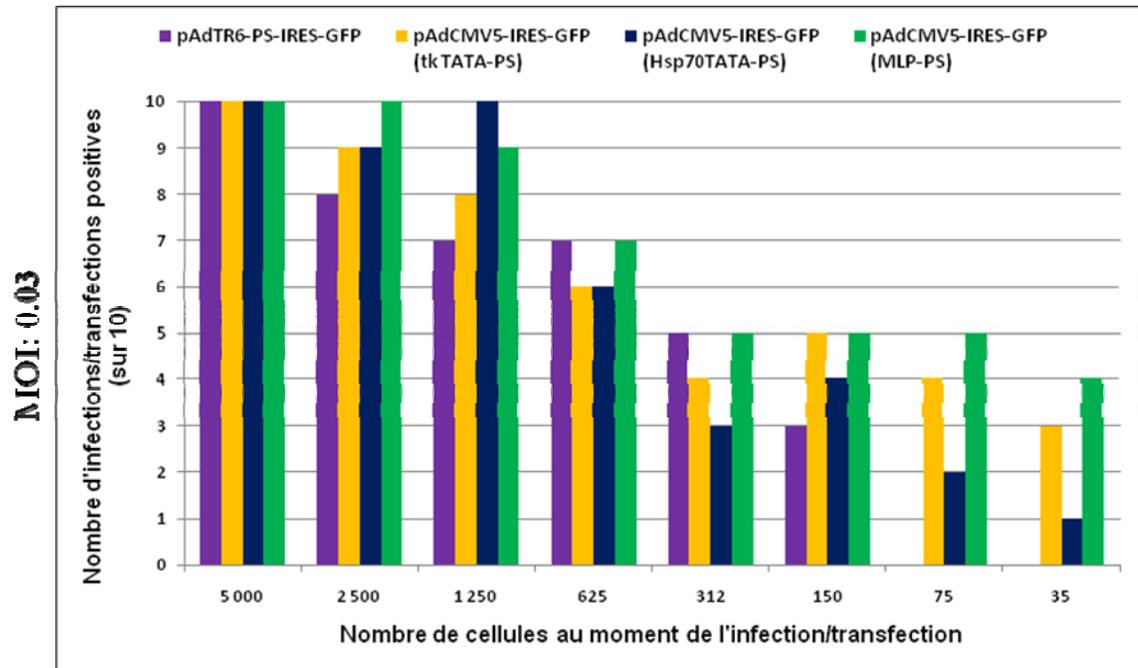
La diversité théorique a donc été mesurée avec les constructions tk TATA-PS, Hsp70-PS, MLP-PS et pAdTR6-PS-IRES-GFP. Cette dernière construction, utilisée dans les travaux antérieurs (45), exprime la PS à partir d'un promoteur TR6 qui est plus puissant que le promoteur MLP. Les expériences d'infection/transfection visant à

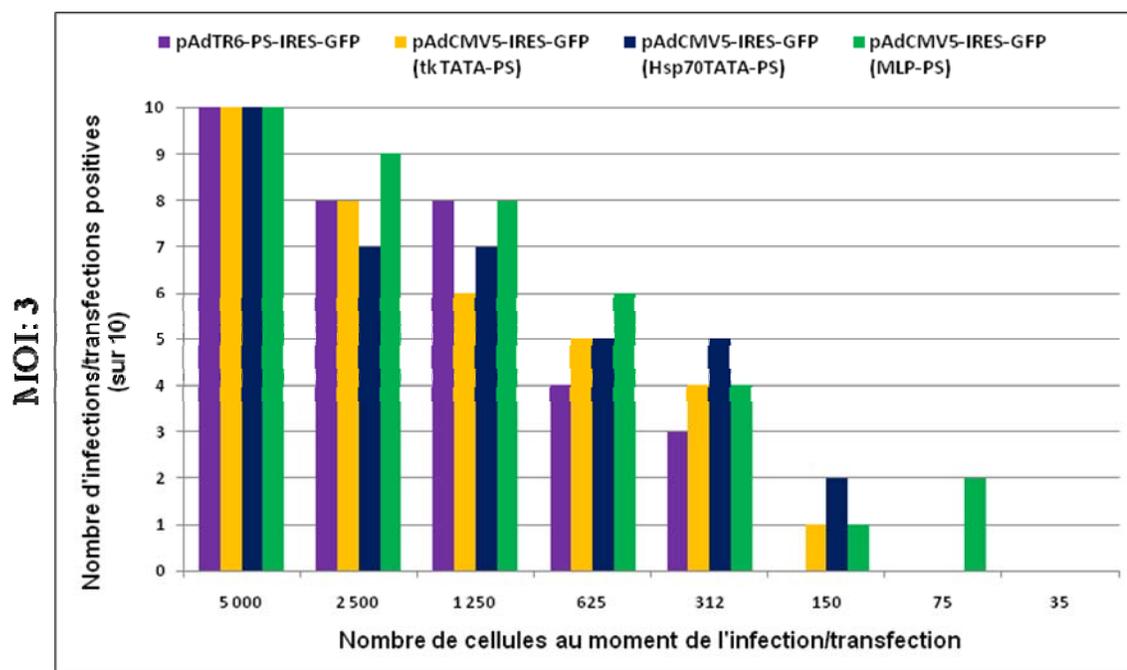
mesurer la diversité ont été réalisées avec 3 MOI différentes, soit 0.03, 0.3 et 3, dans le but de déterminer dans quelle condition la diversité était maximale (figure 17).



**Figure 17 : Schéma expérimental de l'expérience mise au point pour mesurer la diversité. Une transfection est réalisée avec un plasmide de transfert exprimant la PS (TR6-PS, MLP-PS, tk TATA-PS et Hsp70-PS) et l'infection est faite avec un AdΔPS à une MOI de 0.03, 0.3 et 3. Deux semaines après l'infection/transfection, la plaque 96 puits est soumise à 3 gels/dégels et le lysat cellulaire de chacun des puits, contenant le virus recombinant produit par l'infection/transfection, est utilisé pour infecter une nouvelle plaque de 96 puits. Deux semaines plus tard, on calcule le nombre de puits positifs pour déterminer la diversité.**

Peu importe la construction transfectée, la meilleure diversité (seuil de 6/10) a été obtenue en utilisant une MOI du virus AdΔPS de 0,3. Avec des MOI inférieures ou supérieures, la diversité chutait de manière importante. Avec le vecteur MLP-PS la diversité obtenue à 0,3 a été de 1/75 : il faut donc infecter/transfecter 75 cellules pour générer un adénovirus recombinant. Avec la MOI de 0,03 et 3, la diversité a été de 625 (figure 18).





**Figure 18 : Mesure de la diversité générée par les vecteurs de transfert. Infections/transfections réalisées avec les trois plasmides de transfert construits. Comme contrôle, le plasmide pAdTR6-PS-IRES-GFP a été utilisé. Ce plasmide a été utilisé dans nos travaux précédents et exprime la PS à partir d'un promoteur TR6. Ce promoteur est plus fort que les trois promoteurs que nous avons utilisés. Le virus recombinant produit exprimant la GFP, le nombre de réactions d'infection/transfection positives est déterminé en utilisant le produit de l'infection/transfection pour infecter des cellules 293 pour documenter l'apparition de cellules vertes.**

Il est à noter que les 2 autres plasmides construits (tk TATA-PS et Hsp70 TATA-PS) ont fait tout aussi bien que la construction MLP-PS en ce qui a trait à la diversité lorsque la MOI est de 0,3 ou 0,03 soit 1/75 et 1/625 respectivement. Avec une MOI de 3, les 2 constructions tk TATA-PS et Hsp70 TATA-PS ont une diversité inférieure à la construction MLP-PS : 1/1250 contre 1/625. Avec une MOI optimum de 0.3, la construction TR6 a nécessité 312 cellules pour avoir un événement de recombinaison. Si l'on utilise une MOI inférieure ou supérieure la diversité est ramenée à 1/625 ou 1/1250.

La conclusion la plus importante relative à ce résultat est la confirmation de notre hypothèse à savoir qu'un fort niveau d'expression de PS par le plasmide de transfert

peut nuire à la diversité en causant une transcomplémentation du virus parental. Ce phénomène a été le plus apparent lorsque la MOI optimum de 0,3 a été utilisée : dans ces conditions, nos constructions génèrent une diversité de 1/75 alors que la construction TR6, qui exprime plus de PS, a une diversité que de 1/312. La diversité moindre obtenue avec une MOI de 3 est probablement imputable à un niveau de transcomplémentation plus élevé découlant d'un plus grand nombre de virus parental (voir section 3.1.5) alors qu'avec la MOI de 0,03, si l'on minimise le niveau probable de transcomplémentation, la faible proportion de cellules infectées fait en sorte que la probabilité de générer un virus recombinant diminue.

L'objectif premier a donc été atteint, nous avons pu construire un vecteur de transfert qui tout en minimisant l'expression de la PS pour maximiser la diversité permet une réplication normale des adénovirus recombinants exprimant la PS de manière ectopique. Ce vecteur, pAd-CMV5-IRES-GFP (MLP-PS) pourra donc être utilisé pour la construction de bibliothèques adénovirales.

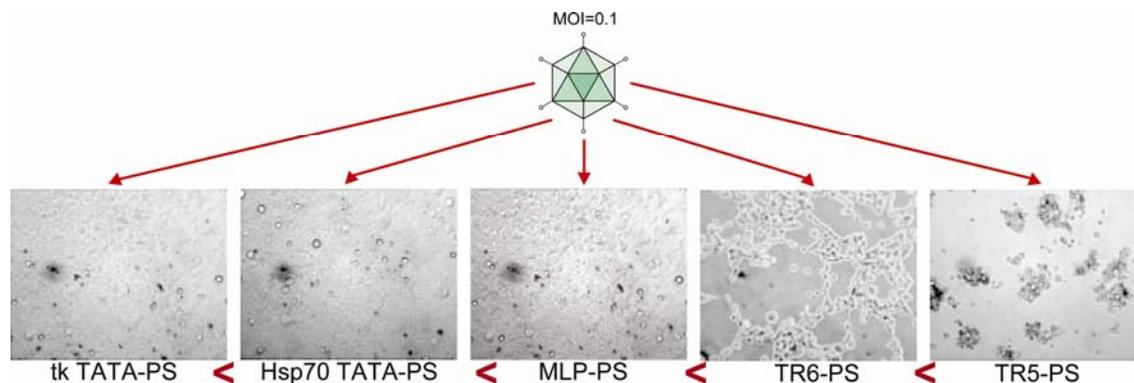
### **3.1.4 Visualisation de l'effet cytopathique causé par la transcomplémentation**

Même si nous avons été en mesure de minimiser la transcomplémentation avec les plasmides de transfert qui ont été construits, le virus parental généré au moment de l'infection/transfection cause tout de même un effet collatéral indésirable. Pour évaluer dans quelle mesure la transcomplémentation permet la réplication du virus parental  $\Delta$ PS, nous avons fait des infections/transfections avec nos constructions et avec les plasmides qui ont été publiés précédemment. Ces 2 plasmides sont pAdTR5-PS-IRES-GFP et pAdTR6-PS-IRES-GFP. Ces 2 constructions expriment la PS à partir d'un promoteur TR5 et TR6, TR5 étant plus puissant que TR6.

Les virus recombinants qui ont été obtenus par infection/transfection ont été quantifiés par un « essai de plages de lyse » sur des cellules 293. Avec les cellules 293,

le virus recombinant sera en mesure de produire des plages de lyse grâce à l'expression ectopique de la PS. En contrepartie, le virus parental sera toujours  $\Delta$ PS et ne produira pas de plages de lyse. Donc, en déterminant la concentration des particules infectieuses sur des cellules 293, nous obtenons seulement la quantité de virus recombinants générés par l'infection/transfection. À partir de la concentration obtenue en « essai de plages de lyse », nous avons infecté un tapis cellulaire avec une MOI de 0,1. Autrement dit, seulement une cellule sur 10 devrait être infectée et montrer un effet cytopathique. Par contre, si l'on remarque un effet cytopathique supérieur, on devra conclure à une présence du virus parental. Même si ce dernier est  $\Delta$ PS, il n'en demeure pas moins capable de produire un effet toxique pour la cellule infectée.

L'effet cytopathique qui a été observé avec nos constructions s'avère relativement faible en comparaison avec celui généré par les plasmides pAdTR5-PS-IRES-GFP et pAdTR6-PS-IRES-GFP (figure 19).



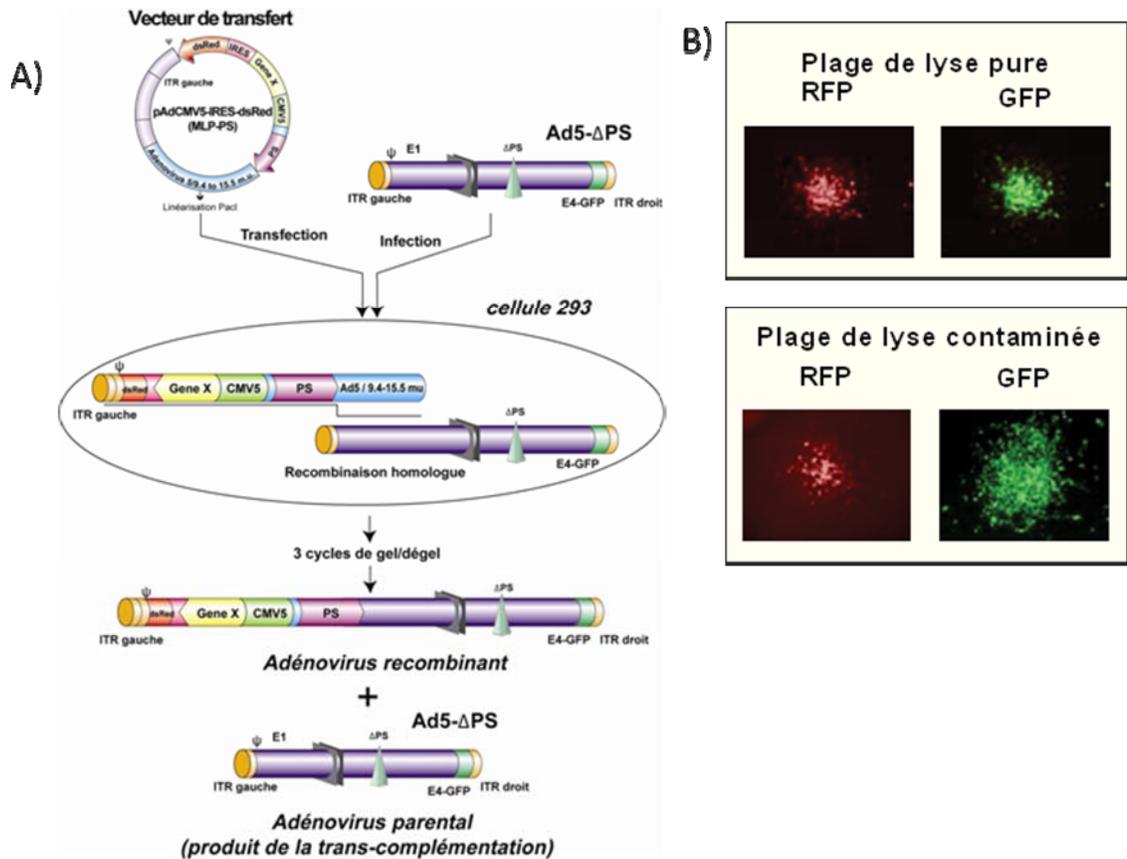
**Figure 19 : Effet cytopathique créé par la transcomplémentation du virus parental. Un tapis cellulaire à 100% de confluence a été infecté avec une MOI de 0,1 de virus recombinants produits par sélection positive. Tout effet cytopathique supérieur à 0,1 peut être attribué à la présence du virus parental. Les images sont disposées en fonction de la force du promoteur de la PS : à gauche le promoteur le plus faible et à droite le promoteur le plus fort.**

Il existe une forte corrélation entre l'effet cytopathique visible et la force du promoteur utilisé pour exprimer la PS. Pour nos 3 constructions, l'effet cytopathique est resté faible et le tapis cellulaire est demeuré relativement intact. Par contre, pour les promoteurs TR5 et TR6, la quasi-totalité des cellules a montré un effet cytopathique

indiquant une présence importante du virus parental  $\Delta$ PS. Ce résultat a confirmé qu'une expression trop importante de la PS par le plasmide de transfert est bel et bien capable de causer un phénomène de transcomplémentation. De plus, il est important de rappeler que la construction pAdTR6-PS-IRES-GFP génère une diversité 4 fois moins grande que nos constructions. Ce résultat nous a permis de confirmer l'hypothèse voulant que la transcomplémentation permette une prolifération du virus parental au dépend du virus recombinant, ce qui s'avère délétère pour la diversité de la librairie.

### **3.1.5 Évaluation quantitative de l'effet de transcomplémentation**

Ayant démontré l'importance du phénomène de transcomplémentation, il était important de savoir dans quelle mesure le virus parental pouvait contaminer le virus recombinant produit lors de l'infection/transfection. Pour ce faire, nous avons remplacé la GFP par la dsRed, une protéine de fluorescence rouge, dans notre construction MLP-PS. Pour l'infection, nous avons utilisé un virus  $\Delta$ PS exprimant la GFP dans sa région E4. Le résultat de l'infection/transfection produira donc un virus recombinant exprimant à la fois la GFP et la dsRed alors que le virus parental, un sous-produit de l'infection/transfection, exprimera seulement la GFP (figure 20a). Pour s'assurer que ce modèle expérimental était capable de discriminer le virus recombinant du virus parental, le résultat d'une infection/transfection a été visualisé sur des plages de lyse (figure 20b) et comme prévu la distribution de la GFP et de la RFP permet de distinguer les cellules ayant été infectées par un virus parental et/ou recombinant.

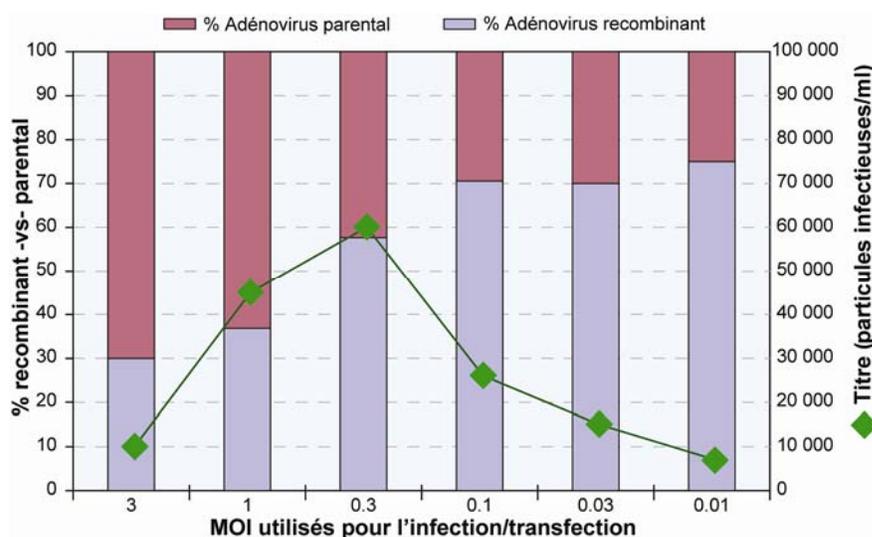


**Figure 20: Stratégie de production d'un virus recombinant par sélection positive suite à une infection/transfection. (A) L'infection/transfection produira un virus recombinant, capable d'exprimer la GFP et la dsRed alors que le virus parental n'exprimera que la GFP. Le virus parental est produit par transcomplémentation au moment de l'infection/transfection. Ce dernier peut utiliser la PS produite par le vecteur de transfert pour se répliquer normalement. (B) Le résultat de l'infection/transfection produit en (A) a été utilisé pour infecter un tapis de cellules 293 qui a ensuite été recouvert d'agarose pour former des plages de lyse. On peut voir que dans les plages de lyse non contaminées, la distribution de GFP et de RFP est identique alors que dans les plages de lyse contaminées, on retrouve de nombreuses cellules exprimant la GFP sans exprimer la dsRed.**

L'analyse quantitative a été réalisée par une infection utilisant une MOI décroissante allant de 3 à 0,03 et le virus recombinant généré lors de l'infection/transfection a subi un titrage sur des cellules 293, où seuls les virus exprimant la PS produiront des plages de lyse. Ensuite, le lysat cellulaire a été utilisé pour infecter avec une MOI de 0,1 des cellules 293. En analysant les cellules infectées en cytofluorométrie en flux, il est donc possible d'établir le ratio des cellules infectées par

le virus recombinant et le virus parental. Les cellules infectées par le virus recombinant seront vertes et rouges alors que les cellules infectées par le virus parental seront uniquement vertes. L'élément capital de cette expérience est la faible MOI utilisée lors de l'infection. En utilisant une MOI de 1, on aurait pu avoir des cellules infectées à la fois par le virus parental et par le virus recombinant. De telles cellules auraient été rouges/vertes et classées comme étant infectées par un virus recombinant ce qui aurait eu pour conséquence de sous-estimer la quantité de virus parentaux. En utilisant une MOI de 0,1 on élimine le phénomène de double infection et l'on évite de sous-estimer la présence du virus parental.

La première chose qui frappe dans le résultat de cette expérience est l'importance de la MOI utilisée au moment de l'infection/transfection (figure 21).



**Figure 21 : Effet de la MOI sur la concentration et la transcomplémentation. La courbe sigmoïdale représente la concentration de l'adénovirus recombinant générée suite à une infection/transfection réalisée avec différente MOI de virus  $\Delta$ PS. L'histogramme représente le ratio d'adénovirus recombinants et parentaux générés suite à l'infection transfection.**

Aux MOI supérieures à 0,3 la quantité de virus recombinants produits par l'infection/transfection est faible et augmente au fur et à mesure que la MOI utilisée diminue pour atteindre un sommet à 0,3. Aux MOI plus élevées, on favorise le

phénomène de transcomplémentation : si plus d'un virus est capable d'infecter une cellule, alors la PS produite par le plasmide de transfert pourra transcomplémenter plus d'un virus parental. La prolifération du virus parental se faisant au dépend du virus recombinant, on fait en sorte que moins d'adénovirus recombinants sont produits. La diversité de la librairie étant directement en lien avec le nombre de virus recombinants produits par l'infection/transfection, à forte MOI lorsque la transcomplémentation est favorisée, la diversité diminue (MOI de 3 de la figure 18). Cette transcomplémentation est quantifiable lorsque l'on regarde le ratio de virus recombinant et de virus parental. Avec une MOI de 3 et 1, plus de 50% des virus générés sont parentaux, une indication supplémentaire que la croissance du virus parental s'est faite au dépend du virus recombinant.

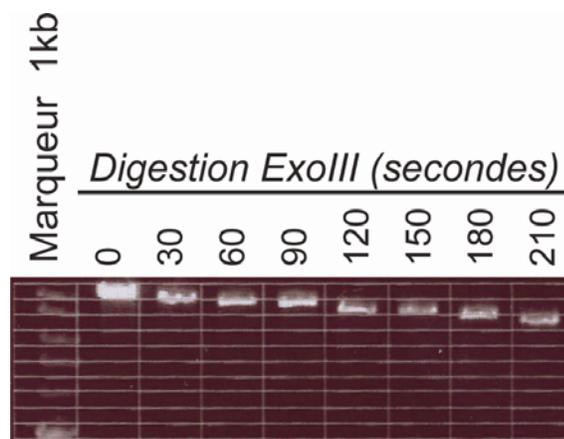
Par contre lorsque la MOI est inférieure à 0,3 on peut aussi observer une diminution de la quantité de virus recombinants générés par l'infection/transfection. Pour qu'un adénovirus recombinant soit produit, la cellule doit être transfectée par le plasmide de transfert et infectée par l'Ad $\Delta$ PS. Avec une MOI inférieure à 0,3 le nombre de cellules infectées était tout simplement trop faible : beaucoup de cellules transfectées ne sont pas infectées par l'Ad $\Delta$ PS et, par conséquent, aucun virus recombinant ne peut être généré. Avec la diminution de la MOI, on voit aussi une chute importante de la quantité de virus parental généré par la transcomplémentation. Avec une MOI de 0,3 seulement 40% des virus produits sont parentaux.

La MOI de 0,3 représente donc un bon compromis : 1-on s'assure que suffisamment de cellules sont infectées et peuvent donc participer à la génération de virus recombinants, mais 2- on s'assure aussi que la transcomplémentation n'affecte pas la production de l'adénovirus recombinant de manière trop importante. On pourrait être tenté de croire que le niveau de contamination de 40% de virus parentaux associés avec la MOI de 0,3 serait problématique. Or, il faut se rappeler que lors de la création de librairies adénovirales, le virus est isolé par plages de lyse pour être en mesure d'isoler des clones viraux. Lors de cette étape, il suffit donc de bien diluer le virus pour obtenir

des plages de lyse isolées. Ainsi, on peut aisément se débarrasser du virus  $\Delta$ PS qui est incapable de se répliquer.

### 3.1.6 Création de la librairie antisens contre la GFP

Le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) ayant les caractéristiques recherchées pour la création de librairies adénovirales, nous avons décidé de le mettre à l'épreuve en créant une librairie antisens dirigée contre la GFP. En plus d'être facile à cribler, cette librairie nous permettra de mettre la main sur un antisens qui pourra être utilisé pour réguler négativement des transgènes qui sont en fusion ou co-exprimés en IRES avec la GFP. Comme il a déjà été établi qu'une délétion dans un antisens « pleine longueur » permettait de trouver des antisens plus efficaces (191), nous avons décidé de construire notre librairie en faisant une série de délétion dans l'antisens GFP. La librairie a été construite en clonant dans une orientation antisens la GFP présente dans la construction MLP-PS. Par la suite, la séquence anti-GFP a été digérée à l'extrémité 5' ce qui a permis de faire une série de délétion avec l'enzyme ExoIII (figure 22).



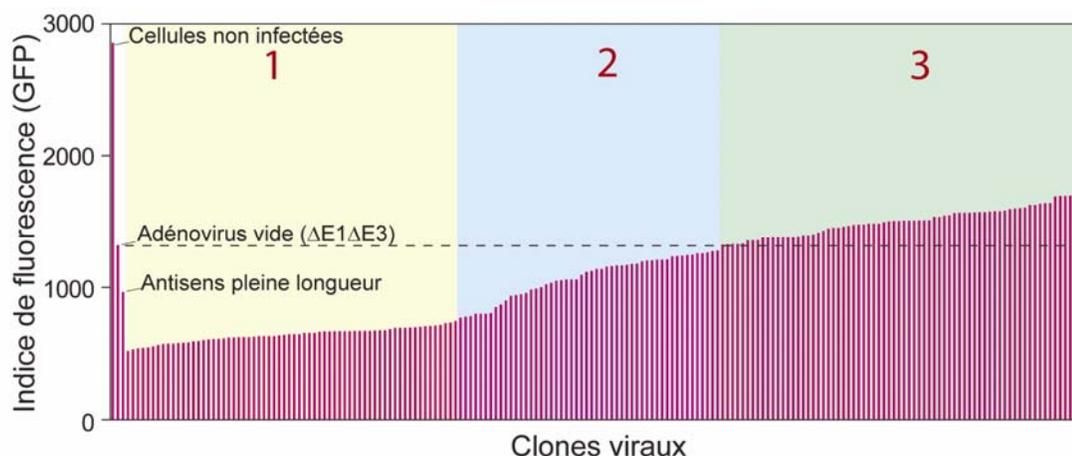
**Figure 22 : Digestion de l'antisens GFP par l'enzyme ExoIII. À 30°C, l'enzyme ExoIII est capable de déléter 210 paires de bases par minutes. Les différentes bandes présentées sur le gel montrent la progression de l'ExoIII à travers la GFP clonée en orientation antisens.**

Les délétions ont permis de générer des antisens de différentes longueurs qui ont par la suite été poolées pour créer la librairie de plasmide. La librairie de plasmide a par la suite été convertie en librairie adénovirale par infection/transfection de 5 millions de cellules 293. Le résultat de cette infection/transfection a par la suite été utilisé pour générer des plages de lyse sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose et 192 des 6000 plages de lyses ainsi produites ont été récoltées pour être amplifiées individuellement en infectant 10000 cellules 293 en format 96 puits. Chacun des stocks viraux ainsi produits correspond à un clone viral exprimant un élément distinct de la librairie.

### **3.1.7 Criblage préliminaire de la librairie antisens**

Pour cribler les différents clones viraux de manière simple et rapide, nous avons utilisé la lignée cellulaire 293CymR-CMV5-CuO-GFP (148). Cette lignée, qui a été dérivée des 293 exprime de manière stable la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible au cumate. Le criblage s'est donc effectué en infectant les 293CymR-CMV5-CuO-GFP avec un de nos 192 clones viraux. Une fois l'infection complétée, l'expression de la GFP a été induite par l'ajout de cumate et le niveau de fluorescence a été mesuré. Question de simplifier l'expérience, nous n'avons pas fait le titrage de chacun des 192 clones testés, nous avons simplement supposé qu'ils avaient tous une concentration similaire. Le but du criblage préliminaire est de faire une première sélection et ensuite, la concentration des clones sélectionnés sera déterminée en vue d'une caractérisation plus exhaustive.

Ce premier criblage nous permet d'apprécier toute la diversité générée par notre librairie (figure 23).



**Figure 23 : Criblage préliminaire de la librairie antisens. Inhibition de l'expression de la GFP dans les cellules 293CymR-CMV5-CuO-GFP induite par les différents éléments antisens de la librairie. L'adénovirus « pleine longueur » correspond à un adénovirus exprimant un antisens n'ayant pas subi de délétion.**

Un point majeur au niveau du criblage de la librairie concerne le moment auquel la GFP doit être induite. Lors de la première tentative de criblage, l'induction de la GFP s'est faite de manière simultanée avec la transduction par les clones adénoviraux. Lorsque nous avons procédé au criblage en mesurant l'intensité de la GFP, tous les antisens avaient un profil similaire c.-à-d. la répression de l'expression de la GFP était faible et qu'il y avait peu de différence entre les différents clones viraux. Suite à ce résultat, nous avons réalisé que la GFP est une protéine extrêmement stable avec une demi-vie supérieure à 24 heures (32). Donc, dans le cas d'une induction et d'une transduction simultanée, la quantité de GFP produite dans les heures qui suivent l'induction est suffisante pour interférer avec le criblage, puisque la GFP ainsi produite ne sera affectée par l'expression subséquente d'un antisens. Cette production « préliminaire » de GFP a donc généré un bruit de fond qui a rendu ce premier criblage inutile.

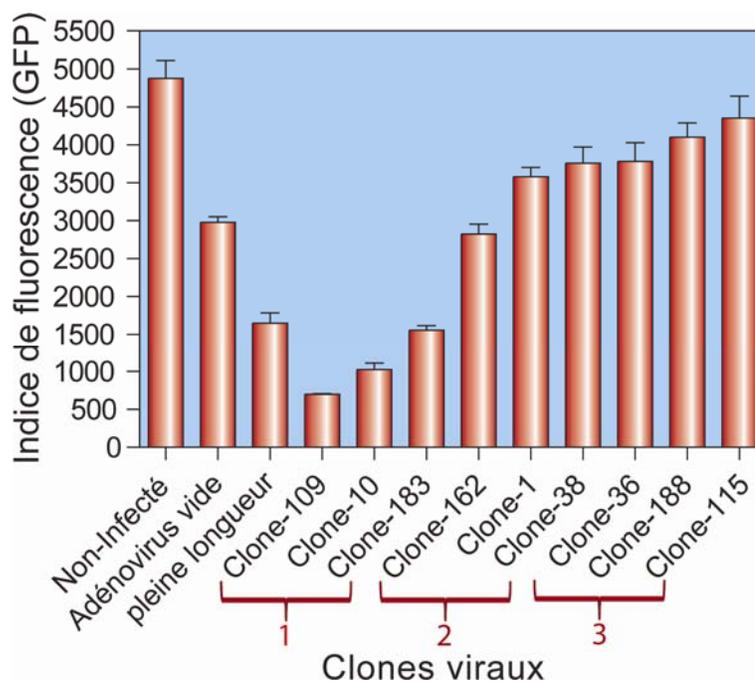
Pour que le criblage soit efficace, nous avons décidé de laisser à l'antisens suffisamment de temps pour qu'il puisse s'accumuler dans les cellules transduites. Une fois que l'antisens a pu s'exprimer (18 heures après l'infection), on a induit l'expression de la GFP. Dans ces conditions, on ne laisse pas à la GFP l'opportunité de créer un bruit

de fond en s'accumulant dans les cellules puisqu'au moment où son expression débute, l'antisens est déjà présent en bonne quantité.

