

Isabel Boivin

**Modulation expérimentale de l'inflammation dans l'alvéolite allergique
extrinsèque par l'administration de vecteurs viraux *in vivo* de
l'interleukine-6 et l'interleukine-10**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département de Médecine Expérimentale
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL

Juin 2000

© Isabel Boivin, 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-53926-1

Canada

Résumé

L'alvéolite allergique extrinsèque (AAE) est une maladie de nature inflammatoire. Le but de notre projet était de moduler l'expression de cytokines par l'introduction de leurs gènes dans un modèle murin d'AAE. Pour cela, on a effectué la construction de deux vecteurs adénovirus inductibles : l'un produisant l'interleukine-6, une cytokine dite pro-inflammatoire, et l'autre l'interleukine-10, une cytokine anti-inflammatoire. Les ADNc des cytokines obtenus par RT-PCR sur des macrophages murins, ont été clonés dans le vecteur pAdTR5F-K7-GFPq pour générer des adénovirus recombinants. Ces vecteurs viraux ont été testés par instillation nasale chez la souris saine et la souris AAE. Les vecteurs viraux utilisés ont été induits *in vivo* et *in vitro* avec un niveau de protéines intéressant. La courbe du niveau de protéines en fonction du temps, nous démontre une baisse de l'efficacité après 10 jours. Finalement, l'efficacité des vecteurs en présence d'un modèle d'AAE ne s'est pas avérée satisfaisante.

Avant-propos

La maîtrise est une étape importante dans la formation de l'esprit scientifique. Il est donc important pour moi de remercier tout ceux qui m'ont dirigé dans ce cheminement ainsi que ceux qui m'ont encouragé et écouté dans mes moments de faiblesse. J'ai eu la chance d'avoir un directeur qui a voulu me donner ma chance et qui m'a donné un sujet de maîtrise très diversifié et intéressant. Ce coup de pouce de votre part, Dr. Cormier, a été très apprécié et m'a permis de me faire des contacts qui m'ont maintenant donné un emploi, je vous en remercie beaucoup. J'aimerais remercier par le fait même mon co-directeur Bernard qui cherche toujours à développer mon sens de déduction et mes connaissances. Merci beaucoup chers messieurs pour votre patience et vos discussions des plus enrichissantes.

Comment puis-je oublier toutes les assistantes de recherche qui ont su m'appuyer, me conseiller, me marternier, m'écouter et bien plus. Comment aurais-je pu terminer ce travail sans vos précieux conseils? Merci beaucoup à Linda pour ses discussions matinales, Claire qui m'a montré ce que je voulais devenir plus tard, Lucie pour son tango, Evelyne pour mes nombreuses souris et Julie pour sa compréhension. Un merci tout particulier pour ma mère microbiologique (Anne) qui a su me mater avec soin durant toutes ces années.

Merci à tous mes collègues et amis de travail tel que André, Nadine, Sylvain, Claudia, Christian et tous les autres que j'oublie. Merci aussi à toutes mes amies de longue date avec qui j'ai dû partager tous mes problèmes et qui ont su me les faire oublier.

Un dernier remerciement à toute ma famille qui a supporté durant tant d'années, qui ont contribué à devenir ce que je suis aujourd'hui. Merci maman, papa, mon petit frère Francis et ma grande soeur Lucie.

Mille Mercis à tous!

Table des matières

RÉSUMÉ	II
AVANT-PROPOS	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
1.0 INTRODUCTION	1
1.1 L'ALVÉOLITE ALLERGIQUE EXTRINSÈQUE (AAE).....	2
1.2 L'INFLAMMATION	6
1.2.1 INTERLEUKINE-10 (IL-10)	9
1.2.2 INTERLEUKINE-6 (IL-6)	11
1.3 MODÈLE ANIMAL DE L'ALVÉOLITE ALLERGIQUE EXTRINSÈQUE	12
1.4 TRANFERT DE GÈNES POUR DES ÉTUDES FONCTIONNELLES	12
1.5 LES ADÉNOVIRUS	15
1.5.1 VECTEUR INDUCTIBLE VS VECTEUR CONSTITUTIF	20
2.0 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	22
3.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	24
3.1 OBTENTION DES ADNC IL-6 ET IL-10 POUR LE CLONAGE.....	25
3.1.1 LAVAGES BROCHOALVÉOLAIRES	25
3.1.2 STIMULATION DES MACROPHAGES ET EXTRACTION D'ARN	26
3.1.3 RT-PCR.....	26
3.1.4 PCR.....	27
3.1.5 ANALYSE DES PRODUITS PCR	29
3.2 CLONAGE DES GÈNES IL-6 ET IL-10.....	29
3.2.1 CONSTRUCTION DES VECTEURS DE TRANSFERT, PADTR5F/IL-6 ET PADTR5F/IL-10	29
3.2.2 SÉQUENÇAGE DES ADNC POUR IL-6 ET IL-10	31
3.3 CELLULES.....	32
3.4 GÉNÉRATION, PURIFICATION ET PRODUCTION D'ADÉNOVIRUS.....	33
3.4.1 PURIFICATION ET PRODUCTION D'ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS	36
3.5 PURIFICATION DU VIRUS	38
3.5.1 PASSAGE SUR CHLORURE DE CÉSIIUM (CsCl)	38
3.5.2 DIALYSE DU VIRUS	38
3.5.3 CALCUL DU TITRE VIRAL PAR CYTOFLUOROMÉTRIE	39
3.6 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	40
3.7 TEST <i>IN VIVO</i> AVEC ADTR5F/IL-6 ET IL-10 K7 GFPQ SUR DES SOURIS SAINES.....	41
3.7.1 ANIMAUX.....	41

3.7.2 COLORATIONS DIFFÉRENTIELLES	41
3.7.3 INDEX PULMONAIRE.....	42
3.7.4 ELISA	43
3.7.5 RÉACTION INFLAMMATOIRE DE DIFFÉRENTES DOSES D'AdTR5K7/IL6 GFPQ SUR LES SOURIS C57BL/6	44
3.7.6 DÉTERMINATION DU RAPPORT AdCMV TTA VS AdTR5K7/IL-6 ET IL-10 <i>IN VIVO</i> POUR AVOIR UNE PRODUCTION DE CYTOKINE MAXIMALE.	45
3.7.7 VARIATION DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES EN FONCTION DU TEMPS.....	45
3.8 EFFET DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES INFLAMMATOIRES DANS UN MODÈLE D'AAE	46
3.8.1 ANIMAUX.....	46
3.8.2 CALENDRIER DES INSTILLATIONS.....	47
3.9 ANALYSES STATISTIQUES	48
4.0 RÉSULTATS	49
4.1 OBTENTION DES ADNC DE L'IL-6 ET IL-10	50
4.2 CONSTRUCTION D'ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS EXPRIMANT L'IL-6 ET L'IL-10.....	52
4.2.1 CLONAGE DES ADNC DANS LE VECTEUR DE TRANSFERT	52
4.2.2 TRANSFECTION	56
4.2.3 DÉTECTION DE LA PRODUCTION DE L'IL-6 ET IL-10 <i>IN VITRO</i>	58
4.2.4 GLYCOSYLATION DE LA PROTÉINE IL-10.....	59
4.2.5 TITRES VIRAUX.....	63
4.3 EXPÉRIENCE <i>IN VITRO</i> POUR DÉTERMINER LE RATIO TTA VS IL-6 OU IL-10.....	64
4.4 EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES <i>IN VIVO</i> AFIN DE CARACTÉRISER L'ADTR5.....	66
4.4.1 DÉTERMINATION DU NOMBRE DE PARTICULES INFECTIEUSES D'ADTR5 NÉCESSAIRE À L'INFECTION DE SOURIS C57BL/6.....	66
4.4.2 RAPPORT LE PLUS PRODUCTIF ENTRE AdCMVTTA ET AdTR5F	69
4.4.3 NIVEAU D'EXPRESSION DE LA PROTÉINE IL-6 DANS LE TEMPS.....	71
4.5 EXPRESSION DE L'IL-6 ET DE L'IL-10 APRÈS L'INSTILLATION DE VECTEURS VIRAUX DANS LE LBA DE SOURIS DANS UN MODÈLE D'ALVÉOLITE ALLERGIQUE EXTRINSÈQUE	73
4.5.1 DONNÉES CELLULAIRES	73
4.5.2 INDEX PULMONAIRE.....	77
4.5.3 ELISA	79
5.0 DISCUSSION	81
5.1 AMPLIFICATION DES ADNC DE SOURIS ET CONSTRUCTION DES VECTEURS DE TRANSFERT	82
5.2 EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES <i>IN VIVO</i>.....	84
5.3 MÉCANISMES ET MODULATION DE L'AAE.....	85
BIBLIOGRAPHIE.....	89
ANNEXE	96

Liste des figures et des tableaux

Figure 1	Représentation graphique des parties constituant l'adénovirus.....	16
Figure 2	Représentation graphique de l'orientation des gènes E1 à E4 de l'adénovirus.....	19
Figure 3	Schéma explicatif du principe d'un vecteur inductible.....	21
Figure 4	Représentation schématique de la recombinaison entre un vecteur de transfert (pAdBM5-X) possédant une séquence adénovirale et l'adénovirus (Ad Δ E1 Δ E3).....	35
Figure 5	Principe de l'ELISA.....	43
Figure 6	Gels d'agarose des fragments d'ADNc IL-6 et IL-10 amplifiés par PCR.....	51
Figure 7	Schéma du plasmide AdTR5F/IL-6 ou IL-10-K7-GFPq.....	54
Figure 8	Patron de digestion des clones du plasmide pAdTR5F/IL-6 et pAdTR5F/IL-10 par l'enzyme Xmn1.....	55
Figure 9	Visualisation de la GFPq par la microscopie à fluorescence.....	57
Figure 10	Western sur le surnageant de 1×10^6 cellules 293 rtTA lors de la deuxième amplification de la première étape de purification.....	60
Figure 11	Western sur le surnageant de 1×10^6 cellules 293rtTA pour la vérification de la production de protéines des préstock de AdTR5F/IL-6 et AdTR5F/IL-10.....	61
Figure 12	Western des surnageants de 1×10^6 cellules KbrtTA, HelartTA, 293rtTA afin de vérifier la différence de glycosylation de la protéine de IL-10.....	62
Figure 13	Graphiques du ratio AdCMVtTA vs AdTR5F/IL-6 ou IL-10 produisant la plus grande quantité de protéines.....	65
Figure 14	Décompte du nombre de cellules/ml dans le LBA de souris dépendant du virus et du nombre de ufp instillées.....	67

Figure 15	Graphique de la quantité de cytokines (pg/ml) produite dans le LBA de souris C57BL/6 par rapport à la quantité de ufp de virus instillé.....	68
Figure 16	Graphique de la quantité de protéine produite dans le LBA de souris selon le rapport entre la quantité du virus AdCMVtTA et AdTR5/IL-6.....	70
Figure 17	Graphique du niveau d'expression de l'IL-6 dans le temps dans le LBA de souris C57BL/6.....	72
Figure 18	Décompte du nombre de cellules/ml ainsi que du nombre de macrophages, lymphocytes et neutrophiles dans le LBA de différents groupes de souris C57BL/6.....	75
Figure 19	Graphique de l'index pulmonaire de 8 groupes de souris C57BL/6.....	78
Figure 20	Graphique de la quantification de cytokines dans le LBA de souris C57BL/6.....	80
Tableau 1	Syndrome représentatifs de l'AAE.....	3
Tableau 2	Caractéristiques des principales cytokines retrouvées dans l'AAE..	8
Tableau 3	Comparaisons entre les vecteurs viraux.....	14
Tableau 4	Amorces sens et antisens pour les gènes de l'IL-6 et l'IL-10.....	28
Tableau 5	Groupes de souris pour différentes doses d'AdTR5F/IL-6 et IL-10 K7 GFPq induit avec AdCMVtTA.....	44
Tableau 6	Groupes de souris pour la détermination du rapport AdCMVtTA vs AdTR5F/IL-6 K7 GFPq.....	45
Tableau 7	Groupes de souris pour l'expérience avec le modèle AAE.....	46
Tableau 8	Calendrier des instillations.....	47
Tableau 9	Données sur le nombre de particules totales vs le nombre de particules infectieuses de différents virus.....	63
Annexe	96

Liste des abréviations

AAE	Alvéolite allergique extrinsèque
AAV	<i>"Adeno-associated virus "</i>
Ad	Adénovirus
ADNc	Acide desoxyribonucléique complémentaire
Ag	Antigène
ARN	Acide ribonucléique
BSA	<i>"Bovine serum albumine "</i>
CAR	Coxsackie/adénovirus récepteur
CIP	<i>"Alkaline phosphatase calf intestinal"</i>
CMF	Cytométrie en Flux
DMEM	<i>"Dulbecco's modification of eagle's medium "</i>
EBV	Virus Epstein-Barr
FBS	<i>"Fetal serum albumine "</i>
GFP	<i>"Green fluorescent protein "</i>
HBS	<i>"Hepes buffer saline "</i>
HSV	Virus Herpès Simplex
Ig	Immunoglobuline
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-10	Interleukine-10
KDa	Kilo Dalton
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
MA	Macrophage alvéolaire
M-MuLV	<i>"Moloney Murine Leukemia Virus "</i>
NK	<i>"Natural Killer "</i>
NTP	<i>"Nucleoside triphosphate"</i>
Pb	Paire de base

PBS	<i>"Phosphate Buffer Saline "</i>
PCR	<i>"Polymerase chain reaction"</i>
UFP	Unité formatrice de plages
RT-PCR	<i>"Reverse transcriptase polymerase chain reaction"</i>
SR	Saccharopolyspora rectivirgula
TAE	Tampon tris acétate éthylène diamine tétraacétique
TBS	<i>"Tris Buffer Saline "</i>
TE	Tampon tris éthylène diamine tétraacétique
TNF- α	<i>"Tumor Necrosis Factor-alpha "</i>
tTA	<i>"Tetracycline-regulated transactivator"</i>

1.0 Introduction

1.1 L'alvéolite allergique extrinsèque (AAE)

L'AAE est une maladie qui a été décrite pour la première fois par Cambell en 1932.¹³ Il rapporta des cas de fermiers qui présentaient des symptômes respiratoires accompagnés d'hyperthermie et de malaises généraux sans évidence d'infection.¹⁸ Depuis, on s'est rendu compte qu'il y avait des personnes provenant d'autres milieux et vivant dans des conditions tout à fait différentes qui avaient les mêmes symptômes. Depuis plusieurs années, notre groupe de recherche s'intéresse à l'étude de la pathophysiologie de l'AAE. On commence à comprendre certains mécanismes de l'AAE et c'est dans cette voie que ce projet a été réalisé.

L'AAE représente un groupe de maladies pulmonaires caractérisées par une importante réponse inflammatoire à différents antigènes inhalés.²² Les agents responsables de l'AAE peuvent être des agents microbiens, des protéines animales ou plus rarement des composants chimiques.⁵ Cette pathologie présente un nombre de syndromes cliniques très important qui dépendent de la réponse immunologique du patient, la durée de l'exposition et la quantité ainsi que la nature de l'antigène inhalé. Les propriétés intrinsèques de l'antigène sont la non-digestibilité par les macrophages alvéolaires (MA) et leur habilité à fixer le complément et donc à agir comme adjuvant.⁷ Ceci mène au déclenchement de la réponse immunitaire au niveau pulmonaire. Les différents groupes cliniques et leurs agents responsables sont présentés au tableau 1.

Tableau 1
Syndromes représentatifs de l'AAE

Principaux syndromes cliniques	Agents responsables	Sources environnementales
-Poumon du fermier -Poumon de l'humidificateur	Actinomycètes Thermophiles - <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> - <i>T. vulgaris</i> , <i>T. candidus</i>	-Foin, paille ou grain mal conservés -Air conditionné, Humidificateur contaminé
-Poumon de l'éleveur de pigeons	Protéines aviaires	-Excréments d'oiseaux, plumes
-Poumon du brasseur de bière -Poumon du fromager -Suberosis	Moisissures - <i>Aspergillus flavus</i> - <i>Penicillium casen</i> - <i>Penicillium frequentans</i>	-Malt humide -Fromage humide -Liège humide
-Alvéolite allergique aux isocyanates	Produits chimiques -Toluène diisocyanate, Trimellitic anhydride	-Industrie du plastique

Référence : Kaltreid et al. ⁴⁹

Au Québec, le poumon du fermier est une forme commune de l'alvéolite allergique extrinsèque. Elle est causée, entre autre par l'inhalation d'actinomycètes thermophiles, tel que *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR), lors de la manipulation du foin, du grain ou de la paille détériorés. Lorsque le foin est d'une humidité de plus de 30% et qu'il n'est pas entreposé sous un séchoir à foin ou dans un endroit aéré, il y a détérioration du foin. Cette détérioration est initiée par la croissance des moisissures qui lors de leur croissance augmentent peu à peu la température jusqu'à ce qu'elle atteigne 50°C et c'est à ce moment qu'il y a développement des actinomycètes thermophiles.⁷¹

Au Québec, chaque année environ 3 fermiers sur 1000 développent le poumon du fermier. Plus de 10% des fermiers vivant dans un climat humide ont des anticorps contre les actinomycètes thermophiles responsables de la maladie. La moitié de ces fermiers ont une lymphocytose alvéolaire.^{16,54}

Les signes cliniques de la maladie varient selon la durée et le type d'antigène inhalé. L'alvéolite se présente sous deux formes importantes : aiguë et chronique. La forme aiguë se présente de 4 à 10 heures suite à l'exposition antigénique. Les principaux symptômes sont : dyspnée, toux, myalgie et râles.⁷⁵ Cette réaction s'estompera dans les 18-24 heures qui suivent l'exposition s'il n'y a pas d'autre contact avec l'antigène. Le lendemain, si le contact est répété, les symptômes réapparaîtront. Lorsque l'exposition persiste, les poussées aiguës se répètent et progressivement la dyspnée devient continue et le sujet perd du poids. La forme chronique résulte vraisemblablement des séquelles issues de la forme aiguë.¹⁸ En effet, la phase chronique implique une longue exposition à l'agent responsable (SR). Les fermiers atteints du poumon du fermier sont hautement à risque pour le développement de séquelles irréversibles (fibrose pulmonaire et emphysème). On peut aussi observer une toux chronique.

Lorsque l'histoire et l'examen physique font suspecter une AAE, l'évaluation d'un patient doit se faire suivant différentes étapes. On commence tout d'abord par la recherche d'anticorps sériques précipitants contre un antigène spécifique. On effectue pas la suite une radiographie pulmonaire pour déterminer l'infiltration intersticielle. Les épreuves fonctionnelles respiratoires indiquent l'altération des volumes pulmonaires (diminution de la capacité pulmonaire) suite à une diffusion au monoxyde de carbone. On utilise l'endoscopie bronchique avec lavage bronchoalvéolaire (LBA) pour mesurer l'augmentation des cellules du liquide du LBA et ainsi mesurer la lymphocytose. Le dernier point important est la biopsie transbronchique qui détermine la présence d'infiltration lymphocytaire avec ou sans granulômes.^{18,15}

Le LBA est l'un des éléments le plus utile pour le diagnostic de l'AAE. L'absence de lymphocytose exclue le diagnostic de l'AAE mais par contre sa présence dans le LBA n'est pas spécifique. Plusieurs autres maladies pulmonaires comme comme la sarcoïdose, la tuberculose miliaire, la béryllose et la pneumonie interstitielle lymphocytaire présente une forte lymphocytose. De plus, plusieurs fermiers asymptomatiques présentent aussi une forte lymphocytose. L'analyse des sous-populations lymphocytaires révèle une majorité des lymphocytes T avec une forte prédominance de CD8+ (donc avec un rapport CD4+/CD8+ qui diminue)⁷. On peut dire cependant que la présence de granulôme, d'infiltration interstitielle et lymphocytose alvéolaire de plus de 50% chez le malade atteint caractérise la pathologie.