Un des contrôles importants est l'infection avec un adénovirus vide  $\Delta E1\Delta E3$ . Ce virus permet de voir que la simple infection adénovirale affecte l'induction de la GFP. Si l'on compare à des cellules infectées et non infectées, une infection avec le virus vide produit une réduction de l'expression non spécifique supérieure à 50%. Par conséquent, le niveau basal utilisé pour calculer la capacité de nos antisens à réprimer l'expression de la GFP sera celui produit par le virus vide. Le virus avec l'antisens « pleine longueur » a une capacité relativement modeste à réprimer l'expression de la GFP, surtout lorsqu'on le compare avec les meilleurs éléments de la librairie. Le résultat de ce criblage préliminaire a été divisé en trois zones. Trois clones viraux ont été sélectionnés dans chaque zone et ont été soumis à une caractérisation plus exhaustive.

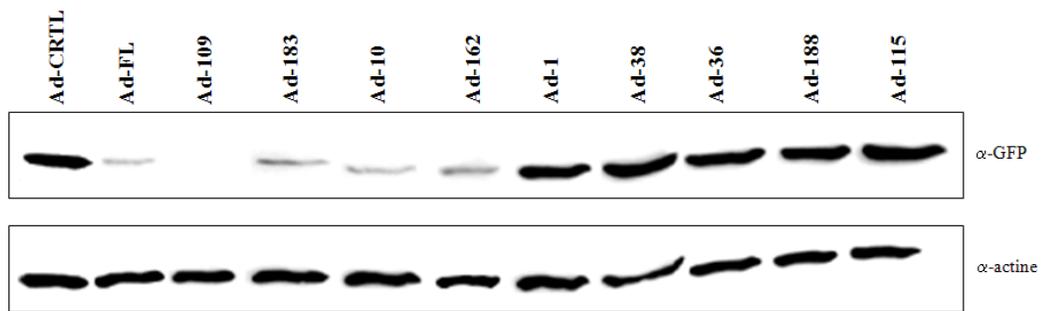
### **3.1.8 Analyse quantitative des anti-sens sélectionnés**

La première analyse reprend ce qui a été fait lors du criblage préliminaire sauf que cette fois-ci, la concentration des neuf clones sélectionnés a été déterminée pour s'assurer que l'infection se faisait avec une MOI de 5. Les résultats de cette analyse concordent avec ceux du criblage préliminaire (figure 24).



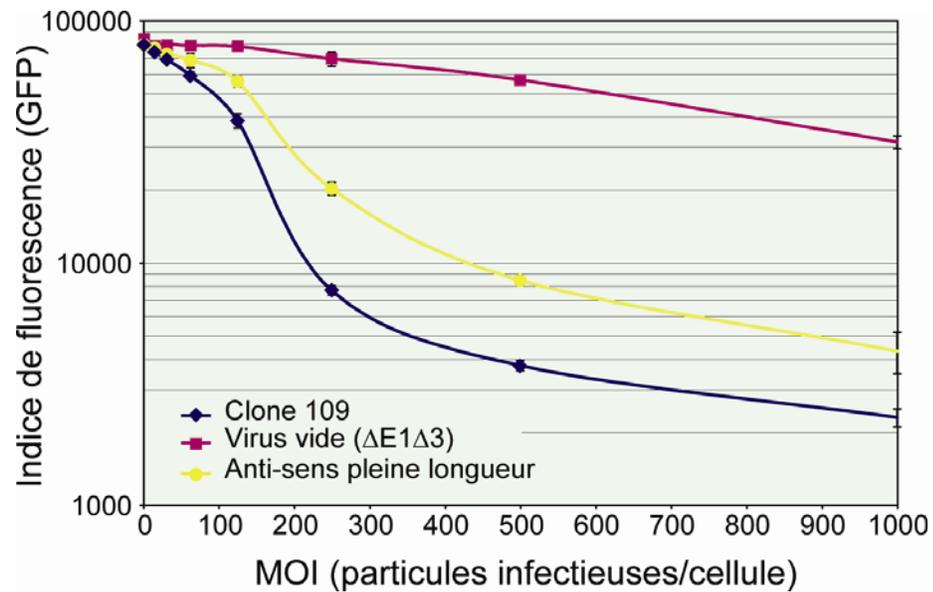
**Figure 24 : Caractérisation des neuf clones viraux sélectionnés suite au criblage préliminaire. Trois clones ont été sélectionnés dans chaque zone de la figure 23. Les contrôles sont les mêmes que ceux utilisés précédemment.**

Les trois clones provenant de la zone 1 sont ceux qui ont le mieux performé, notamment le clone 109. Ce dernier est quatre fois meilleur que le virus vide et 2 fois meilleur que le virus avec un antisens « pleine longueur ». Les clones prélevés dans les zones 2 et 3 ont un comportement analogue à celui observé lors du criblage préliminaire. Ces résultats ont été confirmés par un immunobavardage de type western en infectant des cellules 293CymR-CMV5-CuO-GFP, avec les clones viraux (figure 25).



**Figure 25 : Inhibition de l'expression de la GFP par les clones viraux.** Des cellules 293CymR-CMV5-CuO-GFP ont été infectées à une MOI de 5. Six heures post infection l'expression de la GFP a été induite par l'ajout de cumate et 3 jours plus tard, le lysat cellulaire a été récupéré et la GFP a été détecté par immunobavardage de type western.

Notre meilleur clone a aussi été testé dans des cellules A549. Cette lignée cellulaire ne possédant pas de région E1, il n'y aura pas de réplication de l'ADN viral suite à l'infection. Par conséquent, on peut contrôler de manière précise le nombre de copies du gène sens et antisens. Dans cette expérience nous avons utilisé une MOI croissante du clone viral portant la séquence antisens (0 à 1000) et la GFP a été livrée par une infection avec un adénovirus à une MOI de 200 (figure 26).



**Figure 26 : Inhibition de l'expression de la GFP dans des cellules A549. L'infection avec le virus rapporteur exprimant la GFP s'est faite avec une MOI constante de 200. L'infection avec le clone 109 et les différents contrôles est faite avec une de 1000, 500, 250, 125, 62, 30, 15 et 0.**

Le virus vide nous donne l'inhibition non spécifique, c'est-à-dire l'inhibition de l'expression de la GFP causée par l'infection adénovirale. Avec une MOI de 1000, cette inhibition non spécifique est de 3 fois. Avec la même MOI, le virus « pleine longueur » donne une inhibition de 18 fois et le clone 109 une inhibition de 35 fois. On peut donc conclure que l'antisens 109 a une activité spécifique importante. Pour une MOI de 250, le nombre de séquences sens et antisens sont en proportion presque identique. Dans ces conditions, l'inhibition non spécifique est de 1,2 fois alors que l'antisens « pleine longueur » inhibe l'expression de la GFP 4 fois et le clone 109 de 10 fois. Nous pouvons donc conclure que la librairie de délétion nous a permis de trouver un antisens très efficace qui performe mieux que l'antisens « pleine longueur ».

### 3.1.9 Vérification des séquences antisens

Pour s'assurer que la librairie adénovirale contenait bien et bien des éléments différents, la séquence des antisens présents dans chacun des clones a été séquencée.

Ceux-ci ont été utilisés pour infecter des cellules 293 et trois jours après l'infection, l'ADN viral de chacun de chacun des clones produits lors de l'infection a été isolé dans le but de séquencer l'antisens GFP. Tous les clones contenaient des antisens de tailles différentes (séquences à l'annexe II).

Le meilleur antisens (no.109) possède une délétion de 231 nucléotides alors que les 2 autres antisens du groupe 1 ont subi des délétions de 116 et 287 nucléotides respectivement. Dans les antisens des groupes 2 et 3, on retrouve des délétions de différentes tailles; la plus petite correspond à la perte de 378 nucléotides alors que pour la plus grande, 503 nucléotides ont été perdus. On peut donc supposer que la délétion des 287 premiers nucléotides permet de retirer une région qui affecte négativement l'antisens « pleine longueur », alors que les délétions au-delà du 378<sup>e</sup> nucléotide éliminent une région qui est importante pour les propriétés inhibitrices de l'antisens.

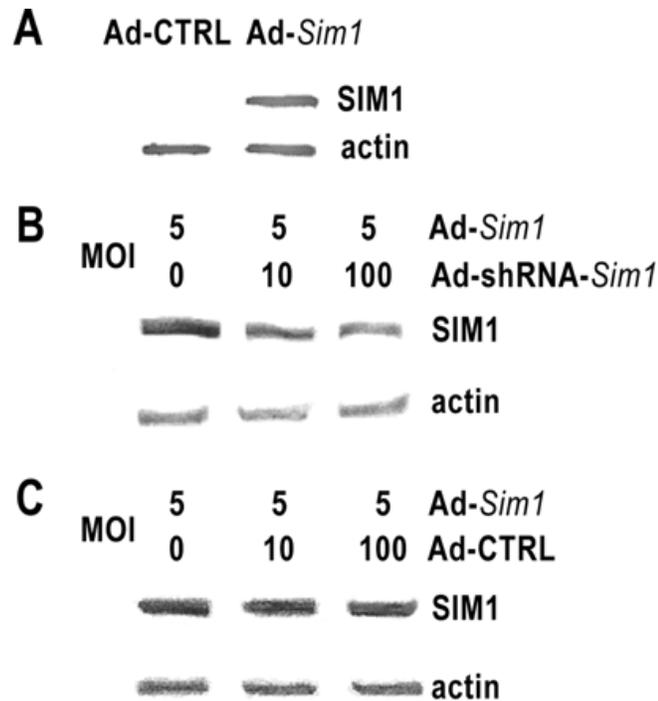
### **3.1.10 Versatilité du système de construction de vecteurs adénoviraux : étude du rôle du gène *Sim1* dans le contrôle de la satiété**

Si le système de construction de vecteur adénoviraux a été développé pour construire des bibliothèques, il n'en demeure pas moins très efficace si l'on désire construire un vecteur bien spécifique. En effet, la méthode mise au point permettant de sélectionner le virus recombinant tout en éliminant le virus parental, la construction d'un vecteur par sélection positive fera en sorte que celui-ci sera généré efficacement dans un délai relativement court par rapport aux autres méthodes de construction actuellement disponibles. C'est pour cette raison que la méthode développée a été utilisée dans le cadre d'une collaboration avec le centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine visant à déterminer que le gène *Sim1*, codant pour un facteur de transcription, jouait un rôle dans le mécanisme de faim et satiété (227).

*Sim1* est exprimé de manière constitutive dans la région nucléaire paraventriculaire du cerveau (PVN), de plus cette région est aussi impliquée dans le contrôle de la balance

énergétique en régulant à la fois l'apport calorique et les dépenses énergétiques (94). Pour déterminer si *Sim1* joue un rôle dans le mécanisme de faim et satiété, nous avons utilisé la sélection positive pour créer 2 adénovirus recombinants. Un premier qui exprime *Sim1* conjugué à un IRES, permettant ainsi une expression concomitante de la GFP. Le second adénovirus recombinant a été construit pour exprimer la RFP sous le contrôle d'un promoteur CMV et un ARN avec une structure en épingle à cheveu (shRNA) dirigé contre *Sim1* sous le contrôle d'un promoteur H1 de l'ARN polymérase III. Par la suite, on a procédé à une amplification des vecteurs ainsi construits pour tester s'ils étaient fonctionnels pour moduler l'expression de *Sim1*.

Il a été montré que l'infection de cellules 293 par l'Ad-*Sim1* était apte à produire une quantité abondante de cette protéine (figure 27a). Dans le cas de la co-infection conjointe de cellules 293 par le virus Ad-*Sim1* et Ad-shRNA-*Sim1*, le niveau de production de la protéine *Sim1* est réduit de 60% (figure 27b) alors que si le virus exprimant le shRNA est remplacé par un virus contrôle (vide), le niveau d'expression de *Sim1* demeure inchangé (figure 27c).



**Figure 27 : Répression de l'expression de la protéine *Sim1* avec un ARN interférence exprimé à partir d'un adénovirus recombinant. (A) La protéine *Sim1* est détectée dans les cellules infectées avec un Ad-*Sim1* mais pas avec l'Ad-contrôle (virus vide). (B) Les cellules sont infectées avec une MOI constante (5) d'Ad-*Sim1* et avec une MOI croissante (0, 10, 100) d'Ad-shRNA-*Sim1*. Avec une MOI de 10 d'Ad-shRNA-*Sim1*, l'expression de *Sim1* est réduite de 40%, avec une MOI de 100 l'expression est réduite de 60%. (C) La substitution de l'Ad-shRNA-*Sim1* par un Ad contrôle n'affecte pas l'expression de *Sim1*.**

Le promoteur CMV, utilisé pour exprimer *Sim1*, était beaucoup plus fort que l'expression du promoteur H1, utilisé pour exprimer le shRNA, il est normal de n'obtenir qu'une inhibition de 60% malgré un excès de 20 fois d'Ad-shRNA-*Sim1* par rapport à l'Ad-*Sim1*.

Ayant démontré la fonctionnalité des vecteurs adénoviraux construits, ceux-ci ont été amplifiés, leurs concentrations évaluées et ils ont envoyé à nos collaborateurs pour procéder aux expériences à être réalisées chez la souris. Il a ainsi pu être démontré qu'une injection de l'Ad-shRNA-*Sim1* dans le PVN des souris pouvait augmenter l'apport calorique jusqu'à 22%. À l'opposé, l'injection de l'Ad-*Sim1* a pu réduire l'apport calorique de 20%. L'expression de *Sim1* et du shRNA-*Sim1* a pu être aisément mesurée chez les souris traitées en mesurant les niveaux respectifs de GFP et de RFP.

Ces résultats suggèrent que Sim1 fait partie intégrante du mécanisme régulant la faim et satiété.

Cette collaboration a aussi permis de démontrer qu'il était possible non seulement de générer rapidement et efficacement une quantité suffisante d'Ad recombinants par sélection positive, mais qu'en plus l'expression ectopique de la PS ne compromettait pas l'utilisation de ces virus dans un modèle animal. Ces résultats ont aussi démontré que les Ad recombinants produits par sélection positive pouvaient être utilisés pour exprimer un shRNA à partir d'un promoteur de l'ARN polymérase III.

### **3.2 Optimisation d'une nouvelle lignée cellulaire pour la production de vecteurs adénoviraux délétés E1**

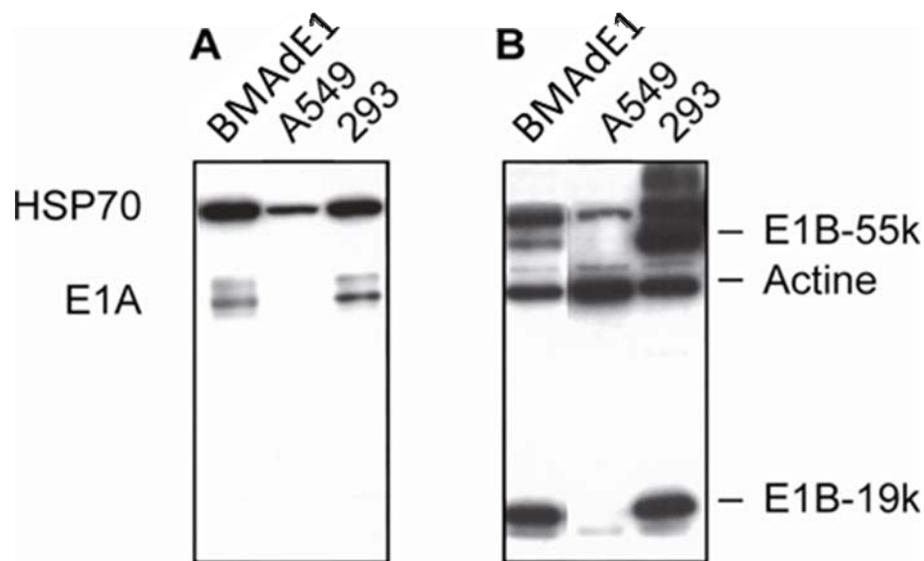
La construction d'un vecteur adénoviral de première génération complété, il reste toujours le problème de la production, principalement si le vecteur est destiné à être utilisé en grande quantité pour des essais *in vivo* ou pour la production de protéines recombinantes en bioréacteur. Idéalement, une lignée cellulaire utilisée pour la production à grande échelle de vecteurs adénoviraux de première génération doit avoir 3 qualités : 1-répliquer efficacement l'adénovirus, 2-ne pas produire de RCA, et 3-peut-être cultivée en suspension dans un milieu sans sérum.

#### **3.2.1 Problèmes associés à la lignée BMAdE1**

Telle qu'expliquée dans l'introduction, la lignée cellulaire BMAdE1 a été construite en introduisant une cassette d'expression de la région E1 à l'intérieur de cellules A549. Contrairement aux cellules 293, la région E1 introduite dans les BMAdE1 élimine les homologies avec les vecteurs adénoviraux si bien qu'il n'y a pas de production de RCA. Par contre, la production de vecteur de première génération dans les BMAdE1 est suboptimale, à peine de 15-30% du niveau de production des cellules

293. Bien que leur capacité à amplifier les adénovirus de première génération sans produire de RCA soit un atout majeur, la production des BMAdeE1 est tout simplement trop faible pour que cette lignée cellulaire se révèle utile pour la production à grande échelle de vecteur.

Pour tenter de trouver une explication à la faible production des BMAdeE1, nous avons décidé de vérifier dans quelle mesure cette lignée cellulaire pouvait exprimer les protéines E1A, E1B-19K et E1B-55K. La comparaison a été faite avec les cellules 293 qui sont capables de répliquer efficacement les adénovirus déletés de leur région E1 (figure 28).



**Figure 28 : Expressions des protéines associées à la région E1 chez les 293 et les BMAdeE1. Les cellules A549 représentent un contrôle négatif, les cellules 293 représentent un contrôle positif et les BMAdeE1 représentent la lignée A549 exprimant la région E1 de l'Ad. (A) Immunobavardage de type western contre la protéine de la région E1A, le western a été normalisé simultanément avec Hsp70. (B) Immonobavardage de type western contre les protéines E1B-55K et E1B-19K. Le western a été normalisé simultanément avec l'actine.**

Il n'y a pas de différence entre les cellules 293 et les BMAdeE1 au niveau de l'expression des protéines E1A et E1B-19K. Par contre, l'expression d'E1B-55K dans les BMAdeE1 est nettement inférieure aux cellules 293. E1B-55K joue plusieurs rôles critiques dans la

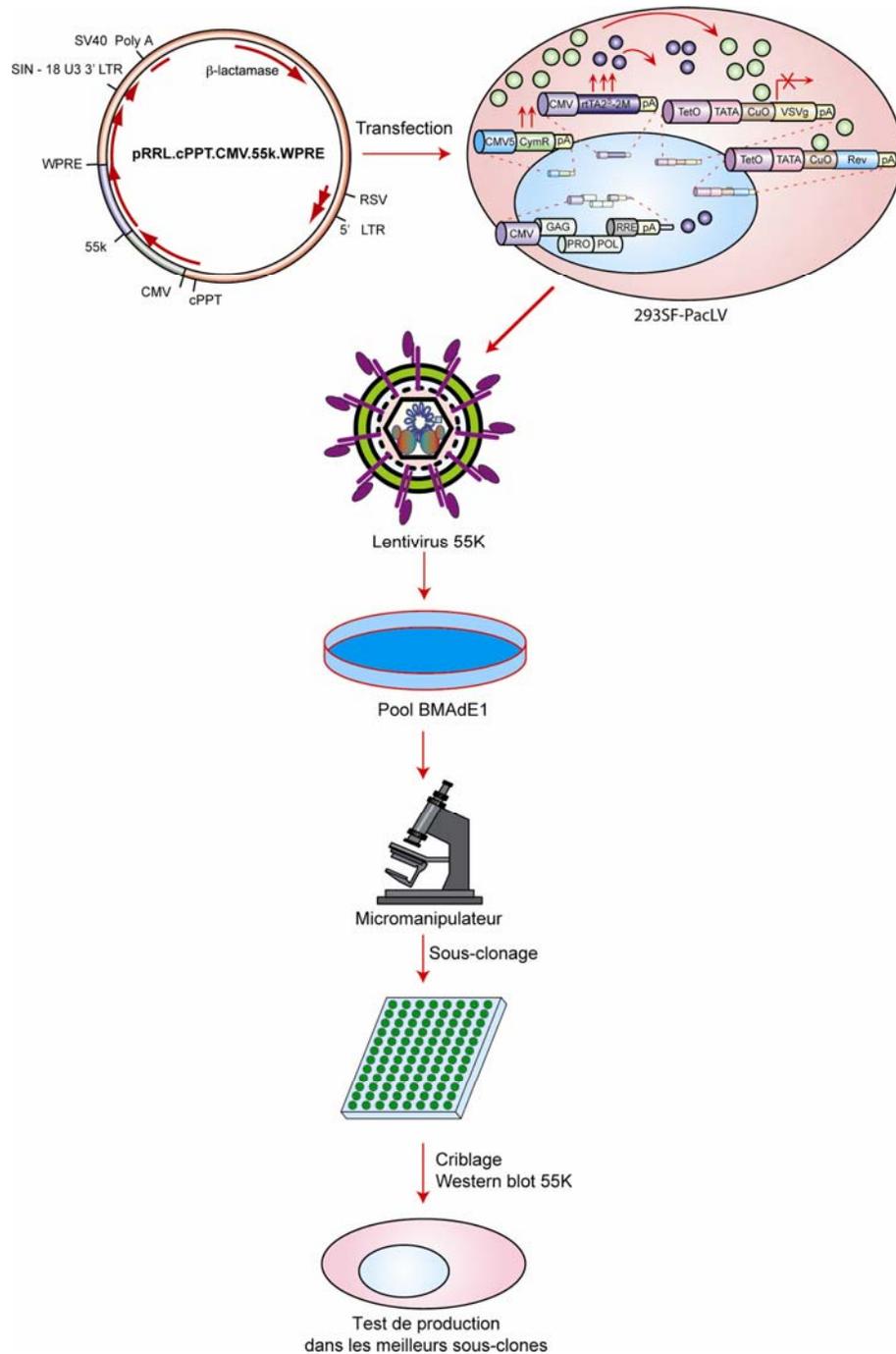
réplication de l'adénovirus (voir la section 1.4.3 de l'introduction), par conséquent il est logique de voir qu'une lignée cellulaire avec une expression inférieure d'E1B-55K par rapport aux cellules 293 possède aussi une production inférieure. Il est à noter que sur le western, Hsp70 a été utilisé comme contrôle pour s'assurer que la même quantité de protéine avait été chargée sur le gel. Si la bande correspondante à Hsp70 est plus faible chez les A549, ce n'est pas dû à une erreur de dosage, mais à cause de l'expression de la région E1. Il a été prouvé dans la littérature que la région E1 était capable de transactiver l'expression d'Hsp70 (153). Cette expression légèrement différente d'Hsp70 dans les A549 ne change rien à l'interprétation du western.

### **3.2.2 Transduction des BMADE1 avec un lentivirus exprimant E1B-55K**

Pour vérifier l'hypothèse voulant que la mauvaise production des BMADE1 soit associée à une expression insuffisante d'E1B-55K, nous avons construit un vecteur de transfert lentiviral exprimant cette protéine et une lignée d'encapsulation lentivirale a été transfectée avec ce plasmide pour créer un stock de lentivirus recombinant exprimant cette protéine. La transduction des BMADE1 avec ce lentivirus va permettre d'augmenter l'expression d'E1B-55K, ce qui pourrait augmenter leur capacité à amplifier les vecteurs adénoviraux de première génération.

Le vecteur lentiviral a été utilisé pour infecter les BMADE1 et ainsi générer un pool de cellules avec une expression potentiellement plus élevée d'E1B-55K que la lignée parentale. Ce pool a été sous-cloné pour trouver des cellules avec une expression accrue d'E1B-55K et par la suite, la production de vecteur de première génération a été testée pour chacun des sous-clones (stratégie résumée à la figure 29).

La séquence utilisée pour exprimer la protéine E1B-55K ne contient aucune homologie avec les vecteurs adénoviraux de première génération. Comme il a déjà été prouvé que les BMADE1 ne généraient pas de RCA (61), on s'assure ainsi que les sous-clones dérivés de ces cellules conserveront cette propriété.

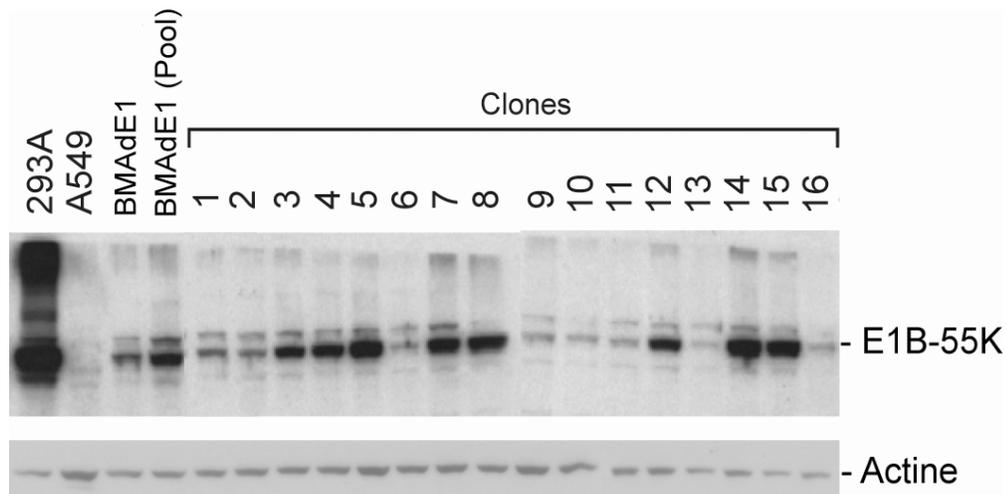


**Figure 29 : Construction d'une nouvelle lignée cellulaire à partir des BMAde1. Un vecteur lentiviral est transfecté dans la lignée de production 293SF-PacLV (20) ce qui permet de produire un lentivirus exprimant E1B-55K. Ce virus a été utilisé pour transduire les BMAde1 créant ainsi un pool qui sera sous-cloné avec un micromanipulateur. Parmi les sous-clones, on cherchera ceux exprimant le plus de E1B-55K pour vérifier si leur production d'adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$  est plus robuste.**

Un micromanipulateur, permettant de sélectionner individuellement des cellules, a été utilisé pour isoler 48 sous-clones à partir du pool BMAdeE1 transduit avec le lentivirus E1B-55K. Chacun de ces clones a été ensemencé dans une plaque 96 puits. De ces 48 sous-clones, 16 étaient viables et ont pu être cultivés pour procéder à leur caractérisation. Le criblage a donc été effectué en quantifiant l'expression d'E1B-55K pour trouver les sous-clones qui auront été en mesure d'augmenter leur niveau d'E1B-55K grâce à la transduction lentivirale. Il est à noter que la séquence codante d'E1B-55K introduite dans les BMAdeE1 ne contient pas d'homologie avec les vecteurs adénoviraux de première génération, ce qui garantit qu'aucun RCA ne sera produit.

### 3.2.3 Criblage des sous-clones

Un immunobavardage de type western contre la protéine E1B-55K a été effectué pour trouver des cellules exprimant cette protéine en quantité plus importante que la lignée parentale (figure 30).

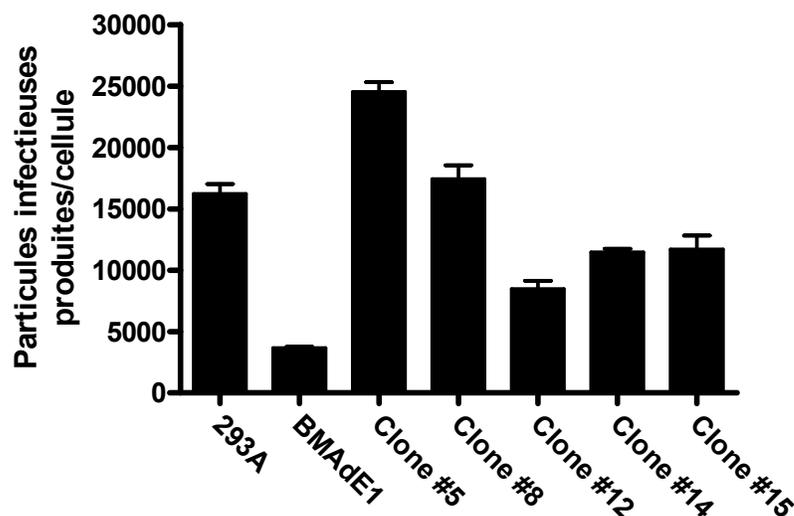


**Figure 30 : Niveau d'expression d'E1B-55K dans les différents clones.** L'immunobavardage de type western est dirigé contre la protéine E1B-55K. Les cellules 293 et A549 sont respectivement les contrôles positifs et négatifs. BMAdeE1 est la lignée parentale transduite avec le lentivirus et le pool est le résultat de cette transduction. Un contrôle d'actine a été utilisé pour s'assurer que la même quantité de protéine avait été chargée sur le gel.

La comparaison du pool avec la lignée parentale confirme que le vecteur lentiviral a fait son travail, l'expression d'E1B-55K ayant été substantiellement augmentée. Par contre, on est encore bien en deçà du niveau observable dans les cellules 293. Au niveau des sous-clones, on peut voir une expression très variée d'E1B-55K. Si quelques clones ne semblent pas faire mieux que le parent, les clones 3, 4, 5, 7, 8, 12, 14, et 15 ont un niveau d'expression supérieur au pool mais encore inférieur aux cellules 293. À l'exception des clones 3, 4 et 7, qui proliféraient trop lentement pour être utilisés dans de futures expériences, tous les clones montrant une meilleure expression d'E1B-55K ont été testés pour vérifier si leur production virale a été augmentée.

#### **3.2.4 Réplication des adénovirus de première génération dans les clones sélectionnés**

Les propriétés répliquatives de nos clones ont été testées en utilisant un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$ . Le choix de cet adénovirus a été motivé par le fait que l'expression d'un transgène par un adénovirus de première génération peut affecter sa réplication, c'est le cas par exemple pour les adénovirus exprimant la GFP. La première caractérisation s'est faite en quantifiant le nombre de particules infectieuses produites par nos clones (figure 31).



**Figure 31 : Particules infectieuses produites par une infection avec un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$ . Le nombre de particules infectieuses est mesuré par la formation, sur 2 semaines, de plages de lyse sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose. Tous les clones permettent une réplication statistiquement différente du contrôle BMAdE1 (test de student, valeur de  $p$  de 0,05)**

Tous les clones ont une production substantiellement supérieure aux BMAdE1. Sachant que tous les clones utilisés dans cette expérience produisent plus d'E1B-55K que la lignée parentale, ce résultat confirme que la production insuffisante de cette protéine était à l'origine du faible niveau de réplication des adénovirus de première génération chez les BMAdE1. La comparaison avec les cellules 293 est aussi intéressante. Les 293 sont considérées comme les cellules les plus efficaces quand à l'amplification des adénovirus de première génération, il est donc surprenant de voir que les clones 5 et 8 ont une production capable de rivaliser, sinon de surpasser, ces dernières. Sachant que ces 2 clones expriment moins d'E1B-55K que les 293, on peut donc conclure que soit les 293 expriment cette protéine en excès ou encore que les capacités répliquatives intrinsèques aux clones 5 et 8 leur permettent de compenser pour leur expression plus faible d'E1B-55K.

Si tous les clones se montrent supérieurs à la lignée parentale, une variation clonale est tout de même observable. Les clones 5, 8, 14 et 15 ont tous une expression similaire d'E1B-55K, pourtant seuls les clones 5 et 8 se détachent du lot. C'est une

autre indication que si le niveau d'expression d'E1B-55K est important pour assurer une répllication optimale du virus, chacun des clones possède une capacité intrinsèque à répliquer un Ad  $\Delta E1\Delta E3$  qui est indépendante de son expression d'E1B-55K. Par contre, un seuil minimum d'E1B-55K doit être exprimé pour que les meilleures propriétés répliquatives d'un clone puissent s'exprimer. Par exemple, dans la série de clones analysée, le 12 est celui exprimant le moins d'E1B-55K, c'est aussi le clone le moins efficace. Mais la capacité intrinsèque de chacun des clones à pouvoir répliquer un Ad  $\Delta E1\Delta E3$  indépendamment de l'expression d'E1B-55K fait en sorte qu'il n'est pas possible de corréler directement le niveau d'expression d'E1B-55K et la répllication du virus.

Les propriétés répliquatives de nos différents clones ont aussi été vérifiées en quantifiant le nombre de particules physiques produites suite à une infection avec un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$  (figure 32).

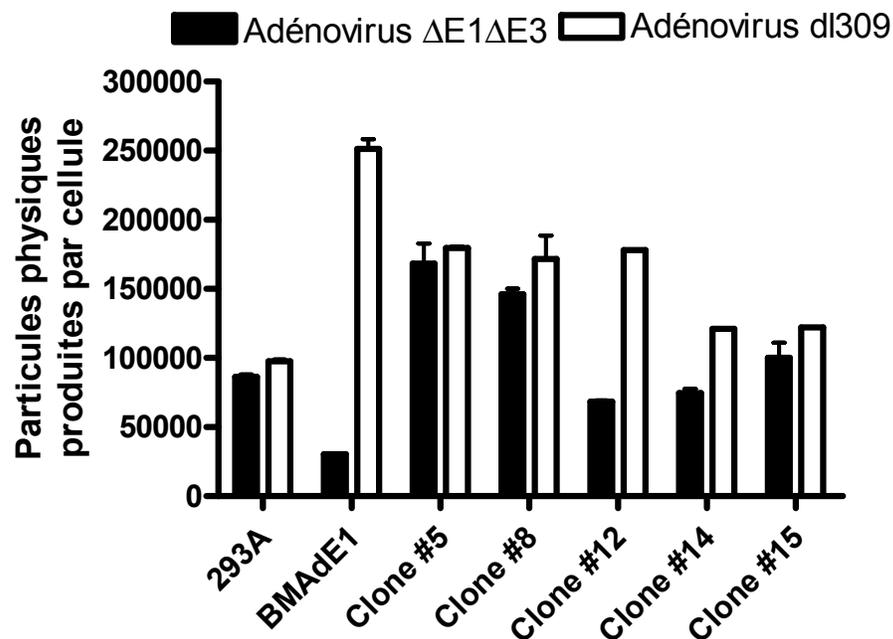
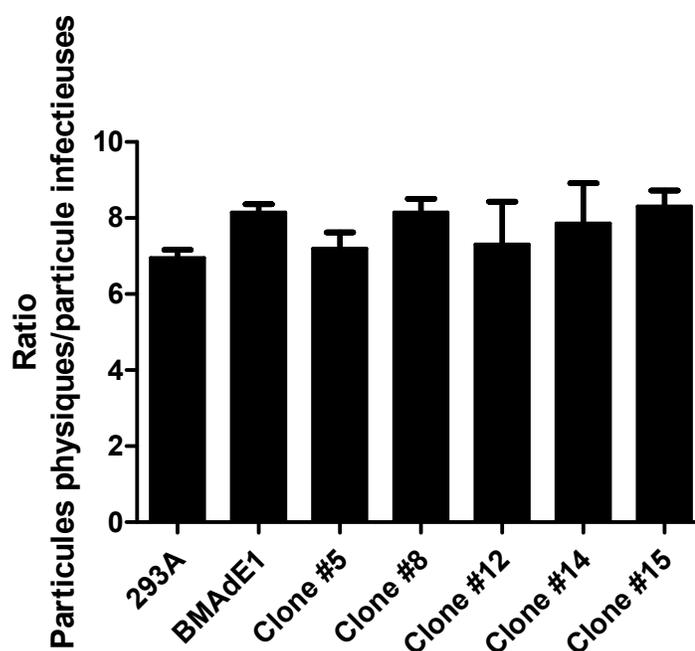


Figure 32 : Particules physiques produites par une infection avec un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$  et un adénovirus sauvage (dl309). Le nombre de particules physique est mesuré par « HPLC ».

Même si le nombre de particules physiques produites lors d'une infection adénovirale est en moyenne 7,8 fois plus grand que le nombre de particules infectieuses (figure 33), les résultats mesurés en particules physiques corroborent parfaitement ceux obtenus avec les particules infectieuses. Étant donné que le titrage des particules physiques par « HPLC » est moins long et fastidieux que le titrage par un « essai de plages de lyse » et comme les résultats sont équivalents, dans les prochaines expériences le titrage se fera par la quantification de particules physiques.



**Figure 33 : Ratio des particules adénovirales physiques et infectieuses produites lors d'une infection. Un stock d'AdΔE1ΔE3 a été amplifié dans différentes lignées cellulaires pour ensuite subir un titrage par un « essai de plages de lyse » durant deux semaines (particules infectieuses) et par HPLC (particules physiques).**

Pour vérifier si nos clones ont atteint leur potentiel maximum de réplication en ce qui a trait à l'expression d'E1BB-55K, nous avons vérifié la production adénovirale découlant d'une infection avec un virus sauvage dl309 (figure 32). Le virus dl309 exprime toutes les protéines nécessaires à sa réplication, y compris E1B-55K. L'utilisation de ce virus permet de mesurer la réplication intrinsèque indépendamment de l'expression d'E1. Comme on pouvait s'y attendre, le virus dl309 se réplique

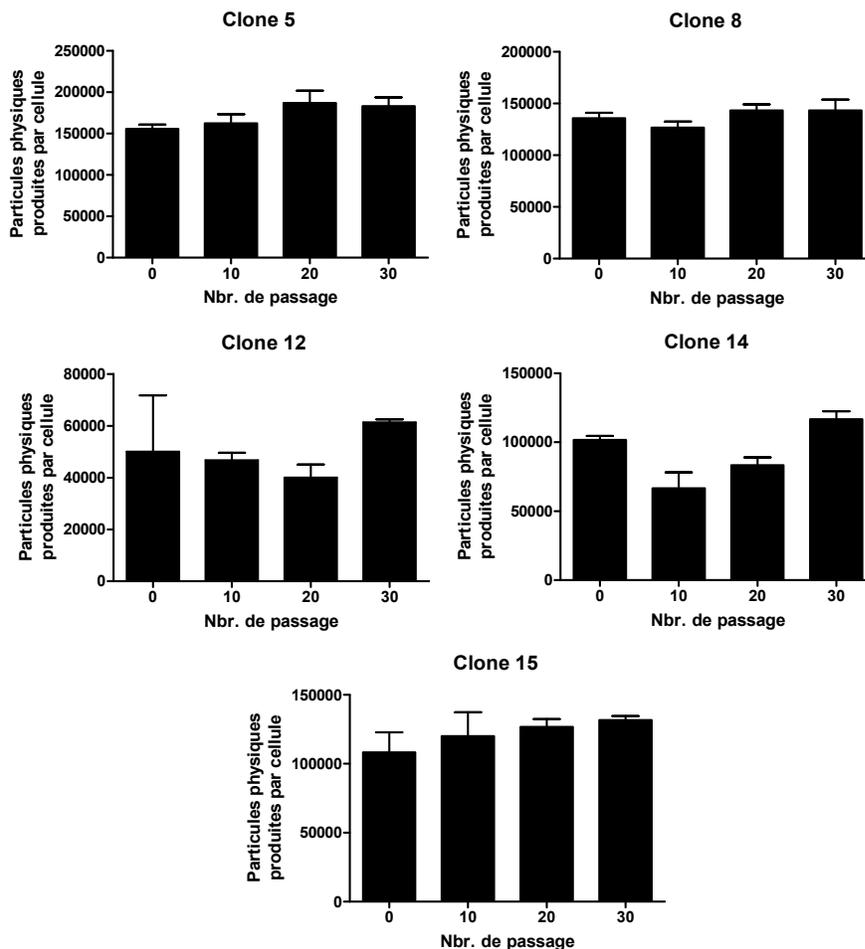
beaucoup mieux dans les BMA $\Delta$ E1 que le virus  $\Delta$ E1 $\Delta$ E3, un résultat logique si l'on tient compte de la faible production d'E1B-55K dans cette lignée cellulaire. Le virus dl309 étant capable d'exprimer E1B-55K, il peut combler la carence présente au niveau de la cellule et se répliquer normalement. À l'exception du clone 12 et de la lignée BMA $\Delta$ E1, tous les autres clones, y compris les cellules 293, ont une répllication semblable du virus sauvage et du virus  $\Delta$ E1 $\Delta$ E3. La capacité à répliquer de manière identique un virus sauvage et un virus  $\Delta$ E1 $\Delta$ E3 nous indique qu'une expression supérieure d'E1B-55K, ou de n'importe quelles autres protéines de la région E1 chez ces cellules ne pourrait pas augmenter la répllication d'un adénovirus de première génération. Autrement dit, la transduction avec le lentivirus 55K a permis de générer des cellules exprimant suffisamment d'E1B-55K. Même si l'on exprimait une quantité plus importante de cette protéine, la répllication d'un virus délété de sa région E1 ne serait pas augmentée. La seule exception est le clone 12 qui montre une répllication supérieure du virus dl309. Mais comme indiqué précédemment, le clone 12 est aussi celui qui exprime le moins d'E1B-55K. On peut donc conclure que pour une répllication normale d'un adénovirus  $\Delta$ E1 $\Delta$ E3, un seuil critique d'E1B-55K doit être exprimé. Ce seuil est atteint dans les cellules 293, et dans les clones 5, 8, 14 et 15. On peut donc finalement conclure que les cellules 293 expriment E1B-55K en excès.

L'infection avec le virus dl309 fait aussi ressortir la capacité intrinsèque d'une lignée cellulaire à répliquer un adénovirus indépendamment de l'expression de la région E1. La production de particule physique chez les BMA $\Delta$ E1 pour un adénovirus sauvage est substantiellement plus élevée que pour les cellules 293, nous indiquant que sans égard à l'expression de la région E1, le potentiel de répllication des BMA $\Delta$ E1 surpasse celui des cellules 293. La même chose est aussi vraie pour les clones 5, 8 et 12. Il faut bien réaliser qu'une fois que le niveau d'expression des protéines E1 a été optimisé chez une cellule permissive, ce qui influencera la répllication sera le « potentiel intrinsèque » de la cellule. La répllication des adénovirus de première génération n'est pas qu'une affaire d'expression d'E1A, E1B-19K et E1B-55K : l'adénovirus a besoin de détourner et d'utiliser de nombreux facteurs cellulaires pour pouvoir se répliquer. On peut

supposer que dans la lignée BMAde1, l'adénovirus est en mesure d'interagir plus efficacement avec les différents facteurs cellulaires pour de créer un environnement plus propice à sa réplication que dans les cellules 293.

### 3.2.5 Stabilité des sous-clones de BMAde1

La stabilité de l'expression d'E1B-55K a aussi été vérifiée en effectuant un test de production sur des cellules à différents passages (figure 34).

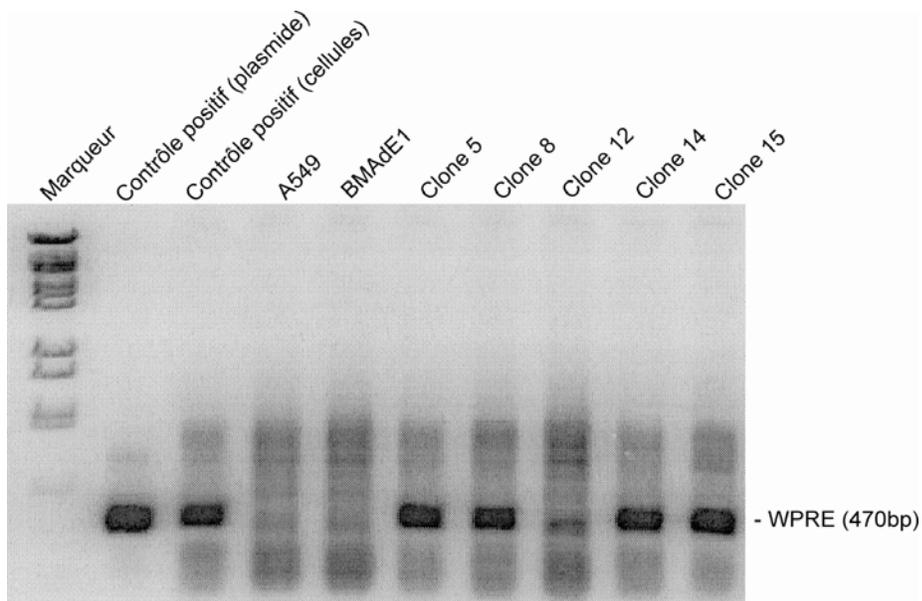


**Figure 34 : Stabilité des sous-clones BMAde1 transduit avec le vecteur lentiviral E1B-55K. Les clones pris aux passages 0, 10, 20 et 30 ont été infectés avec un AdΔE1ΔE3 et la concentration de la progéniture virale produite a été déterminée par « HPLC ». Les sous-clones ont été passés 2 fois par semaine.**

La production étant la même qu'au premier passage, on a pu conclure que l'expression était stable, c'est-à-dire qu'elle ne diminuerait pas dans le temps par une sélection des cellules exprimant moins d'E1B-55K.

### **3.2.6 Confirmation de la transduction par le vecteur lentiviral**

La meilleure expression d'E1B-55K dans les clones sélectionnés peut être attribuable à la transduction avec le vecteur lentiviral, mais il est toujours possible que cette dernière soit causée par une simple variation clonale, c'est-à-dire par une sélection de clones exprimant naturellement plus d'E1B-55K. Pour nous assurer que l'expression d'E1B-55K a bel et bien été augmentée par la transduction lentivirale, nous avons fait un PCR sur la séquence WPRE à partir de l'ADN génomique des clones. La principale propriété des vecteurs lentiviraux est leur capacité de s'intégrer dans le génome des cellules qu'ils transduisent. Le « WPRE » (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) est une séquence retrouvée dans le vecteur lentiviral qui permet d'augmenter l'expression du transgène tout en servant de site de polyadénylation (240). Cette séquence a donc été intégrée dans le génome de la cellule transduite par le lentivirus et il sera possible de la détecter par PCR (figure 35).



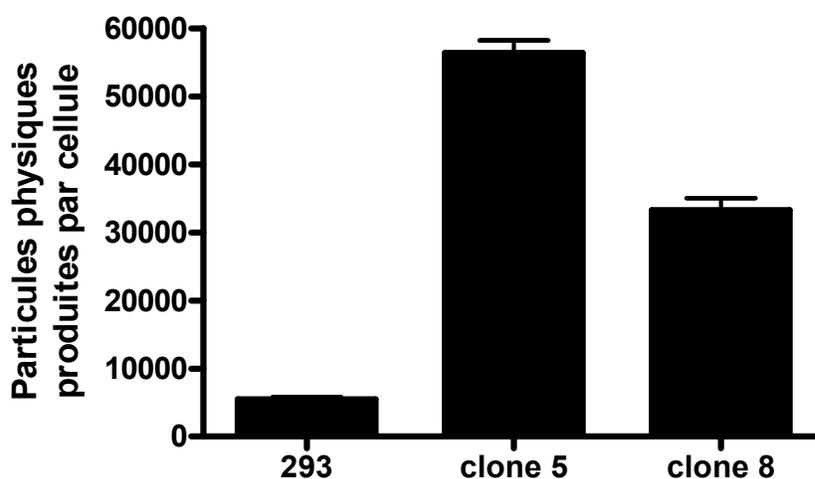
**Figure 35 : PCR pour la détection de la séquence WPRE fait à partir de l'ADN génomique des clones sélectionnés. Deux contrôles positifs sont utilisés : un plasmide lentiviral et une lignée cellulaire possédant uniquement une copie du WPRE dans son génome. Les contrôles négatifs sont les BMAde1 et les A549 qui ont servi à la construction des BMAde1.**

La séquence WPRE est aisément détectable dans tous les clones sélectionnés sauf pour le clone 12. Chez ce dernier, une bande est observable, mais elle est d'intensité moindre et sa taille est légèrement inférieure. Ce résultat indique que le clone 12 n'a pas été transduit par un lentivirus. Rappelons que ce clone était aussi celui exprimant le moins d'E1B-55K parmi les clones testés pour leur capacité à répliquer un adénovirus de première génération. Pour les autres clones, on peut conclure que l'expression supérieure d'E1B-55K par rapport à la lignée parentale est attribuable à la transduction avec le lentivirus.

### **3.2.7 Production d'un adénovirus recombinant exprimant un gène pro-apoptotique**

L'expression de FasL dans une cellule peut rapidement induire l'apoptose par l'activation de la caspase 8 (155). Par conséquent, la production d'un adénovirus recombinant exprimant le FasL sera une tâche ardue étant donné la capacité de ce virus à

provoquer l'apoptose des cellules avant la complétion du cycle de réplication. Notre groupe a déjà démontré que les cellules 293 exprimaient une plus grande quantité de caspase 8 que les cellules A549 ayant servi à la construction de BMAde1 (résultat non publié). En exprimant moins de caspase 8 que les cellules 293, nos 2 meilleurs clones dérivés des BMAde1 sont moins susceptibles d'entrer en apoptose lorsqu'ils sont infectés par un adénovirus exprimant le FasL et par conséquent ils permettent une meilleure réplication du virus (figure 36).



**Figure 36 : Production de particules physiques suite à une infection avec un adénovirus exprimant le FasL. La concentration est obtenue par « HPLC ».**

La différence de production entre nos 2 meilleurs clones et les 293 est considérable. Le clone 5 a une production 10 fois supérieure au 293 lorsque vient le temps d'amplifier un adénovirus FasL alors cette différence n'est que de 80% pour un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$  (figure 32). Quoique moins spectaculaire, le résultat avec le clone 8 pointe aussi dans la même direction. La capacité du clone 5 à pouvoir amplifier facilement un adénovirus exprimant le FasL signifie que la production de certains adénovirus recombinants exprimant des gènes pro-apoptotiques activant la caspase 8 sera désormais une tâche plus efficace.

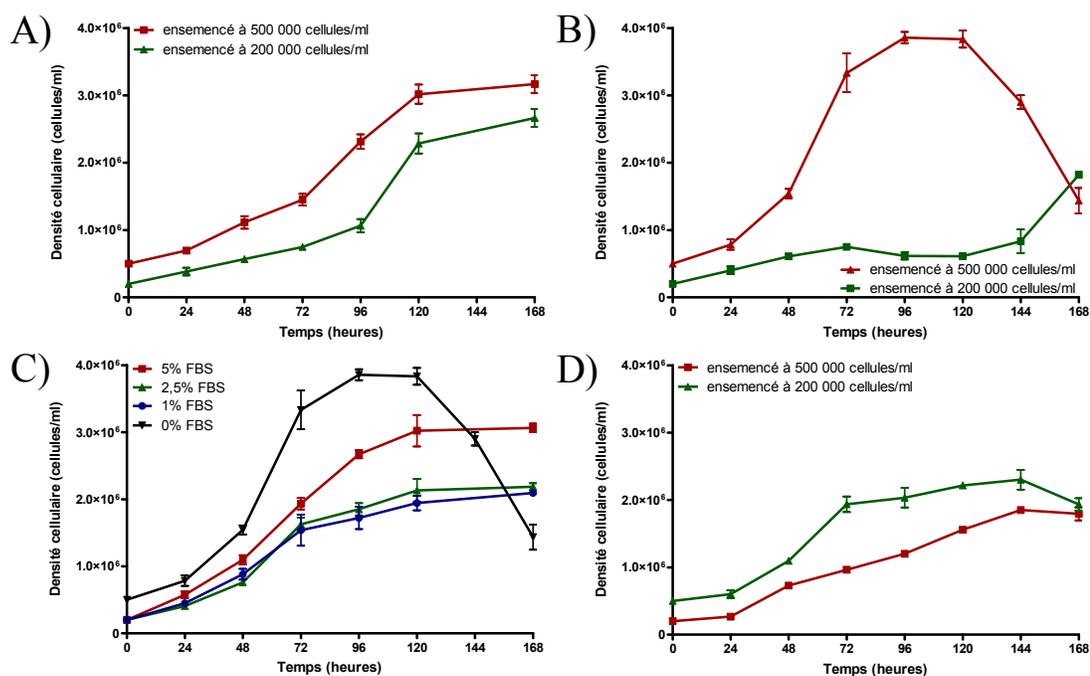
### 3.2.8 Adaptation à la culture en suspension sans sérum

Bien que les clones 5 et 8 se sont montrés capables de produire plus efficacement un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$  que les cellules 293, et ce, sans générer de RCA, ces clones doivent absolument être adaptés à la culture en suspension sans sérum pour qu'ils soient considérés comme des outils pouvant être utile pour la production à grande échelle.

L'adaptation à la suspension, réalisée avec les clones 5 et 8, s'est révélée relativement longue et ardue. Après plus de 10 passages de culture en suspension, les cellules formaient systématiquement des agrégats et suivant la formation de ces agrégats, la mortalité cellulaire excédait 90%. Pour résoudre ce problème, nous avons fait passer la vitesse de rotation de l'agitateur orbital de 50 à 80, 100 et 150 rpm. À 80 rpm, la formation des agrégats était toujours un problème après 10 passages. Aux vitesses supérieures, ce problème disparaissait, mais les forces de friction associées à ces hautes vitesses faisaient en sorte que la viabilité cellulaire n'excédait pas les 70%. Pour augmenter la viabilité cellulaire aux vitesses d'incubation supérieures à 100 rpm, du pluronique a été ajouté au milieu de culture. Après de nombreuses tentatives, nous avons été en mesure d'ainsi adapter le clone 5 à la suspension en utilisant un milieu additionné de pluronique et un agitateur à 100 rpm. Par contre, nous avons été incapables de trouver des conditions permettant une adaptation du clone 8 à la culture en suspension.

Pour l'étape suivante, l'adaptation à la culture sans sérum, nous avons donc utilisé le clone 5. La concentration de sérum a été progressivement diminuée de 5% à 1% en l'espace de deux mois. Lorsque le clone a été cultivé pour la toute première fois dans un milieu avec 0% de sérum, la majorité des cellules sont mortes et celles qui ont pu survivre au sevrage croissaient très lentement. En fait, la croissance du clone adapté à la suspension était si médiocre qu'il était pratiquement inutilisable. Nous avons donc décidé de reprendre le processus d'adaptation. Comme pour la fois précédente, en l'espace de 2 mois, la quantité de sérum a été diminuée progressivement de 5% à 1%.

Par contre, lors de l'étape suivante, au lieu d'utiliser un milieu sans sérum nous avons utilisé un milieu conditionné par notre clone (à 1% sérum) qui a été dilué à 50% par du milieu sans sérum. Durant 2 mois nous avons diminué progressivement de 50% à 0%. Une fois arrivé à 0% au bout de quelques passages un problème agrégation similaire à celui rencontré lors de l'adaptation des cultures en suspension a été rencontré. Le processus d'adaptation a donc été repris à partir de la dernière étape utilisant du milieu conditionné (avec un aliquot de cellules qui avait été congelé) en utilisant une vitesse d'agitation supérieure, mais contrairement à la fois précédente, cette solution n'a pas porté fruit. Le processus a donc été repris (à partir du même aliquot de cellules congelées) mais cette fois en additionnant le milieu de culture avec du dextran sulfate (233), ce qui a permis de résoudre définitivement ce problème nous permettant ainsi de compléter l'adaptation de notre clone à la culture en suspension sans sérum. La croissance du clone 5 en suspension milieux avec et sans sérum a été évaluée sur une période de 7 jours (figure 37a et 37b).



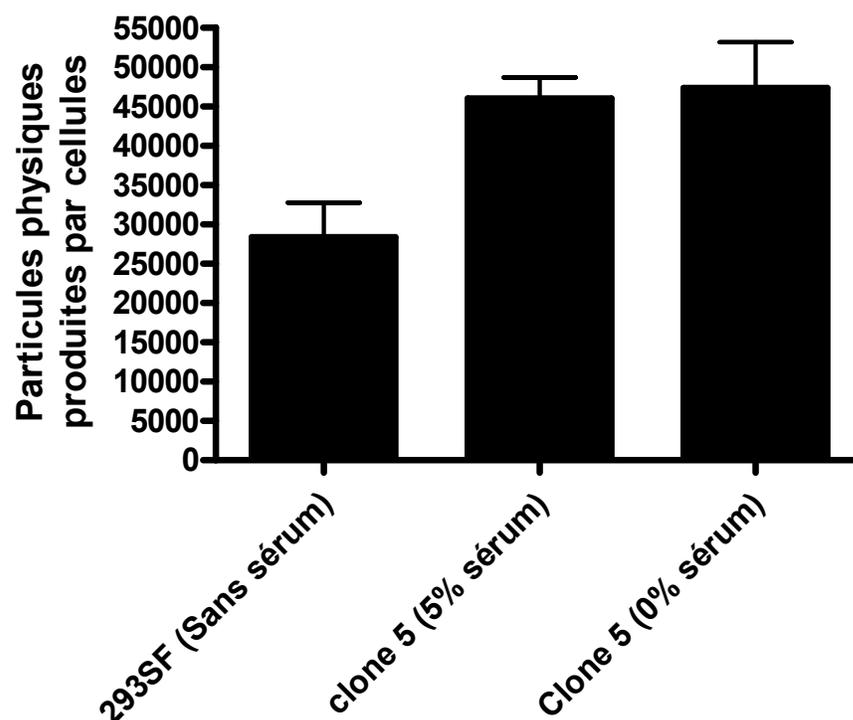
**Figure 37 : Croissance des cellules 293SF, BMAdE1 et du clone #5 en suspension. Courbe de croissance pour (A) le clone 5 avec 5% de sérum, (B) le clone 5 sans sérum, (C) Les clones lors de leur phase d'adaptation à 5%, 2,5%, 1% et 0% sérum ensemencé à 200 000 cellules/ml, et (D) la ligné 293SF sans sérum. Les cellules viables ont été comptées en triplicata durant 7 jours.**

Lorsque le clone 5 est ensemencé à une concentration 500 000 cellules/ml dans un milieu sans sérum, les cellules doublent en 24 heures durant leur phase exponentielle et la densité cellulaire atteint un facteur de multiplication entre 6 et 8. Par contre, lorsque la culture est démarrée avec une dilution de 200 000 cellules/ml, la prolifération en milieu sans sérum est beaucoup plus faible, ce phénomène n'est pas observable avec un milieu contenant 5% de sérum. Avec 5% sérum, la densité cellulaire augmente durant les 5 premiers jours, durant lesquels leur temps de doublement excède 30 heures. Ensuite, la densité se stabilise alors que dans un milieu sans sérum, celle-ci décroît rapidement après 120 heures de culture. Une courbe de croissance a aussi été réalisée avec des cellules prises à chacune de leur phase d'adaptation à la culture sans sérum (figure 37c). Si les cellules adaptées à un milieu avec 2,5% et 1% de sérum ont une croissance inférieure aux cellules cultivées avec 5% sérum, le clone adapté au milieu sans sérum a une croissance supérieure au clone de départ durant les 120 premières

heures. Ce résultat nous indique que la longue période d'adaptation à la culture en milieu sans sérum a permis une optimisation de la croissance dans de pareilles conditions. Lorsque l'on compare la croissance du clone 5 en milieu sans sérum avec des cellules 293SF, des cellules 293 adaptées à la culture en suspension sans sérum (33) (figure 37d), la prolifération de notre clone démarre plus rapidement et celui-ci peut atteindre une densité cellulaire supérieure; le facteur de multiplication des 293SF n'est que de 4. Le seul avantage des 293SF par rapport au clone 5 est d'être capable de maintenir une bonne viabilité cellulaire lorsqu'elles atteignent leur plateau. Somme toute, notre clone se montre capable d'être cultivé de manière efficace en suspension dans un milieu sans sérum.

### **3.2.9 Production de vecteurs de première génération en suspension dans un milieu sans sérum**

Le clone 5 ayant été adapté à la culture en suspension sans sérum, l'étape suivante est de vérifier dans quelle mesure ce clone peut produire efficacement un adénovirus de première génération comparativement à la lignée cellulaire 293SF qui est couramment utilisée pour la production à grande échelle (figure 38).



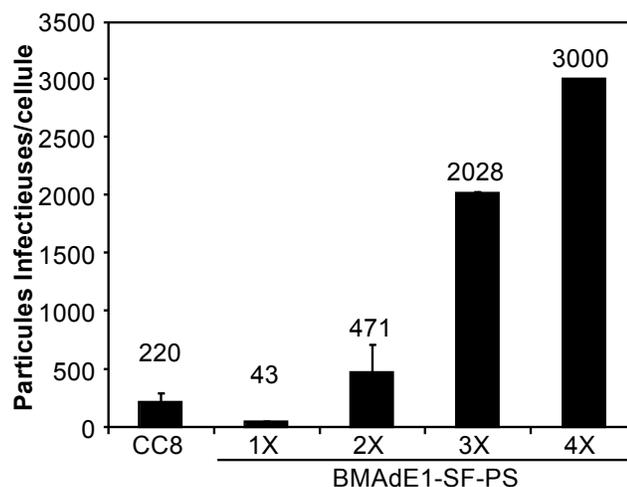
**Figure 38 : Production de particules physiques dans une culture en suspension suite à une infection par d'un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$ . La concentration est obtenue par « HPLC ».**

Le niveau de production du clone 5 étant le même pour la culture en suspension avec et sans sérum, on peut donc conclure que l'utilisation d'un milieu sans sérum n'affecte pas la capacité de notre clone à amplifier un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$ . Notre clone se montre aussi supérieur à la lignée cellulaire 293SF qui peut être considérée comme un standard de production à grande échelle pour les adénovirus de première génération. Comme c'était le cas avec les cellules adhérentes, le clone 5 a une meilleure production que son équivalent 293, dans le cas présent, le clone 5 produit 62% plus de particules physiques que les 293SF (17 667 particules de plus par cellules). Donc, non seulement notre clone a pu être adapté pour la culture en suspension sans sérum, mais dans ces conditions, le clone 5 se comporte mieux que la lignée cellulaire qui est considérée comme le standard de production.

### 3.2.10 Production d'un adénovirus $\Delta$ PS en suspension dans un milieu sans sérum

L'Ad $\Delta$ PS était un réactif fréquemment utilisé dans notre laboratoire, la lignée adaptée à la culture en suspension sans sérum a été modifiée pour exprimer la PS adénovirale de manière à avoir une lignée production pouvant amplifier efficacement ce type de vecteur.

Pour ce faire, vecteur de transfert lentiviral exprimant la PS sous le contrôle d'un promoteur inductible au cumate a été construit. Ce vecteur a ensuite été transfecté dans une lignée d'encapsidation pour produire un stock de lentivirus capable d'exprimer la PS et ce stock a été concentré de manière à pouvoir transduire efficacement le clone 5 adapté à la culture en suspension sans sérum. Le clone 5 a donc été infecté à 4 reprises, de manière consécutive, avec le lentivirus recombinant, générant ainsi 4 lignées cellulaires (la première a été transduite à une seule reprise alors que la 4<sup>e</sup> a subi 4 transductions avec le vecteur lentiviral). Pour démontrer la capacité de ces nouvelles lignées cellulaires (BMAde1-SF-PS 1x, 2x, 3x, 4x) à produire un Ad $\Delta$ PS, chacune des 4 lignées a été infectée avec un Ad $\Delta$ PS à une MOI de 50. Trois jours après l'infection, le nombre de particules infectieuses produit a été mesuré pour déterminer leur capacité à répliquer efficacement un Ad $\Delta$ PS (figure 39).



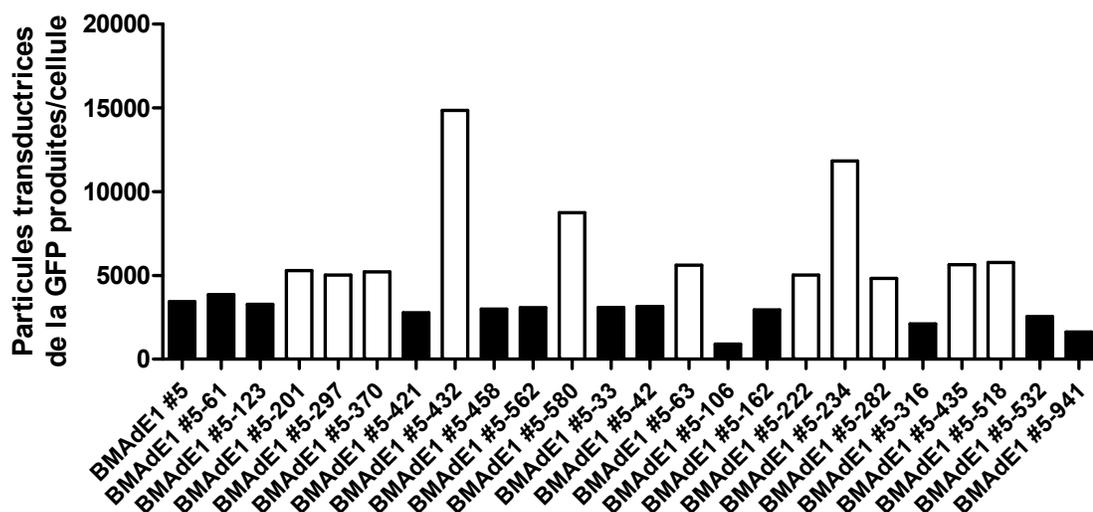
**Figure 39 : Progéniture virale du clone #5, exprimant la PS, produite suite à une infection avec un Ad $\Delta$ PS. Les lignées BMAde1-SF-PS générées par une transduction d'un lentivirus PS du clone #5. La lignée 1x a été transduite à une seule reprise alors que la lignée 4X a fait l'objet de 4 transductions. La lignée CC8, exprimant déjà la PS adénovirale, est utilisée comme contrôle positif. La lignée contrôle est en mesure de produire 220 particules infectieuses par cellule alors que la lignée 4x 14 fois plus efficace.**

Si la première transduction ne s'est pas soldée par un gain de production, les transductions 2,3 et 4 ont permis d'accroître de manière très importante la production de l'Ad $\Delta$ PS. Ainsi, la lignée ayant subi 4 transductions produit 14 fois plus de particules infectieuses que le contrôle CC8, une lignée exprimant la PS et qui était couramment utilisée pour amplifier un Ad $\Delta$ PS. Notez que le gain entre la lignée 3x et 4x est moins grand que celui entre la lignée 2x et 3x, ce résultat suggère que dans les premières transductions, le gain d'expression de la PS se traduisait par une forte augmentation de la production de particules virales. À partir de la transduction 3x, on peut supposer que la PS commence à être exprimée en quantité suffisante pour permettre une réplication normale du virus ce qui fait en sorte que dans la lignée 4x le gain reste relativement modeste par rapport à la lignée 3x.