Le traitement idéal de l'AAE est l'élimination du contact antigénique. Ceci fait, le malade guérit souvent sans séquelle. Si la maladie s'est aggravée avant l'arrêt du contact, il pourra y avoir des séquelles permanentes. Lorsque le contact ne peut être évité (exemple d'un fermier à son travail), la prise de corticostéroïdes par voie systémique peut contrôler la maladie. Ce traitement ne semble pas cependant modifier l'évolution à long terme. Dans le cas du poumon du fermier, plusieurs moyens sont disponibles pour diminuer le niveau d'exposition. Les premiers moyens reposent sur l'entreposage du fourrage qui ne doit pas être trop humide (<20%). Améliorer la ventilation pourrait contribuer à diminuer l'intensité de l'exposition. Le port d'un masque protecteur peut s'avérer utile.¹⁸

Outre les lymphocytes, les macrophages alvéolaires (MA) sont des cellules impliquées dans cette pathologie. Ces cellules sont présentes sur l'épithélium alvéolaire ainsi que dans les alvéoles elles-mêmes dans le poumon sain.²⁰ De plus, les MA occupent une position unique, celle d'être en contact avec l'air entrant dans les poumons et par le fait même, entrent directement en contact avec les antigènes inhalés qui pénètrent dans les poumons. Lorsque le SR entre en contact avec les macrophages ceux-ci sont stimulés et relâchent des médiateurs de l'inflammation

dont IL-1 et TNF alpha. Ces cytokines ont un effet direct sur le recrutement des neutrophiles et de plus promeuvent la libération d'autres cytokines d'inflammation (IL-6 et IL-8) ce qui peut ainsi contribuer à la chronicité de la réaction inflammatoire.

La physiopathologie d'une maladie est toujours très complexe et par le fait même les cibles à atteindre sont d'autant plus difficiles lorsqu'on ne connaît pas le mécanisme de la maladie. Ce projet vise à comprendre l'interrelation entre différentes molécules de l'inflammation. Notre but est de surexprimer certaines cytokines (IL-6 et IL-10) dans un modèle *in vivo* de l'AAE et de voir l'effet de cette surexpression sur le développement de l'AAE.

1.2 L'inflammation

L'AAE étant une maladie inflammatoire importante, il est nécessaire de bien comprendre ce qu'est l'inflammation ainsi que le rôle que joue certaines molécules. On peut considérer qu'une lésion tissulaire causée par des microbes ou des agents chimiques constitue une forme de stress. On appelle inflammation la réaction au stress provoqué par le dommage tissulaire. Le processus de l'inflammation se divise en deux catégories soit : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est rapide et de courte durée. C'est une réaction relativement uniforme qui se caractérise par une accumulation de fluide, de protéines plasmatiques et de leucocytes. En contraste, l'inflammation chronique est de longue durée et inclue un influx de macrophages, de lymphocytes et de fibroblastes.⁷³ Bien entendu, l'inflammation est cruciale pour le maintien de l'intégrité de l'individu mais comme on viens de le voir, cette même intégrité se dérègle parfois conduisant à des maladies chroniques comme celle dont on fait l'étude dans ce projet.

Une inflammation, qu'elle soit aiguë ou chronique, se manifeste généralement par quatre signes fondamentaux : la rougeur, la douleur, la chaleur et la tuméfaction. Ce processus contribue à l'élimination des microbes, des toxines ou autres corps étrangers au siège de la lésion, prévient leur propagation aux organes adjacents et prépare le site pour la réparation tissulaire. L'inflammation est donc une réaction destinée à rétablir l'homéostasie. Cette réaction de défense est de type non-spécifique et réagit donc de la même façon à tous les types de stress. Dans chaque cas la réaction inflammatoire est initiée, résultant en une production de médiateurs pro-inflammatoires solubles. Ils sont responsables de l'augmentation du flux sanguin et la perméabilité vasculaire, la migration des leukocytes à partir du sang périphérique dans les tissus, l'accumulation de ces leukocytes au foyer inflammatoire, et l'activation de ceux-ci pour éliminer la substance étrangère. Les médiateurs solubles comprennent les protéases du plasma, les médiateurs lipidiques ainsi que les peptides dont les cytokines pro-inflammatoires.⁷³ Tous ces médiateurs solubles et composants cellulaires travaillent ensemble, afin d'éliminer l'agent responsable de cette détresse physique.

Les médiateurs qui nous intéressent le plus dans notre cas sont les cytokines. Les cytokines sont un groupe de protéines aux fonctions multiples qui agissent dans des processus biologiques aussi variés que la croissance et l'activation de cellules, l'immunité, hématopoïèses, la réparation de tissus et bien sûr l'inflammation. La majorité de ces cytokines agissent localement de manière autocrine (sur la cellule qui les sécrète) ou paracrine (sur les cellules voisines). Les cytokines sont synthétisées par différents types cellulaires comme les phagocytes, les lymphocytes, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules endothéliales.⁶⁰ Quelques cytokines comme l'érythropoïétine par exemple, sont transportées par le sang vers des cibles plus éloignées (action endocrine). Le tableau 2 donne les principales caractéristiques des cytokines les plus importantes.

Les cytokines sont des molécules ayant une demie-vie très courte de l'ordre de quelques minutes à quelques heures seulement. Lorsqu'on veut étudier l'effet de ces cytokines dans un modèle particulier, on doit pouvoir garder l'effet de la cytokine dans le milieu durant un certain temps. C'est pour cette raison que l'injection ou l'inhalation d'une protéine recombinante purifiée n'est pas idéale étant donné son élimination rapide. Une façon de contourner ce problème est d'introduire des gènes pour maintenir la synthèse. Par exemple, les vecteurs adénoviraux permettent une production continue de protéine²⁷ tel que les cytokine durant quelques jours à quelques semaines nous permettant ainsi de tester l'effet de la cytokine dans le modèle.³²

Tableau 2

Caractéristiques des principales cytokines retrouvées dans l'AAE

Cytokines	Sites de production	Cibles principales	Effets majeurs
INF- γ Ref : ^{43,29}	Lymphocytes T, cellules NK	Lymphocytes, monocytes, plusieurs autres types cellulaires	Activer les monocytes; induction du CMH de classe I et II; augmenter l'adhérence des lymphocytes aux cellules endothéliales via l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion.
IL-1 α,β Ref : ²⁴	Macrophages, autres sources (Cellule B, fibroblastes, cellules endothéliales)	Essentiel à tous les types cellulaires qui possèdent le récepteur et peuvent répondre à IL-1	Stimule les lymphocytes B et T; médiateur pro-inflammatoire; pyrogène; augmentation de l'ATCH relâché à partir des glandes pituitaires; induit la production de protéines en phase aiguë.
IL-2 Ref : ^{21,29}	Cellules T	Cellules T, B et monocytes	Prolifération et différenciation de cellules T; activation des lymphocytes cytotoxiques et des macrophages.
IL-4 Ref : ³³	Cellules T	Cellules B et T	Facteur de croissance et de différenciation pour les cellules B menant en une production particulière de IgG1 et IgE; facteur d'activation et de croissance des cellules T.

IL-6 Ref : ²⁴	Plusieurs types cellulaires, cellules T et B, macrophages, fibroblastes, et cellules endothéliales	Agit sur plusieurs types cellulaires	Activation et différenciation des cellules B; induction de la production en phase aiguë de protéines; médiateur pro-inflammatoire; facteur de croissance pour plusieurs myélome.
IL-10 Ref : ⁴²	Lymphocytes de types TH1 et TH2, autres types cellulaires	Lymphocytes B, lymphocytes TH1, macrophages	Inhibe la production de INF- γ et IL-3 par les lymphocytes de type TH1; inhibe la production de macrophages; inhibe la production de IL-6, IL-1 et TNF- α
IL-12 Ref : ⁴⁴	Monocytes, cellules B	Lymphocytes de type TH1, Cellules NK	Stimulation des cellules NK; Stimulation de l'activation et de la prolifération des lymphocytes TH1; induit la sécrétion INF- γ
TNF- α Ref : ²³	Neutrophiles, Lymphocytes, macrophages, cellules NK, neutrophiles et plusieurs cellules nonlymphoïdes	Neutrophiles, lymphocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, et bien d'autres types de cellules	Activation des macrophages, des leukocytes et des cellules cytotoxiques; cytokines pro-inflammatoire; augmente l'adhésion des leukocytes aux cellules endothéliales

Ref : Lowe et al. ⁶⁰

1.2.1 Interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 est initialement désignée comme un facteur d'inhibition de la synthèse de cytokines (CSIF). C'est une petite molécule de 18-kDa qui, chez la souris, possède deux sites potentiels de N-glycosylation produisant des protéines de poids variables 17, 19 et 21 kDa. Chez l'humain, elle ne possède qu'un seul site de glycosylation. L'absence de glycosylation n'influence pas l'activité biologique de la protéine.⁶⁵ La séquence d'homologie entre hIL-10 et mL-10 est de plus de 80% pour les nucléotides et la seule différence significative est l'insertion, chez l'humain, d'une

séquence *Alu* répétitive dans la région 3' de l'ARN hIL-10. La séquence de l'ARN possède 1345 acides nucléiques avec ses parties codantes et non codantes.⁶⁶

Les lymphocytes T peuvent maturer en différentes populations fonctionnelles telles les TH1 et TH2. Cette différenciation est dépendante de l'Ag reconnu et des cytokines présente dans le milieu. Par exemple, l'IL-12 est reconnu pour induire la production de cellules TH1 tandis que l'IL-4 induit la production de TH2.^{1,2} C'est en analysant les lymphocyte TH2 qu'on a initialement découvert L'IL-10. On a remarqué qu'elle inhibait la production de cytokines, en particulier INF- γ . Plus tard, on s'est aperçu que l'IL-10 était aussi produite par les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B, certaines populations de lymphocytes T CD8⁺ et des lignées cellulaires transformées par le virus EBV.⁹ L'IL-10 active les lymphocytes B entraînant leur prolifération, leur croissance, la sécrétion d'Ig et l'expression de molécules du CMH de classe II. IL-10 active la prolifération et la différenciation des mastocytes. Par ailleurs, IL-10 est un puissant inhibiteur de lymphocytes T TH1. Elle supprime la production de cytokines par les lymphocytes T de types TH1 et des cellules NK; elle abaisse la synthèse de l'oxide nitrique. Elle abaisse aussi l'expression de la production de cytokines (TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, mais pas du TGF- β et du récepteur antagoniste de l'IL-1) par l'inhibition des macrophages et des fonctions des cellules dendritiques.⁵²

L'effet le plus important de l'IL-10 est finalement son puissant effet anti-inflammatoire qui joue un rôle important dans l'équilibre de l'homéostasie lors d'une réaction inflammatoire. C'est ce dernier point qui rend cette cytokine aussi intéressante pour les applications thérapeuthiques dans des maladies inflammatoires chroniques. Plusieurs études ont utilisé IL-10 pour réduire l'inflammation dans certaines maladies comme l'arthrose rhumatoïde⁶ ou dans l'aspergillose bronchopulmonaire allergique.⁴¹

Plusieurs autres cytokines, comme l'IL-4 et l'IL-13 ont aussi des effets anti-inflammatoires. L'avantage de l'IL-10 par rapport aux autres, est son absence d'effets secondaires lors de tests en clinique.²⁵ Certains auteurs⁴² ont démontré que l'IL-10 jouait un rôle important dans l'AAE. En effet, ils ont utilisé des souris knockout pour éliminer l'expression de l'IL-10 dans le modèle. Ils ont démontré que l'absence de cette cytokine aggravait de façon importante la formation de granulômes dans la réponse immunitaire. Pour appuyer ce fait, ils ont déjà démontré que l'INF- γ était essentiel pour la formation de granulômes et que l'IL-10 inhibe l'effet de cette cytokine.⁴³

1.2.2 Interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6, auparavant connu comme l'interféron- β_2 , est une glycoprotéine de 21 kDa fait de 184 acides aminés qui peut être retrouvée sous différentes formes homodimériques. Le gène de l'IL-6 est localisé sur le bras long du chromosome 7.⁵² Lorsqu'il y a initiation de la réaction inflammatoire, et que l'IL-1 et le TNF- α sont relâchés, leur libération augmente la transcription du gène IL-6 pour continuer la cascade d'événement.⁵² On a observé cet effet dans une expérience chez des primates. Le niveau d'IL-6 commence à augmenter entre 4-8 heures après l'injection de LPS, contrairement aux niveaux de l'IL-1 et du TNF- α qui atteignent leur pic d'expression après 90 minutes. La sévérité clinique de l'inflammation, dans les maladies autoimmunes ou dans les maladies infectieuses corrèle avec le niveau de cytokines dans le plasma. Il est clairement démontrée que le niveau circulant d'IL-6 corrèle avec la sévérité et le risque de mortalité.^{52,25} On constate que l'IL-6 est relâchée par une plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes B/T, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales.^{73,60} Cette cytokine est un facteur important pour la différenciation finale des lymphocytes B, la production des immunoglobulines, la prolifération et l'activation des lymphocytes T et l'hématopoïèse.^{60,81} C'est une cytokine reconnue pour jouer un rôle important dans la défense de l'hôte et dans les mécanismes immuns. Elle affecte aussi la

différentiation et la production des lymphocytes B et T.⁸² On a longtemps considéré l'IL-6 comme une cytokine pro-inflammatoire, mais certaines recherches indiquent que dans certaines conditions, comme par exemple dans un cas d'une réaction inflammatoire aiguë, l'IL-6 n'est plus vraiment inflammatoire mais pourrait avoir certains effets anti-inflammatoires afin de rétablir l'homéostasie.⁷⁹

1.3 Modèle animal de l'aivéolite allergique extrinsèque

Un modèle murin de l'AAE a été mis au point en instillant des souris C57BL/6, selon un calendrier très précis établi dans notre laboratoire et basé sur quelques publications d'autres groupes, avec une préparation antigénique de SR, la bactérie la plus en cause dans les cas de poumon du fermier. Les souris AAE montrent une forte accumulation de MA et de lymphocytes.

1.4 Transfert de gènes pour des études fonctionnelles

On pourrait utiliser d'autres modèles pour effectuer un transfert de gène, tels que les souris knockout ou les souris transgéniques, des protéines recombinantes, etc. La souris knockout et la souris transgénique ont le défaut, pour notre étude, d'enlever les gènes étudiés ou de l'ajouter de façon permanente, on n'a donc aucun contrôle sur leur expression ou leur absence. De plus, l'effet est systémique alors que l'AAE est une pathologie localisée. On fait les mêmes observations en ce qui concernent les protéines recombinantes qui ont une demi-vie très courte. C'est pour cette raison qu'on en est venu à l'utilisation d'une méthode dite de transfert de gènes pour l'étude fonctionnelle de nos cytokines.⁷²

La découverte, en 1950, de la capacité des virus à transférer leur matériel génétique aux cellules, a permis à l'Homme d'imaginer ce qu'il pourrait faire s'il contrôlait lui-même ces virus. Lentement, les méthodes physicochimique, telle que la transfection au phosphate de calcium, se sont développées ayant ainsi permis de transférer l'ADN dans une culture de cellules. A cette même époque, la technologie

de l'ADN recombinant rend possible l'insertion à volonté de séquences d'ADN dans le génome viral.³ C'est à partir de ce moment, qu'on a développé différentes méthodes de transfert comme des méthodes chimiques (ex. liposomes), méthodes physiques (ex. bombardement de particules) et les vecteurs viraux (ex. l'adénovirus, le rétrovirus, le virus de l'herpès).

Il existe différents aspects du transfert de gènes selon le but que l'on veut atteindre. En effet, ce transfert peut être utile aussi bien pour analyser la fonction d'un gène dans un système bien précis ou alors être utile pour la thérapie. L'idée d'exprimer un gène pour comprendre son fonctionnement ou bien d'exprimer ce même gène pour un usage thérapeutique nous laisse entrevoir une démarche scientifique tout à fait différente. On doit déterminer nos besoins et savoir précisément ce que l'on attend du vecteur. Le tableau 3 résume les caractéristiques principales des différents vecteurs utilisés pour le transfert de gènes. Ce tableau est un bon repère pour choisir le vecteur approprié au but que l'on s'est fixé. On cherche dans notre étude un vecteur qui peut infecter des cellules qui sont non répliquatives, qui soit facile de production et accessible. On recherche un bon outil, facile à générer et à produire pour transférer des gènes dans un tissu spécifique. En plus de toutes ces caractéristiques, l'Ad est très bien caractérisé, les recombinants sont relativement stables, le virus recombinant peut être produit à un titre très élevé.³ Les caractéristiques précédentes sont très favorables à l'emploi d'un tel système, mais ce qui nous attire le plus dans l'adénovirus est son tropisme naturel pour l'épithélium bronchique.¹² De plus, il infecte une variété de types cellulaires différents *in vitro* et *in vivo*. Bien que l'adénovirus n'intègre pas son génome dans celui de la cellule hôte, il peut maintenir son expression pour quelques semaines dans les cellules des tissus infectés. Toutes ces caractéristiques en font un vecteur de prédilection pour cibler le poumon. L'ensemble de ces caractéristiques se sont retrouvés dans l'adénovirus de première génération qui avait été préalablement construit dans le laboratoire du Dr. Massie.

Tableau 3
Comparaisons entre les vecteurs viraux

Vecteurs	Taille de l'insert	Intégration dans le génome	Titre	Efficacité de transduction	Avantages	Limitations
MMLV	<8Kb	Oui	10 ⁶	Élevée	Transduction stable chez des cellules en division	Infecte rapidement seulement les cellules en division
Ad	<8Kb	Non	10 ¹²	Élevée	Transduction de tous les types cellulaires (cellules en division ou non)	Expression déclenche une réaction inflammatoire
AAV	<4Kb	Oui?	10 ⁶	Élevée	Transduction stable	Intégration faible et petite taille de l'insert Difficile à produire
HSV	<20Kb	Non	10 ¹⁰	Faible	Bonne grandeur de l'insert et spécifique aux neurones	Expression instable et potentiel de générer des infections HSV
Vaccinia	<25Kb	Non	N/A	Élevée	Infecte efficacement une variété de cellules	Vecteur réplicatif

Ref ⁴⁷ <http://www.mc.vanderbilt.edu/gcrc/gene/frame5.htm>

1.5 Les Adénovirus

On retrouve une cinquantaine d'adénovirus différents qui peuvent infecter l'homme. Ils appartiennent au genre Mastadénovirus et portent un antigène de surface commun. Certains sont pathogènes et déclenchent de graves entérites chez les nourrissons, mais ils sont souvent présents chez leur hôte sans se manifester. Les adénovirus sont des virus non enveloppés, à capsidie nue composée de 252 sous-unités, nommées capsomères, assemblées en icosaèdre de 70 à 90nm de diamètre. Les fibres de l'adénovirus interagissent avec leurs récepteurs spécifiques présents à la surfaces des cellules. La base permet à l'Ad de reconnaître les récepteurs des intégrines⁶⁹ et le récepteur CAR.^{80,8} Les cellules qui possèdent ces récepteurs peuvent être infectées par l'adénovirus. Le niveau d'infection est proportionnel à la quantité de récepteurs qui se retrouvent sur les cellules visées. Environ 80% du message génétique de la particule virale sert à coder ses protéines d'assemblage. Les virions s'absorbent sur la membrane des cellules, puis pénètrent par endocytose; le virus perd alors progressivement les composants de sa capsidie. L'ADN viral associé à des protéines migre vers le noyau, y pénètre, puis commence à être transcrit par les enzymes de l'hôte, deux heures après le début de l'infection.