### **3.2.11 Sous-clonage du clone #5 pour améliorer les niveaux de production de vecteurs de première génération en suspension dans un milieu sans sérum**

Pour améliorer le niveau de production du clone #5 adapté à la culture en suspension sans sérum, nous avons décidé de procéder à son sous-clonage pour déterminer s'il était possible d'isoler un clone capable d'amplifier plus efficacement un vecteur adénoviral de première génération. Pour ce faire, nous avons eu recours à l'utilisation d'un micromanipulateur qui a permis de sélectionner individuellement des cellules à partir d'un pool constitué du clone #5. Nous avons donc sélectionné 192 clones avec le micromanipulateur qui ont étéensemencés dans 2 plaques de 96 puits. Des 192 clones ainsi sélectionnés, seulement 23 ont survécu au clonage et se sont divisés. Ces 23 clones ont donc été amplifiés et nous avons procédé à leur caractérisation pour déterminer s'il était possible d'isoler un sous-clone plus performant que le clone parental #5. Il est à noter que le clone #5, de même que les sous-clones adaptés à la suspension, peuvent être cultivés en condition adhérente.

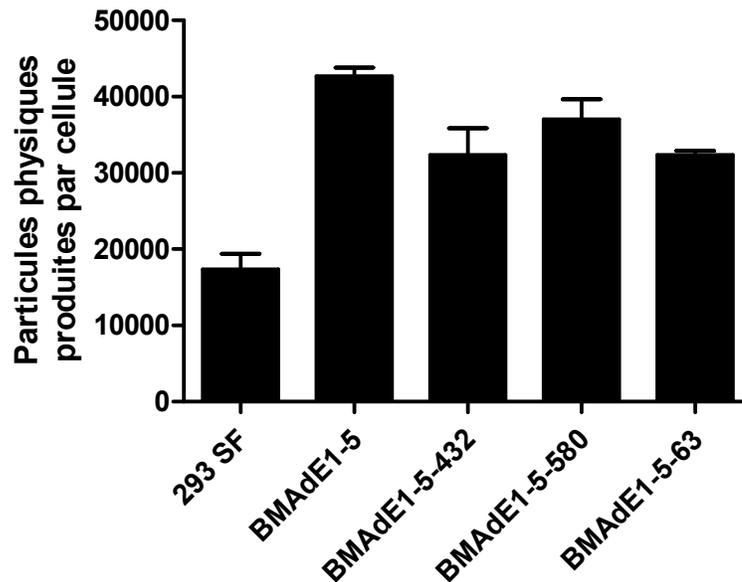
La première caractérisation a été réalisée en infectant chacun des clones, cultivés en condition adhérente, avec un Ad $\Delta$ E1 $\Delta$ E3 exprimant la GFP. Une fois l'infection complétée, la progéniture virale produite par chacun des 23 clones est récoltée et la concentration est déterminée (figure 40).



**Figure 40 : Progéniture virale produite par les sous-clones du clone #5. Chacune des lignées cellulaires est infectée avec un Ad $\Delta$ E1 $\Delta$ E3 exprimant la GFP. La progéniture virale ainsi produite est récoltée et diluée en série pour infecter des cellules 293. Vingt-quatre heures après l'infection, les cellules 293 sont récoltées, fixées à la paraformaldéhyde, et le nombre de cellules vertes pour chacune des dilutions est déterminé par cytométrie en flux. Basées sur le nombre de cellules vertes ainsi calculé, nous avons pu déterminer la concentration exprimée en particules transductrices de la GFP produites par cellule.**

Des 23 sous-clones isolés, 11 ont un niveau de production supérieur à la lignée parentale. Ces clones (indiqués en blanc sur la figure 40) ont donc été mis en culture en suspension dans un milieu sans sérum. Seulement les clones #5-432, #5-580 et #5-63 se sont adaptés à ce passage, les autres clones sélectionnés avaient tendance à former des agrégats et à avoir une viabilité en deçà du clone parental, nous avons donc décidé de les mettre de côté.

La production adénovirale des 3 sous-clones cultivés en suspension dans un milieu sans sérum a donc été comparée à la lignée parentale et au 293SF pour savoir dans quelle mesure les sous-clones isolés sont en mesure de produire plus efficacement un vecteur de première génération (figure 41).



**Figure 41 : Production de particules physiques des sous-clones du clone #5 dans une culture en suspension sans sérum suite à une infection par d'un adénovirus  $\Delta E1\Delta E3$ . La concentration est obtenue par « HPLC ».**

Aucun des sous-clones cultivés en suspension dans un milieu sans sérum n'est en mesure de surpasser la production du clone parental. Par contre, toutes les manipulations réalisées dans le cadre du sous-clonage du clone #5 nous donnent des informations importantes sur la stabilité de l'expression de la protéine E1B-55K. En effet, les clones #5-432, #5-580 et #5-63 ont tous été dérivés d'une cellule unique issue du clonage avec un micromanipulateur. Chacune de ces cellules uniques s'est divisée et a été gardée en culture durant plusieurs semaines et malgré tous, à la fin du processus, chacun des sous-clones a une production équivalente à la lignée parentale. Donc, malgré les très nombreuses divisions réalisées à partir d'une cellule unique, nos sous-clones n'ont pas perdu leur capacité de répliquer efficacement un vecteur adénoviral de première génération. Ce résultat nous donne une indication supplémentaire que l'expression de la protéine E1B-55K dans le clone 5 est très stable.

# **Section 4 :**

# **Discussion**

#### **4.1 Nouvelles approches pour une nouvelle ère**

Les récents développements dans le domaine de la génomique fonctionnelle, l'utilisation croissante de protéines recombinantes comme agents thérapeutiques et les innovations constantes dans le champ de la thérapie génique ont fait des vecteurs adénoviraux de première génération un point de convergence. Si les propriétés uniques de l'adénovirus confèrent à ce vecteur une place de choix dans ces différents champs d'applications, l'utilisation à grande échelle des adénovirus recombinants est compromise sur deux fronts: la construction et la production des vecteurs. Un développement technologique des vecteurs adénoviraux apparaît donc comme essentiel pour rendre plus efficaces ces deux processus. Premièrement, nous avons réalisé une réingénierie du vecteur de transfert pour permettre une construction plus efficace des vecteurs viraux. Deuxièmement, nous avons aussi travaillé sur la réingénierie des lignées cellulaires utilisées pour la production de vecteurs de première génération ainsi construits.

#### **4.2 Nouvelle approche de construction : la création de bibliothèques adénovirales par sélection positive**

Notre groupe ayant démontré qu'il était possible d'utiliser l'expression ectopique du gène de la PS pour construire des adénovirus recombinants, notre objectif a été de pousser plus loin le développement de ce système pour que ce dernier puisse être utilisé dans la construction de bibliothèques adénovirales par sélection positive. Ce travail de développement a été réalisé sur deux axes. Dans un premier temps, nous avons séparé l'expression du transgène et de la PS, ce qui donne au système une plus grande versatilité en permettant l'utilisation de promoteurs finement régulables pour exprimer un transgène qui pourrait s'avérer toxique pour les cellules et/ou l'adénovirus. Dans un deuxième temps, nous avons optimisé l'expression de la PS pour permettre de maximiser la diversité.

#### 4.2.1 L'optimisation de l'expression de la PS

La construction d'une cassette indépendante d'expression de la PS a été réalisée en clonant un segment d'ADN contenant un promoteur, la PS et le BGHpolyA dans le site AflII du plasmide de transfert. Ce travail nous a aussi permis d'optimiser l'expression ectopique du gène de la PS dans un adénovirus recombinant. Cette optimisation a été rendue essentielle à cause du phénomène de transcomplémentation observable lors d'une infection/transfection avec un Ad $\Delta$ PS et un vecteur de transfert exprimant la PS.

Prenons un cas où le promoteur utilisé pour exprimer la PS dans le plasmide de transfert serait relativement puissant. Lors de l'infection/transfection, la PS produite par le vecteur de transfert peut directement compléter l'Ad $\Delta$ PS qui ainsi peut terminer son cycle de réplication et produire une particule infectieuse sans avoir eu besoin de recombiner avec le plasmide de transfert. Ce genre de situation, où le virus parental peut proliférer au détriment du virus recombinant, affecte grandement la diversité de la librairie qui peut être générée par sélection positive. C'est d'ailleurs ce phénomène qui explique pourquoi la diversité des librairies était si faible dans nos travaux précédents (45) : les promoteurs utilisés pour exprimer la PS étaient trop forts.

À l'opposé, le promoteur servant à exprimer la PS ne doit pas être trop faible. La PS étant une protéine critique pour le bon déroulement du cycle réplcatif de l'adénovirus, un adénovirus recombinant ayant une expression trop faible de sa PS aura une réplication sous-optimale. À ce niveau, il serait contre-productif de vouloir contourner le problème de la transcomplémentation en affectant le potentiel réplcatif du virus. Il faut bien se rendre compte que si la librairie permet de mettre la main sur un élément intéressant, le virus portant cet élément devra par la suite être produit en grande quantité pour être caractérisé et utilisé dans des essais chez les animaux. Un adénovirus recombinant produit par sélection positive qui se révélerait difficile à amplifier ne serait pas d'une grande utilité.

On voit donc que l'expression de la PS doit être finement régulée dans le plasmide de transfert servant à la construction des bibliothèques adénovirales. C'est ce que nous avons réussi à faire en exprimant la PS avec le promoteur MLP: exprimer suffisamment de PS pour permettre une répllication normale des adénovirus produits par sélection positive tout en étant capables de minimiser le phénomène de transcomplémentation pour maximiser la diversité. Les de promoteurs légèrement plus faibles, comme tk TATA et Hsp70 TATA, ne produisaient pas assez de PS pour atteindre le seuil critique permettant une répllication normale de l'adénovirus. Le promoteur MLP est le promoteur naturel de la PS. Lors d'une infection adénovirale, ce promoteur est très peu actif dans la phase précoce du cycle, alors que dans la phase tardive son activité est multipliée par un facteur de 100 (193). Lors de l'infection/transfection, tant et aussi longtemps que la répllication de l'ADN viral n'a pas débuté, l'expression de la PS par le promoteur MLP est probablement plus faible qu'avec les promoteurs TR5 et TR6 utilisés dans les travaux précédents. Ce faisant, on minimise la transcomplémentation pour favoriser la diversité de la bibliothèque. Par contre, une fois la répllication accomplie, le promoteur MLP devient très actif et permet une expression suffisante de PS pour permettre une répllication normale du virus. Donc, le promoteur MLP, contrairement aux promoteurs TR5 et TR6, permet une répllication normale du virus sans trop affecter la diversité. Avec le promoteur MLP, nous avons été en mesure de trouver un compromis permettant de réconcilier deux objectifs opposés, soit la répllication virale et la diversité de la bibliothèque.

Par contre, même avec le promoteur MLP, la transcomplémentation est toujours présente : il s'agit d'un phénomène quasi inévitable dans la mesure où la PS exprimée par le plasmide de transfert sera toujours en mesure de permettre la répllication du virus parental. Mais l'utilisation d'un promoteur MLP rend ce phénomène gérable. Lors de la construction de bibliothèques adénovirales, on doit toujours passer par une étape où les clones viraux seront isolés en produisant des plaques de lyse sur des cellules 293. Or, le virus parental ne pouvant se répliquer sur les 293, il ne produira pas de plaques de lyse. Lors de l'étape de purification des clones viraux, il suffira de diluer suffisamment le virus recombinant qui a été produit par sélection positive pour s'assurer que des plaques

de lyse parfaitement isolées seront obtenues. Ainsi, on pourra aisément se débarrasser du virus parental. Dans le cas où la préparation virale ne serait pas assez diluée, on court le risque d'avoir une co-infection d'une cellule par un virus recombinant et un virus parental. En pareille circonstance, le virus recombinant peut servir de virus auxiliaire au virus parental et permettre sa réplication à l'intérieur de la plage de lyse. Lorsque cette plage de lyse sera récoltée, on traînera donc une contamination parentale. Dans les conditions d'infection/transfection utilisées, 40% des virus générés sont parentaux et 60% des virus sont répliatifs. Lors de la purification des plages de lyse, on obtient uniquement la concentration de virus répliatif. Si l'on augmente cette concentration de 40%, on obtiendra la concentration combinée de virus répliatif et de virus parental. Si cette concentration « totale » implique que le tapis cellulaire a été infecté avec une MOI inférieur à 1 lorsque l'agarose a été ajoutée sur les cellules, alors on peut considérer comme peu probable la possibilité de co-infection d'une cellule par un virus recombinant et parental.

#### **4.2.2 La diversité de la librairie**

La diversité a été définie comme le nombre de cellules devant être infectées/transfectées pour avoir un événement de recombinaison entre le virus parental et le vecteur de transfert. Autrement dit le nombre de cellules nécessaires pour générer un virus recombinant. Avec la construction pAdTR6-PS-IRES-GFP publiée précédemment (45), 312 cellules sont nécessaires pour générer un adénovirus recombinant. En optimisant l'expression de la PS, nous avons réduit ce nombre à 75 cellules pour avoir un adénovirus recombinant. À titre indicatif, une librairie d'ADNc typique de cellules de mammifères compte environ de  $3 \times 10^4$  à  $1.2 \times 10^5$  éléments différents (174). Pour construire une librairie adénovirale capable de représenter tous ces éléments avec le plasmide pAdTR6-PS-IRES-GFP, il faudrait faire une infection/transfection sur environ 25 millions de cellules, soit l'équivalent d'un pétri de 150 mm. Avec notre plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS), la construction de la même librairie nécessiterait une infection/transfection de 6 millions de cellules, soit un

simple pétri de 60 mm. Dans le cas d'une librairie de mutants, qui nécessite une diversité bien plus grande, de l'ordre de  $10^9$ - $10^{10}$  adénovirus recombinants, il faudrait faire l'infection/transfection sur environ 150 millions de cellules, un travail aisément réalisable en utilisant une culture en suspension. Des cellules 293 adaptées à la suspension peuvent être transfectées à une densité optimale de 2 millions de cellules par ml de culture (139), donc la librairie serait réalisable en utilisant une culture de 75 ml.

La méthode d'infection/transfection a été utilisée sur 5 millions de cellules pour générer une librairie antisens dirigée contre la GFP. Des 6 000 plages de lyse générées par cette librairie, 192 ont été repiquées pour être analysées. Parmi ces clones viraux, nous avons été en mesure de trouver un antisens capable de réprimer l'expression de la GFP deux fois plus efficacement que l'antisens « pleine longueur », démontrant ainsi que le système est valable pour la construction d'une librairie adénovirale. Il est à noter que l'expression d'un antisens peut provoquer une répression d'un gène de manière non spécifique en activant la PKR (157). Par contre, nous pouvons rejeter la possibilité que la réduction de l'expression de la GFP que nous avons observée est non spécifique parce que notre antisens était exprimé à partir d'un adénovirus produisant l'ARN VA capable d'antagoniser la PKR (110).

La méthode de sélection positive qui a été développée a pu être utilisée pour créer une librairie de mutants d'un transactivateur chimérique (148). CymR est un répresseur de transcription se fixant à la séquence opératrice CuO retrouvée dans les opérons bactériens *cmt* et *cym*. Dans sa configuration répresseur, l'expression est régulée par la liaison de CymR sur la séquence opératrice CuO qui a été clonée en aval d'un promoteur constitutif. L'ajout de cumate permet une séquestration de CymR et l'activation de la transcription. Dans la configuration transactivateur, un transactivateur chimérique (cTA) est construit par la fusion de CymR au domaine de transactivation VP16. Le cTA active la transcription d'un promoteur CMV minimal lorsqu'il se fixe aux séquences opératrices CuO en aval de ce dernier. En présence de cumate, l'expression sera donc réprimée. Une librairie de mutants a été construite pour trouver un cTA inverse, c.-à-d. un cTA qui en présence de cumate va activer la transcription au lieu de la réprimer. Le

cTA a été muté de manière aléatoire par PCR et une librairie adénovirale a été constituée à partir de cette banque de mutants. Le criblage de la librairie s'est effectué en générant des plages de lyse sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose, en présence et en absence de cumate, sur une lignée cellulaire 293 exprimant de manière stable le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur CMV minimal situé en amont de séquences opératrices CuO. Grâce au rapporteur  $\beta$ -galactosidase, le phénotype cTA inverse en présence de cumate donnera des plages de lyse bleues et des plages de lyse blanches en l'absence de cumate. Le criblage de 60 000 plages de lyse a permis de trouver le phénotype voulu démontrant une nouvelle fois la viabilité de la sélection positive pour la création de bibliothèques adénovirales.

Les deux dernières publications où l'on fait état de nouvelles méthodes pour la construction de bibliothèques adénovirales ont été publiées en 2003 (85, 143). Bien que ces deux groupes ont fait un calcul théorique de la diversité pouvant être générée par leur librairie, la disparité des méthodes de production et de calcul fait en sorte qu'il est difficile de faire une comparaison entre les différents résultats. Par contre, ultimement on peut définir la diversité comme étant le nombre d'adénovirus recombinants produits suivant la conversion de la librairie de plasmide en librairie adénovirale. En utilisant cette définition, il est possible d'évaluer la diversité des différentes méthodes de création de librairie en regardant le nombre d'adénovirus recombinants produits par  $\mu\text{g}$  d'ADN de la librairie plasmidique transfectée. La méthode développée par McVey et coll. consiste à cloner le transgène d'intérêt dans un cosmide contenant le génome d'un adénovirus  $\Delta\text{E1}\Delta\text{E3}$ . Par la suite, le cosmide est digéré pour libérer le génome adénoviral recombinant qui est transfecté dans des cellules permissives pour permettre la conversion de la librairie de plasmides en librairie adénovirale. Selon les données présentées, 100 000 adénovirus recombinants peuvent être produits par  $\mu\text{g}$  d'ADN transfecté. Un résultat douteux quand on sait qu'il existe une littérature très abondante démontrant que la transfection d'un génome adénoviral nu génère tout au plus 50 adénovirus recombinants par  $\mu\text{g}$  d'ADN (27, 34, 69, 87, 105, 147). La méthode développée par Hatanaka et coll. procède à la construction du génome adénoviral

recombinant *in vitro* en utilisant le système Cre/LoxP. Le génome adénoviral ainsi construit est complexé avec la pT pour favoriser sa conversion en particules infectieuses. La méthode développée permet de générer 30 000 adénovirus recombinants par  $\mu\text{g}$  de plasmide transfecté. Avec notre méthode, la transfection de 4  $\mu\text{g}$  de plasmide permet de générer en conditions optimales environ 60 000 adénovirus recombinants, ce qui nous donne un ratio de 15 000 adénovirus recombinants par  $\mu\text{g}$  d'ADN (figure 21). Ce résultat est comparable à celui Hatanaka et coll., mais il faut voir que leur méthode utilise un ADN viral complexé à la pT, une protéine difficile à obtenir en grande quantité et qui possède une demi-vie très courte (45). Si la méthode développée par Hatanaka et coll. se prête bien aux expériences à petite échelle (dans un pétri de 60 mm), il sera très difficile, voire impossible, d'augmenter la diversité de la librairie en transfectant une plus grande quantité d'ADN, dans un pétri de 150 mm ou dans une culture en suspension par exemple. Somme toute, avec notre méthode, contrairement à celle Hatanaka et coll., la mise à l'échelle ne pose aucun problème étant donné la facilité à produire massivement les 2 réactifs utilisés pour l'infection/transfection.

#### **4.2.3 L'amélioration de la diversité**

En théorie, une cellule 293 infectée par un adénovirus recombinant peut aisément produire plus de 20 000 particules infectieuses. En d'autres termes, la diversité maximum que pourrait atteindre une librairie adénovirale n'est pas d'un adénovirus recombinant par 75 cellules, mais bien de 20 000 adénovirus recombinants par cellule. En pratique, la diversité est moindre : lors d'une transfection effectuée avec des liposomes cationiques, utilisés lors de l'infection/transfection, un maximum de 4 000 plasmides se rend au noyau (207) et sont donc en mesure de recombiner avec le génome viral. De plus, on estime à 10% la fréquence de recombinaison entre un génome adénoviral et un plasmide de transfert (154). Donc, dans la pratique, la diversité maximale de la librairie adénovirale n'est pas de 20 000 adénovirus recombinants par

cellules, mais de 400 adénovirus recombinants par cellules. Trois obstacles importants nous empêchent d'atteindre cette diversité.

Premièrement, il y a l'efficacité de la transfection. Chaque cellule qui n'est pas transfectée par le plasmide de transfert ne pourra générer d'adénovirus recombinants et contribuer à la diversité. Autrement dit, chaque cellule qui n'est pas transfectée est gaspillée. Par conséquent, étant donné que l'efficacité de transfection atteinte lors des différentes expériences oscillait autour de 50-60%, toute amélioration de l'efficacité de transfection se traduira nécessairement par une augmentation de la diversité. Il faut aussi savoir que le plasmide de transfert qui est transfecté doit d'abord être linéarisé pour permettre une recombinaison efficace avec le virus parental (84, 86). Or, il a été démontré que la transfection d'un plasmide de transfert adénoviral circulaire, qui est linéarisé *in situ* par l'endonucléase *SceI* exprimée de manière stable chez les cellules transfectées, permettait de multiplier par un facteur 10 la génération d'adénovirus recombinants (64). Une des raisons avancées pour expliquer ce phénomène est la plus grande facilité à transfecter un ADN circulaire par rapport à un ADN linéarisé. Il serait intéressant de voir si l'utilisation d'un plasmide circulaire suivi de sa linéarisation *in situ* pourrait augmenter la diversité de nos bibliothèques en permettant une meilleure efficacité de transfection.

Le deuxième obstacle est la prolifération du virus parental lors de l'infection/transfection. Si une cellule ne peut produire que 400 adénovirus infectieux, alors chaque particule virale produite correspondant au virus parental prend la place d'un virus recombinant. L'insertion d'une séquence reconnue par l'endonucléase *SceI* près de l'ITR gauche du virus parental pourrait être un bon moyen de se débarrasser de ce dernier. Si l'ITR gauche du virus parental était clivé par *SceI*, le virus perdrait les éléments actifs en *cis* qui sont essentiels à l'encapsidation du génome. La transcomplémentation ne permettrait plus la croissance du virus  $\Delta$ PS. Par contre, en recombinant avec le vecteur de transfert, le virus parental regagnerait son ITR gauche, permettant ainsi une répllication normale. L'utilisation de l'endonucléase *SceI* pourrait

donc d'augmenter la diversité en linéarisant *in situ* le vecteur de transfert et en réduisant considérablement la présence du virus parental.

Le troisième obstacle affectant la diversité des bibliothèques adénovirales est la fréquence de recombinaison entre le vecteur de transfert et le virus parental : cet événement dépend entièrement de la cellule. À cet égard, il a été démontré que dans les cellules de mammifère, les phénomènes de recombinaisons homologues diminuaient lors de la phase G1 et augmentaient lors de la phase G2/M (178). Bien que l'expression des protéines E1 chez les cellules 293 font en sorte que celles-ci cherchent toujours à progresser vers la phase S, il n'en demeure pas moins que cet exemple démontre que la fréquence de recombinaison suite à l'infection/transfection sera largement influencée par l'état de la cellule. Le meilleur moyen pour contourner cet obstacle consisterait à s'affranchir du mécanisme cellulaire de recombinaison homologue en utilisant une lignée cellulaire exprimant la recombinase FLP capable de reconnaître une séquence spécifique *f<sub>rt</sub>* (18). Il suffirait d'introduire cette séquence dans le vecteur de transfert et le virus parental pour que la recombinase, exprimée de manière stable dans les cellules 293, puisse catalyser l'événement de recombinaison. Ce système a été utilisé dans la production de virus auxiliaire pour la production de vecteurs adénoviraux de troisième génération (154). Dans ce système, le site d'encapsidation du virus auxiliaire est bordé par des séquences *f<sub>rt</sub>* qui permettent l'excision de ce dernier par la recombinase FLP. Cette excision permet d'éliminer par recombinaison le site d'encapsidation de 99% des virus auxiliaires, prévenant ainsi la contamination des vecteurs de troisième génération lors de leur production. L'utilisation de ce système de recombinaison permettrait de faire passer de 10% à presque 100% la fréquence de recombinaison entre le génome viral et les 4 000 copies du plasmide de transfert se rendant au noyau lors de l'infection/transfection. Une telle augmentation de la fréquence de recombinaison aura un effet bénéfique sur la diversité.

#### 4.2.4 Conclusions

Les différents plasmides de transfert construits nous ont permis de confirmer que le phénomène de transcomplémentation était néfaste pour la création de librairie par sélection positive avec le gène de la PS. Le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) nous a permis de minimiser le phénomène de transcomplémentation tout en permettant la production d'adénovirus recombinants se répliquant normalement en exprimant leur PS de manière ectopique. Si ce plasmide ne peut pas éliminer complètement le phénomène de transcomplémentation, le problème a été suffisamment minimisé pour être gérable. Le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS) a été utilisé pour la construction d'une librairie antisens dirigée contre la GFP et nous a permis d'isoler un nouvel antisens surpassant sa contrepartie « pleine longueur ». Ce plasmide a aussi permis la construction d'une librairie où 60 000 mutants ont été criblés pour trouver un transactivateur chimérique inverse de l'opéron cumate. Le système pourrait cependant faire l'objet d'améliorations qui le rendrait encore plus puissant dans la création de librairies de mutants qui demandent des diversités importantes. Pour terminer, il convient de souligner que l'expression ectopique de la PS pourrait avoir d'autres applications que la création de librairies adénovirales. Ce système pourrait par exemple servir à la création d'adénovirus capables de se répliquer uniquement dans un type de cellule bien précis. On pourrait construire un adénovirus répliatif exprimant la PS de manière ectopique sous le contrôle du promoteur du gène PSA (122). Ce promoteur étant très actif au niveau du cancer de la prostate, on aurait un adénovirus oncolytique qui pourrait se répliquer principalement dans les cellules tumorales.

La méthode développée pouvant servir à créer des librairies adénovirales, elle implique aussi la possibilité de créer rapidement un ou des adénovirus recombinants pour des études fonctionnelles ou pour la production de protéines recombinantes. Avec les méthodes classiques de production de vecteur, il faut souvent compter plus d'un mois avant d'avoir un adénovirus recombinant qui peut être utilisable. La technique de recombinaison dans les cellules 293 entraîne la contamination du stock par le virus sauvage et chaque ronde de purification qui sera nécessaire pour se débarrasser du virus

prendra environ deux semaines. Si la technique de recombinaison dans *E.coli* évite la contamination par le virus sauvage, la faible infectivité du génome recombinant produit par cette technique signifie que suivant la transfection de cellules 293, il faut compter au moins trois semaines avant de voir apparaître le virus. De plus, suivant l'apparition du virus, il faut procéder à son amplification si l'on veut réaliser des expériences *in vitro*. Avec la sélection positive, on peut produire un stock d'adénovirus recombinants pour des expériences *in vitro*, de manière routinière, en moins de deux semaines. Cette capacité à produire très rapidement un vecteur adénoviral est une qualité hautement désirable. Par exemple, si l'on voulait déconstruire une voie de signalisation nucléaire en utilisant un ribozyme dirigé contre chacune des protéines impliquées dans cette voie, la technique de sélection positive permettrait de générer rapidement les différents adénovirus recombinants nécessaires, l'étape limitante serait le clonage du ribozyme dans le plasmide de transfert. Avec les méthodes classiques, la construction d'un grand nombre d'adénovirus recombinants aurait été un processus long et fastidieux qui aurait été tout aussi limitant que l'étape de clonage.

#### **4.3 Nouvelle approche de production : création d'une nouvelle lignée cellulaire pour la production de vecteurs adénoviraux de première génération**

Si la nouvelle approche de construction de vecteurs adénoviraux de première génération par sélection positive représente une avancée majeure, que ce soit pour la construction d'une librairie ou la simple construction de vecteurs viraux, l'incapacité de produire le vecteur viral généré par la sélection positive à grande échelle limitera l'utilité de cette stratégie. En effet, peu importe l'efficacité de la technique permettant la construction du vecteur, si l'on ne peut produire ce dernier en quantité suffisante pour des études fonctionnelles *in vivo*, pour la thérapie génique ou pour la production de protéines recombinantes, le gain permis par la sélection positive restera marginal. En d'autres termes, il ne sert à rien de pouvoir construire efficacement un vecteur adénoviral de première génération si l'on ne peut le produire efficacement.

L'un des premiers objectifs de la production à grande échelle sera de limiter, voire d'éliminer la génération de RCA lors du processus d'amplification. La présence de RCA, même à un très bas niveau, peut compromettre l'efficacité du transfert de gène dans les expériences chez les animaux ou lors de la production de protéines recombinantes. De plus, ceux-ci vont également susciter des inquiétudes quant à la biosécurité pour les patients en essais cliniques.

Le second objectif de production à grande échelle sera de maximiser le rendement des cultures produisant le vecteur adénoviral. La culture en suspension est vue comme le mode de culture de prédilection pour la production des vecteurs adénoviraux, et ce, pour deux raisons. Premièrement, la culture en suspension est plus simple, moins coûteuse et sa mise à l'échelle plus facile. En effet, l'accroissement des rendements de production, par l'augmentation de la densité cellulaire et/ou par l'augmentation du volume des bioréacteurs, est limité principalement par la composition du milieu de culture et non par la surface disponible, comme c'est le cas pour la croissance des cellules adhérentes. Deuxièmement, la production à grande échelle doit se faire en milieu sans sérum tant pour des motifs de biosécurité que pour des motifs d'ordre économique. Or, l'adaptation en milieu sans sérum est grandement facilitée par le fait que les cellules en suspension sont moins dépendantes de certains facteurs de croissance et de certains facteurs d'attachements normalement présents dans le sérum.

Pour le moment, seule la lignée PERC.C6© permet une production efficace de vecteurs adénoviraux de première génération en milieu sans sérum tout en évitant de générer des RCA (50). Mais son utilisation reste limitée étant donné qu'il faut obtenir une licence d'exploitation pour être en mesure de l'utiliser. Il y a donc encore un besoin pour la création d'une lignée productrice pouvant être utilisée dans la production sans sérum à grande échelle. Il est à noter que l'utilisation de notre lignée n'est pas limitée par un brevet puisque celle-ci a été construite en utilisant la technologie lentivirale ce qui rend impossible l'obtention d'un brevet.

### 4.3.1 Optimisation de la lignée cellulaire BMAdE1

La lignée cellulaire BMAdE1, brevetée par notre groupe (137), a été construite en introduisant une région E1 dans des cellules A549 (137). La région E1 utilisée pour produire les BMAdE1, contrairement à celle retrouvée dans les cellules 293, élimine les homologies avec les vecteurs adénoviraux de première génération si bien que ces derniers ne produisent pas de RCA. Par contre, leur niveau de production est trop faible pour constituer une alternative intéressante par rapport aux cellules PER.C6©.

Nous avons montré que la mauvaise production des BMAdE1 pouvait être associée à une expression insuffisante de la protéine E1B-55K. Cette protéine permet de : 1- prévenir l'apoptose induite par la région E1A, 2- favoriser l'exportation des ARN messagers viraux au détriment des ARN messagers cellulaires, et 3- promouvoir la traduction des ARN messager viraux présents dans le cytoplasme (9). En aucun moment, l'observation des cellules BMAdE1 en microscopie optique ne laisse croire que ces cellules sont sujettes à l'apoptose. Ceci laisse donc croire que la mauvaise expression d'E1B-55K retrouvée dans ces cellules interfère avec la production de l'adénovirus en ne permettant pas une exportation et une traduction efficaces des ARN messagers viraux.

L'expression d'E1B-55K a été augmentée dans les cellules BMAdE1 en les transduisant avec un lentivirus exprimant cette protéine. Ce choix a été motivé par la démonstration que le lentivirus est un outil efficace pour générer une lignée stable (40). Le vecteur utilisé a été pseudotypé par VSV-G, ce qui garantit une bonne efficacité de transduction des BMAdE1 (173). De plus, la transduction lentivirale affecte marginalement les profils de transcription et de traduction d'une cellule (145). Ceci nous assure que la transduction n'aura pas des effets inattendus sur les BMAdE1.

Suivant la transduction avec le lentivirus E1B-55K, des sous-clones exprimant un niveau supérieur de cette protéine ont pu être isolés et nous avons montré que ces derniers répliquaient avec une plus grande efficacité les adénovirus de première

génération. Grâce à la transduction avec le lentivirus, nous avons pu isoler les clones 5 et 8 dont la production est supérieure aux cellules 293. Un résultat très intéressant si l'on considère que cette lignée cellulaire est la plus efficace actuellement disponible pour amplifier un adénovirus délété de la région E1.

#### **4.3.2 La variation clonale des BMAE1**

Bien que nous ayons pu confirmer que la meilleure expression d'E1B-55K n'était pas le fruit d'une simple variation clonale en détectant la séquence WPRE dans le génome de nos clones, et bien que nous ayons démontré que c'est l'expression accrue d'E1B-55K qui était à l'origine de la meilleure réplication de l'adénovirus, il n'en demeure pas moins qu'une certaine variation clonale est toujours présente et influence le niveau de production. Le nombre de particules virales produites par une infection avec un virus sauvage dl309 est très révélateur à cet égard. Ce virus exprimant toutes les protéines nécessaires à sa réplication, un niveau de production différent entre deux cellules ne saurait être attribuable à une expression différente des protéines de la région E1, mais plutôt à la capacité intrinsèque de la cellule à fournir un environnement propice à la réplication adénovirale. En effet, des facteurs cellulaires peuvent contribuer à la réplication de l'adénovirus comme cela a été démontré dans la lignée 293 où des sous-clones plus performants ont pu être isolés. Ce sous-clonage a permis l'identification d'un clone exprimant un niveau plus élevé d'intégrine  $\alpha\beta3$  (126). Il a été découvert que la production supérieure de ces cellules n'était pas causée par un meilleur attachement du virus aux récepteurs secondaires, mais par des signaux de survie que les intégrines  $\alpha\beta3$  pouvaient transduire suivant une infection par un adénovirus. Le même groupe a aussi démontré que l'expression de ces intégrines était associée à une plus grande viabilité dans un milieu de culture avec une faible concentration en sérum. À cet égard, le sous-clonage du clone 5 permettra sans doute d'identifier des cellules avec une meilleure production adénovirale. Alternativement, il pourrait être intéressant de

transduire le clone 5 avec le gène de l'intégrine  $\alpha\beta 3$  pour voir si la production des vecteurs adénoviraux serait augmentée.

Les cellules BMAdE1 étant celles qui permettent la plus forte réplication du virus dl309, on peut donc conclure qu'indépendamment de l'expression de la région E1, la présence ou l'absence de certains facteurs cellulaires confère aux BMAdE1 un potentiel de réplication supérieur aux cellules 293. Il serait intéressant d'établir le profil d'expression des 293 et des BMAdE1 avec des micropuces à ADN pour trouver les facteurs cellulaires potentiellement responsables de la meilleure réplication adénovirale. L'identification de candidats potentiels permettrait de pousser plus loin l'ingénierie cellulaire des lignées productrices de vecteurs de première génération.

#### **4.3.3 L'expression d'E1B-55K a été pleinement optimisée**

L'utilisation du dl309 nous a aussi permis de déterminer que les clones 5 et 8 ont été pleinement optimisés en ce qui a trait à l'expression d'E1B-55K. Le virus sauvage exprimant cette protéine n'est pas en mesure de se répliquer plus efficacement que le virus  $\Delta E1\Delta E3$ , indiquant qu'une augmentation de l'expression d'E1B-55K n'entraînerait pas une meilleure réplication des adénovirus de première génération. Il est à noter cependant que les cellules 293 expriment substantiellement plus d'E1B-55K que nos meilleurs clones. On peut donc conclure que la lignée cellulaire 293 exprime en excès E1B-55K, que le seuil minimum essentiel pour une réplication normale a été atteint dans les clones 5 et 8.

#### **4.3.4 Production en suspension dans un milieu sans sérum**

Lorsqu'adapté à la culture en suspension en milieu sans sérum, notre clone se montre aussi supérieur à la lignée cellulaire 293SF, une lignée actuellement très

populaire pour la production de vecteurs de première génération. Les 293SF produisent environ 30 000 particules physiques par cellules. Si l'on considère qu'il y a de 7-10 fois plus de particules physiques produites par cellule que de particules infectieuses, ce résultat s'accorde avec les données en particules infectieuses publiées dans la littérature (151). Ne sachant pas quelles étaient les conditions optimales d'infection du clone 5 en suspension dans un milieu sans sérum, nous avons utilisé les mêmes paramètres d'infection que pour les 293SF. Par conséquent, il est remarquable que même en conditions non optimisées pour le clone 5, ces dernières produisent 33% plus de particules que les 293SF. En optimisant la densité cellulaire au moment de l'infection de même que la MOI utilisé et le temps de l'infection, on serait probablement en mesure d'augmenter la production du clone 5.

Par contre, la production en suspension dans un milieu sans sérum reste significativement moins élevée que la production des cellules adhérentes. Ce résultat peut être expliqué par les conditions non optimisées de production. Par exemple, il a été observé qu'à partir d'une certaine densité cellulaire, les cellules 293SF pouvaient produire des inhibiteurs compromettant la production du vecteur (68). L'apparition de ces inhibiteurs peut être contrecarrée en optimisant le milieu de culture (150). La variation clonale qui est apparue au moment où les cellules ont été adaptées à la culture en suspension sans sérum peut aussi être à l'origine de ce déclin de production. Le processus d'adaptation a créé une forte pression sélective sur les cellules et il est pratiquement inévitable de voir apparaître une certaine hétérogénéité au niveau de la population cellulaire. Lors de l'adaptation des cellules 293 à la culture en suspension sans sérum, il a été démontré qu'en sous-clonant la lignée cellulaire, il était possible de trouver des sous-clones avec des qualités supérieures pour la production à grande échelle (33). Il ne fait donc pas de doute que le sous-clonage du clone 5 adapté à la suspension en milieu sans sérum permettrait de trouver un nouveau clone aux propriétés intéressantes.

### 4.3.5 Comparaison avec les autres lignées de production

Récemment, deux lignées cellulaires dérivées des A549 et capables de produire des vecteurs adénoviraux de première génération ont été décrites (52, 97). Bien qu'il soit impossible de comparer directement les résultats de production de particules physiques à cause des méthodes de quantification différentes, on peut tout de même comparer l'efficacité de ces lignées étant donné qu'elles ont été comparées aux cellules 293. Pour les deux publications, la production en particules physiques est la même dans la lignée développée et dans les cellules 293. Si l'on suppose que le clone 293 utilisé dans ces deux publications est le même que celui utilisé dans notre laboratoire, alors on peut conclure à la supériorité du clone 5 dont la production est 2 fois supérieure aux cellules 293. De plus, il faut aussi noter qu'aucune de ces lignées cellulaires n'a été adaptée à la culture en suspension en milieu sans sérum. Actuellement, il n'existe qu'une seule lignée capable de produire des vecteurs adénoviraux de première génération en suspension dans un milieu sans sérum, sans produire de RCA : les PER.C6©. Ces cellules sont les plus utilisées dans la production d'adénovirus de première génération destinés aux essais cliniques. N'ayant pas accès à ces cellules, nous n'avons pas été en mesure de les comparer directement aux nôtres. Par contre, Farson et coll. (52) ont pu comparer la production adénovirale des PER.C6© par rapport aux cellules 293 et ces dernières s'avèrent équivalentes dans les 2 cas. Sur la base de ces résultats, et encore une fois en assumant que le clone de cellules 293 est le même, on peut donc conclure que le clone 5 a probablement une production supérieure aux PER.C6©. Par contre, cette comparaison doit être considérée avec prudence, car seule une comparaison directe permet de véritablement savoir quel est le niveau de production d'un clone par rapport à un autre. Une comparaison en faisant une standardisation par rapport aux cellules 293 est toujours hasardeuse étant donné que nous ne pouvons être certains de travailler avec le même clone de cellules 293.

Nous avons aussi démontré que les clones 5 et 8, dérivés des BMAdE1, étaient en mesure d'amplifier efficacement un adénovirus exprimant un transgène pro-apoptotique activant la caspase 8. Cette caractéristique pourrait s'avérer avantageuse dans plusieurs

situations. Par exemple, la compagnie VirRx a développé un adénovirus oncolytique exprimant l'interféron- $\alpha$  (192). L'Interféron- $\alpha$  étant capable de déclencher l'apoptose en activant la caspase 8, notre lignée cellulaire pourrait s'avérer très utile pour la production à grande échelle de ce vecteur thérapeutique.

Les expériences d'amplification d'un adénovirus exprimant le FasL nous donnent aussi une information très importante sur la nécessité de disposer de plusieurs lignées cellulaires pour la production à grande échelle. Par exemple, nous avons montré que les BMAde1 étaient inférieures aux cellules 293 pour produire un adénovirus vide. Par contre, la production d'un adénovirus FasL dans les BMAde1 est supérieure à celle des cellules 293. Ce résultat nous montre que si un adénovirus exprimant un transgène donné ne peut être amplifié dans une lignée cellulaire, la situation pourrait être différente dans une autre lignée, d'où l'importance d'explorer différentes lignées cellulaires pour la production de vecteurs de première génération. Plus grand sera le nombre de lignées disponibles, plus faibles seront les chances de se retrouver dans une situation où il sera impossible d'amplifier efficacement un vecteur adénoviral.

#### **4.3.6 Conclusions**

Les cellules BMAde1 sont en mesure d'amplifier les adénovirus de première génération sans générer de RCA (61). Par contre, le niveau de production des BMAde1 s'avère faible, seulement 15% à 30% du niveau de production des cellules 293. Nous avons établi que cette faible production pouvait être attribuable à une expression insuffisante d'E1B-55K. L'expression de cette protéine a été augmentée en transduisant les BMAde1 avec un lentivirus exprimant cette protéine. Pour conserver la capacité de la lignée cellulaire à produire des Ad de première génération sans générer de RCA, le vecteur lentiviral utilisé pour la transduction de l'E1B-55K ne contient aucune région homologe avec le vecteur adénoviral, ce qui permet, comme dans le cas des BMAde1, de prévenir le phénomène de recombinaison homologe entre le vecteur et la cellule.

Suivant la transduction, des clones avec une meilleure production d'E1B-55K ont été isolés. Ces clones ont tous une production supérieure à la lignée parentale et le clone 5 à une production supérieure aux cellules 293. Ce clone, une fois adapté à la culture en suspension sans sérum, a une production supérieure au 293SF. En conclusion, nous avons été capables de construire une nouvelle lignée cellulaire ne produisant pas de RCA et qui peut être utilisée pour la production de vecteurs adénoviraux de première génération à grande échelle dans une culture en suspension sans sérum.

#### **4.4 La construction et la production de vecteurs de première génération : plus efficace que jamais**

Les vecteurs adénoviraux de première génération ont de nombreuses qualités qui en font des outils de choix en génomique fonctionnelle, pour la production de protéines recombinantes ou pour la thérapie génique. Premièrement, l'adénovirus peut se répliquer à de hautes concentrations, ils peuvent transduire un grand nombre de cellules différentes avec une efficacité de 100% et la transduction virale ne requiert pas de division cellulaire ou l'intégration du chromosome virale.

Nous avons établi qu'avec la réingénierie conjointe du vecteur de transfert et de la lignée de production, l'utilisation de vecteurs adénoviraux de première génération sera beaucoup plus aisée et conviviale que dans le passé. Ces réingénieries feront des vecteurs adénoviraux des outils d'une grande utilité dans de nombreux domaines d'études. Par exemple, la construction rapide de vecteurs et la production efficace à grande échelle jumelée aux plus récentes innovations en matière de production de protéines recombinantes à partir de vecteurs adénoviraux dans les cellules CHO (62) fait en sorte qu'il est désormais possible de produire plusieurs milligrammes d'une batterie de protéines recombinantes, ce qui permet de disposer rapidement d'une quantité suffisante de matériel pour des études de caractérisation.

La délétion de tous les gènes viraux, telle que celle retrouvée dans les vecteurs de troisième génération, est probablement la solution la plus radicale pour éliminer les RCA et la réponse immunitaire dirigée contre le vecteur adénoviral. Cependant, même dans le contexte où l'utilisation des vecteurs de troisième génération devient de plus en plus importante, la lignée développée dans cette thèse n'en conserve pas moins son utilité. En effet, la production des vecteurs de troisième génération nécessite l'utilisation d'un virus auxiliaire qui est lui-même un vecteur de première génération modifié de manière à ce que sa séquence d'encapsidation, flanquée de sites *loxP*, puisse être excisée par la recombinase Cre, prévenant ainsi sa réplication en empêchant ainsi l'encapsidation de son génome (167). Lors de la production du virus auxiliaire dans les cellules 293, il peut y avoir génération de RCA qui auront perdu les sites *loxP* nécessaires à l'excision de la séquence d'encapsidation. Si un vecteur de troisième génération est produit avec un virus auxiliaire contaminé par des RCA, le stock d'Ad de troisième génération ainsi préparé sera à son tour contaminé par un Ad répliquatif qui pourra induire une réponse immunitaire lors de son injection chez le patient, éliminant du même coup les avantages reliés à l'utilisation d'un vecteur de troisième génération. Donc, même avec un vecteur de troisième génération, la problématique des RCA demeure présente et nécessitera des actions pour que la production du vecteur réponde à des normes de qualités strictes. La lignée cellulaire que nous avons développée permet de pallier à ce problème.

**Section 5 :**  
**Bibliographie**

1. **Abbink, P., A. A. Lemckert, B. A. Ewald, D. M. Lynch, M. Denholtz, S. Smits, L. Holterman, I. Damen, R. Vogels, A. R. Thorner, K. L. O'Brien, A. Carville, K. G. Mansfield, J. Goudsmit, M. J. Havenga, and D. H. Barouch.** 2007. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol* **81**:4654-63.
2. **Administration, F. a. D.** 2001. Adenovirus Vector Titer Measurements and RCA Levels. *In* B. R. M. A. Committee (ed.).
3. **Alba, R., A. Bosch, and M. Chillon.** 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* **12 Suppl 1**:S18-27.
4. **Amalfitano, A., M. A. Hauser, H. Hu, D. Serra, C. R. Begy, and J. S. Chamberlain.** 1998. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol* **72**:926-33.
5. **Anderson, C. W.** 1990. The proteinase polypeptide of adenovirus serotype 2 virions. *Virology* **177**:259-72.
6. **Apostolidis, L., V. Schirmacher, and P. Fournier.** 2007. Host mediated anti-tumor effect of oncolytic Newcastle disease virus after locoregional application. *Int J Oncol* **31**:1009-19.
7. **Appledorn, D. M., S. Patial, A. McBride, S. Godbehere, N. Van Rooijen, N. Parameswaran, and A. Amalfitano.** 2008. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol* **181**:2134-44.
8. **Arnberg, N., K. Edlund, A. H. Kidd, and G. Wadell.** 2000. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* **74**:42-8.
9. **Babiss, L. E., and H. S. Ginsberg.** 1984. Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **50**:202-12.
10. **Babiss, L. E., H. S. Ginsberg, and J. E. Darnell, Jr.** 1985. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol* **5**:2552-8.
11. **Barton, E. S., J. C. Forrest, J. L. Connolly, J. D. Chappell, Y. Liu, F. J. Schnell, A. Nusrat, C. A. Parkos, and T. S. Dermody.** 2001. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* **104**:441-51.

12. **Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-3.
13. **Bester, A. C., M. Schwartz, M. Schmidt, A. Garrigue, S. Hacein-Bey-Abina, M. Cavazzana-Calvo, N. Ben-Porat, C. Von Kalle, A. Fischer, and B. Kerem.** 2006. Fragile sites are preferential targets for integrations of MLV vectors in gene therapy. *Gene Ther* **13**:1057-9.
14. **Bett, A. J., L. Prevec, and F. L. Graham.** 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **67**:5911-21.
15. **Bischoff, J. R., D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey, and F. McCormick.** 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**:373-6.
16. **Bourbeau, D., C. J. Lau, J. Jaime, Z. Koty, S. P. Zehntner, G. Lavoie, A. M. Mes-Masson, J. Nalbantoglu, and B. Massie.** 2007. Improvement of antitumor activity by gene amplification with a replicating but nondisseminating adenovirus. *Cancer Res* **67**:3387-95.
17. **Brand, K., R. Klocke, A. Possling, D. Paul, and M. Strauss.** 1999. Induction of apoptosis and G2/M arrest by infection with replication-deficient adenovirus at high multiplicity of infection. *Gene Ther* **6**:1054-63.
18. **Broach, J. R., V. R. Guarascio, and M. Jayaram.** 1982. Recombination within the yeast plasmid 2mu circle is site-specific. *Cell* **29**:227-34.
19. **Broussau, S., N. Jabbour, G. Lachapelle, Y. Durocher, R. Tom, J. Transfiguracion, R. Gilbert, and B. Massie.** 2008. Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture. *Mol Ther* **16**:500-7.
20. **Broussau, S., N. Jabbour, G. Lachapelle, Y. Xu, A. Mullick, R. Gilbert, and B. Massie.** 2004. 70. Stable packaging cell lines development for the production of lentiviral vectors. *Mol Ther* **9**:S29-S29.
21. **Brunetti-Pierri, N., D. J. Palmer, V. Mane, M. Finegold, A. L. Beaudet, and P. Ng.** 2005. Increased hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* **12**:99-106.

22. **Carpentier, E., S. Paris, A. A. Kamen, and Y. Durocher.** 2007. Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells. *J Biotechnol* **128**:268-80.
23. **Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, C. C. Bartholomae, G. Veres, M. Schmidt, I. Kutschera, M. Vidaud, U. Abel, L. Dal-Cortivo, L. Caccavelli, N. Mahlaoui, V. Kiermer, D. Mittelstaedt, C. Bellesme, N. Lahlou, F. Lefrere, S. Blanche, M. Audit, E. Payen, P. Leboulch, B. l'Homme, P. Bougneres, C. Von Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, and P. Aubourg.** 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* **326**:818-23.
24. **Case, S. S., M. A. Price, C. T. Jordan, X. J. Yu, L. Wang, G. Bauer, D. L. Haas, D. Xu, R. Stripecke, L. Naldini, D. B. Kohn, and G. M. Crooks.** 1999. Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2988-93.
25. **Cerullo, V., M. P. Seiler, V. Mane, R. Cela, C. Clarke, R. J. Kaufman, S. W. Pipe, and B. Lee.** 2007. Correction of murine hemophilia A and immunological differences of factor VIII variants delivered by helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* **15**:2080-7.
26. **Chan, H. M., and N. B. La Thangue.** 2001. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**:2363-73.
27. **Chartier, C., E. Degryse, M. Gantzer, A. Dieterle, A. Pavirani, and M. Mehtali.** 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* **70**:4805-10.
28. **Chilov, D., C. Fux, H. Joch, and M. Fussenegger.** 2003. Identification of a novel proliferation-inducing determinant using lentiviral expression cloning. *Nucleic Acids Res* **31**:e113.
29. **Choi, K. J., J. H. Kim, Y. S. Lee, J. Kim, B. S. Suh, H. Kim, S. Cho, J. H. Sohn, G. E. Kim, and C. O. Yun.** 2006. Concurrent delivery of GM-CSF and B7-1 using an oncolytic adenovirus elicits potent antitumor effect. *Gene Ther* **13**:1010-20.
30. **Christ, M., B. Louis, F. Stoeckel, A. Dieterle, L. Grave, D. Dreyer, J. Kintz, D. Ali Hadji, M. Lusky, and M. Mehtali.** 2000. Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum Gene Ther* **11**:415-27.
31. **Conrad, C., C. R. Miller, Y. Ji, C. Gomez-Manzano, S. Bharara, J. S. McMurray, F. F. Lang, F. Wong, R. Sawaya, W. K. Yung, and J. Fueyo.**

2005. Delta24-hyCD adenovirus suppresses glioma growth in vivo by combining oncolysis and chemosensitization. *Cancer Gene Ther* **12**:284-94.
32. **Corish, P., and C. Tyler-Smith.** 1999. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* **12**:1035-40.
33. **Cote, J., A. Garnier, B. Massie, and A. Kamen.** 1998. Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells. *Biotechnol Bioeng* **59**:567-75.
34. **Crouzet, J., L. Naudin, C. Orsini, E. Vigne, L. Ferrero, A. Le Roux, P. Benoit, M. Latta, C. Torrent, D. Branellec, P. Deneffe, J. F. Mayaux, M. Perricaudet, and P. Yeh.** 1997. Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1414-9.
35. **Cui, Q., W. Jiang, Y. Wang, C. Lv, J. Luo, W. Zhang, F. Lin, Y. Yin, R. Cai, P. Wei, and C. Qian.** 2008. Transfer of suppressor of cytokine signaling 3 by an oncolytic adenovirus induces potential antitumor activities in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**:105-12.
36. **Davis, A. R., K. Meyers, and J. M. Wilson.** 1998. High throughput method for creating and screening recombinant adenoviruses. *Gene Ther* **5**:1148-52.
37. **Davison, A. J., M. Benko, and B. Harrach.** 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84**:2895-908.
38. **Dehecchi, M. C., A. Tamanini, A. Bonizzato, and G. Cabrini.** 2000. Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* **268**:382-90.
39. **Dedieu, J. F., E. Vigne, C. Torrent, C. Jullien, I. Mahfouz, J. M. Caillaud, N. Aubailly, C. Orsini, J. M. Guillaume, P. Opolon, P. Delaere, M. Perricaudet, and P. Yeh.** 1997. Long-term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J Virol* **71**:4626-37.
40. **Delenda, C.** 2004. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6 Suppl 1**:S125-38.
41. **Deol, J. R., G. Danialou, N. Larochelle, M. Bourget, J. S. Moon, A. B. Liu, R. Gilbert, B. J. Petrof, J. Nalbantoglu, and G. Karpati.** 2007. Successful compensation for dystrophin deficiency by a helper-dependent adenovirus expressing full-length utrophin. *Mol Ther* **15**:1767-74.
42. **Di Pasquale, G., and J. A. Chiorini.** 2003. PKA/PrKX activity is a modulator of AAV/adenovirus interaction. *Embo J* **22**:1716-24.

43. **Edelstein, M. L., M. R. Abedi, and J. Wixon.** 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med* **9**:833-42.
44. **Eixarch, H., A. Gomez, E. Kadar, M. George, N. Martinez, C. Espejo, J. Petriz, R. Gimeno, and J. Barquinero.** 2009. Transgene expression levels determine the immunogenicity of transduced hematopoietic grafts in partially myeloablated mice. *Mol Ther* **17**:1904-9.
45. **Elahi, S. M., W. Oualikene, L. Naghdi, M. O'Connor-McCourt, and B. Massie.** 2002. Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease. *Gene Ther* **9**:1238-46.
46. **Enders, J. F., J. A. Bell, J. H. Dingle, T. Francis, Jr., M. R. Hilleman, R. J. Huebner, and A. M. Payne.** 1956. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* **124**:119-20.
47. **Engelhardt, J. F., X. Ye, B. Doranz, and J. M. Wilson.** 1994. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6196-200.
48. **Everitt, E., L. Lutter, and L. Philipson.** 1975. Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Virology* **67**:197-208.
49. **Ewing, S. G., S. A. Byrd, J. B. Christensen, R. E. Tyler, and M. J. Imperiale.** 2007. Ternary complex formation on the adenovirus packaging sequence by the IVa2 and L4 22-kilodalton proteins. *J Virol* **81**:12450-7.
50. **Fallaux, F. J., A. Bout, I. van der Velde, D. J. van den Wollenberg, K. M. Hehir, J. Keegan, C. Auger, S. J. Cramer, H. van Ormondt, A. J. van der Eb, D. Valerio, and R. C. Hoeben.** 1998. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**:1909-17.
51. **Fallaux, F. J., O. Kranenburg, S. J. Cramer, A. Houweling, H. Van Ormondt, R. C. Hoeben, and A. J. Van Der Eb.** 1996. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **7**:215-22.
52. **Farson, D., L. Tao, D. Ko, Q. Li, D. Brignetti, K. Segawa, D. Mittelstaedt, T. Harding, D. C. Yu, and Y. Li.** 2006. Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. *Mol Ther* **14**:305-11.

53. **Fauci, A. S.** 2008. 25 years of HIV. *Nature* **453**:289-90.
54. **Fauci, A. S.** 2007. Statement of Anthony S. Fauci, M.D., Director National Institute of Allergy and Infectious Diseases On the Release of New Data from the HVTN 502 (STEP) HIV Vaccine Study *NIH News* **November 7, 2007**
55. **Fessler, S. P., F. Delgado-Lopez, and M. S. Horwitz.** 2004. Mechanisms of E3 modulation of immune and inflammatory responses. *Curr Top Microbiol Immunol* **273**:113-35.
56. **Flint, S. J., S. M. Berget, and P. A. Sharp.** 1976. Characterization of single-stranded viral DNA sequences present during replication of adenovirus types 2 and 5. *Cell* **9**:559-71.
57. **Flynn, N. M., D. N. Forthal, C. D. Harro, F. N. Judson, K. H. Mayer, and M. F. Para.** 2005. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* **191**:654-65.
58. **Forsyth, P., G. Roldan, D. George, C. Wallace, C. A. Palmer, D. Morris, G. Cairncross, M. V. Matthews, J. Markert, Y. Gillespie, M. Coffey, B. Thompson, and M. Hamilton.** 2008. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Mol Ther* **16**:627-32.
59. **Fredman, J. N., and J. A. Engler.** 1993. Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix in vivo and in vitro. *J Virol* **67**:3384-95.
60. **Friedmann, T., and R. Roblin.** 1972. Gene therapy for human genetic disease? *Science* **175**:949-55.
61. **Gagnon, L., P.-A. Moisset, C. Larose, L. Peloquin, M. Simoneau, C. Guilbault, B. Massie, and P. Jolicoeur.** 2003. Highly-Sensitive Method for Detecting Replication Competent Adenoviruses (RCAs) and Production of RCA-Free Adenoviral Vectors in BMAE1 Cell Line. *Mol Ther* **7**:S204-S205.
62. **Gaillet, B., R. Gilbert, R. Amziani, C. Guilbault, C. Gadoury, A. W. Caron, A. Mullick, A. Garnier, and B. Massie.** 2007. High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch. *Biotechnol Prog* **23**:200-9.
63. **Ganly, I., D. Kirn, G. Eckhardt, G. I. Rodriguez, D. S. Soutar, R. Otto, A. G. Robertson, O. Park, M. L. Gulley, C. Heise, D. D. Von Hoff, and S. B. Kaye.** 2000. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **6**:798-806.

64. **Gao, G., X. Zhou, M. R. Alvira, P. Tran, J. Marsh, K. Lynd, W. Xiao, and J. M. Wilson.** 2003. High throughput creation of recombinant adenovirus vectors by direct cloning, green-white selection and I-Sce I-mediated rescue of circular adenovirus plasmids in 293 cells. *Gene Ther* **10**:1926-30.
65. **Gao, G. P., R. K. Engdahl, and J. M. Wilson.** 2000. A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther* **11**:213-9.
66. **Gao, Q., J. Zhou, X. Huang, G. Chen, F. Ye, Y. Lu, K. Li, L. Zhuang, M. Huang, G. Xu, S. Wang, and D. Ma.** 2006. Selective targeting of checkpoint kinase 1 in tumor cells with a novel potent oncolytic adenovirus. *Mol Ther* **13**:928-37.
67. **Garber, K.** 2006. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **98**:298-300.
68. **Garnier, A., J. Cote, I. Nadeau, A. Kamen, and B. Massie.** 1994. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology* **15**:145-55.
69. **Ghosh-Choudhury, G., Y. Haj-Ahmad, P. Brinkley, J. Rudy, and F. L. Graham.** 1986. Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene* **50**:161-71.
70. **Ginsberg, H. S.** 1999. The life and times of adenoviruses. *Adv Virus Res* **54**:1-13.
71. **Ginsberg, H. S., H. G. Pereira, R. C. Valentine, and W. C. Wilcox.** 1966. A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. *Virology* **28**:782-3.
72. **Gorziglia, M. I., M. J. Kadan, S. Yei, J. Lim, G. M. Lee, R. Luthra, and B. C. Trapnell.** 1996. Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. *J Virol* **70**:4173-8.
73. **Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.
74. **Greber, U. F., M. Suomalainen, R. P. Stidwill, K. Boucke, M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *Embo J* **16**:5998-6007.
75. **Greber, U. F., P. Webster, J. Weber, and A. Helenius.** 1996. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *Embo J* **15**:1766-77.

76. **Greber, U. F., M. Willetts, P. Webster, and A. Helenius.** 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**:477-86.
77. **Green, M., and G. E. Daesch.** 1961. Biochemical studies on adenovirus multiplication. II. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. *Virology* **13**:169-76.
78. **Hacein-Bey-Abina, S., F. Le Deist, F. Carlier, C. Bouneaud, C. Hue, J. P. De Villartay, A. J. Thrasher, N. Wulffraat, R. Sorensen, S. Dupuis-Girod, A. Fischer, E. G. Davies, W. Kuis, L. Leiva, and M. Cavazzana-Calvo.** 2002. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* **346**:1185-93.
79. **Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo.** 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**:415-9.
80. **Haj-Ahmad, Y., and F. L. Graham.** 1986. Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *J Virol* **57**:267-74.
81. **Han, J., D. Modha, and E. White.** 1998. Interaction of E1B 19K with Bax is required to block Bax-induced loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Oncogene* **17**:2993-3005.
82. **Harada, J. N., and A. J. Berk.** 1999. p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol* **73**:5333-44.
83. **Harris, J. D., V. Evans, and J. S. Owen.** 2006. ApoE gene therapy to treat hyperlipidemia and atherosclerosis. *Curr Opin Mol Ther* **8**:275-87.
84. **Hartigan-O'Connor, D., A. Amalfitano, and J. S. Chamberlain.** 1999. Improved production of gutted adenovirus in cells expressing adenovirus preterminal protein and DNA polymerase. *J Virol* **73**:7835-41.
85. **Hatanaka, K., S. Ohnami, K. Yoshida, Y. Miura, K. Aoyagi, H. Sasaki, M. Asaka, M. Terada, T. Yoshida, and K. Aoki.** 2003. A simple and efficient method for constructing an adenoviral cDNA expression library. *Mol Ther* **8**:158-66.
86. **Hay, R. T., N. D. Stow, and I. M. McDougall.** 1984. Replication of adenovirus mini-chromosomes. *J Mol Biol* **175**:493-510.

87. **He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein.** 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2509-14.
88. **Hearing, P., R. J. Samulski, W. L. Wishart, and T. Shenk.** 1987. Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* **61**:2555-8.
89. **Heemskerk, B., T. van Vreeswijk, L. A. Veltrop-Duits, C. C. Sombroek, K. Franken, R. M. Verhoosel, P. S. Hiemstra, D. van Leeuwen, M. E. Rensing, R. E. Toes, M. J. van Tol, and M. W. Schilham.** 2006. Adenovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones recognizing endogenous antigen inhibit viral replication in vitro through cognate interaction. *J Immunol* **177**:8851-9.
90. **Hehir, K. M., D. Armentano, L. M. Cardoza, T. L. Choquette, P. B. Berthelette, G. A. White, L. A. Couture, M. B. Everton, J. Keegan, J. M. Martin, D. A. Pratt, M. P. Smith, A. E. Smith, and S. C. Wadsworth.** 1996. Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J Virol* **70**:8459-67.
91. **Hermens, W. T., and J. Verhaagen.** 1997. Adenoviral vector-mediated gene expression in the nervous system of immunocompetent Wistar and T cell-deficient nude rats: preferential survival of transduced astroglial cells in nude rats. *Hum Gene Ther* **8**:1049-63.
92. **Hilleman, M. R., and J. H. Werner.** 1954. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* **85**:183-8.
93. **Hirt, B.** 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**:365-9.
94. **Holder, J. L., Jr., L. Zhang, B. M. Kublaoui, R. J. DiLeone, O. K. Oz, C. H. Bair, Y. H. Lee, and A. R. Zinn.** 2004. Sim1 gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**:E105-13.
95. **Horikoshi, N., A. Usheva, J. Chen, A. J. Levine, R. Weinmann, and T. Shenk.** 1995. Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **15**:227-34.
96. **Horne, R. W., S. Brenner, A. P. Waterson, and P. Wildy.** 1959. The icosahedral form of an adenovirus. *J. Mol. Biol.* **1**:84-86.

97. **Howe, J. A., P. Pelka, D. Antelman, C. Wilson, D. Cornell, W. Hancock, M. Ramachandra, J. Avanzini, M. Horn, K. Wills, S. Sutjipto, and R. Ralston.** 2006. Matching complementing functions of transformed cells with stable expression of selected viral genes for production of E1-deleted adenovirus vectors. *Virology* **345**:220-30.
98. **Huang, A., Y. Chen, X. Wang, S. Zhao, N. Su, and D. W. White.** 2004. Functional silencing of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase gene expression in vivo by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNA. *FEBS Lett* **558**:69-73.
99. **Huebner, R. J., W. P. Rowe, T. G. Ward, R. H. Parrott, and J. A. Bell.** 1954. Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *N Engl J Med* **251**:1077-86.
100. **Iftode, C., and S. J. Flint.** 2004. Viral DNA synthesis-dependent titration of a cellular repressor activates transcription of the human adenovirus type 2 IVa2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17831-6.
101. **Imler, J. L., A. Bout, D. Dreyer, A. Dieterle, H. Schultz, D. Valerio, M. Mehtali, and A. Pavirani.** 1995. Trans-complementation of E1-deleted adenovirus: a new vector to reduce the possibility of codissemination of wild-type and recombinant adenoviruses. *Hum Gene Ther* **6**:711-21.
102. **Imler, J. L., C. Chartier, D. Dreyer, A. Dieterle, M. Sainte-Marie, T. Faure, A. Pavirani, and M. Mehtali.** 1996. Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther* **3**:75-84.
103. **Jarraya, B., S. Boulet, G. S. Ralph, C. Jan, G. Bonvento, M. Azzouz, J. E. Miskin, M. Shin, T. Delzescaux, X. Drouot, A. S. Herard, D. M. Day, E. Brouillet, S. M. Kingsman, P. Hantraye, K. A. Mitrophanous, N. D. Mazarakis, and S. Palfi.** 2009. Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci Transl Med* **1**:2ra4.
104. **Kanagawa, N., J. Q. Gao, Y. Motomura, T. Yanagawa, Y. Mukai, Y. Yoshioka, N. Okada, and S. Nakagawa.** 2008. Antitumor mechanism of intratumoral injection with IL-12-expressing adenoviral vector against IL-12-unresponsive tumor. *Biochem Biophys Res Commun* **372**:821-5.
105. **Ketner, G., F. Spencer, S. Tugendreich, C. Connelly, and P. Hieter.** 1994. Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6186-90.