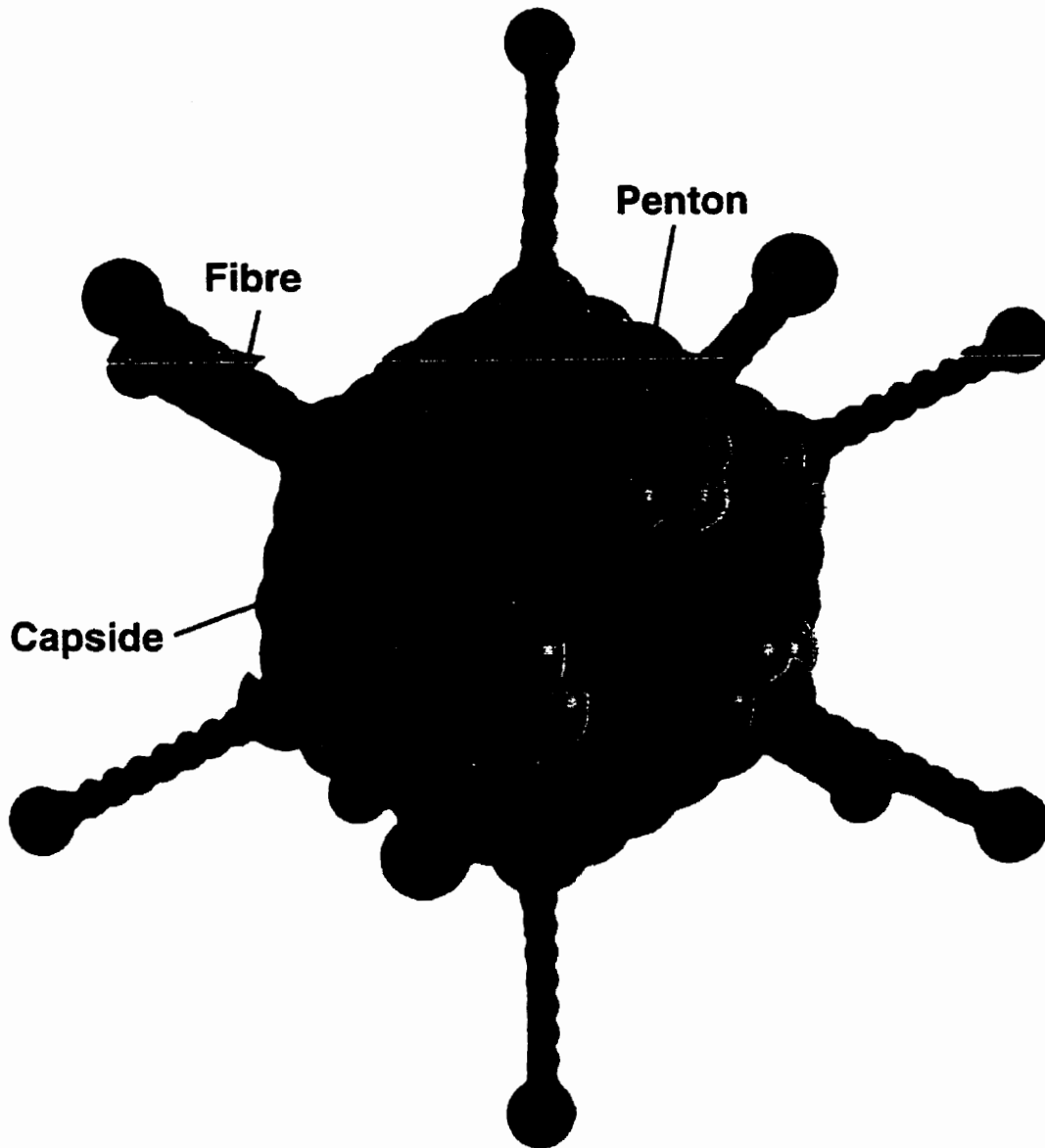


Figure 1 Représentation graphique des parties constituant l'adénovirus

La capside est composée de 252 sous-unités, nommées capsomères, assemblées en icosaèdre de 70 à 90 nm de diamètre. Les fibres de l'adénovirus interagissent avec leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules.

On distingue deux phases d'expression du génome viral : une précoce et une tardive, séparées par le début de la réplication du génome viral. Le gène E1A est immédiatement transcrit après l'infection et code pour des protéines qui contrôlent la transcription des autres gènes précoces et induit la cellule hôte pour qu'elle entre en phase S dans son cycle cellulaire. Le gène E1B interagit avec le gène E1A pour induire la croissance de la cellule; de plus, il favorise l'expression des gènes viraux tardifs. Les protéines nécessaires à la réplication du génome viral sont codées par la région E2. La région E3 code des protéines qui permettent aux cellules infectées d'échapper au système immunitaire. La région E4 est essentielle à la multiplication de l'ADN et favorise l'expression des gènes tardifs et à l'arrêt des fonctions de la cellule hôte. La phase tardive (ML), contient cinq sites potentiels d'addition de poly A appelés L1 à L5. Ces sites poly A permettent, par épissage, la formation de 15 ARNm à partir du transcrit primaire tardif de l'Ad. L'ensemble des gènes tardifs bloquent la synthèse des protéines de la cellule hôte et la transcription des gènes viraux tardifs aboutit à la synthèse des protéines virales de structure, permettant l'assemblage des nouvelles particules virales.⁷⁷ Un seul adénovirus peut produire jusqu'à 10000 particules infectieuses par cellule au cours du cycle infectieux.⁷⁰ La figure 2 est une carte transcriptionnelle simplifiée des gènes précoces et tardifs(E1, E2, E3, E4 et ML).

Lors de la construction du vecteur, le gène à greffer est sous la forme d'ADNc et est encadré de séquences promotrices et du poly A.^{26,38} La quantité maximale d'ADN que l'adénovirus peut encapsuler est limitée entre 105-106% du génome sauvage, c'est-à-dire 2kb d'ADN en extra. Il est donc nécessaire d'avoir au préalable enlevé des parties dans l'ADN de l'adénovirus pour insérer un gène tout de même d'une grosseur appréciable. En plus de devoir enlever des régions de l'Ad pour insérer un gène, on doit aussi faire cette délétion pour rendre le vecteur déficient. En effet, lorsque l'on veut faire un transfert de gène pour une expression à long terme, il faut empêcher l'Ad de se répliquer. Une délétion unique dans la région E3 ne rend pas le vecteur déficient. On doit ajouter une délétion dans une autre partie du gène de

l'Ad (E1 ou E4) pour le rendre défectif, c'est ce qu'on appelle un vecteur de première génération. Les délétions de E1 et E3 combinés, dans les vecteurs de première génération, permettent une insertion totale de 8 kb tout en conservant la capacité du virion de se répliquer dans les cellules 293. La délétion d'un autre gène essentiel tels que E2A, E2B ou E4, nous donne les vecteurs de seconde génération et les vecteurs de troisième génération sont complètement exempts de gènes viraux. La lignée cellulaire 293, une lignée qui a été transformée par l'ADN de l'Ad5, permet aux vecteurs de première et deuxième générations de se répliquer par l'expression des gènes manquants.^{37,10} Par contre, les vecteurs de troisième génération doivent être complétés par un virus auxiliaire pour qu'il y ait multiplication du virus.

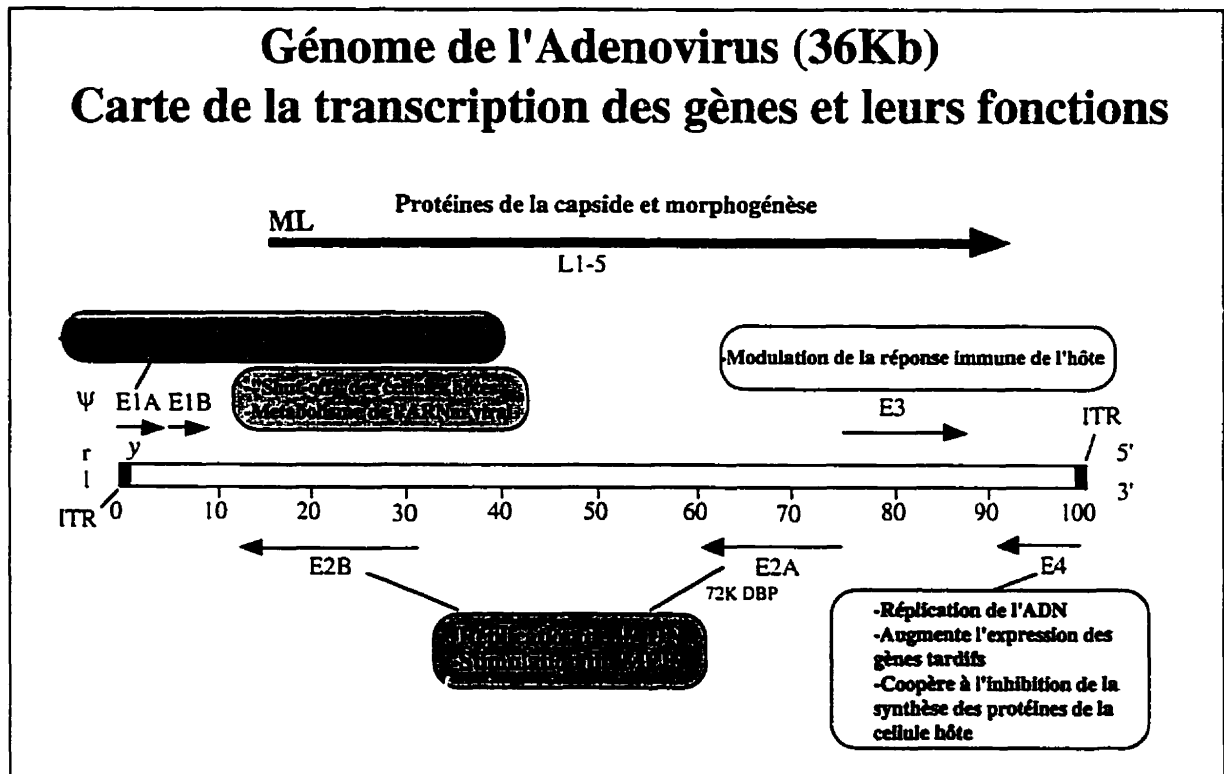


Figure 2 Représentation graphique de l'orientation des gènes E1 à E4 de l'adénovirus

L'ADN du gène de l'adénovirus est double brin. Un unité de cette carte correspond à 356pb pour totaliser une carte d'environ 35,6Kb. Tous les gènes sont identifiés tels que E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4 qui sont des gènes précoces et ML (L1-L5) qui sont des gènes tardifs. ψ :séquence d'encapsidation, ITR:"*Inverted Terminal Repeat*"

1.5.1 Vecteur inductible VS vecteur constitutif

La difficulté de générer des adénovirus produisant une grande quantité de protéines pouvant avoir des effets toxiques ou pouvant interférer avec la réplication de l'Ad, a nécessité le développement de vecteurs de transfert pouvant être régulés.^{63,64} Parmi les vecteurs inductibles le système tétracycline est très populaire. Ce système utilise le facteur de transactivation formé par la fusion du domaine d'activation de la protéine VP16 du HSV (Herpes simplex virus) et de la protéine du gène de résistance à la tétracycline de *E. coli* (*Escherichia coli*). L'utilisation d'une cassette d'expression régulée par la tétracycline (tTA), nous permet d'avoir une production de protéine lors de la coinfection (AdV + AdV tTA) et un arrêt total ou partiel de la production lors de l'ajout de tétracycline dans le modèle.^{63,76} En effet, dans un système tTA, la tétracycline prévient la liaison entre le transactivateur tTA et l'opérateur tet (*tetO*) ce qui empêche l'activation du promoteur. Le système rtTA est à l'inverse du système tTA. L'absence de tétracycline dans le système rtTA, ne permet pas au transactivateur de reconnaître l'ADN cible (*tetO*); par conséquent il n'y a pas de transcription du gène X. Par contre, l'addition de tétracycline permet la liaison entre le rtTA et le *tetO*. Il y aura donc transcription du gène X. On voit tout de suite l'intérêt d'un tel système de vecteur même si notre protéines est non toxique. Le contrôle que ce système nous donne sur l'induction de la protéine, est un atout important même quand cette protéine n'est pas toxique. On peut décider d'induire ou non la production de la protéine que l'on désire étudier. De plus, le promoteur utilisé est plus fort, ce qui permet de produire une plus grande quantité de protéine. Finalement, il facilite de beaucoup la fabrication et la production du vecteur. Ce système a été testé dans plusieurs modèles *in vivo* tel que le système nerveux central²⁷ ou dans les muscles.¹¹ Par contre, le fonctionnement de ce système n'a pas encore été bien documenté dans le poumon.

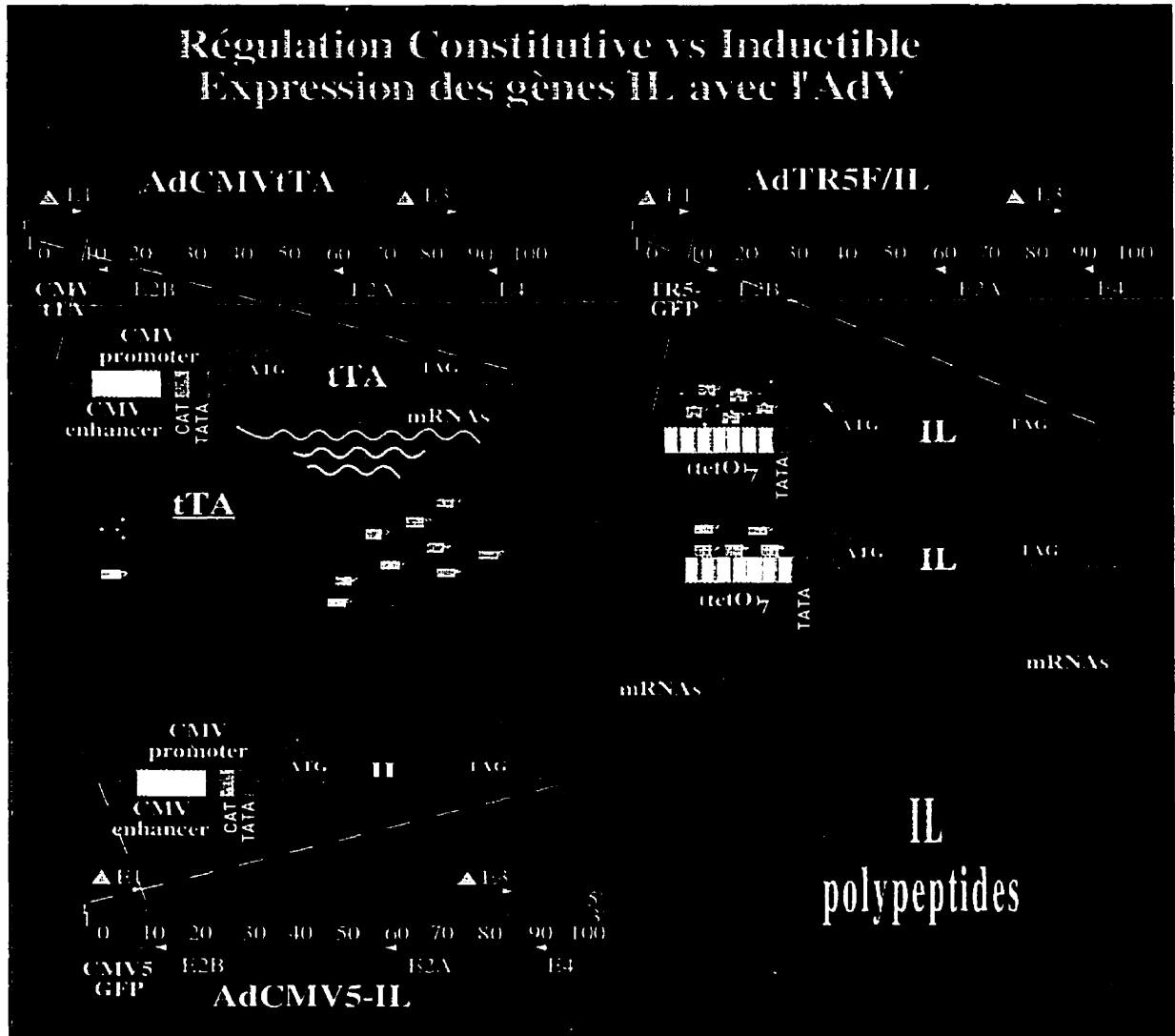


Schéma explicatif du principe d'un vecteur inductible à la tétracycline.

AdTR5F/IL est un vecteur possédant un promoteur TR5 inductible. La co-transfection avec le vecteur AdCMVtTA est nécessaire pour l'induction de la protéine IL. AdCMVtTA produit le transactivateur tTA qui se lie à l'opérateur tet O situé sur le vecteur AdTR5F/IL. Cette liaison permet la transcription du gène IL. La présence de tétracycline empêche la liaison entre le transactivateur et l'opérateur en se fixant sur le transactivateur. Le vecteur AdCMV-IL tant qu'à lui est un promoteur constitutif qui n'a donc pas besoin d'un transactivateur pour être activé.

2.0 Hypothèse de recherche

L'AAE est une maladie de nature inflammatoire (associée à de hauts niveaux de TNF- α et d'IL-1). Plusieurs études ont démontré la régulation négative des niveaux de cytokines pro-inflammatoires par l'expression de l'IL-10, on peut donc postuler que les patients atteints d'AAE ont une réponse au stress inadéquate et que ceci pourrait contribuer en partie aux hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires observées dans cette maladie. En relation avec le modèle murin deux hypothèses se posent : 1. IL-6 va augmenter la réponse à l'Ag tandis que l'IL-10 va diminuer cette réponse ce qui va confirmer le rôle direct de ces cytokines sur l'AAE. 2. On veut aussi voir l'effet de ces cytokines sur le développement des symptômes de l'AAE.

Ce projet comporte plusieurs objectifs. Premièrement, on doit amplifier les ADNc de l'IL-6 et l'IL-10 à partir de macrophages de souris. Deuxièmement, on doit faire la construction de deux vecteurs adénovirus inductibles produisant les cytokines voulues. Ces deux premiers objectifs de l'étude sont plutôt techniques. Le deuxième volet de l'étude traite de la possibilité d'induire les vecteurs dans le poumon de souris saines et ainsi que d'effectuer une modulation de l'inflammation en utilisant un modèle murin de l'AAE par l'administration de vecteurs viraux.

3.0 Matériel et Méthodes

3.1 Obtention des ADNc IL-6 et IL-10 pour le clonage

3.1.1 Lavages Brochoalvéolaires

On a effectué un lavage bronchoalvéolaire (LBA) chez des souris C57BL/6 pour recueillir les macrophages alvéolaires et ainsi être capable d'isoler l'ARN désiré (IL-6 et IL-10). On a aussi utilisé cette technique pour analyser les effets de nos vecteurs sur des souris saines et des souris AAE par des ELISA sur le LBA.