106. **Kim, J. E., M. W. Ahn, S. H. Baek, I. K. Lee, Y. W. Kim, J. Y. Kim, J. M. Dan, and S. Y. Park.** 2008. AMPK activator, AICAR, inhibits palmitate-induced apoptosis in osteoblast. *Bone*.
107. **Kim, J. H., Y. S. Lee, H. Kim, J. H. Huang, A. R. Yoon, and C. O. Yun.** 2006. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst* **98**:1482-93.
108. **Kim, J. S., S. H. Lee, Y. S. Cho, K. Park, Y. H. Kim, and J. H. Lee.** 2001. Development of a packaging cell line for propagation of replication-deficient adenovirus vector. *Exp Mol Med* **33**:145-9.
109. **Kim, S., Z. Peng, and Y. Kaneda.** 2008. Current status of gene therapy in Asia. *Mol Ther* **16**:237-43.
110. **Kitajewski, J., R. J. Schneider, B. Safer, S. M. Munemitsu, C. E. Samuel, B. Thimmappaya, and T. Shenk.** 1986. Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell* **45**:195-200.
111. **Klyushnichenko, V., A. Bernier, A. Kamen, and E. Harmsen.** 2001. Improved high-performance liquid chromatographic method in the analysis of adenovirus particles. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **755**:27-36.
112. **Kojoaghlanian, T., P. Flomenberg, and M. S. Horwitz.** 2003. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* **13**:155-71.
113. **Kopecky-Bromberg, S. A., and P. Palese.** 2009. Recombinant vectors as influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* **333**:243-67.
114. **Kraus, V. B., J. A. Inostroza, K. Yeung, D. Reinberg, and J. R. Nevins.** 1994. Interaction of the Dr1 inhibitory factor with the TATA binding protein is disrupted by adenovirus E1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6279-82.
115. **Krougliak, V., and F. L. Graham.** 1995. Development of cell lines capable of complementing E1, E4, and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Hum Gene Ther* **6**:1575-86.
116. **Kunigal, S., S. S. Lakka, P. Joseph, N. Estes, and J. S. Rao.** 2008. Matrix metalloproteinase-9 Inhibition Down-Regulates Radiation-Induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity Leading to Apoptosis in Breast Tumors. *Clin Cancer Res* **14**:3617-26.

117. **Lamarche, N., G. Matton, B. Massie, M. Fontecave, M. Atta, F. Dumas, P. Gaudreau, and Y. Langelier.** 1996. Production of the R2 subunit of ribonucleotide reductase from herpes simplex virus with prokaryotic and eukaryotic expression systems: higher activity of R2 produced by eukaryotic cells related to higher iron-binding capacity. *Biochem J* **320 ( Pt 1)**:129-35.
118. **Lamartina, S., M. Cimino, G. Roscilli, E. Dammassa, D. Lazzaro, R. Rota, G. Ciliberto, and C. Toniatti.** 2007. Helper-dependent adenovirus for the gene therapy of proliferative retinopathies: stable gene transfer, regulated gene expression and therapeutic efficacy. *J Gene Med* **9**:862-74.
119. **Langelier, Y., S. Bergeron, S. Chabaud, J. Lippens, C. Guilbault, A. M. Sasseville, S. Denis, D. D. Mosser, and B. Massie.** 2002. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* **83**:2779-89.
120. **Langelier, Y., L. Champoux, M. Hamel, C. Guilbault, N. Lamarche, P. Gaudreau, and B. Massie.** 1998. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase is a good substrate for host cell protein kinases but is not itself a protein kinase. *J Biol Chem* **273**:1435-43.
121. **Lechner, R. L., and T. J. Kelly, Jr.** 1977. The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *Cell* **12**:1007-20.
122. **Lee, S. E., R. J. Jin, S. G. Lee, S. J. Yoon, M. S. Park, D. S. Heo, and H. Choi.** 2000. Development of a new plasmid vector with PSA-promoter and enhancer expressing tissue-specificity in prostate carcinoma cell lines. *Anticancer Res* **20**:417-22.
123. **Leen, A. M., A. Christin, M. Khalil, H. Weiss, A. P. Gee, M. K. Brenner, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and C. M. Bollard.** 2008. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *J Virol* **82**:546-54.
124. **Lenaerts, L., E. De Clercq, and L. Naesens.** 2008. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol* **18**:357-74.
125. **Limbach, K. J., and T. L. Richie.** 2009. Viral vectors in malaria vaccine development. *Parasite Immunol* **31**:501-19.
126. **Ling, W. L., R. L. Longley, D. L. Brassard, L. Armstrong, and E. J. Schaefer.** 2002. Role of integrin alphaVbeta3 in the production of recombinant adenoviruses in HEK-293 cells. *Gene Ther* **9**:907-14.

127. **Liu, F., and M. R. Green.** 1990. A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Cell* **61**:1217-24.
128. **Liu LC, S. L.** Jan 2001. Method of Producing Adenoviral Vector Stocks.
129. **Liu, Y., and A. Deisseroth.** 2006. Oncolytic adenoviral vector carrying the cytosine deaminase gene for melanoma gene therapy. *Cancer Gene Ther* **13**:845-55.
130. **Lochmuller, H., A. Jani, J. Huard, S. Prescott, M. Simoneau, B. Massie, G. Karpati, and G. Acsadi.** 1994. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* **5**:1485-91.
131. **Louis, N., C. Eveleigh, and F. L. Graham.** 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* **233**:423-9.
132. **Lubaroff, D. M., B. R. Konety, B. Link, J. Gerstbrein, T. Madsen, M. Shannon, J. Howard, J. Paisley, D. Boeglin, T. L. Ratliff, and R. D. Williams.** 2009. Phase I clinical trial of an adenovirus/prostate-specific antigen vaccine for prostate cancer: safety and immunologic results. *Clin Cancer Res* **15**:7375-80.
133. **Lukashok, S. A., and M. S. Horwitz.** 1998. New perspectives in adenoviruses. *Curr Clin Top Infect Dis* **18**:286-305.
134. **Lusky, M., M. Christ, K. Rittner, A. Dieterle, D. Dreyer, B. Mourot, H. Schultz, F. Stoeckel, A. Pavirani, and M. Mehtali.** 1998. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* **72**:2022-32.
135. **MacGill, R. S., T. A. Davis, J. Macko, H. J. Mauceri, R. R. Weichselbaum, and C. R. King.** 2007. Local gene delivery of tumor necrosis factor alpha can impact primary tumor growth and metastases through a host-mediated response. *Clin Exp Metastasis* **24**:521-31.

136. **Maguire, A. M., F. Simonelli, E. A. Pierce, E. N. Pugh, Jr., F. Mingozi, J. Bennicelli, S. Banfi, K. A. Marshall, F. Testa, E. M. Surace, S. Rossi, A. Lyubarsky, V. R. Arruda, B. Konkle, E. Stone, J. Sun, J. Jacobs, L. Dell'Osso, R. Hertle, J. X. Ma, T. M. Redmond, X. Zhu, B. Hauck, O. Zeleniaia, K. S. Shindler, M. G. Maguire, J. F. Wright, N. J. Volpe, J. W. McDonnell, A. Auricchio, K. A. High, and J. Bennett.** 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**:2240-8.
137. **Massie, B.** 1999. Adenovirus E1-complementing cell lines patent 5,891,690.
138. **Massie, B.** 1998. New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology* **28**:53-64.
139. **Massie, B.** 2000. Production des vecteurs adénoviraux, p. 649-657. *In* E. T. DOC-Lavoisier (ed.), *La thérapie génique*.
140. **Massie, B., F. Couture, L. Lamoureux, D. D. Mosser, C. Guilbault, P. Jolicoeur, F. Belanger, and Y. Langelier.** 1998. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* **72**:2289-96.
141. **Massie, B., J. Dionne, N. Lamarche, J. Fleurent, and Y. Langelier.** 1995. Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Biotechnology (N Y)* **13**:602-8.
142. **McCaffrey, A. P., P. Fawcett, H. Nakai, R. L. McCaffrey, A. Ehrhardt, T. T. Pham, K. Pandey, H. Xu, S. Feuss, T. A. Storm, and M. A. Kay.** 2008. The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver. *Mol Ther* **16**:931-41.
143. **McVey, D., M. Zuber, D. E. Brough, and I. Kovesdi.** 2003. Adenovirus vector library: an approach to the discovery of gene and protein function. *J Gen Virol* **84**:3417-22.
144. **Mirza, M. A., and J. Weber.** 1982. Structure of adenovirus chromatin. *Biochim Biophys Acta* **696**:76-86.
145. **Mitchell, R., C. Y. Chiang, C. Berry, and F. Bushman.** 2003. Global analysis of cellular transcription following infection with an HIV-based vector. *Mol Ther* **8**:674-87.
146. **Miyake, S., M. Makimura, Y. Kanegae, S. Harada, Y. Sato, K. Takamori, C. Tokuda, and I. Saito.** 1996. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:1320-4.

147. **Mizuguchi, H., and M. A. Kay.** 1998. Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Hum Gene Ther* **9**:2577-83.
148. **Mullick, A., Y. Xu, R. Warren, M. Koutroumanis, C. Guilbault, S. Broussau, F. Malenfant, L. Bourget, L. Lamoureux, R. Lo, A. W. Caron, A. Pilotte, and B. Massie.** 2006. The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol* **6**:43.
149. **Muruve, D. A., V. Petrilli, A. K. Zaiss, L. R. White, S. A. Clark, P. J. Ross, R. J. Parks, and J. Tschopp.** 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* **452**:103-7.
150. **Nadeau, I., A. Garnier, J. Côté, B. Massie, C. Chavarie, and A. Kamen.** 1996. Improvement of recombinant protein production with the human adenovirus/293S expression system using fed-batch strategies. *Biotechnology & Bioengineering* **51**:613-623.
151. **Nadeau, I., and A. Kamen.** 2003. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv* **20**:475-89.
152. **Nemunaitis, J., I. Ganly, F. Khuri, J. Arseneau, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, P. Maples, L. Romel, B. Randlev, T. Reid, S. Kaye, and D. Kirn.** 2000. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* **60**:6359-66.
153. **Nevins, J. R.** 1982. Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell* **29**:913-9.
154. **Ng, P., C. Beauchamp, C. Eveleigh, R. Parks, and F. L. Graham.** 2001. Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* **3**:809-15.
155. **Nijhawan, D., N. Honarpour, and X. Wang.** 2000. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* **23**:73-87.
156. **O'Shea, C. C., L. Johnson, B. Bagus, S. Choi, C. Nicholas, A. Shen, L. Boyle, K. Pandey, C. Soria, J. Kunich, Y. Shen, G. Habets, D. Ginzinger, and F. McCormick.** 2004. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell* **6**:611-23.

157. **Ogorelkova, M., J. Zwaagstra, S. M. Elahi, C. Dias, C. Guilbaut, R. Lo, C. Collins, M. Jaramillo, A. Mullick, M. O'Connor-McCourt, and B. Massie.** 2006. Adenovirus-delivered antisense RNA and shRNA exhibit different silencing efficiencies for the endogenous transforming growth factor-beta (TGF-beta) type II receptor. *Oligonucleotides* **16**:2-14.
158. **Oka, K., L. M. Belalcazar, C. Dieker, E. A. Nour, P. Nuno-Gonzalez, A. Paul, S. Cormier, J. K. Shin, M. Finegold, and L. Chan.** 2007. Sustained phenotypic correction in a mouse model of hypoalphalipoproteinemia with a helper-dependent adenovirus vector. *Gene Ther* **14**:191-202.
159. **Ono, H. A., J. G. Davydova, Y. Adachi, K. Takayama, S. D. Barker, P. N. Reynolds, V. N. Krasnykh, C. Kunisaki, H. Shimada, D. T. Curiel, and M. Yamamoto.** 2005. Promoter-controlled infectivity-enhanced conditionally replicative adenoviral vectors for the treatment of gastric cancer. *J Gastroenterol* **40**:31-42.
160. **Ornelles, D. A., and T. Shenk.** 1991. Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol* **65**:424-9.
161. **Ostapchuk, P., M. E. Anderson, S. Chandrasekhar, and P. Hearing.** 2006. The L4 22-kilodalton protein plays a role in packaging of the adenovirus genome. *J Virol* **80**:6973-81.
162. **Ostapchuk, P., and P. Hearing.** 2003. Regulation of adenovirus packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **272**:165-85.
163. **Ostapchuk, P., J. Yang, E. Auffarth, and P. Hearing.** 2005. Functional interaction of the adenovirus IVa2 protein with adenovirus type 5 packaging sequences. *J Virol* **79**:2831-8.
164. **Oualikene, W., L. Lamoureux, J. M. Weber, and B. Massie.** 2000. Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum Gene Ther* **11**:1341-53.
165. **Oualikene, W., and B. Massie.** 2000. Adenovirus vector in functional genomics In cells engineering p. 80-154, *Cell Engineering*. Kluwer Academic Publishers.
166. **Parato, K. A., D. Senger, P. A. Forsyth, and J. C. Bell.** 2005. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* **5**:965-76.

167. **Parks, R. J., L. Chen, M. Anton, U. Sankar, M. A. Rudnicki, and F. L. Graham.** 1996. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:13565-70.
168. **Pitisuttithum, P., P. Gilbert, M. Gurwith, W. Heyward, M. Martin, F. van Griensven, D. Hu, J. W. Tappero, and K. Choopanya.** 2006. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* **194**:1661-71.
169. **Prestwich, R. J., K. J. Harrington, H. S. Pandha, R. G. Vile, A. A. Melcher, and F. Errington.** 2008. Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* **8**:1581-8.
170. **Priddy, F. H., D. Brown, J. Kublin, K. Monahan, D. P. Wright, J. Lalezari, S. Santiago, M. Marmor, M. Lally, R. M. Novak, S. J. Brown, P. Kulkarni, S. A. Dubey, L. S. Kierstead, D. R. Casimiro, R. Mogg, M. J. DiNubile, J. W. Shiver, R. Y. Leavitt, M. N. Robertson, D. V. Mehrotra, and E. Quirk.** 2008. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis* **46**:1769-81.
171. **Puntel, M., J. F. Curtin, J. M. Zirger, A. K. Muhammad, W. Xiong, C. Liu, J. Hu, K. M. Kroeger, P. Czer, S. Sciascia, S. Mondkar, P. R. Lowenstein, and M. G. Castro.** 2006. Quantification of high-capacity helper-dependent adenoviral vector genomes in vitro and in vivo, using quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction. *Hum Gene Ther* **17**:531-44.
172. **Querido, E., M. R. Morrison, H. Chu-Pham-Dang, S. W. Thirlwell, D. Boivin, and P. E. Branton.** 2001. Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol* **75**:699-709.
173. **Quinonez, R., and R. E. Sutton.** 2002. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* **21**:937-51.
174. **Rayner, J. R., and T. J. Gonda.** 1994. A simple and efficient procedure for generating stable expression libraries by cDNA cloning in a retroviral vector. *Mol Cell Biol* **14**:880-7.
175. **Rekosh, D. M., W. C. Russell, A. J. Bellet, and A. J. Robinson.** 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* **11**:283-95.

176. **Roberts, D. M., A. Nanda, M. J. Havenga, P. Abbink, D. M. Lynch, B. A. Ewald, J. Liu, A. R. Thorner, P. E. Swanson, D. A. Gorgone, M. A. Lifton, A. A. Lemckert, L. Holterman, B. Chen, A. Dilraj, A. Carville, K. G. Mansfield, J. Goudsmit, and D. H. Barouch.** 2006. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* **441**:239-43.
177. **Rodrigues, T., M. J. Carrondo, P. M. Alves, and P. E. Cruz.** 2007. Purification of retroviral vectors for clinical application: biological implications and technological challenges. *J Biotechnol* **127**:520-41.
178. **Rothkamm, K., I. Kruger, L. H. Thompson, and M. Lobrich.** 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**:5706-15.
179. **Rots, M. G., M. G. Elferink, W. M. Gommans, D. Oosterhuis, J. A. Schalk, D. T. Curiel, P. Olinga, H. J. Haisma, and G. M. Groothuis.** 2006. An ex vivo human model system to evaluate specificity of replicating and non-replicating gene therapy agents. *J Gene Med* **8**:35-41.
180. **Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, and T. G. Ward.** 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**:570-3.
181. **Santosuosso, M., S. McCormick, and Z. Xing.** 2005. Adenoviral vectors for mucosal vaccination against infectious diseases. *Viral Immunol* **18**:283-91.
182. **Sarantis, H., G. Johnson, M. Brown, M. Petric, and R. Tellier.** 2004. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol* **42**:3963-9.
183. **Sarkar, D., Z. Z. Su, N. Vozhilla, E. S. Park, A. Randolph, K. Valerie, and P. B. Fisher.** 2005. Targeted virus replication plus immunotherapy eradicates primary and distant pancreatic tumors in nude mice. *Cancer Res* **65**:9056-63.
184. **Schaack, J., W. Y. Ho, P. Freimuth, and T. Shenk.** 1990. Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev* **4**:1197-208.
185. **Schaack, J., S. Langer, and X. Guo.** 1995. Efficient selection of recombinant adenoviruses by vectors that express beta-galactosidase. *J Virol* **69**:3920-3.
186. **Schiedner, G., S. Hertel, and S. Kochanek.** 2000. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther* **11**:2105-16.

187. **Schirmbeck, R., J. Reimann, S. Kochanek, and F. Kreppel.** 2008. The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol Ther* **16**:1609-16.
188. **Schmidt, A., M. Bockmann, A. Stoll, T. Racek, and B. M. Putzer.** 2005. Analysis of adenovirus gene transfer into adult neural stem cells. *Virus Res* **114**:45-53.
189. **Schnepp, B. C., R. L. Jensen, K. R. Clark, and P. R. Johnson.** 2009. Infectious molecular clones of adeno-associated virus isolated directly from human tissues. *J Virol* **83**:1456-64.
190. **Schwartz, A. R., Y. Togo, and R. B. Hornick.** 1974. Clinical evaluation of live, oral types 1, 2, and 5 adenovirus vaccines. *Am Rev Respir Dis* **109**:233-9.
191. **Sczakiel, G.** 1997. The design of antisense RNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**:439-44.
192. **Shashkova, E. V., M. N. Kuppaswamy, W. S. Wold, and K. Doronin.** 2007. Anticancer activity of oncolytic adenovirus vector armed with IFN-alpha and ADP is enhanced by pharmacologically controlled expression of TRAIL. *Cancer Gene Ther.*
193. **Shaw, A. R., and E. B. Ziff.** 1980. Transcripts from the adenovirus-2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families. *Cell* **22**:905-16.
194. **Shenk, T.** 1996. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication, p. 2111-2148, *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins.
195. **Shi, C. X., M. Hitt, P. Ng, and F. L. Graham.** 2002. Superior tissue-specific expression from tyrosinase and prostate-specific antigen promoters/enhancers in helper-dependent compared with first-generation adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **13**:211-24.
196. **Shi, Y., E. Seto, L. S. Chang, and T. Shenk.** 1991. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* **67**:377-88.
197. **Shirakawa, T., S. Terao, N. Hinata, K. Tanaka, A. Takenaka, I. Hara, K. Sugimura, M. Matsuo, K. Hamada, K. Fuji, T. Okegawa, E. Higashihara, T. A. Gardner, C. Kao, L. W. Chung, S. Kamidono, M. Fujisawa, and A. Gotoh.** 2007. Long-term outcome of phase I/II clinical trial of Ad-OC-TK/VAL gene therapy for hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Hum Gene Ther* **18**:1225-32.

198. **Short, J. J., A. V. Pereboev, Y. Kawakami, C. Vasu, M. J. Holterman, and D. T. Curiel.** 2004. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* **322**:349-59.
199. **Sinn, P. L., S. L. Sauter, and P. B. McCray, Jr.** 2005. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther* **12**:1089-98.
200. **Smart, J. E., and B. W. Stillman.** 1982. Adenovirus terminal protein precursor. Partial amino acid sequence and the site of covalent linkage to virus DNA. *J Biol Chem* **257**:13499-506.
201. **Snyder, R. O., and T. R. Flotte.** 2002. Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* **13**:418-23.
202. **Snyder, R. O., and J. Francis.** 2005. Adeno-associated viral vectors for clinical gene transfer studies. *Curr Gene Ther* **5**:311-21.
203. **Stitz, J., P. O. Krutzik, and G. P. Nolan.** 2005. Screening of retroviral cDNA libraries for factors involved in protein phosphorylation in signaling cascades. *Nucleic Acids Res* **33**:e39.
204. **Sullivan, N. J., T. W. Geisbert, J. B. Geisbert, D. J. Shedlock, L. Xu, L. Lamoreaux, J. H. Custers, P. M. Popernack, Z. Y. Yang, M. G. Pau, M. Roederer, R. A. Koup, J. Goudsmit, P. B. Jahrling, and G. J. Nabel.** 2006. Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med* **3**:e177.
205. **Sumida, S. M., D. M. Truitt, A. A. Lemckert, R. Vogels, J. H. Custers, M. M. Addo, S. Lockman, T. Peter, F. W. Peyerl, M. G. Kishko, S. S. Jackson, D. A. Gorgone, M. A. Lifton, M. Essex, B. D. Walker, J. Goudsmit, M. J. Havenga, and D. H. Barouch.** 2005. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J Immunol* **174**:7179-85.
206. **Suomalainen, M., M. Y. Nakano, K. Boucke, S. Keller, and U. F. Greber.** 2001. Adenovirus-activated PKA and p38/MAPK pathways boost microtubule-mediated nuclear targeting of virus. *Embo J* **20**:1310-9.
207. **Tachibana, R., H. Harashima, N. Ide, S. Ukitsu, Y. Ohta, N. Suzuki, H. Kikuchi, Y. Shinohara, and H. Kiwada.** 2002. Quantitative analysis of correlation between number of nuclear plasmids and gene expression activity after transfection with cationic liposomes. *Pharm Res* **19**:377-81.

208. **Tamanoi, F., and B. W. Stillman.** 1982. Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:2221-5.
209. **Tauser, R. G., and O. Stoica.** 2003. [Basic principles of the antisense strategy]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* **107**:483-6.
210. **Thorner, A. R., R. Vogels, J. Kaspers, G. J. Weverling, L. Holterman, A. A. Lemckert, A. Dilraj, L. M. McNally, P. M. Jeena, S. Jepsen, P. Abbink, A. Nanda, P. E. Swanson, A. T. Bates, K. L. O'Brien, M. J. Havenga, J. Goudsmit, and D. H. Barouch.** 2006. Age dependence of adenovirus-specific neutralizing antibody titers in individuals from sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol* **44**:3781-3.
211. **Timpe, J. M., K. C. Verrill, and J. P. Trempe.** 2006. Effects of adeno-associated virus on adenovirus replication and gene expression during coinfection. *J Virol* **80**:7807-15.
212. **Toogood, C. I., J. Crompton, and R. T. Hay.** 1992. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *J Gen Virol* **73 ( Pt 6)**:1429-35.
213. **Toth, M., W. Doerfler, and T. Shenk.** 1992. Adenovirus DNA replication facilitates binding of the MLTF/USF transcription factor to the viral major late promoter within infected cells. *Nucleic Acids Res* **20**:5143-8.
214. **Trotman, L. C., N. Mosberger, M. Fornerod, R. P. Stidwill, and U. F. Greber.** 2001. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol* **3**:1092-100.
215. **Tsukui, T., Y. Kanegae, I. Saito, and Y. Toyoda.** 1996. Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs. *Nat Biotechnol* **14**:982-5.
216. **Tuve, S., Y. Liu, K. Tragoolpua, J. D. Jacobs, R. C. Yumul, Z. Y. Li, R. Strauss, K. E. Hellstrom, M. L. Disis, S. Roffler, and A. Lieber.** 2009. In situ adenovirus vaccination engages T effector cells against cancer. *Vaccine* **27**:4225-39.
217. **Valentine, R. C., and H. G. Pereira.** 1965. Antigens and structure of the adenovirus. *J Mol Biol* **13**:13-20.
218. **van Oostrum, J., and R. M. Burnett.** 1985. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol* **56**:439-48.

219. **Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al.** 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-51.
220. **Volkert, F. C., and C. S. Young.** 1983. The genetic analysis of recombination using adenovirus overlapping terminal DNA fragments. *Virology* **125**:175-93.
221. **Wang, C. E., H. Zhou, J. R. McGuire, V. Cerullo, B. Lee, S. H. Li, and X. J. Li.** 2008. Suppression of neuropil aggregates and neurological symptoms by an intracellular antibody implicates the cytoplasmic toxicity of mutant huntingtin. *J Cell Biol* **181**:803-16.
222. **Weber, J. M., and K. Tihanyi.** 1994. Adenovirus endopeptidases. *Methods Enzymol* **244**:595-604.
223. **Weinberg, R. A.** 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**:323-30.
224. **Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresch, and G. R. Nemerow.** 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**:309-19.
225. **Wilson, J. M.** 2005. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther* **16**:1014-5.
226. **Wilson, J. M.** 2009. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab* **96**:151-7.
227. **Yang, C., D. Gagnon, P. Vachon, A. Tremblay, E. Levy, B. Massie, and J. L. Michaud.** 2006. Adenoviral-mediated modulation of Sim1 expression in the paraventricular nucleus affects food intake. *J Neurosci* **26**:7116-20.

228. **Yao, X., Y. Yoshioka, T. Morishige, Y. Eto, H. Watanabe, Y. Okada, H. Mizuguchi, Y. Mukai, N. Okada, and S. Nakagawa.** 2009. Systemic administration of a PEGylated adenovirus vector with a cancer-specific promoter is effective in a mouse model of metastasis. *Gene Ther* **16**:1395-404.
229. **Yew, P. R., X. Liu, and A. J. Berk.** 1994. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* **8**:190-202.
230. **Yoo, J. Y., J. H. Kim, J. Kim, J. H. Huang, S. N. Zhang, Y. A. Kang, H. Kim, and C. O. Yun.** 2008. Short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus-mediated inhibition of IL-8: effects on antiangiogenesis and tumor growth inhibition. *Gene Ther* **15**:635-51.
231. **Yu, W., and H. Fang.** 2007. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* **7**:141-8.
232. **Yueh, A., and R. J. Schneider.** 1996. Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev* **10**:1557-67.
233. **Zanghi, J. A., W. A. Renner, J. E. Bailey, and M. Fussenegger.** 2000. The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures. *Biotechnol Prog* **16**:319-25.
234. **Zhang, H. G., Y. M. Wang, J. F. Xie, X. Liang, H. C. Hsu, X. Zhang, J. Douglas, D. T. Curiel, and J. D. Mountz.** 2001. Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titer recombinant adeno-associated virus. *Gene Ther* **8**:704-12.
235. **Zhang, J. A., D. Jia, D. E. Olson, A. G. Campbell, and P. M. Thule.** 2009. Hepatic insulin gene therapy diminishes liver glycogen despite insulin responsive transcriptional effects in diabetic CD-1 mice. *J Gene Med* **11**:588-97.
236. **Zheng, L., and W. H. Lee.** 2001. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* **264**:2-18.
237. **Zhou, S., D. Mody, S. S. DeRavin, J. Hauer, T. Lu, Z. Ma, S. Hacein-Bey Abina, J. T. Gray, M. R. Greene, M. Cavazzana-Calvo, H. L. Malech, and B. P. Sorrentino.** 2010. A self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy that does not activate LMO2 expression in human T cells. *Blood* **116**:900-8.
238. **Zhu, J., X. Huang, and Y. Yang.** 2007. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* **81**:3170-80.

239. **Zincarelli, C., S. Soltys, G. Rengo, and J. E. Rabinowitz.** 2008. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* **16**:1073-80.
240. **Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono, and T. J. Hope.** 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**:2886-92.

## **ANNEXE I : RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES - DÉVELOPPEMENT DE PROCÉDÉS EFFICACES POUR LA PRODUCTION DE VECTEURS AAV**

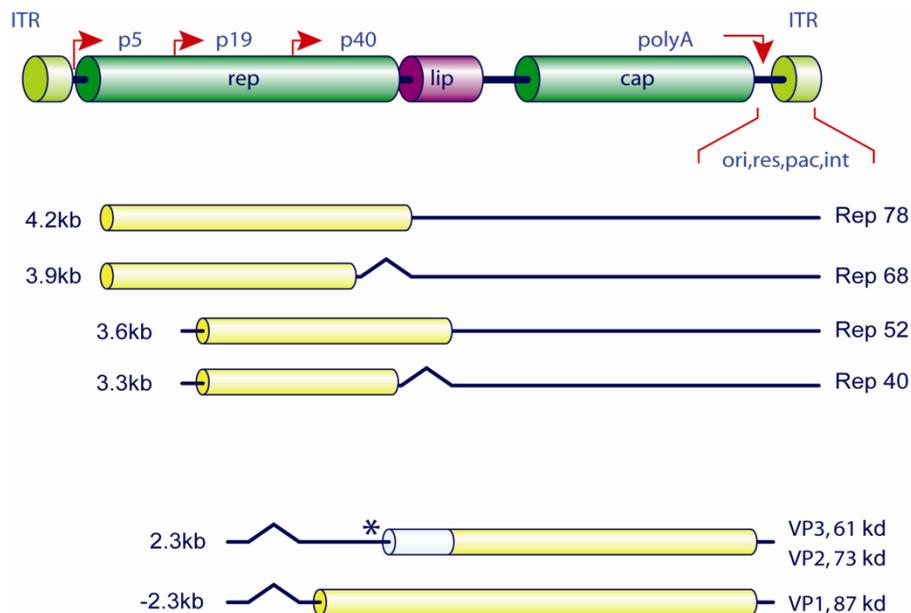
### **1.0 Introduction**

Ce projet, qui traite du développement d'une nouvelle méthode de production de vecteurs Adeno-Associated Virus (AAV), se situe dans le contexte du travail qui a été effectué avec les vecteurs Ad $\Delta$ PS. Si les vecteurs AAV représentent des outils très prometteurs de thérapie génique, leur utilisation reste relativement limitée à cause des méthodes de production déficiente. Or, il s'avère que les Ad $\Delta$ PS pourraient représenter un outil intéressant permettant une construction plus efficace des vecteurs AAV. Dans le cadre des travaux de cette thèse, comme beaucoup de travaux ont impliqué l'utilisation d'un Ad $\Delta$ PS, il nous est apparu logique d'y inclure le volet AAV.

L'AAV) est un petit virus icosaédrique (22-30 nm) à ADN simple-brin non enveloppé appartenant à la famille des parvovirus. L'AAV se distingue aussi par le fait qu'il est un dépendovirus, c'est-à-dire qu'il ne peut compléter son cycle de réplication de manière indépendante. Pour ce faire, une cellule préalablement infectée par un AAV doit être co-infectée par un virus auxiliaire tel que l'adénovirus ou le virus de l'herpes simplex. De ce fait, l'AAV a d'abord été identifié dans les années 60 comme étant un contaminant de préparation adénovirale.

L'AAV possède un génome relativement petit de 4 700 pb qui sera en mesure de produire uniquement 2 familles de protéines : les protéines Rep (Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40), impliquées dans la réplication du virus et les protéines Cap (VP1, VP2 et VP3) qui composeront la capsid. L'expression de ces protéines seront sous le contrôle de 3 promoteurs (p5, p19 et p40), les transcrits produits à partir de ces 3 promoteurs subiront ensuite un épissage alternatif qui donnera naissance aux différentes protéines Rep et Cap. Le génome sera flanqué à ses 2 extrémités par des séquences terminales inversées (ITR) de 145 pb. Ces séquences contiennent les éléments actifs en *cis* qui

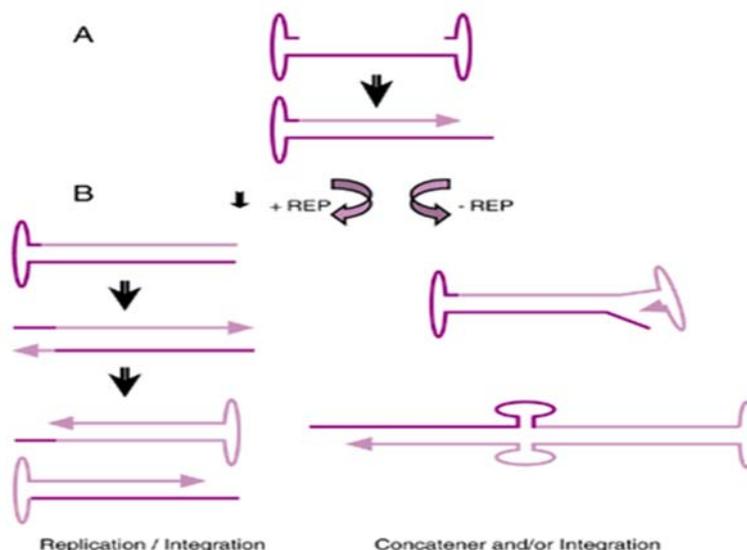
assureront la réplication de l'ADN viral, de même que l'encapsidation du génome (figure AI-1).