On a effectué un LBA chez la souris par une trachéotomie sur l'animal préalablement endormi à l'isoflurane et ensuite euthanasié par dislocation cervicale. On a effectué une ouverture d'environ un centimètre au niveau de la gorge immédiatement après la mort de l'animal. Une fois la trachée dégagée, on a passé un fil de coton dessous pour bien l'isoler. On a pratiqué une petite ouverture dans la trachée pour y insérer un cathéter 22G, 25mm (Johnson & Johnson, Arlington, NY). On a immobilisé le cathéter en nouant le fil de coton autour de la trachée. Le lavage a été réalisé à l'aide d'une seringue à insuline remplie avec 1 ml de saline (0,9%, filtrée) introduite dans l'entrée du cathéter. Le lavage a été effectué trois fois en tout pour un volume final de 3 ml. Il est bien important de noter le volume final de récupération pour exprimer le nombre de cellules récoltées par ml de lavage récupéré. Le liquide du lavage est gardé sur glace afin de préserver un bon taux de viabilité cellulaire.

Les cellules sont ensuite centrifugées à 1200 RPM à 4° C durant 10 minutes. Les surnageants sont aliquotés et entreposés à -80°C jusqu'à leur analyse. Les culots sont resuspendus dans 300µl de saline. Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'un hémacymètre.

3.1.2 Stimulation des macrophages et extraction d'ARN

On a utilisé les macrophages de LBA de 25 souris C57BL/6 instillées avec du SR pour obtenir les ARNm de IL-6 et IL-10. Ces macrophages ont été isolés par adhérence et stimulés *in vitro* avec 10 µg de LPS à une concentration de 5 µg/ml de milieu^{78,56} pendant 6 heures.⁵⁰ La durée de la stimulation est une moyenne qui a été déterminée à partir du maximum d'expression de l'ARNm de l'IL-6 et de IL-10 dans les cellules. L'extraction de l'ARN total s'est faite à l'aide de mini colonnes (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) sur lesquelles l'ARN est retenu au cours des premières étapes. On procède ensuite à plusieurs lavages successifs et l'ARN est finalement élué lors de la dernière étape. L'échantillon fut conservé à -20° C jusqu'à la réaction de polymérase en chaîne (PCR).

3.1.3 RT-PCR

La réaction de RT s'effectue à partir de 1µg d'ARN total pour une réaction de 20 µL. L'échantillon a été préparé comme suit

- 1µg d'ARN
- 10 nM d'NTP
- 10 µg d'Hexamères (2,5µg/µL) (Oligonucléotides qui vont aller se fixer à certain endroit dans l'ARN pour permettre à l'enzyme de débiter son action)
- Tampon M-MuLV transcriptase réverse à concentration finale 1X (New England Biolabs, Inc., Mississauga, ON)
- 0,4U de l'enzyme M-MuLV transcriptase réverse (200u/ml)
- H₂O pour un volume final de 40µL

L'ARN fut dénaturé préalablement à 65°C/10 min avant l'ajout des autres réactifs. Cette dénaturation permet l'hybridation des hexamères aux brins d'ARN. Ensuite, on a utilisé un cycle de 30 min à 37°C sur un appareil Thermo DNA Cycler (Perkin Elmer Cetus, Wellesley, MA) pour la synthèse de l'ADNc. L'ADNc est ensuite conservé à -20°C jusqu'au moment du PCR.

3.1.4 PCR

La PCR nécessite des oligonucléotides spécifiques qui encadrent les séquences que l'on veut amplifier. Les amorces utilisées pour amplifier une séquence de 666 pb du gène de souris de l'IL-6 et de 722 pb du gène de souris de l'IL-10 se retrouvent au tableau 4. Le choix de ces amorces est basé, pour l'IL-10, sur l'article de Goodman³⁵ et pour ce qui est de l'IL-6, le choix des amorces est basé sur nos observations de la carte de l'ADNc. On a ajouté des bouts flottants aux amorces, c'est-à-dire qui ne s'appartient pas à la séquence de l'ADNc. Cette partie des amorces contient des sites d'enzymes de restriction pour faciliter l'insertion des ADNc dans le vecteur d'expression pAdTR5F-K7-GFPq adénovirus (collaboration groupe Bernard Massie, IRB, MTL, PQ) et une séquence consensus de Kozak⁶⁸ qui permet une meilleure traduction dans les cellules mammifères. Pour mIL-6, le site de l'enzyme de restriction est BamHI et pour mIL-10 il s'agit de Bgl II. Les séquences complètes des ADNc⁴⁰ de mIL-6 et mIL-10 se retrouvent en annexe A. Le mélange lyophilisé des deux amorces est reconstitué dans de l'eau exempte de RNases pour une concentration finale de 100pmol/ul pour chaque amorce.

Tableau 4
Amorces sens et antisens pour les gènes de l'IL-6 et l'IL-10

Nom de l'amorce	Oligonucléotides	Position dans l'ARNm
mIL-6 sens	5'-GCTGGATCCGCCATGAAGTTCCTCT CTGCAAG-3'	32-mer en position 52
mIL-6 antisens	5'-TAAGGATCCATATGCTTAGGCATAA CGCACTA-3'	32-mer en position 664
mIL-10 sens	5'-TTCTTCAGATCTGCCATGCCTGGCT CAGCACTGCT- 3'	35-mer en position 76
mIL-10 antisens	5'-AAGAAGAGATCTAATGGGAACTGAG GTATCAGAGG- 3'	35-mer en position 749

Pour la réaction de PCR, 10 µl du produit de la réaction RT ont été utilisés. À ce 10µl ont été ajoutés 40µl du mélange suivant:

- Amorce 50pmoles/amorce/tube
- 16 mM d'NTP
- Tampon de l'enzyme 10X pour une concentration finale 1X (Amersham pharmacia biotech, San Francisco, CA)
- 1,5 unité de l'enzyme Taq polymérase
- H₂O pour un volume final de 50µl/tube

Une centrifugation rapide fut réalisée pour faire descendre tous les réactifs au fond des tubes. On a ajouté 30µl de LiquidWax (Fisher Scientific Co.) à chaque tube pour empêcher l'évaporation pendant la PCR.

Programme utilisé pour le PCR de IL-6 et IL-10

95°C/2 min (1 cycle)
 94°C/1 min (35 cycles)
 68°C/30 sec (35 cycles)
 72°C/1 min (35 cycles)
 72°C/10 min (1 cycle)
 6°C (conservation)

3.1.5 Analyse des produits PCR

Les produits de PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose à 1%. Les échantillons sont préparés de la façon suivante :

- 10µl d'échantillons
- 1µl Gel-loading buffers 10X (0,25% bromophénol bleu + 0,25% xylène cyanol + 30% glycérol)
- 2µl de colorant fluorescent vista green (Amersham-Pharmacia Biotech, San Francisco, CA)

La migration se fait pendant environ 1 heure à 100V dans du tampon TAE 1X (0,04M Tris-acetate + 0,002M EDTA pH 8.0 solution 50X). Une photographie est prise à la fin de la migration en utilisant le Fluoimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Le produit de PCR est purifié avec une trousse QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) avant de passer à l'étape de clonage.

3.2 Clonage des gènes IL-6 et IL-10

3.2.1 Construction des vecteurs de transfert, pAdTR5F/IL-6 et pAdTR5F/IL-10

On a utilisé les techniques standard de clonage pour insérer les ADNc des interleukines 6 et 10. Le plasmide pAdTR5F-K7-GFPq⁶³ a été préparé de la manière suivante :

- 1) Digestion avec l'enzyme Bgl II
 - 2 µg de vecteur pAdTR5F-K7-GFPq
 - 2 unités enzyme Bgl II
 - Tampon NEBuffer 3 concentration finale 1X (New England Biolabs, Inc., Mississauga, ON)
 - H₂O
 - 37° durant 2heures

2) Déphosphorylation du vecteur pour empêcher sa fermeture

- ADN préalablement digéré Bgl II
- 3 unités d'enzyme CIP
- Tampon NEBuffer 3 à une concentration finale 1X (New England Biolabs, Inc., Mississauga, ON)
- H₂O
- 37° durant 2 heures
- Arrêt de la réaction avec 5mM de EDTA

3) Purification du vecteur sur gel d'agarose 0,8%

- On dépose le vecteur sur gel et après migration (section 3.1.4), on excise la bande et on récupère l'ADN avec une trousse Qiagen Gel purification Kit (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA).

Une fois que le vecteur a été préparé, il a fallu liguer les inserts avec le vecteur. L'ADNc de l'IL-6 a des bouts BamHI compatible avec le site Bgl II, ce qui a détruit ce site lors de l'insertion. En ce qui concerne IL-10, les bouts sont Bgl II, on a donc conservé le site de restriction.

4) Ligation du vecteur pAdTR5F-K7-GFPq avec les inserts IL-6 et IL-10

- 50 ng du vecteur
- 10 ng de l'insert (IL-10 ou IL-6)
- 1 unité de l'enzyme Ligase
- Tampon ligase pour une concentration finale de 1X (New England Biolabs, Inc., Mississauga, ON)

5) Transformation pour l'obtention de clone IL-10 et IL-6

On a utilisé 100µl de bactéries compétentes DH5α que l'on a mélangé avec le produit de ligation et on a incubé sur la glace 30 minutes. Ensuite, on a effectué un choc thermique à 42°C durant 1 minute. On a ajouté 900µl de milieu LB et incubé 45 minutes à 37°C. Finalement, on a déposé 200µl et 800µl sur une boîte de milieu LB avec une concentration de 100µg/ml d'ampicilline. On a incubé à 37°C toute la nuit.

Finalement, les clones obtenus ont été amplifiés dans 3 à 5 ml de milieu LB + 100µg/ml d'ampicilline. L'ADN a été purifié par mini-préparation (miniprep qiagen kit. Qiagen Inc., Santa Clarita, CA). La vérification de l'orientation a été effectuée par digestion avec l'enzyme XmnI pour les clones IL-6 et IL-10.

6) Digestion pour vérifier l'orientation des inserts

- Environ 250 ng de minipréparation
- Tampon NEBuffer 2 à une concentration finale de 1X (New England Biolabs, Inc., Mississauga, ON)
- BSA à une concentration finale de 1X
- 3 unités de l'enzyme XmnI
- H₂O

3.2.2 Séquençage des ADNc pour IL-6 et IL-10

Le séquençage des ADNc était nécessaire pour vérifier l'exactitude des séquences et la bonne orientation dans le plasmide. Les réactions pour le séquençage ont été préparées par PCR. Le choix des amorces était très important si on voulait bien lire la séquence. On a dû faire deux PCR par plasmide pour bien séquencer tout l'insert du début à la fin. L'amorce qui a permis de pouvoir séquencer le début de l'insert de l'IL-10 et l'IL-6 dans le plasmide est la suivante 5'-GACATCCACTTTGCCTT-3' (position 2369). On a utilisé une amorce interne pour l'IL-6 (5'-CATAGCTACCTGGAGT-3') et une amorce interne pour l'IL-10 (5'-CCTGGTAGAAGTGATG-3'). La réaction de PCR pour le séquençage s'est amorcée comme suit:

- 1µg d'ADN plasmidique
- 2 pmol d'oligonucléotides
- 4µl dRhod.seq.mix (Amersham pharmacia biotech, San Francisco, CA)
- H₂O pour un volume final de 10µl

Le produit de PCR que l'on a obtenu devait être remis sous forme de culot sec. Le volume total de la PCR a été ajouté à 39µl de tampon TE (10 mM Tris-Cl pH 7,4 + 1mM EDTA) + 1µl de glycogène + 100µl d'éthanol. On a laissé 30 min sur la glace, on a centrifugé ensuite durant 22 minutes. On a enlevé le surnageant et on a ajouté 150µl d'éthanol froid 70%. On a centrifugé un autre 3 minutes, le surnageant a été enlevé et le culot a séché à l'air. Le séquençage a été effectué par Daniel Dinard (IRB) sur le séquenceur automatique et les analyses ont été effectuées par comparaison avec les séquences écrites en acides aminés.

Programme utilisé pour la PCR de séquençage

96°C/10 sec (25 cycles)
 50°C/5sec (25 cycles)
 60°C/4min
 4°C (conservation)

3.3 Cellules

Les cellules 293A proviennent de fibroblastes de rein humains, transformés par de l'ADN d'Ad5. Elles expriment constitutivement les gènes E1A et E1B de l'adénovirus. Donc ces cellules sont utilisées pour la propagation des virus Ad délétés E1.³⁹ Les cellules 293A poussent en couche unicellulaire dans un milieu DMEM (Life technologies, Burlington, ON) supplémenté avec 5% de sérum bovin fétal (FBS) et 2mM de glutamine finale. Les cellules 293A sont utilisées principalement pour les transfections et les essais de plages. Un autre clone de ces 293 (293S) croît en couche unicellulaire dans un milieu régulier de DMEM (Life technologies, Burlington, ON) ou en suspension lorsque l'on utilise un milieu DMEM sans calcium. Les cellules 293S sont utilisées à l'étape de production de virus.³¹ Les cellules 293tTA poussent dans les mêmes conditions que les 293S mais celles-ci ont la particularité de produire le transactivateur sensible à la tétracycline. Ces cellules sont utilisées pour transactiver le promoteur TR5 pour la production des protéines qui sont sous son contrôle dans les vecteurs inductibles AdTR5.

Les cellules BMAde1 78-42 et les 220-8 sont des cellules adhérentes, dérivés des cellules A549. Comme les cellules 293, elles expriment les gènes E1A et E1B de l'Ad mais n'ayant pas de séquence d'homologie avec les vecteurs Ad, contrairement aux 293, elle ne génère pas de révertant E1. Ces cellules croissent plus lentement que les 293A mais nécessitent les mêmes nutriments. On utilise les BMAde1 clone 78-42 pour une ou deux rondes de purification de plages virales virales dépendant de la pureté de celles-ci. Les 78-42 forment des plages plus uniformes et mieux délimités. Ensuite les plages sélectionnées sont amplifiées sur 3×10^7 cellules (passage 3) BMAde1 clone 220-8. Les clones BMAde1 diminuent le risque d'avoir des adénovirus révertants c'est-à-dire avec une réplication compétente.⁶³

Les cellules HeLa et KB expriment le rTA (HeLa-rTA et KBrTA) et les cellules A549 exprime le tTA (A549-tTA). Ces cellules ont été obtenues par « American Type Culture Collection » (ATCC) et sont cultivées avec le même milieu que pour les cellules 293A.

3.4 Génération, purification et production d'adénovirus

On a dû linéariser le vecteur de transfert à la jonction entre l'ITR et la séquence plasmidique par digestion avant d'effectuer la transfection. On a digéré 20 μ g d'ADN avec l'enzyme de restriction Fse I à une concentration de 0.25U/ μ g d'ADN durant une nuit.

On a effectué une co-transfection des plasmides pAdTR5F/IL-6 K7 GFPq et pADTR5F/IL-10 K7 GFPq avec de l'ADN viral Ad5/ Δ E1 Δ E3 linéarisé avec l'enzyme Cla I sur 4×10^6 cellules 293A. On a utilisé la technique au phosphate de calcium pour réaliser la transfection.⁴⁸ La figure 4 représente bien la recombinaison entre le plasmide et l'ADN de l'Ad pour la construction de l'Ad recombinant.

On a utilisé 5µg d'ADN du plasmide AdTR5F/IL-6-K7 GFPq et AdTR5F/IL-10-K7 GFPq ainsi que la même quantité pour l'ADN viral Ad5/ΔE1ΔE3 pour la transfection.

On a préparé trois tubes:

tube 1:

-350µl d'une solution CaCl₂ à une concentration finale de 0,02mole

tube 2:

-5µg ADN

-quantité équivalente en µg d'ADN viral

-0,1X TE stérile pour un volume finale de 100µl

tube 3:

-500µl HBS 2X (0,28M NaCl + 0,05M Hepes + 1,5mM Na₂HPO₄ pH 7,05)

On a mélangé le tube d'ADN goutte à goutte dans le tube 1. On a ajouté ensuite 50µl de CaCl₂ goutte à goutte au tube 1. Le tube 1 a ensuite été mélangé avec le tube 2 par bullage de 2 à 5 minutes.⁴⁸ Le contenu du tube 1 a été déposé goutte à goutte sur des bulles de HBS ce qui a empêché la formation de précipité. On a déposé ensuite le mélange goutte à goutte sur les cellules.

Le lendemain, on a lavé les cellules au PBS-EGTA (137mM NaCl + 2,7mM KCl + 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O + 1,4mM KH₂PO₄ + EGTA 1 mM) et on les a séparé dans 4 pétris de 60mm. Quelques heures plus tard (4 à 6 heures), on recouvrait les cellules transfectées par une couche d'environ 3mL de SeePlaque agarose 1% (Mandel, Montréal, Qc). On a observé, par microscope à fluorescence inversé, l'apparition de plages de lyse vertes (GFPq) et isolées (10 à 15 jours).

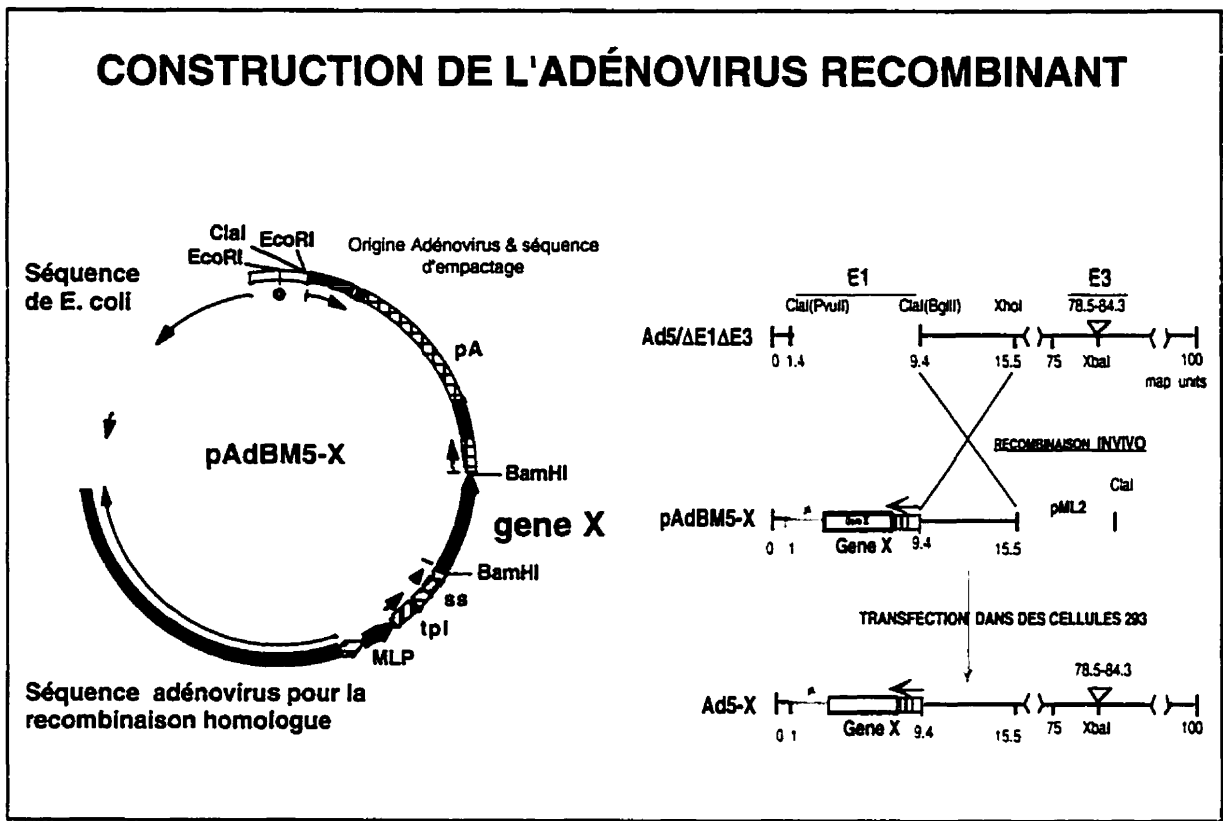


Figure 4 Représentation schématique de la recombinaison entre un vecteur de transfert (pAdBM5-X) possédant une séquence adénovirale et l'adénovirus (AdΔE1ΔE3).

Il y a présence d'une séquence adénovirale dans le plasmide qui permet cette recombinaison avec l'adénovirus et permet ainsi le transfert du matériel génétique du plasmide à l'adénovirus.

3.4.1 Purification et production d'Adénovirus recombinants

Les plages virales positives GFPq provenant de la transfection, ont été repiquées à l'aide d'un tip de 20µl et éluées 24 heures dans une plaque 24 puits avec 1 ml de milieu. La purification a nécessité 1×10^6 cellules 78-42 dans des plaques de 6 puits. Un volume minimal de virus dilué (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) a été appliqué sur les cellules. Après 10 jours, les nouvelles plages virales étaient isolées. Les clones obtenus ont été amplifiés sur des cellules 293 tTA pour tester la production de protéines par immunobuvardage.

Voici le calendrier pour l'amplification et la production :

- Co-transfection sur des cellules 293A
- Sélection et élution des premières plages positives
 - Amplification sur des cellules 293A
 - Infection des cellules 293tTA pour vérifier l'expression du transgène
 - Analyse de la protéine produite par immunobuvardage

- 2 à 3 étapes de purification selon la pureté des plages sur des cellules BMAde1 (Si 100% des plages sont GFP positives après la première étape de purification, on passe aux prochaines étapes)
 - Plage sur des cellules BMAde1
 - Élution dans 1 mL de milieu
 - Première amplification
 - Deuxième amplification
 - Caractérisation des plages par immunobuvardage

- Amplification des stocks viraux

-200µL pour infecter 10^5 cellules BMAde1 (220-8)	10 ⁸ ufp
-500µL pour infecter 5×10^6 cellules BMAde1 (220-8)	5X10 ⁹ ufp
-1-3ml pour infecter 3×10^7 cellules BMAde1 (220-8)	3X10 ¹⁰ ufp

- Pré-stock

-10ml pour infecter 5×10^8 cellules 293S/50ml	5X10 ¹¹ ufp
-Test d'infectivité pour l'étape du stock	

- Stock*

-6 à 30ml pour infecter 6×10^9 cellules 293S/6L	6X10 ¹² ufp
--	------------------------

- Nous avons préféré arrêter la production à cette étape parce que nous avons assez de virus pour les études *in vivo*.

La partie production s'est effectuée de la manière suivante :

-La croissance et l'infection des cellules 293S en suspension ont commencé par l'inoculation d'un Erlenmeyer de culture avec $1-2 \times 10^5$ cellules/ml en phase de croissance exponentielle dans du milieu DM \bar{c} (sans calcium) en ajoutant 5% de cosmic calf serum (Hyclone, Logan, UT), 1% de pluronic F-68 (Life technologies, Burlington, ON) et 2mM final de glutamine.

-Lorsqu'on a atteint une densité cellulaire de $0,7 \times 10^6$ cellules/ml, les cellules ont été centrifugées (1K pour 20 min), le culot cellulaire a été resuspendu dans du milieu frais à une densité cellulaire de 1×10^7 . Les cellules ont été infectées avec une quantité de virus qui a été déterminée préalablement par un test d'infectivité.

-La suspension cellules/virus a été incubée durant 2 heures et diluée à une densité de $1,25 \times 10^6$ cellules/ml avec du milieu frais. Après 24 heures d'infection, 2 mM de glucose final a été additionné et le pH a été contrôlé par l'ajout de 7,5% de NaHCO $_3$ jusqu'à ce que la couleur du milieu de culture retourne au rouge (le milieu contient un indicateur rouge de phénol, rouge à pH 7,1 et jaune à 6,5).

-Après 40-48 heures d'infection, les cellules ont été centrifugées à 1 K pendant 30 minutes. Le culot de cellules a été resuspendu dans un volume de milieu à raison de 1×10^8 cellules/ml et congelé à -20°C .

3.5 Purification du virus

3.5.1 Passage sur chlorure de césium (CsCl)

Lorsqu'on a purifié le virus, le volume maximum dans lequel on a recueilli le virus était de 22ml pour 1×10^9 cellules pour pouvoir déposer dans un tube de nitrate de cellulose sur un gradient de CsCl. La purification s'est effectuée par deux passages sur gradient de CsCl. Le premier gradient était discontinu: 6ml de CsCl 1,2 a été déposé doucement sur la surface de 8 ml de CsCl 1,4 dans des tubes de nitrate de cellulose. On a déposé ensuite le 22ml de virus résultant de 1×10^9 cellules totales sur la surface du gradient. On a centrifugé dans une ultracentrifugeuse Beckman SW 28 à 23000 RPM durant 90 minutes à 4°C. La bande virale a été récoltée par une ponction avec une seringue/18G. Pour passer au gradient continu, il fallait diluer la bande 1:2 dans du TE pH 7,9 et avoir un volume maximal de 10ml pour déposer sur le gradient. Le gradient continu était un mélange de CsCl densité 1.2 et 1.4 allant du plus concentré au moins concentré. Ce gradient a nécessité l'utilisation d'un gradient « maker » pour être coulé. On a récolté la bande virale de la même façon que précédemment.

3.5.2 Dialyse du virus

On a fait préalablement bouillir les membranes de dialyse dans une solution 1mM EDTA et 2 % bicarbonate de sodium durant 10 minutes. Ensuite, on a remplacé le tampon par de l'eau distillée et on a fait bouillir pendant 30 minutes de plus. Le virus a été déposé dans plusieurs sacs à dialyse et ensuite on a laissé agiter dans le tampon à dialyse (10mM tris pH 7,9 + 1mM $MgCl_2$ filtré) pendant 1h30 à 2 heures. Le volume de tampon qui était nécessaire pour bien dialyser était de 100 fois le volume que l'on a dans les sacs. On a effectué un changement toutes les heures durant 4 à 5 heures. On a vérifié la présence de CsCl résiduel par réfractométrie. Au volume de virus, on a ajouté du tampon de congélation 5X (50mM Tris pH7,9 + 5mM

de MgCl_2 + 25% de sucrose filtré) et on a aliquoté en volume de 250 μl dans des tubes de congélation.

3.5.3 Calcul du titre viral par cytofluorométrie

On a préparé 1×10^6 cellules 293A/pétri 60mm. On a effectué les dilutions suivantes en triplicata : 30 μl de virus dans 3 ml de milieu, on a pris 30 μl de la dilution précédente dans 3 ml de milieu, on a pris 1ml de la dilution précédente dans 2 ml de milieu et ainsi de suite pour les autres dilutions (10^{-2} , 10^{-4} , 3×10^{-5} , 1×10^{-5} , 3×10^{-6} , 1×10^{-6} , 4×10^{-7}). Un volume de 1 ml de dilution a été déposé sur les cellules 293A. On a laissé les cellules balancées toute la nuit à 37°C. On a récolté les cellules par aspiration dans un tube de 1,5ml. Les cellules ont été centrifugées à 2500 RPM/5minutes, on a aspiré ensuite le surnageant et on a resuspendu dans 500 μl de PBS. Immédiatement, on a ajouté 500 μl de paraformaldéhyde 4% et on a incubé 30 minutes sur glace pour inactiver le virus sans perdre le signal GFP. Les cellules ont été centrifugées comme précédemment et le culot est resuspendu dans 1 ml de PBS. Les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur passage en cytométrie en flux (CMF) dans la même journée. On a déterminé le pourcentage de cellules qui exprimaient le gène reporteur (GFPq) a été évalué en CMF en utilisant un XL-MCL de Beckman-Coulter (Hialeah, Floride). Un laser Argon de 15mWatts excite la GFPq à 488 nm et recueille l'émission à l'aide d'un filtre passe-bande de 525nm.¹⁵ L'intensité de la fluorescence ainsi que le pourcentage de cellules vertes nous ont indiqué la concentration probable du virus.

3.6 Immunobuvardage de type Western

Un gel unidimensionnel de type sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) à 14% acrylamide a été utilisé pour séparer les extraits protéiques contenu dans le surnageant de 1×10^6 cellules 293 tTA en utilisant la base de montage Mini-Protean (Biorad Laboratories, Richmond, CA). La quantité de protéine dans le surnageant était difficile à doser à cause de la faible concentration en protéines dans le surnageant HSFM^r (milieu sans sérum et sans calcium), on dépose $22 \mu\text{l} + 7 \mu\text{l}$ de laemmli bleu 3X ($1,875 \times 10^{-3}$ mole 1M Tris-HCl pH 6,8 + 2% SDS + 30% glycérol + 0,01 mole β -mercaptoéthanol + H_2O + quelques grains de bleu de bromophénol) dans chaque puits. Le transfert a été effectué à 400mA sur une membrane de nitrocellulose Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Une fois le transfert complété, on a bloqué les sites non spécifiques avec une solution de TBS + 0,5% Tween 20 + 5% de lait écrémé en poudre (Nestlé, Don Mills, Ontario) en agitant une heure à la température de la pièce. L'incubation de la membrane dans le premier anticorps monoclonal anti-IL-6 de souris ou monoclonal anti-IL-10 de souris (ID Labs Inc., London, ON) a été faite pendant toute la nuit à 4°C dans du TBS-Tween (100mM Tris Cl pH 7.5 + 0,9% NaCl + 0,5% Tween 20) + 5% de lait en poudre à une dilution de 1/1000. On a fait une série de lavage (15, 5 et 5 minutes) dans le TBS-Tween. Le deuxième anticorps anti-IgG de rat (Oncogene Research Products, Cambridge, MA) couplé à la peroxidase a été utilisé à une concentration de 1/5000 et on a incubé 1 heure à la température de la pièce dans du TBS-Tween + 5% lait en poudre. La membrane a été lavée de nouveau et la détection s'est faite par chimioluminescence en utilisant le système ECL (Amersham pharmacia biotech, San Francisco, CA).

3.7 Test *in vivo* avec AdTR5K7/IL-6 et IL-10 GFPq sur des souris saines

3.7.1 Animaux

Les souris utilisées étaient des C57BL/6, femelles et stériles de 18 à 20 g (Charles River, Saint-Constant, Québec). Il a été remarqué que cette souche était plus sensible au *Saccharopolyspora Rectivirgula* ce qui donne un bon modèle d'alvéolite allergique extrinsèque chez la souris. Les animaux ont été placés dans des cages avec filtres HEPA et ont été gardés dans une hotte à flux laminaire placée dans un local à accès limité pour isoler les souris infectées par l'adénovirus afin d'éviter d'infecter les autres animaux. Les instillations des souris avec l'adénovirus et les sacrifices des souris infectées ont été effectués sous une hotte à flux laminaire de niveau deux.

3.7.2 Colorations différentielles

Une coloration différentielle a été utilisée comme indicatif, en plus des comptes des cellules totales, pour contrôler la reproductibilité de notre modèle animal. Pour la coloration différentielle, 150 000 à 200 000 cellules ont été utilisées selon la technique de microscope glass cover décrit par Laviolette et al.⁵⁵ Une lamelle de verre ronde de 12 mm (Fisher Scientific Co., Donmills, ON) a été déposée au fond d'un tube à cyto centrifugation. On a déposé les cellules dans le tube avec 3 ml de saline puis on a centrifugé 10 minutes à 1200RPM à 4°C. Ensuite, la lamelle a été récupérée et séchée à l'air libre, les cellules vers le haut. Le montage a été réalisé sur une lame de microscope avec une goutte d'Eukitt (O. Kinder, Freiburg, FRG.) et les lames furent laissées à sécher de 12 à 24 heures avant de faire les colorations différentielles avec le kit Diff-Quick (Baxter Diagnostics Corporation, McGaw Park, IL). Cette coloration permettait de différencier les macrophages, les lymphocytes et

les neutrophiles. Les comptes différentiels furent faits à un grossissement 1000X en microscopie optique en comptant 3 fois 100 cellules en se déplaçant sur la lame.

3.7.3 Index pulmonaire

On a prélevé les poumons non lavés du groupe de souris stériles. On a pesé la souris avant de faire la chirurgie pour récolter le poumon et le peser. On a fait la moyenne du rapport poids du poumon/poids de la souris pour le groupe de souris saline. On a fait la même chose pour chacune des souris et on fait le rapport selon l'équation suivante :

Poids du poumon/poids de la souris (souris à tester)

Poids du poumon/poids de la souris (souris contrôle)

3.7.5 ELISA

La détection et la quantification des protéines IL-6 et IL-10 s'effectuent par des ELISAs commerciaux. Le format le plus commun de l'ELISA est le double anticorps (sandwich), représenté à la figure 5, qui consiste en un anticorps primaire attaché au fond de la plaque à 96 puits et le second anticorps qui est conjugué à une enzyme pour la détection. Le second anticorps se lie aux molécules de l'échantillon qui ont déjà été capturées par le premier anticorps. On mesure la quantité de molécules détectées par un essai enzymatique traditionnel.

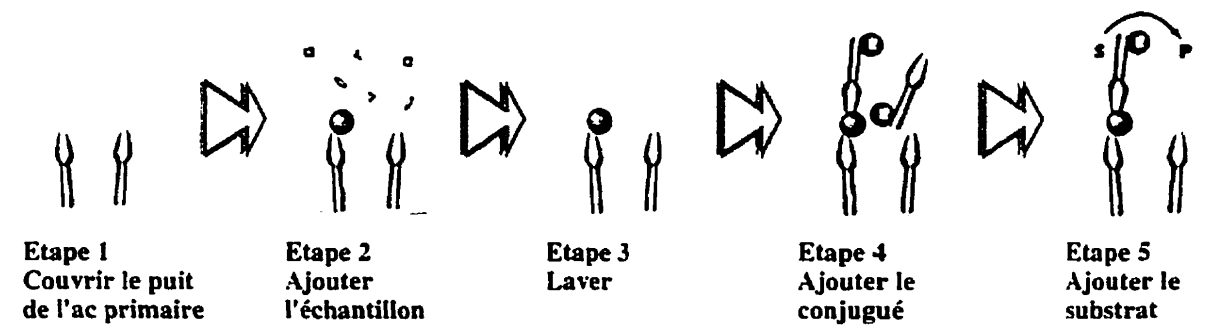


Figure 5 Principe de l'ELISA

Le premier anticorps est attaché au fond des puits, ensuite on y dépose l'échantillon. On effectue plusieurs lavages successifs pour enlever les molécules qui ne sont pas attachées par le premier anticorps. On ajoute le second anticorps qui est couplé à un enzyme de détection. On ajoute finalement le substrat qui est coupé par l'enzyme et qui colore le milieu. On mesure ensuite la densité optique à 590nm.

3.7.5 Réaction inflammatoire de différentes doses d'AdTR5K7/IL6 GFPq sur les souris C57BL/6

Cette expérience nous a permis de déterminer la réaction inflammatoire provoquée par une quantité maximale d'adénovirus ne produisant pas de cytokine. On voulait aussi voir la quantité de cytokines maximales produite par différentes concentrations de virus et ainsi choisir la quantité d'adénovirus à instiller pour les prochaines expériences.

Pour ce faire, on a utilisé 35 souris qui furent divisées en 8 groupes. Le tableau 5 nous démontre la division de ces groupes et les virus administrés. Les souris ont toutes été instillées dans un même laps de temps d'une dose unique et le sacrifice et le lavage bronchoalvéolaire furent effectués 10 jours après.

Tableau 5

Groupes de souris pour différentes doses d'AdTR5FK7/IL-6 et IL-10 GFPq induit avec AdCMVtTA

Groupes	Quantité de souris	Quantité de AdCMVtTA	Quantité de AdTR5F /IL-6 K7 GFPq	Quantité de AdTR5F/IL-10 K7 GFPq
Saline	4	–	–	–
Contrôle tTA	5	$1,8 \times 10^{10}$	–	–
1×10^8 ufp IL-6	4	1×10^8 ufp	1×10^8 ufp	–
5×10^8 ufp IL-6	4	5×10^8 ufp	5×10^8 ufp	–
1×10^9 ufp IL-6	5	1×10^9 ufp	1×10^9 ufp	–
1×10^8 ufp IL-10	4	1×10^8 ufp	–	1×10^8 ufp
5×10^8 ufp IL-10	4	5×10^8 ufp	–	5×10^8 ufp
1×10^9 ufp IL-10	5	1×10^9 ufp	–	1×10^9 ufp

3.7.6 Détermination du rapport AdCMV tTA vs AdTR5K7/IL-6 *in vivo* pour avoir une production de cytokine maximale.

Pour ce faire, on a utilisé 31 souris qui furent divisées en 6 groupes. Le tableau 6 nous démontre la division de ces groupes et la quantité de virus instillée. Les groupes sont exprimés en nombre de ufp c'est à dire que 0.5/1 exprime 1 ufp de tTA pour 2 ufp d'IL-6. Les souris ont toutes été instillées dans un même laps de temps avec une dose unique et le sacrifice et le lavage bronchoalvéolaire furent effectués 10 jours après.

Tableau 6
Groupes de souris pour la détermination du rapport AdCMVtTA vs
AdTR5FK7/IL-6 GFPq

Groupes	Quantité de souris	Quantité de AdCMVtTA	Quantité de AdTR5F K7/IL-6 GFPq
Saline	3	–	–
0,5/1	5	$2,5 \times 10^8$	5×10^8 ufp
1/1	5	5×10^8 ufp	5×10^8 ufp
1,5/1	6	$7,5 \times 10^8$ ufp	5×10^8 ufp
2,5/1	6	$12,5 \times 10^8$ ufp	5×10^8 ufp
5/1	6	25×10^8 ufp	5×10^8 ufp

3.7.7 Variation de la production de cytokines en fonction du temps

On a utilisé 24 souris instillées avec AdTR5F/IL6 (5×10^8 ufp) + AdCMVtTA ($12,5 \times 10^8$). On a divisé le nombre de souris en 4 groupes (6 souris/groupe). Les sacrifices ont été effectués aux jours 2, 4, 10 et 16. On a effectué un LBA. Un compte cellulaire fut effectué ainsi qu'une différenciation cellulaire et un ELISA Quantikine M murine (R&D Systems, Minneapolis, USA) pour mesurer la quantité d'IL-6 et IL-10.

3.8 Effet de la production de cytokines inflammatoires dans un modèle d'AAE

3.8.1 Animaux

Les 120 souris furent divisées en 8 groupes (15 souris/groupe) comme indiqué dans le tableau 7.

Tableau 7

Groupes de souris pour l'expérience avec le modèle AAE

Groupes	Modèle souris saline ou SR	Quantité de AdCMVtTA (ufp)	Quantité de AdTR5F/IL-6 K7 GFPq (ufp)	Quantité de AdTR5F/IL-10 K7 GFPq (ufp)
Saline	saline	-	-	-
Salin tTA	saline	17,5 X 10 ⁸	-	-
Salin tTA + IL-6	saline	12,5 X 10 ⁸	5 X 10 ⁸	-
Salin tTA + IL-10	saline	12,5 X 10 ⁸	-	5 X 10 ⁸
SR	SR	-	-	-
SR tTA	SR	17,5 X 10 ⁸	-	-
SR tTA + IL-6	SR	12,5 X 10 ⁸	5 X 10 ⁸	-
SR tTA + IL-10	SR	12,5 X 10 ⁸	-	5 X 10 ⁸

3.8.2 Calendrier des instillations

Voici le calendrier des instillations intranasales au tableau 8 qui a été utilisé pour l'établissement du modèle murin d'AAE.