**Figure AI-1 : Structure du génome de l'AAV et unités transcriptionnelles. Les régions Rep et Cap sont bordées par les ITR qui contiennent l'origine de réplication (ori), le site d'encapsidation (pac), la séquence d'intégration (int) et d'excision (res). La région Lip que l'on retrouve dans les VP2 et VP3 n'est pas essentielle pour la réplication du virus.**

Lors d'une infection par AAV, dans la phase précoce du cycle il y aura une conversion du génome simple-brin en double-brin suivi d'une expression transitoire des protéines Rep. Les protéines Rep 78 et 68 permettront de diriger une intégration site spécifique des ITR dans le chromosome 19. Une fois intégré, toute activité transcriptionnelle du génome cesse et le virus entre dans une période de dormance en attendant d'être réactivé par un virus auxiliaire. Dans le cas de l'adénovirus, cette réactivation sera déclenchée par l'expression des protéines de la région E1. Celles-ci vont transactiver le promoteur p5 et la nouvelle production des protéines Rep78 et Rep68 vont permettre une excision du génome enclenchant ainsi le cycle répliatif de l'AAV. Cette réplication dépendra aussi de l'expression des protéines E2 et E4 de l'Ad de même que de la production du VA RNA.

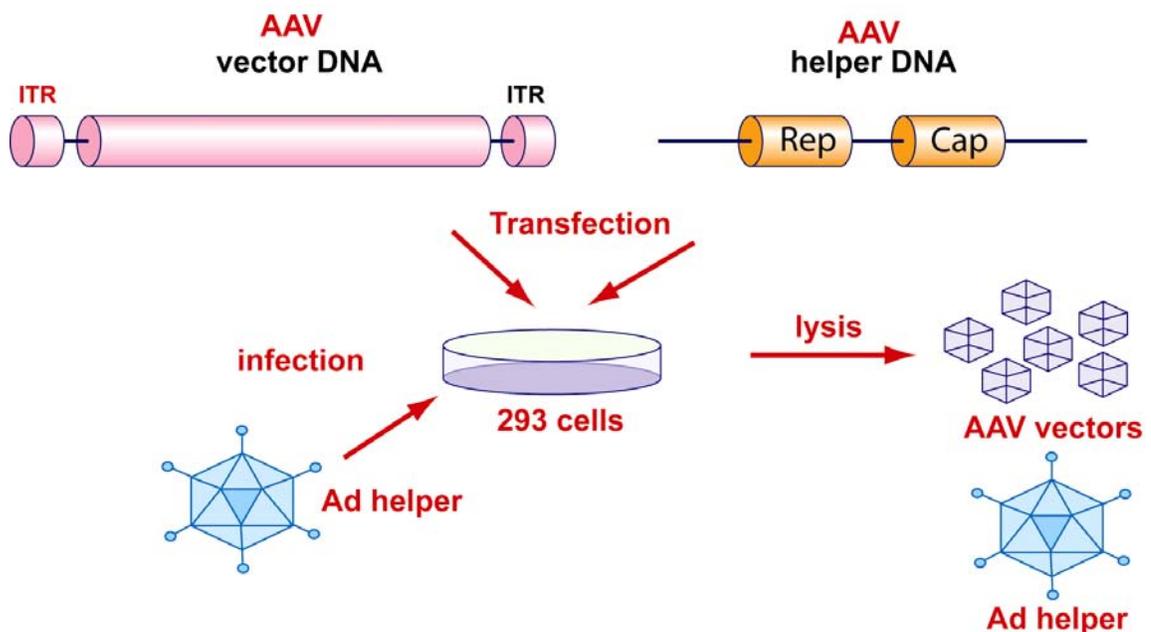
L'AAV est considéré comme un vecteur de choix pour la thérapie génique. Ce virus, naturellement défectueux, est pratiquement non-immunogénique et il n'a jamais été associé à quelque pathologie que ce soit. Ces caractéristiques lui confèrent un des plus hauts niveaux de biosécurité parmi tous les vecteurs d'origines virales (201). Les vecteurs AAV sont construits en remplaçant les gènes Rep et Cap par le transgène d'intérêt ne conservant ainsi que les 2 ITR. L'attrait majeur des vecteurs AAV réside dans leur capacité à pouvoir médier l'expression à long terme d'un transgène, et ce, même dans un hôte immunocompétent. Cette particularité se base sur la faible immunogénicité du vecteur et sur la capacité de ce dernier à créer une structure épisomique stable (concatémère) et/ou à s'intégrer de manière aléatoire dans le génome de la cellule l'hôte (figure AI-2).



**Figure AI-2 : Maintien de l'expression du vecteur AAV dans des cellules transduites. A) Dans un premier temps le génome simple brin est converti en structure double-brin par les polymérases cellulaires en utilisant les ITR comme amorce. B) Dans le cas d'un virus AAV, l'expression des protéines Rep permet une intégration site spécifique. Dans le cas d'un vecteur AAV, l'absence des protéines Rep permet une série de répliation à partir des ITR qui se solde par la formation de structure concatémérique et/ou une intégration aléatoire dans le génome de la cellule hôte.**

La stabilité du génome dans les cellules transduites combinées à la très faible immunogénicité du vecteur fait en sorte qu'il est possible de traiter efficacement des maladies chroniques (202).

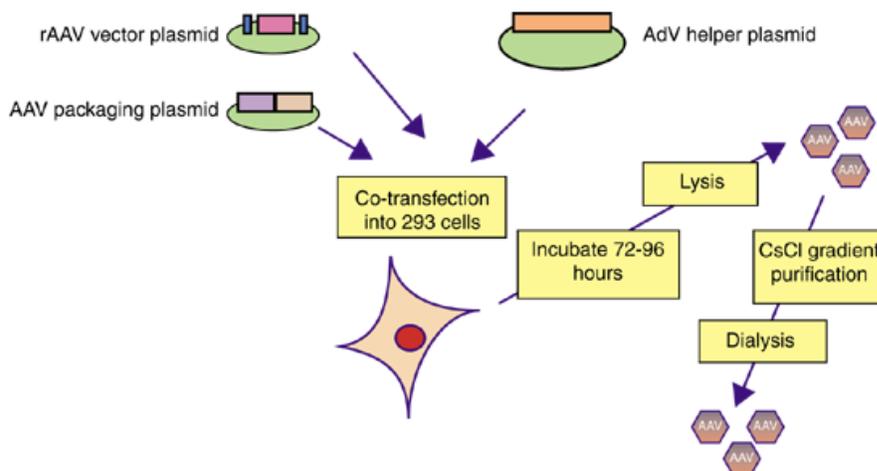
Malgré leur grand potentiel clinique, l'utilisation des vecteurs AAV est fortement limitée par l'absence de moyens efficaces pour produire ce type de vecteur à grande échelle étant donné que l'AAV nécessite un virus auxiliaire tel que l'Ad ou l'herpes simplex pour pouvoir être produit. La première approche développée pour produire les vecteurs AAV consistait à transférer un plasmide contenant le vecteur AAV, un second contenant les gènes Rep et Cap suivi d'une infection adénovirale (figure AI-3).



**Figure AI-3 : Production de vecteurs AAV à l'aide d'un Ad auxiliaire. Le vecteur AAV est produit par une double transfection du vecteur AAV et des gènes Rep et Cap suivit de l'infection par un Ad dans ces cellules 293. Suite à la lyse, on obtient un mélange de particules virales AAV et Ad.**

Si l'utilisation de cette méthode permet de générer de bonne concentration de vecteur AAV, la contamination de ces derniers par la présence de l'Ad fait en sorte que les stocks de vecteurs produits de cette manière ne peuvent pas être utilisés pour des applications cliniques en raison de la forte réponse immunitaire qui serait déclenchée par

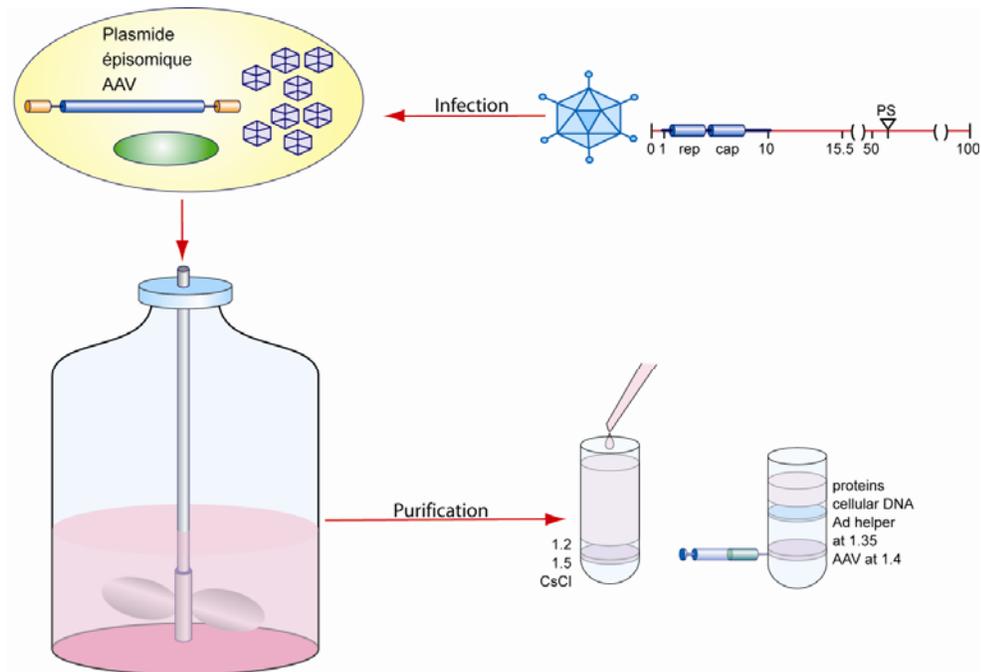
la présence de l'Ad, et ce, même en faible quantité. Pour éliminer la contamination adénovirale, l'infection adénovirale a été remplacée par un plasmide exprimant uniquement les fonctions auxiliaires essentielles pour la réplication de l'AAV (figure AI-4).



**Figure AI-4 : Production de vecteur AAV par tri-transfection. L'infection adénovirale est remplacée par la transfection d'un plasmide exprimant les fonctions auxiliaires de l'Ad, soit la région E2A, E4 et le VA RNA.**

Si cette méthode offre l'avantage d'éliminer la contamination adénovirale des stocks d'AAV produits, elle compromet aussi grandement la production à grande échelle étant donné son rendement relativement faible. Pour qu'une cellule puisse produire un vecteur AAV, elle doit être transfectée simultanément par 3 vecteurs, de plus la transfection à grande échelle (en bioréacteur) nécessitera la préparation d'une grande quantité de plasmides et elle sera toujours tributaire de l'efficacité de transfection qui peut varier sensiblement de production en production. Pour ces raisons, bien que la méthode de tri-transfection soit actuellement utilisée pour produire des stocks d'AAV destinés aux essais cliniques, celle-ci n'est pas assez conviviale pour permettre une utilisation étendue des vecteurs AAV. On se retrouve donc devant une impasse où les objectifs de biosécurité et de production prennent des directions opposées : si l'on veut simplifier la production, on contamine les stocks avec l'Ad alors que si l'on élimine l'Ad de la méthode de production, celle-ci devient beaucoup moins efficace.

Le projet mis en œuvre propose de concilier ces deux aspects: mettre au point une méthode assurant la qualité des vecteurs AAV produits tout en permettant la mise à l'échelle simple et robuste. Ainsi, on voudra produire l'AAV par une simple infection adénovirale d'une cellule contenant déjà sous forme épisomique un vecteur AAV. Un Ad recombinant exprimant les gènes Rep et Cap de l'AAV sera construit. Puisque la production de l'AAV ne dépend que de l'expression de ces deux gènes, d'une infection adénovirale et de la présence du vecteur AAV, on peut livrer de manière simultanée tous les gènes nécessaires à la réplication de l'AAV évitant ainsi les complications associées à la transfection à grande échelle. Pour garantir que les préparations seront exemptes de contamination, l'Ad utilisé se verra amputé d'un de ses gènes essentiels qui n'entre pas en jeu dans les premières étapes de la réplication: la protéase. On pourra ainsi obtenir une expression de Rep et Cap avec blocage total de la production de particules infectieuses Ad (figure AI-5).



**Figure AI-5 : Production de vecteur AAV par une simple infection avec un Ad non-répliatif. La production est déclenchée par l'infection d'une cellule 293, possédant déjà le vecteur AAV sous forme épisodique, par un Ad $\Delta$ PS exprimant les gènes Rep et Cap. Les fonctions AAV et auxiliaires sont donc livrées simultanément au moyen d'une simple infection. L'Ad utilisé pour cette infection étant non-répliatif,**

**la faible quantité résiduelle présente dans le stock de vecteurs AAV produit par cette méthode pourra être aisément éliminée par une purification sur chlorure de césium.**

Par contre, le gène Rep s'avère très toxique pour la réplication de l'Ad (42, 211, 234), il sera donc impératif de réguler adéquatement son expression afin d'assurer une production efficace de l'Ad $\Delta$ PS-Rep/Cap. Pour contrôler l'expression de Rep, nous avons créé un antisens dirigé contre ce gène. Cet antisens a ensuite été utilisé pour construire une lignée cellulaire à partir de cellules 293-PS. Donc l'Ad $\Delta$ PS-Rep/Cap sera amplifié sur des cellules 293-PS-antiRep, minimisant ainsi l'expression de Rep, alors que pour la production d'AAV, des cellules 293 seront infectées, permettant ainsi l'expression de Rep et une élimination de l'Ad $\Delta$ PS.

## **2. Résultats**

### **2.1 Utilisation d'un Ad $\Delta$ PS pour la production de vecteur AAV**

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si l'Ad $\Delta$ PS était tout aussi efficace qu'un Ad pour générer un vecteur AAV. Pour ce faire, nous avons comparé la production d'un vecteur AAV, exprimant la GFP, par la méthode de tri-transfection et par la méthode utilisant un virus auxiliaire de type sauvage ou  $\Delta$ PS. L'AAV recombinant ainsi produit exprimant la GFP, nous avons pu déterminer la concentration la progéniture virale produite par chacune des méthodes en utilisant la cytométrie en flux (figure AI-6).



**Figure AI-6 : Progéniture virale produite par tri-transfection et par infection avec un virus auxiliaire de type sauvage et  $\Delta$ PS.** Des cellules 293 ont été transfectées avec un plasmide AAV-GFP et un plasmide Rep-Cap. Dans le cas de la tri-transfection, un autre plasmide contenant les fonctions auxiliaires adénovirales a été transfecté. Dans les cas des infections, ces fonctions auxiliaires ont été livrées par un Ad sauvage ou  $\Delta$ PS utilisé à une MOI de 5. Cinq jours après la transfection/infection, les cellules ont été lysées par 3 gels-dégels et l'abondance de la progéniture virale a été évaluée par cytométrie en flux.

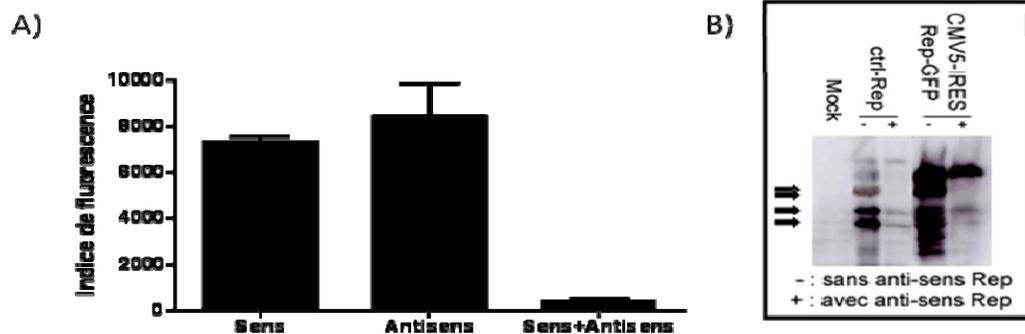
Comme prévu, la méthode de tri-transfection est de loin la moins efficace, celle-ci permettant à peine la production de 200 particules infectieuses par cellule. Si l'on substitue la transfection du plasmide auxiliaire par une infection adénovirale, le nombre de particules produites par cellules quadruple dans le cas du virus sauvage et triple dans le cas du virus  $\Delta$ PS. Bien que la production utilisant l'Ad $\Delta$ PS, soit légèrement inférieure à l'Ad de type sauvage, il n'en demeure pas moins que ce léger déclin dans la production n'est pas assez significatif pour disqualifier l'utilisation de l'Ad $\Delta$ PS comme virus auxiliaire dans la production de vecteur AAV.

## 2.2 Création d'un antisens Rep capable de réduire l'expression des protéines Rep

Ayant montré que l'Ad $\Delta$ PS était utilisable pour produire un vecteur AAV, l'étape suivante a consisté à créer un antisens Rep qui sera utilisé pour construire une lignée

cellulaire capable d'amplifier un Ad $\Delta$ PS-Rep/Cap puisque l'expression de la protéine Rep s'avère toxique pour la réplication de l'Ad. Pour ce faire, nous avons donc vérifié les propriétés inhibitrices d'un antisens Rep « pleine longueur » sur l'expression des protéines Rep. Le gène Rep a été cloné en orientation sens et antisens devant un IRES permettant sa co-expression avec la GFP, le tout est sous le contrôle d'un promoteur CMV5. L'IRES offre l'avantage de pouvoir quantifier l'expression du sens et de l'antisens en mesurant l'expression de la GFP.

La première expérience effectuée tire avantage de l'IRES. Nous avons transfecté un premier groupe des cellules avec un plasmide sens et un second groupe avec le plasmide antisens. L'expression de la GFP dans ces 2 contrôles a ensuite été comparée à un 3e groupe de cellules co-transfectées avec le sens et l'antisens. Plus l'antisens dirigé contre le Rep est efficace, plus il devrait avoir un effet inhibiteur collatéral sur l'expression de la GFP c'est-à-dire que plus l'antisens peut réduire l'expression des protéines Rep, plus le niveau de fluorescence de la GFP devrait diminuer (figure AI-7a).



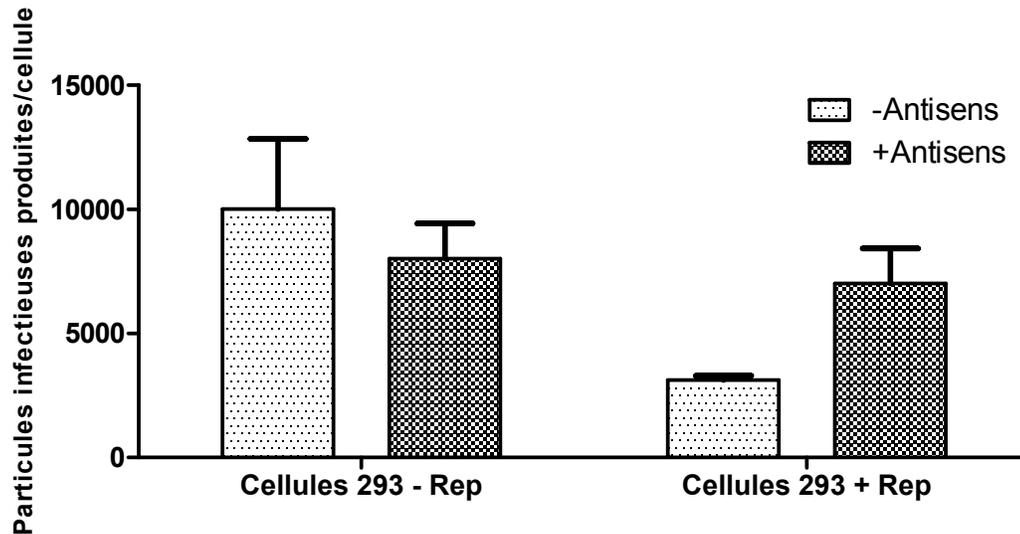
**Figure AI-7 : Efficacité de l'antisens dirigé contre les protéines Rep. (A)** Une construction exprimant simultanément les protéines Rep et GFP via un IRES et une construction exprimant aussi simultanément un ARNm antisens de la protéine Rep et la GFP ont été transfectées dans des cellules 293. Vingt-quatre heures après la transfection, le niveau de GFP des cellules a été mesuré en cytométrie en flux. **(B)** Un immunobavardage de type western contre les protéines Rep (Rep 78, Rep 68, Rep 52 et Rep 40) a été réalisé en présence et en absence de l'antisens. La construction ctrl-Rep exprime les protéines Rep sous le contrôle du promoteur p5 et p19 de l'AAV alors que la construction CMV5-IRES-Rep-GFP exprime simultanément les protéines Rep et GFP sous le contrôle du promoteur CMV5.

Lorsqu'on vérifie son expression en cytométrie en flux, on remarque que tant le sens que l'antisens ont des niveaux d'expression de la GFP comparables. On peut donc en déduire que les deux ARNm ont un niveau de transcription et une stabilité similaire. Lors de la co-transfection du sens et de l'antisens, l'expression de la GFP est inhibée d'un facteur 20. Comme l'antisens Rep, en théorie, ne devrait pas entraver la fixation de l'IRES sur le ribosome, on peut présumer que l'inhibition observée est causée par la dégradation de l'ARNm par la RNaseH (209). On a aussi vérifié l'expression des protéines Rep par immunobavardage de type western (figure AI-7b). L'inhibition de la GFP observée en cytométrie en flux est corrélée par une inhibition du même ordre de grandeur. Notez que l'anticorps Rep détecte les 4 formes de Rep (Rep 78, 68, 52, 48) produit par épissage alternatif. Les nombreuses bandes retrouvées dans la transfection réalisée avec le plasmide utilisant un promoteur CMV5 en l'absence de l'antisens sont sans doute causées par la présence du tripartite-leader (TPL) de l'Ad dans ce dernier. La présence du TPL dans le promoteur CMV5 permet d'augmenter le niveau d'expression du transgène, mais sur un ARN pré messager, le TPL subit un épissage et il est reconnu que cet épissage interfère avec l'épissage des introns d'un transgène de la cassette d'expression. Le résultat est la production d'ARNm aberrants donc, par le même fait, des protéines aberrantes sont traduites. Quoi qu'il en soit, l'antisens prévient la traduction de ces ARNm aberrants. Lorsque les protéines Rep sont exprimées à partir d'un plasmide utilisant le promoteur p5 et p19, les protéines Rep78 et Rep68 ne sont pas détectables alors qu'une très faible quantité de Rep52 et Rep40 demeure exprimée.

### **2.3 Capacité de l'antisens Rep à permettre la réplication d'un Ad**

L'antisens Rep exprimé à partir d'un promoteur CMV5 permet de réduire de manière très importante l'expression des protéines Rep qui sont toxiques pour la réplication d'un Ad. On peut donc se demander si cette réduction de l'expression par notre antisens permet une réplication normale du virus. Pour ce faire un Ad de type sauvage a été utilisé pour infecter des cellules ayant été transfectées par un plasmide exprimant les protéines Rep sous le contrôle des promoteurs p5 et p19 de l'AAV en

présence et en absence de notre antisens exprimé avec un IRES-GFP sous le contrôle du promoteur CMV5 (figure AI-8).

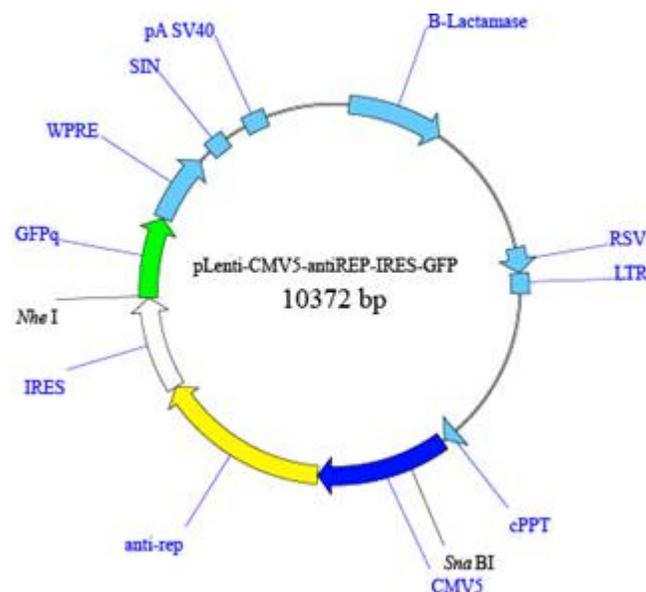


**Figure AI-8 : Réplication d'un Ad en présence des protéines Rep et de l'antisens Rep.** Des cellules 293 ont été transfectées avec un plasmide exprimant les protéines Rep de l'AAV sous le contrôle des promoteurs p5 et p19 ou d'un plasmide vide en présence ou en absence de la construction CMV5-IRES-antisensRep-GFP. Suivant la transfection, les cellules ont été infectées avec un Ad avec une MOI de 5. Trois jours après l'infection, la progéniture virale est récoltée et le titrage a été réalisé en comptant les plages de lyse produites au bout de 2 semaines sur un tapis cellulaire recouvert d'agarose.

Les virus amplifiés sur les cellules non transfectées avec la construction Rep se répliquent presque aussi bien en présence ou en absence de l'antisens. On peut donc conclure que l'expression de l'antisens n'a pas d'effets délétères majeurs sur la répllication de l'Ad. Par contre, lorsque le virus est amplifié en présence des protéines Rep, mais en l'absence de l'antisens, la répllication est fortement affectée et la concentration accuse une baisse de 8 fois par rapport à l'Ad amplifié sans les protéines Rep. Quand les cellules transfectées par les protéines Rep sont aussi transfectées avec l'antisens, la concentration de l'Ad revient à un niveau normal. Ces résultats nous permettent donc de conclure que l'antisens diminue suffisamment l'expression des protéines Rep pour permettre d'éviter leur effet toxique sur la répllication de l'Ad permettant ainsi au virus de se répliquer normalement.

## 2.4 Construction d'une lignée cellulaire exprimant l'antisens Rep

L'antisens Rep permettant une réplication adéquate d'un Ad nous avons donc procédé à la construction d'une lignée cellulaire 293 exprimant cet antisens dans le but de pouvoir y amplifier un Ad exprimant les gènes Rep et Cap de l'AAV. La première stratégie mise au point pour la construction de cette lignée cellulaire reposait sur la construction d'un lentivirus exprimant cet antisens-IRES-GFP sous le contrôle du promoteur CMV5. Pour ce faire, un plasmide de transfert lentiviral a été construit (figure AI-9) pour ensuite être transfecté dans une lignée productrice de lentivirus.

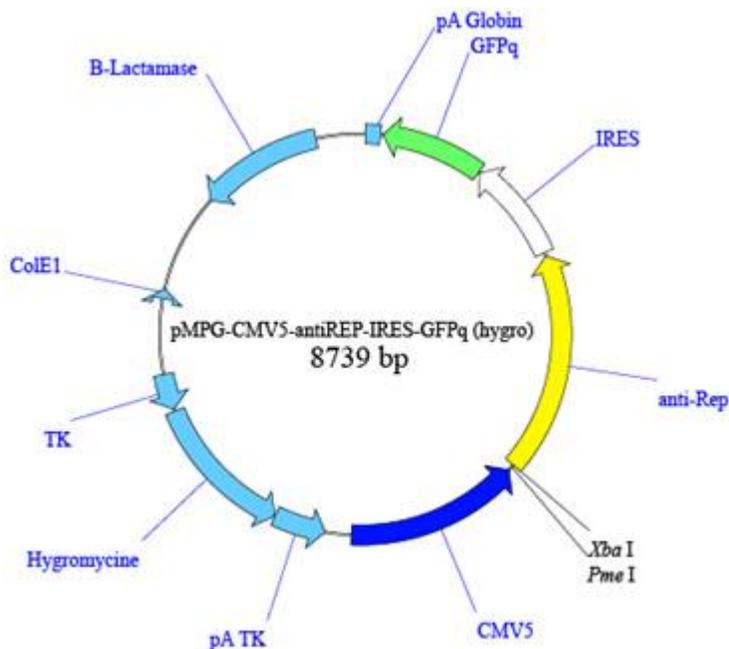


**Figure AI-9 : Plasmide de transfert lentiviral permettant la production d'un lentivirus CMV5-antiRep-IRES-GFP. Le lentivirus produit par ce plasmide exprimera simultanément l'antisens Rep et la GFP.**

Le lentivirus ainsi généré a été concentré par ultracentrifugation et il a été utilisé pour transduire des cellules 293. Ce lentivirus exprimant conjointement l'antisens et la GFP grâce à l'utilisation d'un IRES, on sera en mesure de sélectionner les meilleurs clones producteurs d'antisens par un criblage basé sur le niveau d'expression de la GFP, autrement dit, on sélectionnera les cellules les plus vertes. Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives nous n'avons jamais été en mesure de produire ce lentivirus, pour une raison qui nous était inconnue à ce moment, lorsque l'on procédait à la transduction

des cellules avec la préparation concentrée de lentivirus, aucune cellule verte n'était observable. Pour nous assurer que ce résultat n'était pas attribuable à la technique de production du lentivirus ou encore à une mauvaise transduction des cellules 293, nous avons aussi procédé à la construction d'un lentivirus en utilisant un plasmide de transfert IRES-GFP, mais ne contenant pas la séquence antisens. Dans ces conditions, il était possible d'obtenir une population de cellules exprimant la GFP. Basés sur ces résultats, nous avons conclu que l'antisens Rep entravait la production du lentivirus lors de la transfection du plasmide dans les lignées d'encapsulation lentivirales.

L'approche utilisant un lentivirus n'était pas utilisable, nous avons donc décidé de construire une lignée cellulaire en générant des clones stables par la transfection un plasmide exprimant l'antiRep-IRES-GFP et le gène résistance à l'hygromycine (figure AI-10).



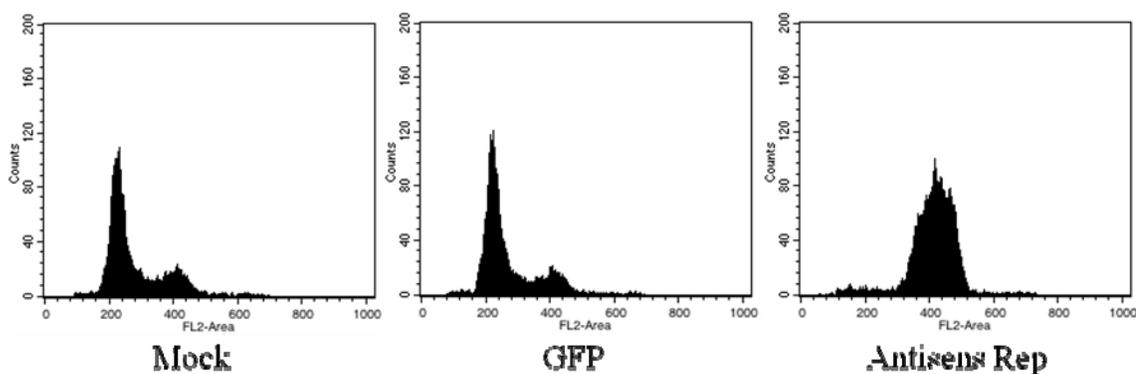
**Figure AI-10 : Plasmide exprimant l'antisens Rep et permettant une sélection de clones stables avec le marqueur hygromycine.**

Tout comme pour l'approche lentivirale, le criblage des meilleurs clones producteurs d'antisens se fera sur la base de l'intensité du signal GFP. La transfection de cellules

293 par ce plasmide a permis de générer une population où plus de 80% des cellules étaient vertes. Suite à cette transfection, nous avons procédé à la sélection d'un pool en traitant les cellules avec l'hygromycine. Malheureusement, lors de cette phase de sélection les cellules vertes, théoriquement résistantes à l'hygromycine étaient rapidement éliminées. Dans le pool résultant, constitué des rares cellules ayant survécu à la sélection, aucune cellule n'était verte et aucune activité antisens n'a été décelable (indice de fluorescence mesuré suite à la transfection d'une construction CMV5-Rep-IRES-GFP, résultat non montré). La tentative de clonage a été répétée à 4 reprises en utilisant différentes concentrations d'agent de sélection, mais à chaque fois le résultat fut négatif. Par contre, si le plasmide antiRep-IRES-GFP était remplacé par un plasmide IRES-GFP, il était possible d'isoler facilement des cellules exprimant la GFP, indiquant ainsi que le problème ne provenait pas de la méthode ou du plasmide ayant servi à la construction, mais bien, encore une fois, à la présence de la séquence antisens.