Tableau 8
Calendrier des instillations

Groupes de souris	Semaines								
	Lun	Mer	Ven	Lun	Mer	Ven	Lun	Mer	Ven
Saline	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Saline + tTA	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Saline + tTA + IL-6	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Saline+ tTA + IL-10	●	●	●	●	●	●	●	●	●
SR	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SR + tTA	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SR + tTA + IL-6	■	■	■	■	■	■	■	■	■
SR + tTA + IL-10	■	■	■	■	■	■	■	■	■

○ Saline □ SR

*Lors de la semaine deux et trois, les groupes avec virus reçoivent une dose unique de virus lors de la dernière instillation de saline ou de SR de la semaine 2 et de la semaine 3.

Les souris ont donc reçu, selon le calendrier et selon le groupe, 50µL de saline physiologique (0,9% NaCl), 50 µl de SR (5mg/ml), trois fois par semaine durant trois semaines par voie intranasale. Certains groupes ont reçu une dose de virus de 50µL, une fois à la fin de la deuxième et de la troisième semaine. Le 50µL était composé du volume de virus dilué dans la saline. Pour l'instillation, les souris étaient anesthésiées avec de l'isofurane.

3.9 Analyses statistiques

Les expériences préliminaires avec des souris normales ont été analysées par une analyse de variance à un facteur pour effectuer une comparaison entre les groupes. Le p utilisé était $p < 0,05$. Alors, que ce soit pour la quantité de cellules présentes ou pour la quantité de protéines, on a effectué ces comparaisons entre les groupes avec une représentation graphique par la méthode de comparaison de Scheffé. L'analyse statistique concernant l'AAE est une analyse de comparaison entre les différents groupes soient : groupe contrôle de saline, un groupe SR, un groupe saline + AdCMVtTA, un groupe saline + AdCMVtTA + AdTR5FK7//IL-6 GFPq, un groupe saline + AdCMVtTA + AdTR5FK7//IL-10 GFPq, un groupe SR + AdCMVtTA, un groupe SR + AdCMVtTA + AdTR5FK7//IL-6 GFPq, un groupe SR + AdCMVtTA + AdTR5FK7//IL-10 GFPq. Le test choisi pour faire la différence statistique entre les groupes est le test de Scheffé. On différencie les groupes par un système de lettre. Les groupes qui sont statistiquement semblables vont se voir attribuer une lettre semblable A et A) tandis que les groupes qui sont statistiquement différents vont avoir des lettres différentes (A et B). Tous les tests statistique ont été effectué par Serge Simard (Hôpital Laval).

4.0 Résultats

4.1 Obtention des ADNc de l'IL-6 et IL-10

On a généré nos propres ADNc par soucis d'apprentissage. En effet, nous aurions pu obtenir les ADNc par Dr. Graham de l'Université McMasters à Hamilton mais nous voulions maîtriser les techniques de RT-PCR et PCR avant de commencer la construction des vecteurs viraux.

On a obtenu 1,2 millions de macrophages des 25 souris SR que l'on a sacrifiées. On a utilisé des souris SR parce que, le système immunitaire étant activé, la quantité de cellules immunitaires est augmentée de façon significative. On a stimulé les macrophages par LPS et on a lysé les cellules pour obtenir l'ARN total. A partir de cet ARN, on a obtenu notre ADNc par RT-PCR et les ADNc spécifiques que l'on voulait par PCR.

Les résultats de ces PCR nous démontrent la présence de fragments amplifiés par PCR. La figure 6 nous indique qu'on a obtenu les bonnes grosseurs de fragments. En effet, la bande pour l'IL-6 semble posséder le bon nombre de paires de bases (666) et de même pour l'IL-10 (722) lorsque l'on compare avec l'échelle de poids moléculaire. Étant donné qu'il n'y a aucune autre bande et qu'on a obtenu ce que l'on attendait, on peut soutenir qu'on a bien réussi à amplifier les fragments voulus.

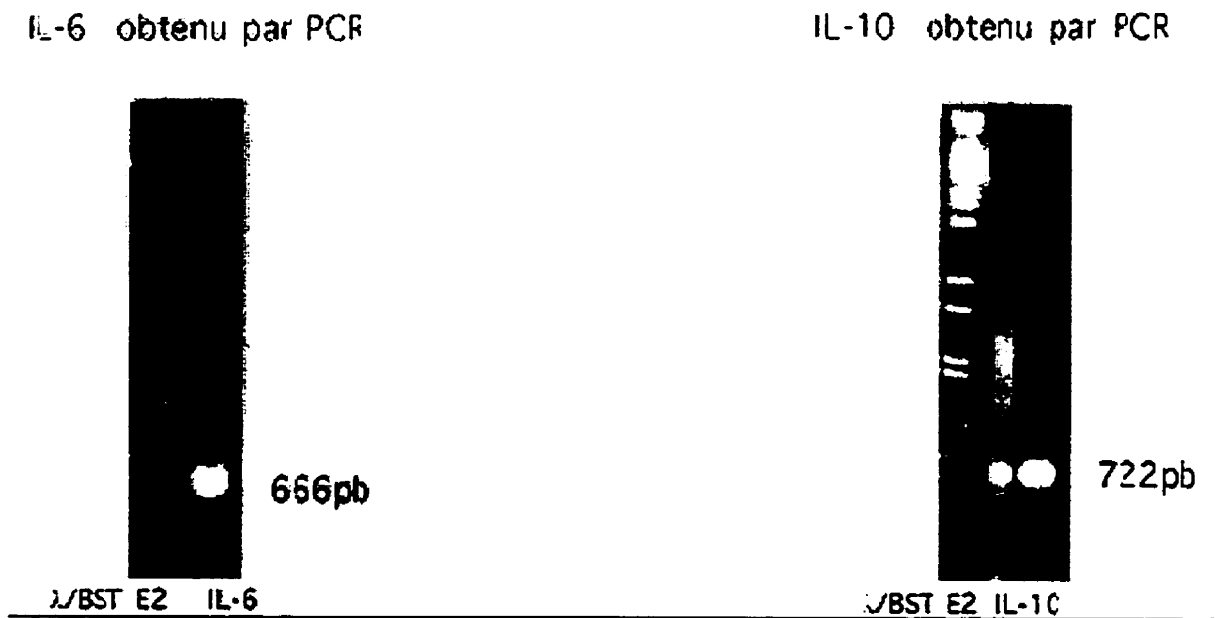


Figure 6 Longueur des fragments d'ADNc IL-6 et IL-10 amplifiés par PCR.

10 μ l de produit PCR a été déposé sur un gel d'agarose 0,8%. La migration a été effectuée à 80 volt durant 2 heures. La partie droite de la photographie nous montre l'ADNc amplifié par PCR de l'IL-6 (666 pb tel qu'attendu) et la partie gauche nous montre l'ADNc amplifié par PCR pour l'IL-10 (722 pb tel qu'attendu). La photographie a été prise par fluorimager.

4.2 Construction d'adénovirus recombinants exprimant l'IL-6 et l'IL-10

4.2.1 Clonage des ADNc dans le vecteur de transfert

Le pAdTR5F-K7-GFPq est un vecteur de transfert adénovirus pour l'insertion de l'ADNc dans la région E1. Il contient une cassette d'expression inductible pour l'insertion du gène à exprimer et une deuxième cassette exprimant la GFPq pour faciliter la sélection des recombinants. Donc, le gène de l'IL-6 ou de l'IL-10 vont être sous le contrôle du promoteur TR5 (Tétracycline Regulatable) inductible par un transactivateur (tTA) régulable par la tétracycline. Le transactivateur tTA peut stimuler la transcription du promoteur contenant la séquence du gène de résistance à la tétracycline (tetO). La présence de tétracycline dans le milieu à des concentrations non toxiques pour des cellules eucaryotes interagit avec le tetO et empêche la transcription du promoteur. La GFP est sous le contrôle du promoteur constitutif CMV. C'est une protéine qui émet une lumière verte lorsqu'elle est exposée à la lumière bleue. Elle peut être vue à l'aide d'un microscope à fluorescence dans les cellules vivantes ou dans des tissus fixés.^{67,14} En effet, l'intégration du gène reporteur dans le vecteur, nous permet de détecter la présence de l'accumulation de la protéine verte dans les cellules. Ce gène reporteur est très utile lors de la construction, de la purification et de la titration des vecteurs viraux étant donné que l'on peut suivre le pourcentage de cellules infectées par microscope à fluorescence. Ce même gène est aussi utilisé pour suivre la dissémination dans les tissus lors d'expériences *in vivo*. Cette protéine s'avère être un atout important lorsque l'on veut suivre le vecteur viral. La GFPq permet de voir les plages de lyse au microscope à fluorescence. Ainsi, on peut suivre l'infection de façon *in vitro* lorsqu'on transfecte des cellules ou amplifie les virus. Le plasmide possède le gène de l'ampicilline pour permettre de sélectionner les clones positifs dans *E. coli*. Le vecteur de transfert possède des parties de l'ADN de l'Ad afin de permettre la recombinaison homologue entre le vecteur de transfert et l'ADN de l'Ad. La figure 7 est une représentation

graphique des vecteurs de transferts pAdTR5F-K7-GFPq contenant respectivement les ADNc pour l'IL-6 et l'IL-10.

La façon de déterminer les bons clones est par digestion enzymatique du vecteur de transfert et de l'insert. Les clones positifs (figure 8a) du vecteur pAdTR5F/IL-6 devait être coupé par Xmn1 en deux endroits et ainsi créer 2 fragments, l'un de 2763 kDa et l'autre de 6052 kDa pour la bonne orientation ou bien deux autres fragments l'un de 3298 kDa et l'autre de 5517 kDa pour la mauvaise orientation de l'insert. On observe des fragments dans la bonne orientation (fragments de 2763 et 6052kDa) au clone qui se retrouve au puit no.13. On a donc un plasmide qui a inséré l'ADNc de l'IL-6. En comparant le clone positif coupé par Xmn1 avec les autres clones, on constate qu'ils n'ont pas inséré l'ADNc de IL-6 étant donné qu'ils ont seulement été linéarisés. Apparemment, aucun vecteur de transfert n'a inséré l'ADNc dans la mauvaise orientation.

Les clones positifs (figure 8b) du vecteur pAdTR5F/IL-10 ont eux aussi été coupé par Xmn1 en deux endroits. Ceci a permis de créer 2 fragments, l'un de 3247 kDa et l'autre de 5606 kDa pour la bonne orientation de l'insert ou deux autres fragments, l'un de 2852 kDa et l'autre de 6001 kDa pour la mauvaise orientation de l'insert. On observe les deux cas, c'est à dire un insert dans la mauvaise orientation au clone que l'on retrouve au puits no.5 et la bonne orientation au puits no.7. On a donc un plasmide qui a inséré l'ADNc de l'IL-10 dans la bonne orientation.

On a confirmé l'orientation ainsi que la séquence des clones positifs AdTR5F/IL-6 et IL-10 par séquençage afin de prouver qu'il y avait bien 100% homologie entre la séquence amplifiée par PCR et la séquence originale. On pourra retrouver les résultats du séquençage de l'IL-6 et de l'IL-10 à l'annexe A.

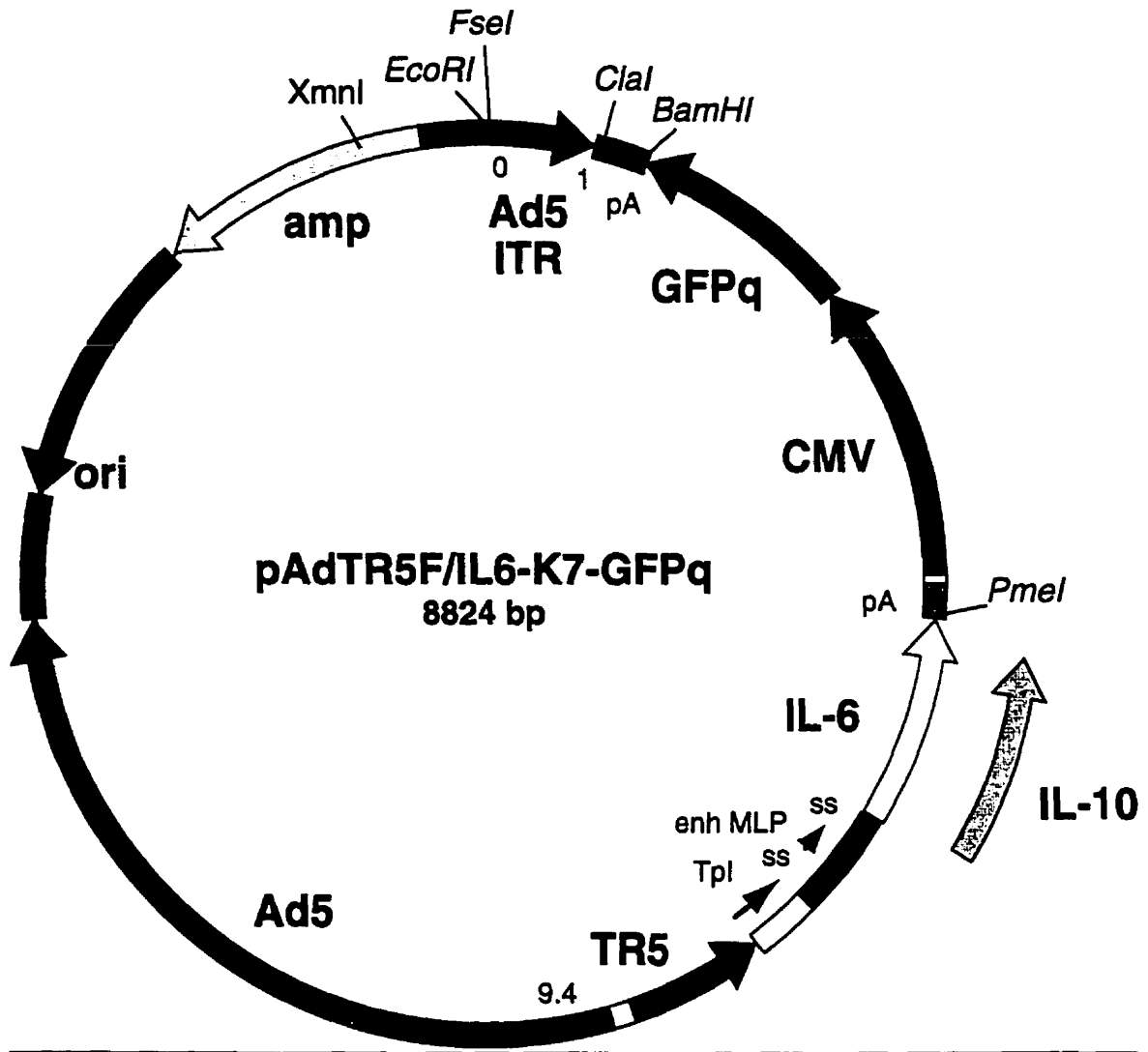


Figure 7 Schéma des plasmides pAdTR5F/IL-6 et IL-10-K7-GFPq

Les éléments présents dans ce vecteur ont déjà été décrit en détail dans Massie et al 1998.⁶³ Les nombres inscrits dans le vecteur réfère à la position du génome de l'Ad5 en M.U. (maps units). Les segments entre 0-1 et 9,4-15,5 M.U. sont des portions subgénomiques de l'Ad qui sont impliquées dans la recombinaison homologue pour générer des Ad recombinants. La cassette d'expression est constituée de 2 parties: la première est constituée de la GFPq sous le contrôle d'un promoteur CMV constitutif et l'autre partie est constituée du promoteur inducible régulé par la tétracycline. Le gène de l'IL-6 et 10 a été inséré sous le contrôle du promoteur inducible. Tpl: "Tripartite leader", SS: "Slicing signal", MLP: "Major late promoteur"

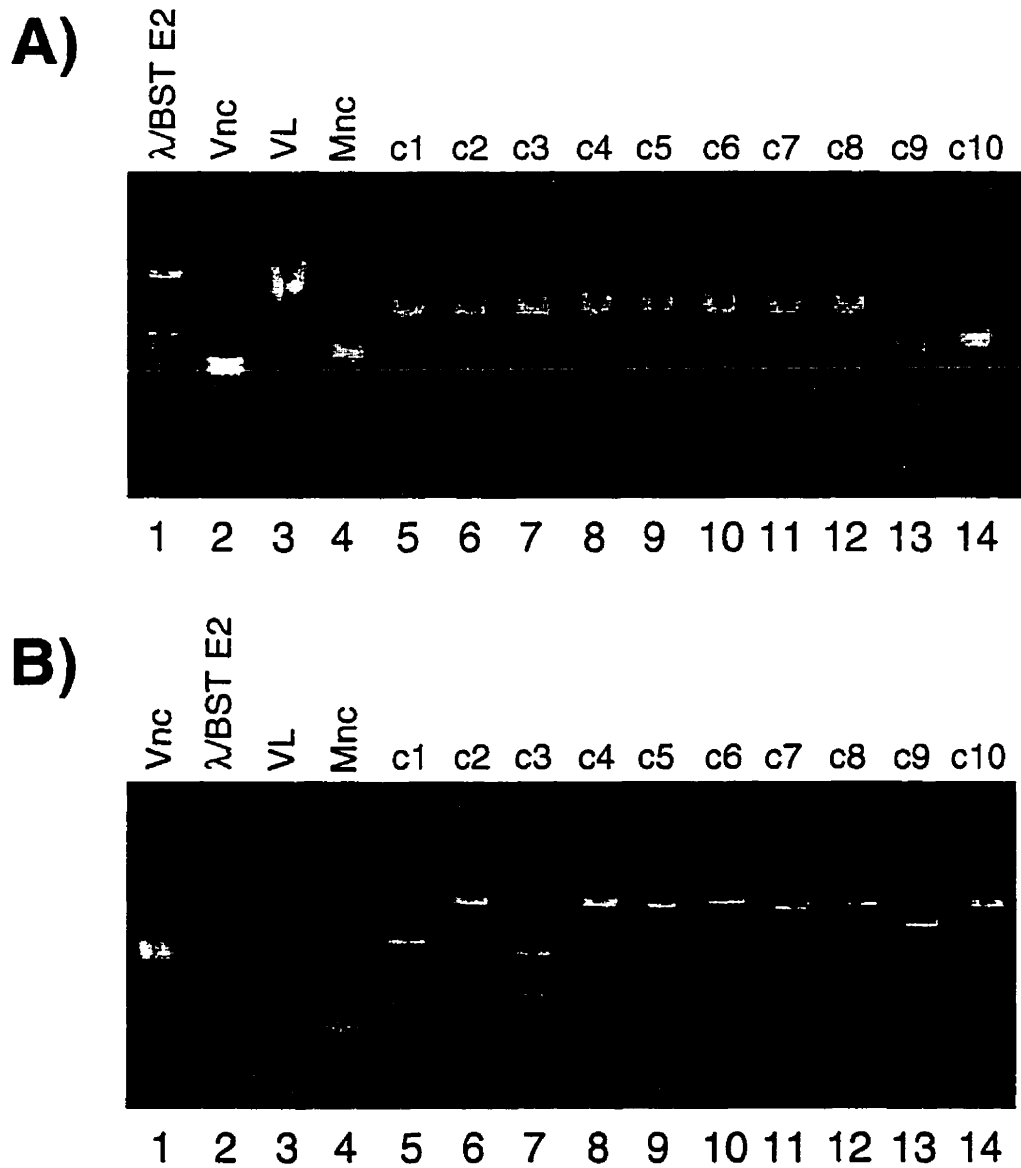


Figure 8 Patron de digestion des clones obtenus pour a) AdTR5F/IL-6 et b) AdTR5F/IL-10 par l'enzyme Xmn1. Vnc: vecteur non coupé, VL: vecteur linéarisé, Mnc: clone non coupé, c1 à c10 sont les clones no 1 à 10 et λ BST E2 est une échelle de poids moléculaire. A) Le Vnc à un poids de 8158 kDa. On a obtenu un clone positif en c9 B) Le Vnc à un poids de 8158 kDa. On a obtenu un clone positif en c1 et en c3

4.2.2 Transfection

Détection de plages vertes à différentes étapes de la production virale.

Une fois la construction du vecteur terminée, on est passé à l'étape de la transfection sur des cellules 293A. L'efficacité de la transfection a été d'environ 70% de cellules transfectées pour les deux constructions. Normalement, on effectue une transfection transitoire c'est-à-dire une transfection sans l'ADN viral. Cette transfection est un test pour vérifier s'il y a bel et bien production de protéine avant de passer à l'étape de la construction des virus. On n'a pas fait de transfection transitoire parce que notre immunobuvardage n'était pas encore au point. On a préféré ne pas perdre de temps et commencer la construction des virus sans attendre. De plus, la GFPq présente dans notre vecteur, nous permet de suivre les recombinants et d'éliminer les virus révertants sans avoir préalablement testé ceux-ci.

Lors de la première étape de purification, on a purifié 6 plages GFPq positives pour chaque construction. La GFPq donne l'indication que la plage choisie est un recombinant voulu. Nous avons toujours obtenu le même genre de résultats que ce qui apparaît à la figure 9 pour toutes les étapes de purification et d'amplification. Il y a toujours eu visualisation des infections par microscopie à fluorescence grâce à la GFPq et ensuite il y avait vérification de la présence de protéines par des immunobuvardages que l'on présente plus loin.

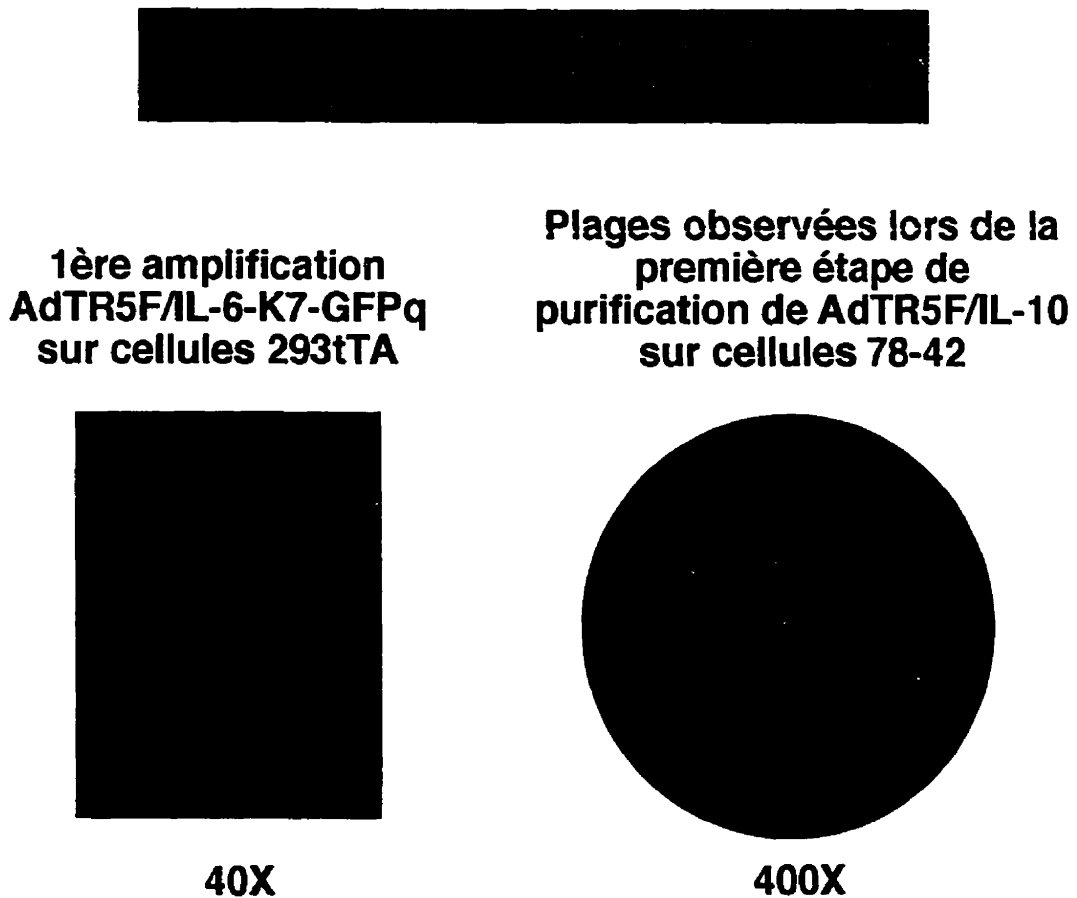


Figure 9 Visualisation de la GFPq par la microscopie à fluorescence.

La figure de gauche est la visualisation de cellules 293tTA infectées par AdTR5F/IL-6-K7-GFPq provenant de la première amplification sur 1×10^6 cellules 293A. La figure de droite représente des plages observées lors de la première étape de purification de AdTR5F/IL-10-K7-GFPq sur des cellules 78-42 à la dilution 10^{-3} .

4.2.3 Détection de la production de l'IL-6 et IL-10 *in vitro*.

Il est très important de détecter la présence de la protéine voulue pour ne pas amplifier un clone qui produit peu ou pas du tout. En effet, on doit non seulement vérifier la présence mais aussi la quantité de protéine produite.

Lors des étapes de purification, on se doit de sélectionner les clones les plus forts. En principe, les clones sont homogènes génétiquement à moins qu'il n'y ait un réarrangement ou autres mutations du genre. On choisit les plus forts parce qu'ils sont plus purs au départ. L'étape de purification sera donc moins longue dans ces conditions. Les figures 10a et 10b sont deux immunobuvardages que l'on a effectué sur des clones obtenus lors de la première étape de purification. On observe que tous les clones d'IL-10 (figure 10a) produisent l'interleukine avec sensiblement la même intensité. La bande au niveau 16 kb est preuve que l'on a obtenu IL-10 dans chacun des 4 clones étudiés. Par contre, la situation est différente pour l'IL-6 (figure 10b) car sur les 4 clones testés seulement deux produisent la protéine et un seul semble produire la protéine avec un fort niveau. On a analysé la provenance des clones non productifs et on s'est rendu compte qu'ils provenaient tous de la même plage isolée de la transfection initiale. On a donc amplifié les clones 17 et 21 pour l'IL-10 et 6 et 12 pour l'IL-6.

On présente ici un deuxième western pour confirmer la présence des protéines souhaitées avant la production des stock viraux. Le western présenté à la figure 11 nous permet de confirmer la production de protéine IL-6 par le préstock de virus AdTR5F/IL-6 et de protéine IL-10 par le préstock de virus AdTR5F/IL-10 par rapport aux deux contrôles positifs qui sont des recombinants des protéines voulues. L'IL-6 et l'IL-10 sont des protéines glycosylées. La façon de glycosyler l'IL-6 dans les cellules 293 diffère du contrôle qui lui est glycosylé dans des cellules d'insectes. Le recombinant contrôle a été produit dans un vecteur d'expression de baculovirus et a

été exprimé dans des cellules d'insectes. Les cellules d'insectes glycolysent les protéines de différentes façons. L'IL-10 que nous avons produit se présente sous deux formes différentes : glycosylée et non-glycosylée. La bande non-glycosylée co-migre avec le contrôle positif qui a été produit dans une souche de E.coli. Les bandes observées ont le bon poids moléculaire, c'est à dire 18 kDa pour IL-10 et 23 kDa pour IL-6.

4.2.4 Glycosylation de la protéine IL-10

Comme on a pu observer plus haut, les protéines produites par nos clones IL-10 étaient légèrement différentes du contrôle positif. C'est pour cette raison que nous avons infecté différentes lignées cellulaires avec notre clone AdTR5F/IL-10. La glycosylation est dépendante de la lignée cellulaire, du tissu spécifique et de l'espèce. On voulait donc vérifier la possibilité que notre protéine IL-10 soit glycosylée.

On observe que chaque lignée a une façon différente de glycosyler la protéine recombinante (figure 12). On voit trois bandes pour les cellules HelartTA et pour kbrtTA et seulement deux bandes pour les cellules 293rtTA. Les bandes ont une taille de 17, 19 et 21 kDa ce qui est fidèle à la littérature.⁶⁵ Le contrôle positif est un recombinant commercial non glycosylé.

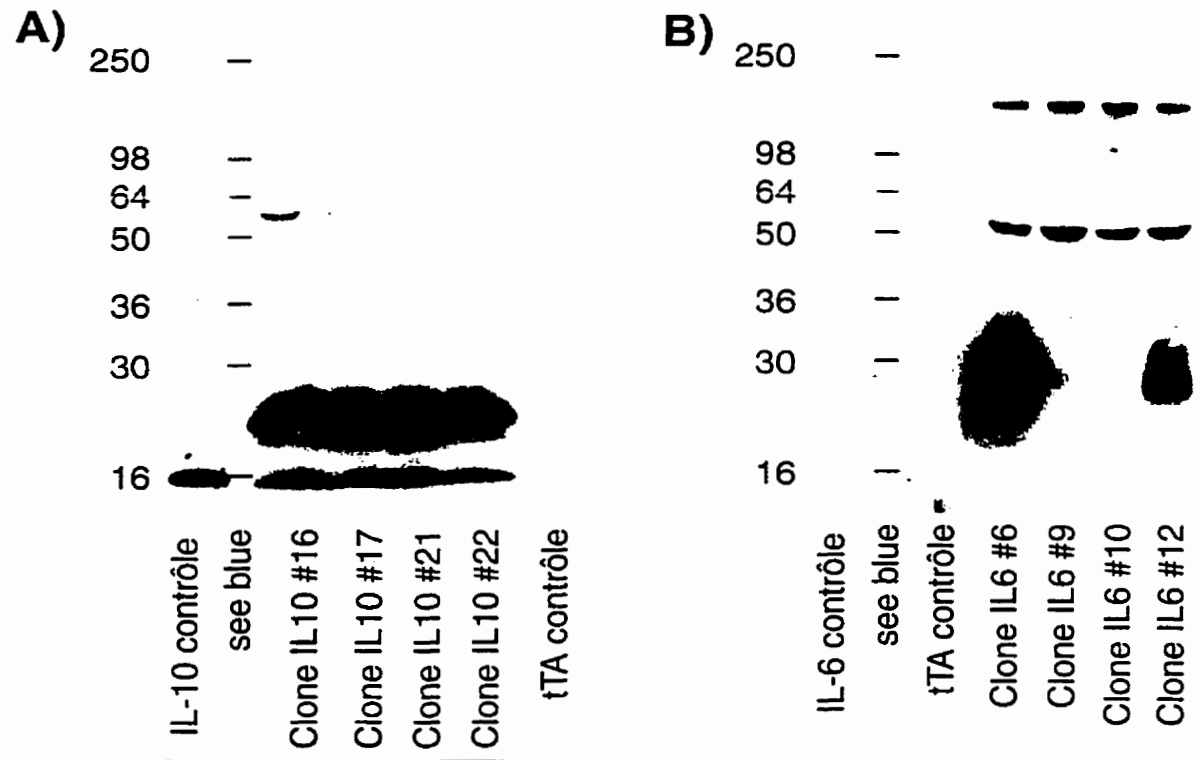


Figure 10 Western sur le surnageant de 1×10^6 cellules 293 rtTA lors de la deuxième amplification de la première étape de purification.

On a utilisé un anticorps monoclonal anti-IL-6 et un anticorps monoclonal anti-IL-10 de souris comme premier anticorps et l'anticorps monoclonal anti-IgG comme second anticorps pour la détection de la production des cytokines IL-6 et IL-10. On a utilisé le système ECL pour révéler la protéine. A) Puits 1 et 7 sont des contrôles positif (IL-10) et négatif (cellules tTA non infectées), puits 2 est une échelle de poids moléculaire, les puits 3 à 6 sont les clones 16, 17, 21 et 22. B) Puits 1 et 3 sont des contrôles positif (IL-6) et négatif (cellules tTA non infectées), puits 2 est une échelle de poids moléculaire, les puits 4 à 7 sont les clones 6, 9, 10 et 12. IL-6 contrôle n'est pas visible sur cette exposition. Tous les clones IL-10 sont positifs mais seulement 2 clones sont positifs pour l'IL-6.

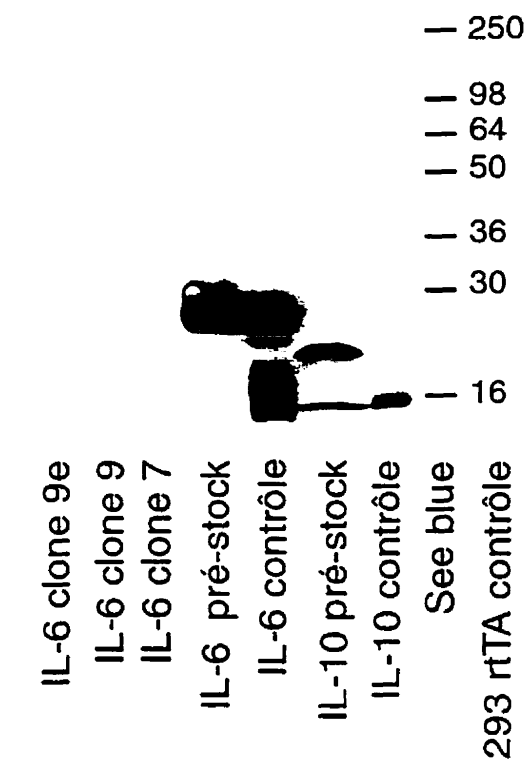


Figure 11 Western sur le surnageant de 1×10^6 cellules 293rtTA pour la vérification de la production de protéines des préstocks de AdTR5F/IL-6 et AdTR5F/IL-10.

Un maximum de surnageant (concentré 10X) provenant de 1×10^6 cellules 293rtTA infectées avec AdTR5F/IL-6 K7 GFPq à une MOI de 100 (puits 4) ou avec AdTR5F/IL-10 K7 GFPq (puits 6). Puits 5, 7 et 9 sont des contrôles IL-6 (25 μ g), IL-10 (50 μ g) et des cellules 293 rtTA non-infectées. Le puits 8 est un marqueur de poids moléculaire "see blue". Les puits 1 à 3 sont des clones IL-6 #9e, 9 et 7. On a utilisé un anticorps monoclonal anti-IL-6 et un anticorps monoclonal anti-IL-10 de souris comme premier anticorps et l'anticorps monoclonal anti-IgG comme second anticorps pour la détection de la production des cytokines IL-6 et IL-10 avec le système ECL. On observe que certains clones IL-6 ne produisent pas la protéine.

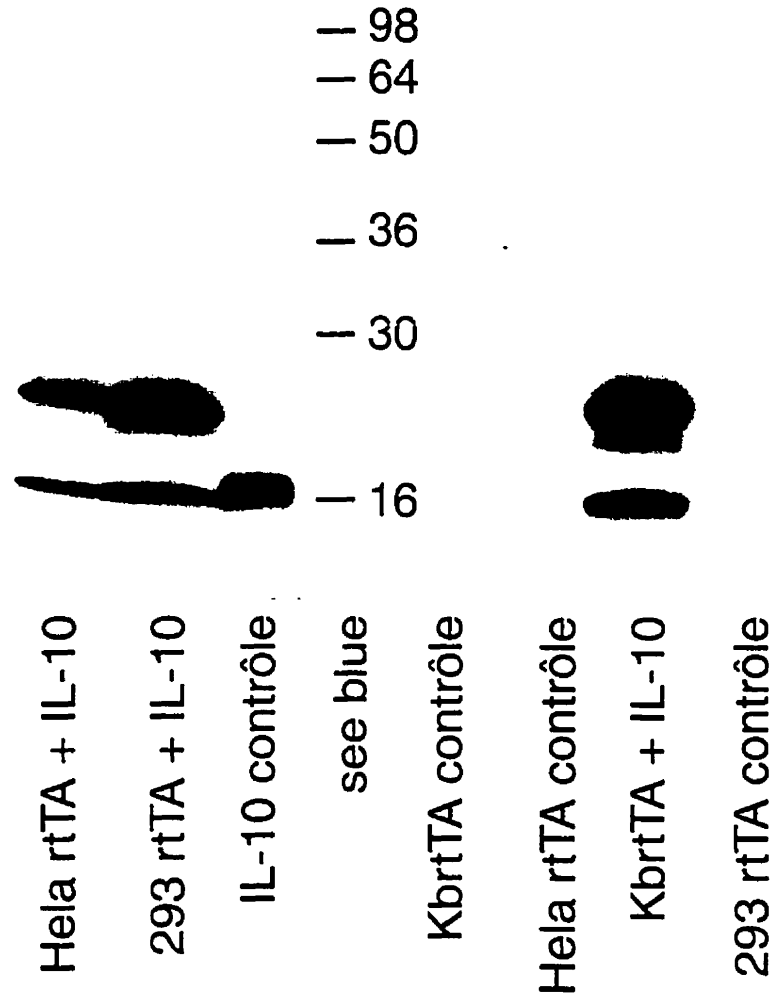


Figure 12 Western des surnageants de 1×10^6 cellules KBrTtA, HeLa rtTA, 293rtTA afin de vérifier la différence de glycosylation de la protéine de IL-10.

Tous les groupes sont des infections à partir du virus AdTR5F/IL-10 préstock sur 1×10^6 de différents types cellulaires tels que HeLa rtTA, 293rtTA et KBrTtA. On a infecté les HeLa rtTA et les KBrTtA avec une MOI de 1000 et un MOI de 10 pour les 293rtTA. Le contrôle positif est un recombinant IL-10 commercial de souris. Les contrôles négatifs sont des surnageants des types cellulaires non infectés. On a utilisé un anticorps monoclonal anti-IL-10 de souris comme premier anticorps et l'anticorps monoclonal anti-IgG comme second anticorps pour la détection de la production de la cytokine IL-10. On a utilisé le système ECL pour révéler le film. L'IL-10 est glycosylé de différentes façon selon le type cellulaire.

4.2.5 Titres viraux

On a procédé à plusieurs étapes de purification et d'amplification pour finalement avoir un stock viral préparé sur 6×10^9 cellules 293S. Les titres viraux des stocks des virus AdCMVtTA, AdTR5F/IL-6 et IL-10 k7GFPq sont présentés au tableau 9.

Tableau 9
Données sur le nombre de particules totales VS le nombre de particules infectieuses de différents virus

Virus	Volume final (ml)	Particules totales/ml	Particules infectieuses/ml
AdTR5F/IL-6-K7-GFPq	21	$8,1 \times 10^{11}$	$1,65 \times 10^{11}$
AdTR5F/IL-10-K7-GFPq	16	$1,82 \times 10^{12}$	$2,1 \times 10^{11}$
AdCMVtTA	18	$5,3 \times 10^{12}$	$5,3 \times 10^{11}$

Les deux premiers virus ont été titrés par FACs et quantifié par le logiciel excel (annexe B) tandis que le titre de AdCMVtTA a été déterminé seulement par la prise de la densité optique pour le nombre de particules totales/ml. On a considéré que seulement 10% des particules totales étaient infectieuses.