## **2.5 Effet de l'antisens Rep sur le cycle cellulaire**

Les résultats relatifs à la construction des lignées cellulaires antisens Rep de même que de nombreuses observations réalisées suite à la transfection de cet antisens nous ont amenés à penser que celui-ci pouvait affecter le cycle cellulaire. En effet, lors de la construction de lignées cellulaires par transfection nous avons observé à de nombreuses reprises que des cellules exprimant l'antisens Rep semblaient stopper leur division cellulaire. Cela pourrait expliquer pourquoi il a été impossible de sélectionner des cellules vertes lors de la construction de la lignée cellulaire antisens. Pour vérifier si tel était le cas, nous avons transfecté cet antisens dans des cellules 293 pour ensuite l'état du cycle cellulaire en colorant les cellules avec de l'iodure de propidium (figure AI-11).



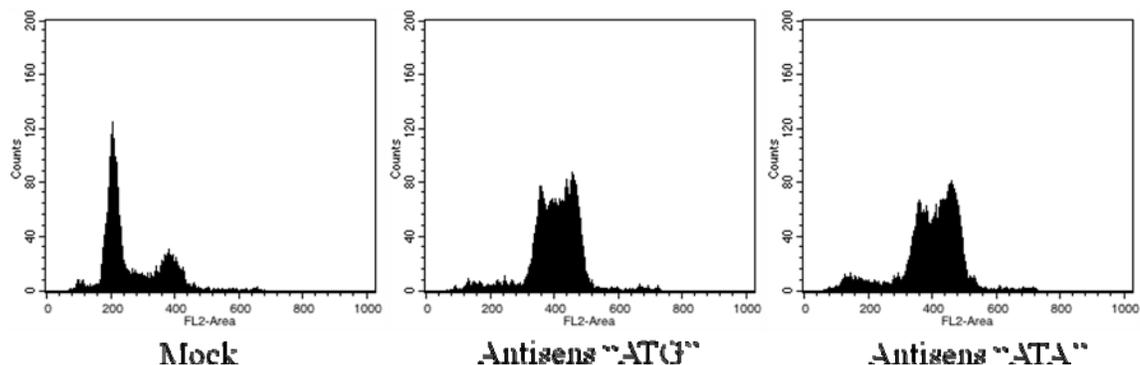
**Figure AI-11 : Effet de l'expression de l'antisens Rep sur le cycle cellulaire. Des cellules 293 ont été transfectées avec un plasmide vide (mock), un plasmide exprimant la GFP et un plasmide exprimant l'antisensRep-IRES-GFP. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, fixées à l'éthanol et colorées à l'iodure de propidium pour être analysées en cytométrie en flux.**

Les cellules transfectées avec le plasmide vide nous donnent le niveau de distribution normal des populations cellulaires en phase G1, S et G2/M. Lorsque l'on compare la distribution, des cellules transfectées avec le plasmide vide à celle des cellules ayant été transfectées avec l'antisensRep-IRES-GFP, on peut observer un blocage important en phase G2/M. Comme la transfection GFP donne des résultats similaires au plasmide vide, alors on se doit de conclure que ce blocage n'est imputable à l'expression de la GFP, mais bien à celle de l'antisens Rep.

Ce résultat explique pourquoi les cellules vertes isolées lors du clonage par dilution limite refusaient de se diviser, l'expression de l'antisens faisait en sorte de bloquer la mitose. Ce résultat fournit aussi une explication sur l'impossibilité de produire le vecteur lentiviral antisens. Selon toute vraisemblance, le processus cellulaire, affecté par l'antisens, qui est responsable du blocage en phase G2/M, affecte aussi la production lentivirale.

L'antisens Rep contenant un codon ATG en position 93 (séquence en annexe III), il est possible que la toxicité de l'antisens soit causée par l'utilisation de ce codon pour produire une protéine de 51 acides aminés qui est responsable du blocage en phase G2/M. Pour vérifier si c'était est le cas, la séquence antisens a été mutée pour remplacer

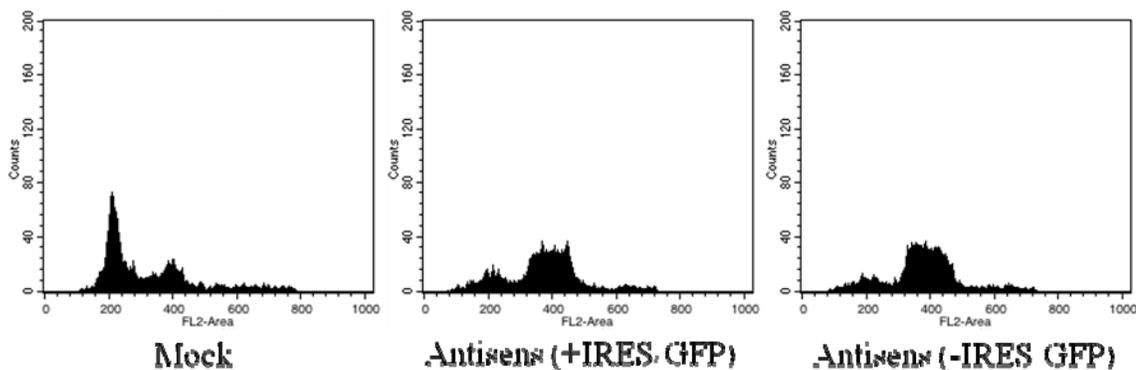
la séquence ATG par une séquence ATA. Cette mutation rendant inopérant le site d'initiation de la traduction, on évitera la production de cette protéine qui pourrait être responsable du blocage du cycle cellulaire (figure AI-12).



**Figure AI-12 : Effet de la mutation de l'antisens sur la modulation du cycle cellulaire. Des cellules 293 ont été transfectées avec les constructions antisensRep-IRES-GFP mutée et non mutée. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, fixées à l'éthanol et colorées à l'iodure de propidium pour être analysées en cytométrie en flux.**

Le cycle cellulaire subit le même effet avec la construction mutée et non mutée, on peut donc conclure que cette modulation du cycle cellulaire n'était pas le fruit de la production d'une protéine aberrante via le codon ATG présent au début de la séquence de l'antisens.

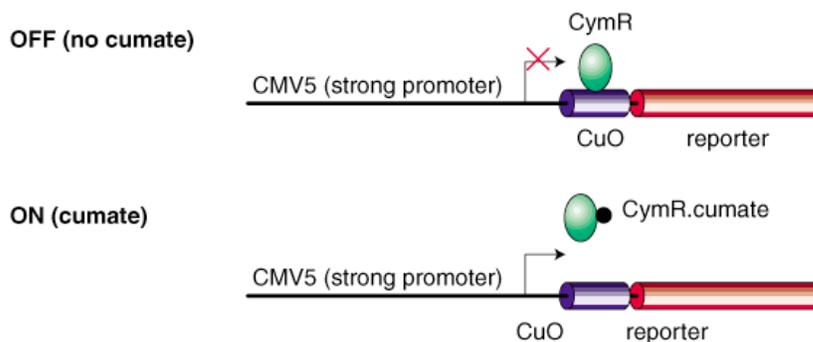
Il est aussi possible que l'effet toxique observé avec l'antisens soit dû à l'effet conjoint de celui-ci et de l'IRES-GFP. Pour vérifier si tel était le cas, nous avons construit un antisens Rep non jumelé à un IRES GFP. Malheureusement, cette construction bloque aussi les cellules en phase G2/M (figure AI-13).



**Figure AI-13 : Effet de l'expression de l'antisens Rep-IRES/GFP sur le cycle cellulaire.** Des cellules 293 ont été transfectées avec un plasmide vide (mock), un plasmide exprimant l'antisensRep conjointement avec un IRES/GFP et un plasmide exprimant l'antisensRep seulement. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, fixées à l'éthanol et colorées à l'iodure de propidium pour être analysées en cytométrie en flux.

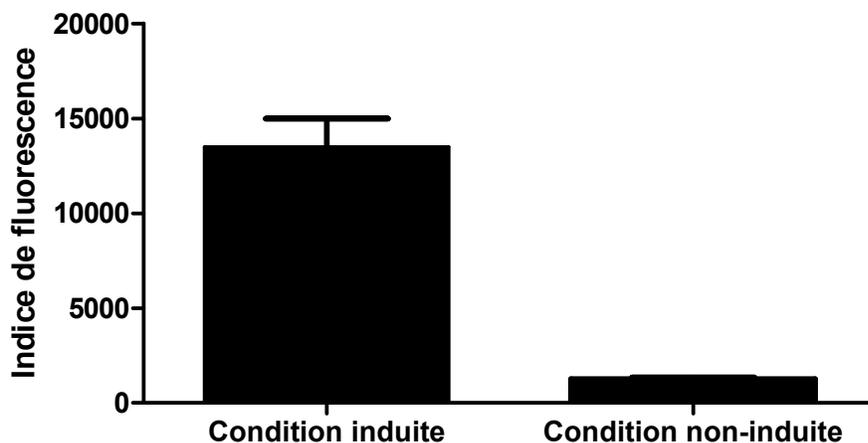
## 2.6 Régulation de l'expression de l'antisens Rep pour éviter sa toxicité

La dernière option qui s'offre à nous pour minimiser l'effet toxique de l'antisens, et donc pour être en mesure de construire une lignée cellulaire pouvant exprimer celui-ci, consiste à réguler l'expression de cet antisens. Pour ce faire, le promoteur CMV5 de la construction a été remplacé par un promoteur inductible au cumate (figure AI-14).



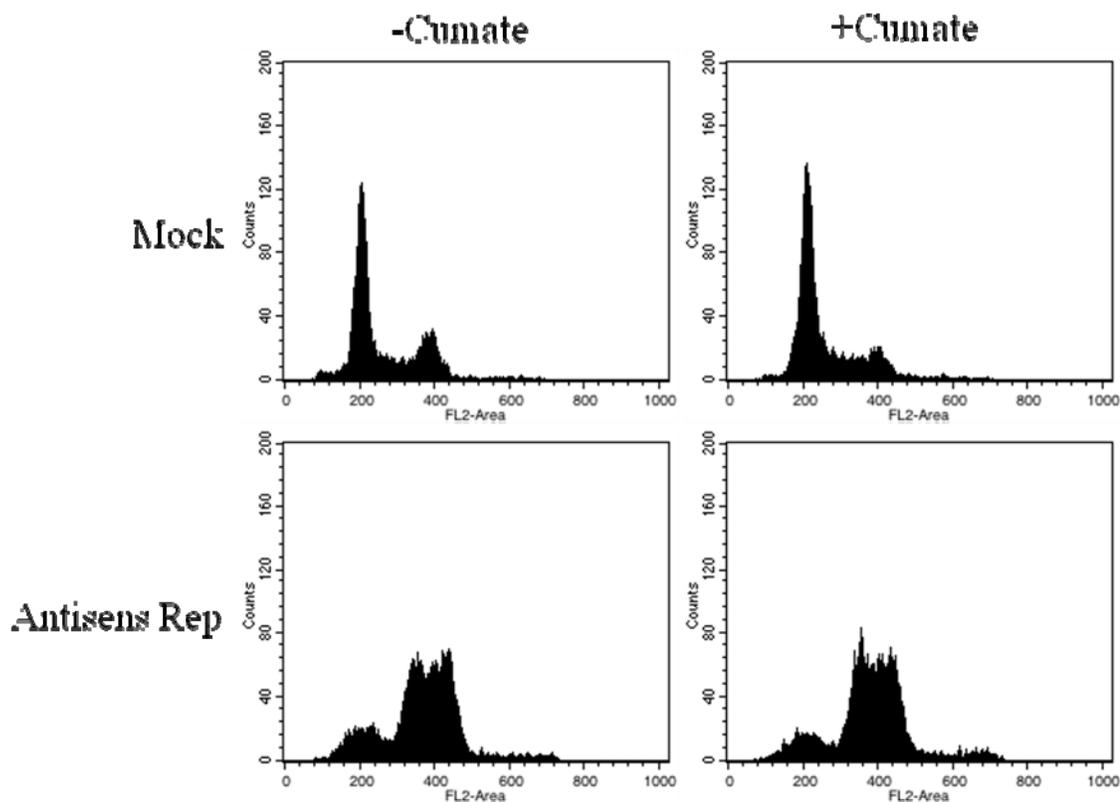
**Figure AI-14 : Promoteur CVM5 inductible au cumate.** Dans une lignée cellulaire exprimant le répresseur CymR, ce dernier peut se lier à la séquence opératrice CuO inhibant ainsi la transcription du transgène (configuration « off »). En présence de cumate, le répresseur CymR ne se lie plus à la séquence opératrice et il peut y avoir transcription du transgène (configuration « on »).

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'expression de l'antisens était bien régulable par le cumate. Pour ce faire, il n'a suffi que de mesurer le niveau de fluorescence des cellules en condition induite et non-induite puisque notre antisens est exprimé avec un IRES-GFP (figure AI-15).



**Figure AI-15 : Répression de l'expression de l'antisens Rep par le promoteur inducible au cumate. Des cellules 293 CymR ont été transfectées par la construction CMV5/CuO-AntisensRep-IRES-GFP en présence en absence de cumate. Le niveau d'induction a été déterminé en mesurant l'indice de fluorescence des cellules en cytométrie en flux.**

L'introduction de la séquence opératrice cumate dans le promoteur CMV5 de notre construction a permis de réguler le niveau de fluorescence de la GFP et donc le niveau d'expression de l'antisens Rep, en condition induite l'expression est 11,2 fois plus importante qu'en condition non induite. Reste à savoir si le niveau d'expression basal observé en condition non induite est assez faible pour prévenir le blocage des cellules transfectées en phase G2/M. Pour ce faire, des cellules 293 CymR ont été transfectées avec nos nouvelles constructions et l'effet sur le cycle cellulaire a été mesuré en condition induite et non induite (figure AI-16).



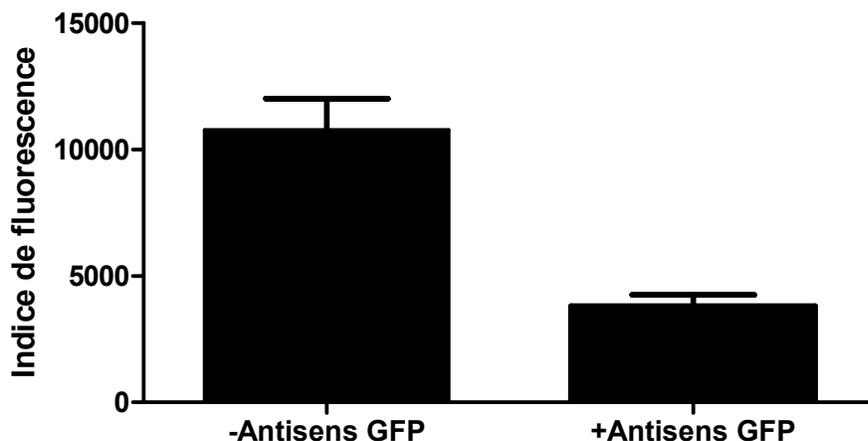
**Figure AI-16 : Effet de la régulation de l'expression de l'antisens Rep sur le cycle cellulaire. Des cellules 293 CymR ont été transfectées avec un plasmide exprimant la GFP et un plasmide exprimant l'antisensRep-IRES-GFP sous le contrôle du promoteur CMV5 inducible au cumate. Six heures après la transfection, un groupe de cellule a été induit par l'ajout de cumate alors que l'autre groupe est resté en condition non induite. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, fixées à l'éthanol et colorées à l'iodure de propidium pour être analysées en cytométrie en flux.**

Si l'ajout du cumate ne change rien au cycle cellulaire, l'expression atténuée de l'antisens Rep en condition non induite demeure suffisamment élevée pour affecter le cycle cellulaire.

Finalement, nous avons testé si un antisens GFP, dirigé contre l'antisensRep-IRES-GFP, pouvait être en mesure de réduire suffisamment l'expression de l'antisens toxique pour permettre une division normale des cellules. Si tel était le cas, il serait possible de construire une lignée antisens GFP régulable par le cumate dans des cellules CymR. Une fois cette lignée construite, on y ajouterait l'antisensRep-IRES-GFP. Ainsi,

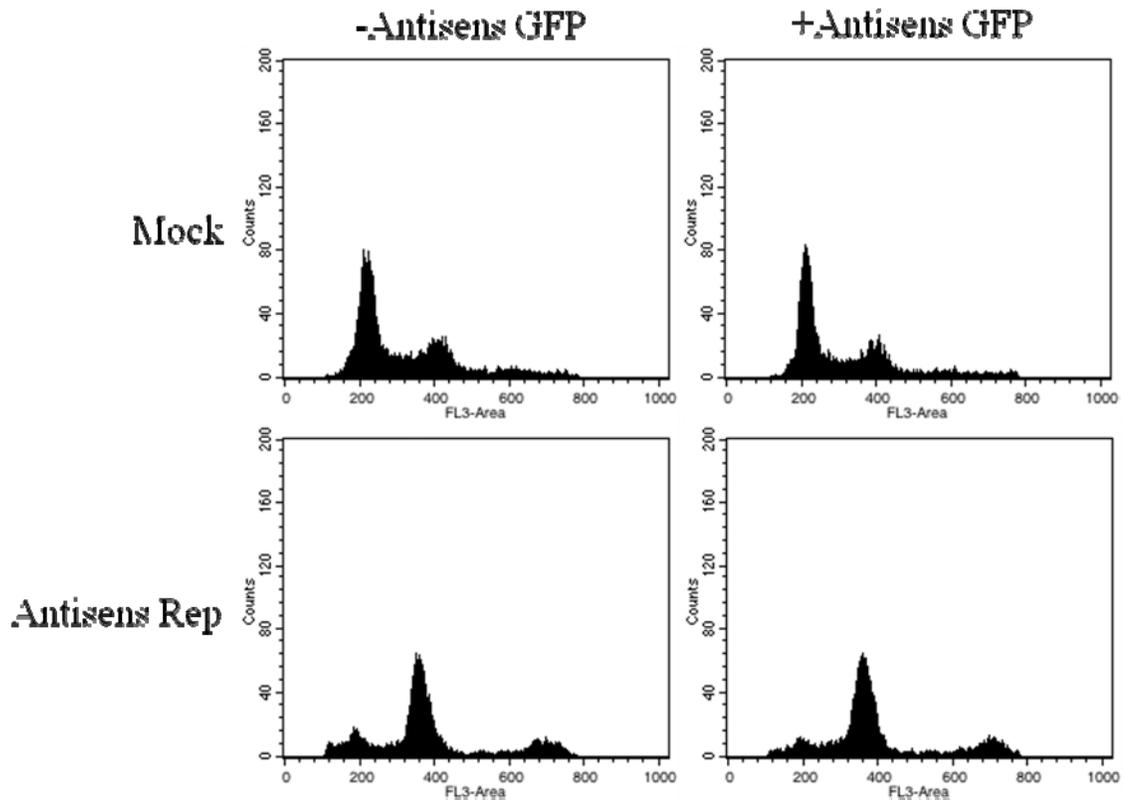
en présence de cumate, l'expression de l'antisens GFP peut réprimer l'antisens Rep et permettre la division cellulaire. Pour produire un Ad exprimant les protéines Rep/Cap, il ne suffirait que de retirer le cumate pour permettre l'expression de l'antisens Rep. Il est à noter que le blocage des cellules en phase G2/M ne semble pas avoir impact important sur la production adénovirale (figure AI-8).

La cotransfection de l'antisens GFP et de l'antisensRep-IRES-GFP permet de réduire de manière importante l'expression de la GFP signifiant du même coup que l'expression de l'antisens Rep est d'autant affectée (figure AI-17).



**Figure AI-17 : Efficacité de l'antisens GFP pour réprimer l'expression de l'antisensRep-IRES-GFP. Une construction exprimant simultanément les protéines Rep et GFP via un IRES et une construction exprimant antisens GFP ont été transfectées dans des cellules 293. Vingt-quatre heures après la transfection, le niveau de GFP des cellules a été mesuré en cytométrie en flux.**

L'antisens GFP permet de réprimer par un facteur 2,8 l'expression de l'antisensRep-IRES-GFP. Par contre, même avec ce haut niveau de répression, on observe toujours un arrêt des cellules en phase G2/M (figure AI-18).



**Figure AI-18 : Effet sur le cycle cellulaire de la co-expression d'un antisense GFP et d'un antisenseRep-IRES-GFP. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, fixées à l'éthanol et colorées à l'iodure de propidium pour être analysées en cytométrie en flux.**

Si l'expression de l'antisense GFP seul n'a aucun effet sur le cycle cellulaire, comme dans toutes les autres expériences, l'expression de l'antisense Rep, même en condition de répression par l'antisense GFP, induit un blocage des cellules en phase G2/M.

Suite à ce résultat, nous avons décidé de mettre un terme au projet AAV.

## ANNEXE II : SÉQUENCES DES ANTISENS GFP

### Antisens GFP pleine-longueur :

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTTCGAAAGGGCAG  
ATTGTGTGGACAGGTAATGGTTGTCTGGTAAAAGGACAGGGCCATCGCCAA  
TTGGAGTATTTTGTGATAATGGTCTGCTAGTTGAACGCTTCCATCTTCAATG  
TTGTGGCGGGTCTTGAAGTTCACCTTTGATTCCATTCTTTTGTGTTGTCTGCCAT  
GATGTATACATTGTGTGAGTTATAGTTGTATTCCAATTTGTGTCCCAGAATGT  
TGCCATCTTCCTTGAAGTCAATACCTTTTAACTCGATTCTATTAACAAGGGTA  
TCACCTTCAAACCTTGACTTCAGCACGTGTCTTGTAGTTGCCGTCATCTTTGAA  
GAAGATGGTCCTTTCCTGTACATAACCTTCGGGCATGGCACTCTTGAAAAAG  
TCATGCCGTTTCATATGATCCGGGTATCTTGAAAAGCATTGAACACCATAGC  
ACAGAGTAGTGACTAGTGTTGGCCATGGAACAGGCAGTTTGCCAGTAGTGC  
AGATGAACTTCAGGGTAAGTTTTCCGTATGTTGCATCACCTTCACCCTCTCCA  
CTGACAGAGAACTTGTGGCCGTTAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATTG  
GGACAACCTCCAGTGAAGAGTTCTTCTCCTTTGCTAGCCAT

### Antisens GFP no. 109 :

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTCTTGAAGTCAAT  
ACTTTTTAACTCGATTCTATTAACAAGGGTATCACCTTCAAACCTTGACTTCAG  
CACGTGTCTTGTAGTTGCCGTCATCTTTGAAGAAGATGGTCCTTTCCTGTACA  
TAACCTTCGGGCATGGCACTCTTGAAAAAGTCATGCCGTTTCATATGATCCG  
GGTATCTTGAAAAGCATTGAACACCATAGCACAGAGTAGTGACTAGTGTTG  
GCCATGGAACAGGCAGTTTGCCAGTAGTGCAGATGAACTTCAGGGTAAGTTT  
TCCGTATGTTGCATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAGAGAACTTGTGGCCGT  
TAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAACCTCCAGTGAAGAGTTC  
TTCTCCTTTGCTAGCCAT

### Antisens GFP no. 10 :

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTTGTGGCGGGTCT  
TGAAGTTCACCTTTGATTCCATTCTTTTGTGTTGTCTGCCATGATGTATACATTGT  
GTGAGTTATAGTTGTATTCCAATTTGTGTCCCAGAATGTTGCCATCTTCCTTG  
AAGTCAATACCTTTTAACTCGATTCTATTAACAAGGGTATCACCTTCAAACCTT  
GACTTCAGCACGTGTCTTGTAGTTGCCGTCATCTTTGAAGAAGATGGTCCTTT  
CCTGTACATAACCTTCGGGCATGGCACTCTTGAAAAAGTCATGCCGTTTCAT  
ATGATCCGGGTATCTTGAAAAGCATTGAACACCATAGCACAGAGTAGTGAC  
TAGTGTTGGCCATGGAACAGGCAGTTTGCCAGTAGTGCAGATGAACTTCAGG  
GTAAGTTTTCCGTATGTTGCATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAGAGAACTT  
GTGGCCGTTAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAACCTCCAGTG  
AAGAGTTCTTCTCCTTTGCTAGCCAT

**Antisens GFP no. 183 :**

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTTGACTTCAGCAC  
GTGTCTTGTAGTTGCCGTCATCTTTGAAGAAGATGGTCCTTTCCTGTACATAA  
CCTTCGGGCATGGCACTCTTGAAAAAGTCATGCCGTTTCATATGATCCGGGT  
ATCTTGAAAAGCATTGAACACCATAGCACAGAGTAGTGACTAGTGTTGGCC  
ATGGAACAGGCAGTTTGCCAGTAGTGCAGATGAACTTCAGGGTAAGTTTTCC  
GTATGTTGCATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAGAGAACTTGTGGCCGTTA  
ACATCACCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAACCTCCAGTGAAGAGTTCTT  
CTCCTTTGCTAGCCAT

**Antisens GFP no. 162 :**

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTGTTTGCCAGTAG  
TGCAGATGAACTTCAGGGTAAGTTTTCCGTATGTTGCATCACCTTCACCCTCT  
CCACTGACAGAGAACTTGTGGCCGTTAACATCACCATCTAATTCAACAAGAA  
TTGGGACAACCTCCAGTGAAGAGTTCTTCTCCTTTGCTAGCCAT

**Antisens GFP no. 1 :**

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTCTAATTCAACAA  
GAATTGGGACAACCTCCAGTGAAGAGTTCTTCTCCTTTGCTAGCCAT

**Antisens GFP no. 38 :**

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTTTCCGTATGTTG  
CATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAGAGAACTTGTGGCCGTTAACATCACC  
ATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAACCTCCAGTGAAGAGTTCTTCTCCTTTG  
CTAGCCAT

**Antisens GFP no. 36 :**

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTGAACACCATAG  
CACAGAGTAGTGACTAGTGTTGGCCATGGAACAGGCAGTTTGCCAGTAGTG  
CAGATGAACTTCAGGGTAAGTTTTCCGTATGTTGCATCACCTTCACCCTCTCC  
ACTGACAGAGAACTTGTGGCCGTTAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATT  
GGGACAACCTCCAGTGAAGAGTTCTTCTCCTTTGCTAGCCAT

**Antisens GFP no. 188 :**

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTGTCATGCCGTTT  
CATATGATCCGGGTATCTTGAAAAGCATTGAACACCATAGCACAGAGTAGT  
GACTAGTGTTGGCCATGGAACAGGCAGTTTGCCAGTAGTGCAGATGAACTTC  
AGGGTAAGTTTTCCGTATGTTGCATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAGAGA

ACTTGTGGCCGTTAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAACCTCC  
AGTGAAGAGTTCTTCTCCTTTGCTAGCCAT

**Antisens GFP no. 115 :**

TCAGTTGTACAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAAAC  
TCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTTTCAGGGTAAGT  
TTTCCGTATGTTGCATCACCTTCACCTCTCCACTGACAGAGAACTTGTGGCC  
GTAAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAACCTCCAGTGAAGAGT  
TCTTCTCCTTTGCTAGCCAT

### ANNEXE III : SÉQUENCES DE L'ANTISENS REP

AGATCTGACTCGCGCACCCGTTTGGGCTCACTTATATCTGCGTCACTGGGGG  
 CGGGTCTTTTCTTGGCTCCACCTTTTTGACGTAGAATTCATGCTCCACCTCA  
 ACCACGTGATCCTTTGCCACCGGAAAAAGTCTTTGACTTCCTGCTTGGTGA  
 CCTTCCCAAAGTCATGATCCAGACGGCGGGTGAGTTCAAATTTGAACATCCG  
 GTCTTGCAACGGCTGCTGGTGTTCGAAGGTCGTTGAGTTCCCGTCAATCACG  
 GCGCACATGTTGGTGTGGAGGTGACGATCACGGGAGTCGGGTCTATCTGGG  
 CCGAGGACTTGCATTTCTGGTCCACGCGCACCTTGCTTCTCCGAGAATGGC  
 TTTGGCCGACTCCACGACCTTGGCGGTCATCTTCCCCTCCTCCCACCAGATCA  
 CCATCTTGTGACACAGTCGTTGAAGGGAAAGTTCTCATTGGTCCAGTTTAC  
 GCACCCGTAGAAGGGCACAGTGTGGGCTATGGCCTCCGCGATGTTGGTCTTC  
 CCGGTAGTTGCAGGCCCAAACAGCCAGATGGTGTTCCTCTTGCCGAACTTTT  
 TCGTGGCCCATCCAGAAAGACGGAAGCCGCATATTGGGGATCGTACCCGTT  
 TAGTTCCAAAATTTTATAAATCCGATTGCTGGAAATGTCCTCCACGGGCTGC  
 TGGCCACCAGGTAGTCGGGGGCGGTTTTAGTCAGGCTCATAATCTTTCCCG  
 CATTGTCCAAGGCAGCCTTGATTTGGGACCGCGAGTTGGAGGCCGCATTGAA  
 GGAGATGTATGAGGCCTGGTCCTCCTGGATCCACTGCTTCTCCGAGGTAATC  
 CCCTTGTCCACGAGCCACCCGACCAGCTCCATGTACCTGGCTGAAGTTTTTG  
 ATCTGATCACCGGCGCATCAGAATTGGGATTCTGATTCTCTTTGTTCTGCTCC  
 TCGCTCTGCGACACGTGCGTCAGATGCTGCGCCACCAACCGTTTACGCTCCG  
 TGAGATTCAAACAGGCGCTTAAATACTGTTCCATATTAGTCCACGCCCACTG  
 GAGCTCAGGCTGGGTTTTGGGGAGCAAGTAATTGGGGATGTAGCACTCATCC  
 ACCACCTTGTTCCCGCCTCCGGCGCCATTTCTGGTCTTTGTGACCGCGAACCA  
 GTTTGGCAAAGTCGGCTCGATCCCGCGGTAAATTCTCTGAATCAGTTTTTCG  
 CGAATCTGACTCAGGAAACGTCCCAAACCATGGATTTACCCCCGGTGGTTT  
 CCACGAGCACGTGCATGTGGAAGTAGCTCTCTCCCTTCTCAAATTGCACAAA  
 GAAAAGGGCCTCCGGGGCCTTACTCACACGGCGCCATTCCGTCAGAAAGTC  
 GCGCTGCAGCTTCTCGGCCACGGTCAGGGGTGCCTGCTCAATCAGATTCAGA  
 TCCATGTCAGAAATCTGGCGGCAACTCCCATTCTCTCGGCCACCCAGTTCA  
 CAAAGCTGTCAGAAATGCCGGGCAGATGCCCGTCAAGGTCGCTGGGGACCT  
 TAATCACAATCTCGTAAAACCCCGGCATAGATCT

**ANNEXE V : PLASMIDES, VIRUS ET LIGNÉES CELLULAIRES UTILISÉES  
DANS CETTE THÈSE**

<b>Nom du plasmide</b>	<b>Provenance</b>
pAdCMV5-IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 40
pAdTR5-PS-IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 94
pVax	Invitrogen, États-Unis
pAdCMV5-IRES-GFP (tk TATA-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
pAdCMV5-IRES-GFP (Hsp70 TATA-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
pAdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
pAdBM5	Fait dans ce laboratoire, réf 38
pCMV-DsRed-Express	Clontech, États-Unis
pAdCMV5-IRES-dsRED (MLP-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
pcDNA3-55K	Dr. Phil Branton, Université McGill
pRRL.CPPT.CMV-GFP.WPRE	Fait dans ce laboratoire, non-publié
pRRL.cPPT.CMV-55K.WPRE	Fait dans le cadre de cette thèse
pAdTR6-PS-IRES-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 94

<b>Nom du virus</b>	<b>Provenance</b>
AdΔPS	Fait dans ce laboratoire, réf 114
AdΔE1ΔE3	Disponible dans notre laboratoire
Ad (dl309)	Disponible dans notre laboratoire
AdFasL	Fait dans ce laboratoire, réf 118
AdCMV5-IRES-GFP (TK-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
AdCMV5-IRES-GFP (HSP70-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
AdCMV5-IRES-GFP (MLP-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
AdCMV5-IRES-dsRED (MLP-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
AdCMV5-αGFP (MLP-PS)	Fait dans le cadre de cette thèse
Lentivirus CMV-55K.WPRE	Fait dans le cadre de cette thèse

<b>Nom de la lignée cellulaire</b>	<b>Provenance</b>
293A	Disponible dans notre laboratoire, réf 32
293S	Disponible dans notre laboratoire, réf 37
293SF	Disponible dans notre laboratoire, réf 112
293SF-PacLV	Fait dans ce laboratoire, réf 111
293CymR-CMV5-CuO-GFP	Fait dans ce laboratoire, réf 110
A549	Disponible dans notre laboratoire
BMAde1	Fait dans ce laboratoire, réf 108
Sous-clone BMAde1	Fait dans le cadre de cette thèse