Voici l'équation qui a servi pour déterminer le nombre de particules totales/ml à partir de la densité optique.

$$\text{Densité optique} \times \text{facteur de dilution} \times \text{constante} (5 \times 10^{11}) = \text{ufp/ml}$$

4.3 Expérience *in vitro* pour déterminer le ratio tTA vs IL-6 ou IL-10

On a fait cette expérience afin de démontrer la quantité de AdCMVtTA nécessaire à l'induction du vecteur inductible AdTR5F-IL-6 et IL-10. On a infecté des cellules Kb avec différentes proportions de AdCMVtTA par rapport à la quantité de AdTR5 (1×10^9) administrée. On a aussi infecté les cellules KbrtTA avec la même quantité de AdTR5. Les cellules KbrtTA nous servent de contrôle. En effet, on a pu comparer la quantité de protéines produite par les KbrtTA et les KB. Ceci nous a permis d'évaluer la concentration de AdCMVtTA qu'il fallait utiliser pour se rapprocher le plus de la quantité de protéines produites par les KbrtTA.

On observe à la figure 13 (a) et (b) que l'efficacité de production est atteinte et semble faire un plateau lorsqu'on atteint le rapport de 1 pour 1. C'est à dire qu'il y a une particule de AdCMVtTA pour activer une particule d'AdTR5. Les deux graphiques donnent l'allure d'une cloche. On peut produire des quantités similaires d'IL-6 et d'IL-10 dans les cellules KB co-infecté avec AdCMVtTA comparé aux niveaux d'expression de protéines obtenus dans les cellules KbrtTA. Le ratio optimal pour la co-infection est d'une MOI de 1/1. On observe une petite diminution d'induction avec un ration de 2 :1. On a donc travaillé avec une MOI de 1 :1 dans les expériences suivantes pour ne pas instiller trop de particules virales aux animaux.

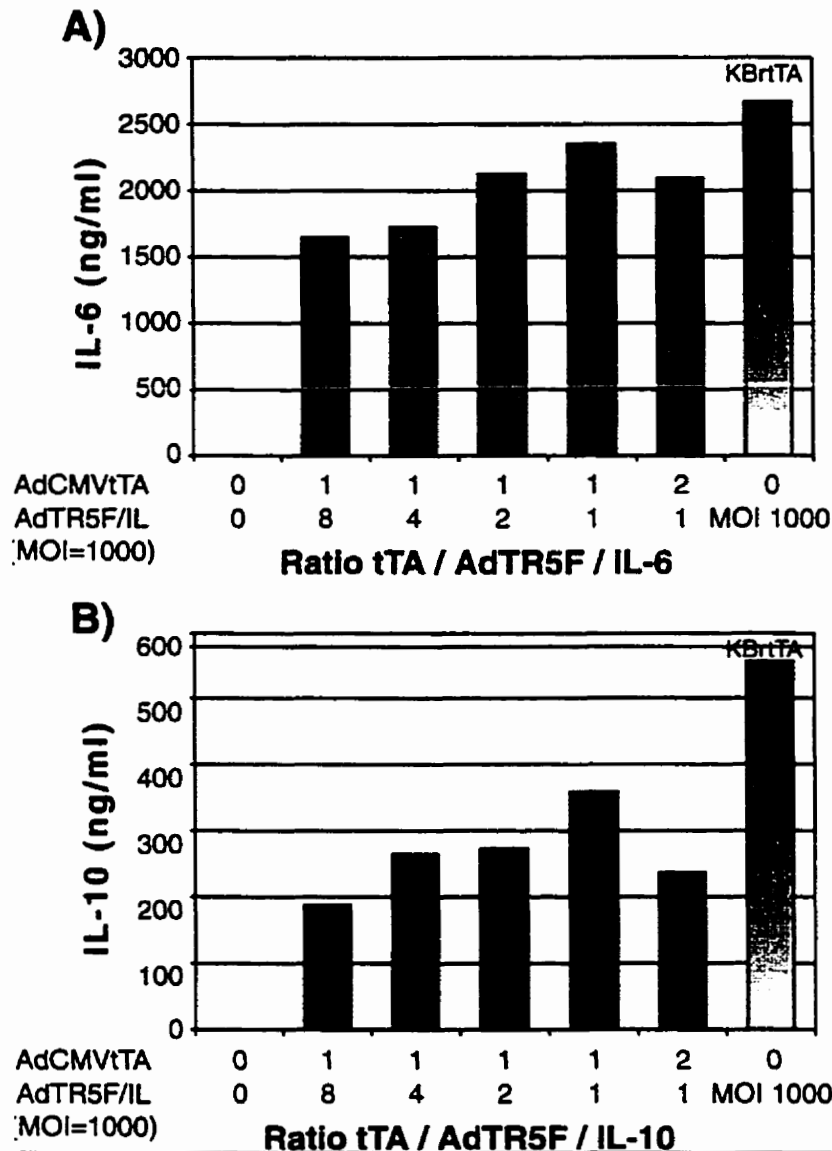


Figure13 Graphiques du ratio AdCMVtTA vs AdTR5F/IL-6 ou IL-10 produisant la plus grande quantité de protéines.

On a infecté 1×10^6 cellules KB et KBrTA avec 1×10^9 (MOI de 100pfu) pfu a) AdTR5F/IL-6 ou b) IL-10. On a utilisé différents ratios AdCMVtTA/AdTR5F (1/8, 1/4, 1/2, 1/1, 2) pour l'infection. Les cellules ont balancées durant 4 heures dans 1 ml de milieu DMEM. Les cellules ont été infectées pendant une période de 48 heures. La lignée KBrTA est un contrôle pour la quantité de protéines produites dans un système ou l'induction du vecteur AdTR5 est maximale. On observe que le système inductible tTA produit environ autant de protéines que les cellules KBrTA. Les résultats sont exprimés en ng/ml. (annexe C)

4.4 Expériences préliminaires *in vivo* afin de caractériser l'AdTR5

4.4.1 Détermination du nombre de particules infectieuses d'AdTR5 nécessaires à l'infection de souris C57BL/6.

La première expérience de cette section nous a permis de déterminer la réaction inflammatoire provoquée par une quantité maximale d'adénovirus ne produisant pas de cytokine. On voulait aussi voir la quantité de cytokines maximales produites par différentes concentrations de virus et ainsi choisir la quantité d'adénovirus à instiller pour les prochaines expériences.

Selon les comptes cellulaires du LBA de la figure 14, on observe une faible quantité de cellules dans le groupe contrôle de souris salines. Le nombre de cellules augmente faiblement lorsqu'on a instillé le virus contrôle ainsi que le virus IL-6 à la dose la moins élevée ainsi que les trois groupes avec le virus IL-10. La dose la plus forte du virus IL-10 obtient un peu plus de cellules mais sans différence significative par rapport au virus inducteur seul. Par contre, il y a un grand nombre de cellules dans les deux doses les plus fortes avec le virus IL-6. Cette différence est significative avec un p de 0,0082 à la suite d'une analyse de variance à un facteur. Cette différence est démontrée sur la figure 14 par la méthode de comparaison de Scheffé. Les figures 15 (a) et (b) nous ont montré les résultats obtenus par la quantification de protéines produites. Ceci nous a permis de déterminer la quantité de ufp maximale pour infecter une souris de 20g. On a pu se rendre compte que le maximum de protéines était produit lorsqu'on instillait une quantité de 5×10^8 ufp autant pour AdTR5F/IL-6 que AdTR5F/IL-10. Les résultats de la figure 15a sont moins clairs dans ces résultats puisqu'il n'y a pas de différence significative entre 5×10^8 et 1×10^9 avec un $p=0,4689$. Par contre, la figure 15b démontre un résultat assez étonnant car à une dose seulement deux fois plus élevée, il y a une baisse de production de 10 fois. On a déduit que la quantité maximale de protéine est obtenue par instillation de 5×10^8 ufp avec un $p=0,3911$.

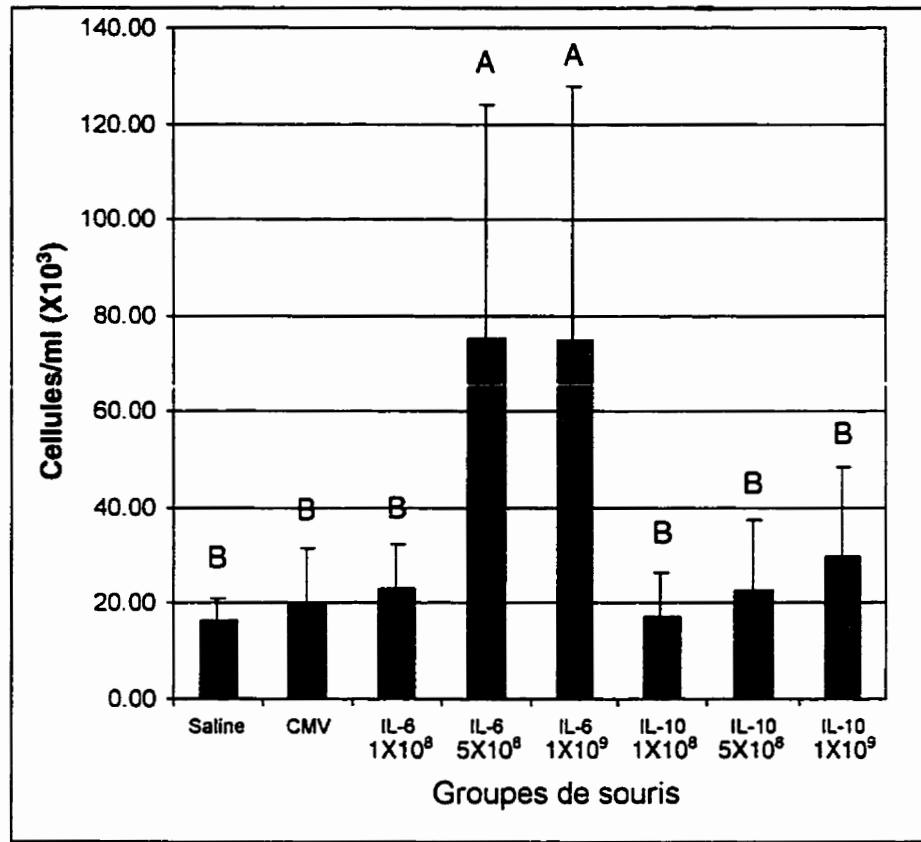


Figure 14 Décompte du nombre de cellules/ml dans le LBA de souris dépendant du virus et du nombre de ufp instillées. Une seule dose a été instillée au jour un de l'expérience et les sacrifices ont eu lieu au jour 10. Les groupes sont les suivants : souris salines, virus tTA (virus inducteur contrôle), virus IL-6 1×10^8 ufp induit, virus IL-6 5×10^8 ufp induit, virus IL-6 1×10^9 ufp induit, virus IL-10 1×10^8 ufp induit, virus IL-10 5×10^8 ufp induit et virus IL-10 1×10^9 ufp induit ($n=5$ souris/groupe). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mL et les barres d'erreurs sont des écarts type en plus d'une analyse de variance ($p < 0,05$) représenté par les lettres. Ces lettres représentent la différences statistiques entre deux groupes. Par exemple, si deux groupes ne sont pas statistiquement différent, ils vont avoir la lettre A. Pour des différences statistiques entre deux groupes les lettres A pour l'un et B pour l'autre vont être appropriées. Seulement les groupes avec l'IL-6 ont un nombre de celules plus élevé que les autres groupes. Les données brut du compte cellulaire sont à l'annexe D.

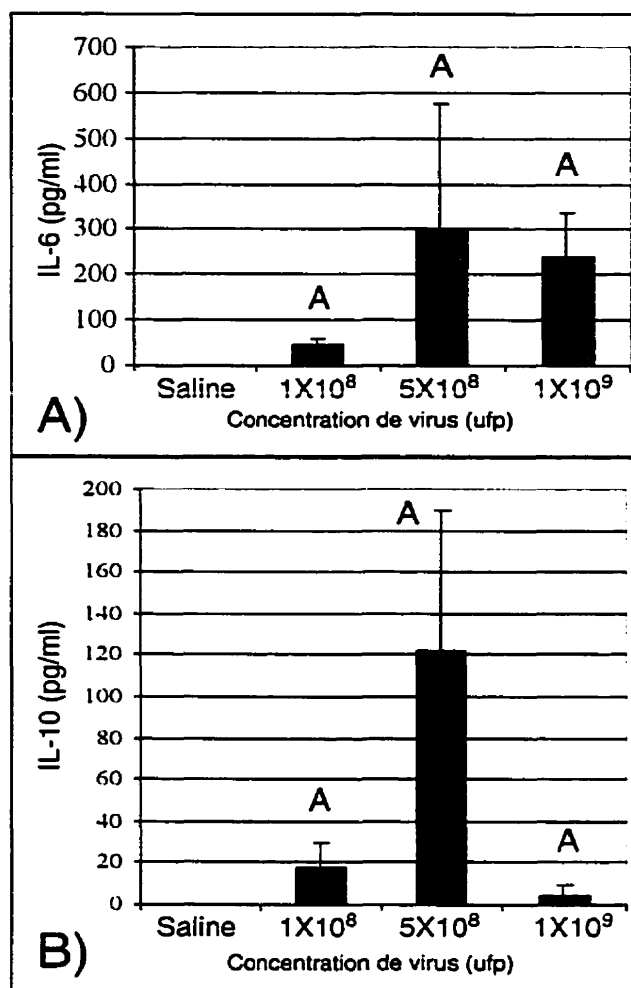


Figure 15 Graphique de la quantité de cytokines (pg/ml) produites dans le LBA de souris C57BL/6 par rapport à la quantité de ufp de virus instillé.

Les quatre groupes ont reçu le vecteur inducteur AdCMVtTA et la quantité suivante de particules virales de AdTR5F/IL-K7-GFPq : 0 ufp, 1X10⁸ufp induit, 5X10⁸ ufp induit et le dernier 1X10⁹ ufp induit (n=4 souris/groupe). Une seule dose par instillation nasale (50µl) et les sacrifices ont eu lieu 10 jours après la première instillation. On a ensuite quantifié le niveau de protéines par ELISA commerciale de souris IL-6. A) AdTR5F/IL-6-K7-GFPq B) AdTR5F/IL-10-K7-GFPq. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mL et les barres d'erreurs sont des écarts type en plus d'une analyse de variance ($p < 0,05$) représenté par les lettres. L'explication de ces lettres se retrouvent à la figure 14. Statistiquement aucune concentration se distingue des autres. (annexe E)

4.4.2 Rapport le plus productif entre AdCMVtTA et AdTR5F

On a répété l'expérience du ratio AdCMVtTA/AdTR5 mais *in vivo*. On voulait confirmer que le ratio déterminé *in vitro* donnait les mêmes résultats *in vivo*. On a choisi de n'utiliser que l'IL-6 puisque les résultats sont plus faciles à analyser en présence d'inflammation qu'en absence de celle-ci.

Les résultats que l'on retrouve à la figure 16 indiquent qu'un trop grand rapport entre le nombre de particules de l'inducteur (tTA) par rapport au virus à induire peut diminuer l'efficacité de l'induction (5/1). Cette diminution est statistiquement différente avec un $p=0,0352$. On observe que 0,5 à 2,5 particules de tTA pour 1 particule de virus à induire, l'effet d'induction est semblable entre ces groupes. On a choisi de travailler avec une combinaison de 2,5 ufp AdCMVtTA pour 1 ufp AdTR5F dans nos prochaines expériences plutôt que le rapport un pour un que l'on avait préalablement déterminé *in vitro*.

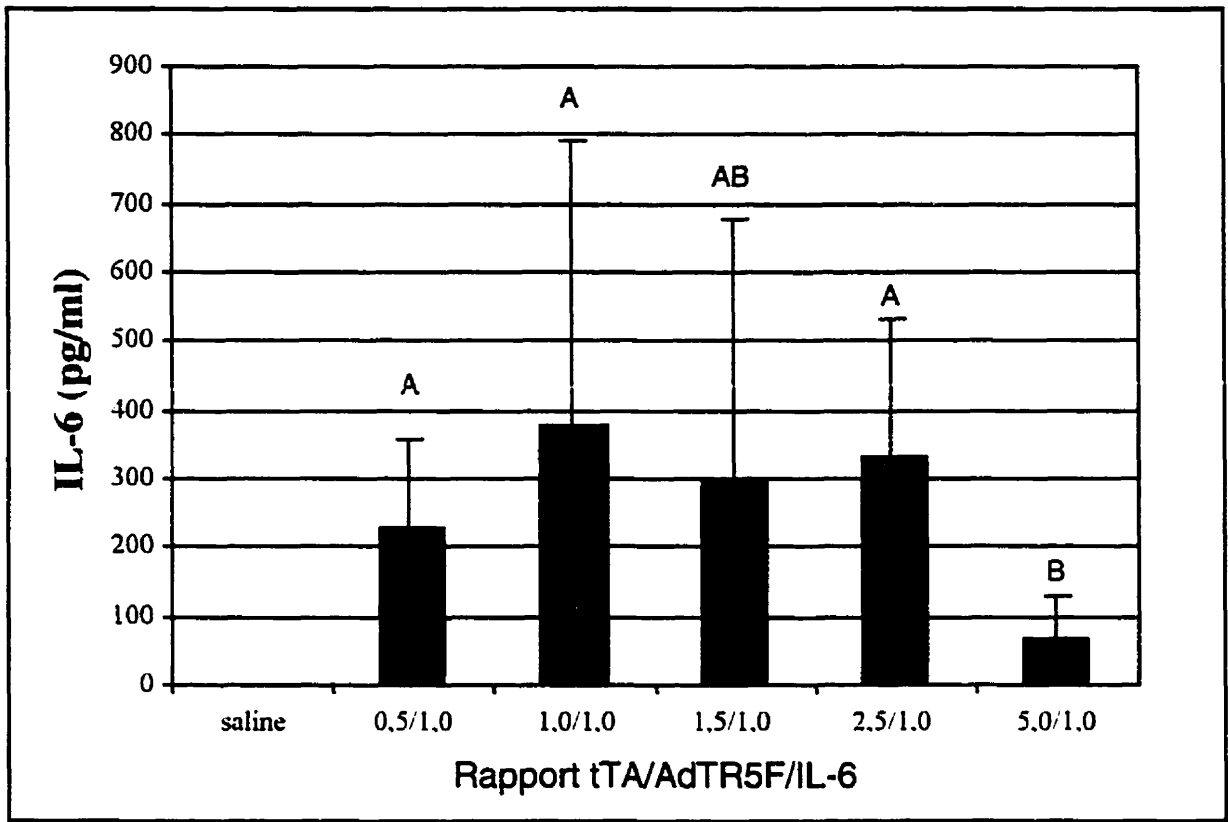


Figure 16 Graphique de la quantité de protéine produite dans le LBA de souris selon le rapport entre la quantité du virus CMV et AdTR5/IL-6.

Les souris C57BL/6 ont reçu une dose 5×10^8 ufp d'AdTR5F/IL-6 plus une dose variable d'AdCMVtTA au jour 1 de l'expérience (n=6 souris/groupe). Le premier groupe a été instillé à la saline, le groupe deux à reçu $2,5 \times 10^8$ ufp (0,5/1) de AdCMVtTA, le groupe trois à reçu 5×10^8 ufp (1/1) de AdCMVtTA, le groupe 4 à reçu $7,5 \times 10^8$ ufp (1,5/1) de AdCMVtTA le groupe 5 à reçu $12,5 \times 10^8$ ufp (2,5/1) de AdCMVtTA et finalement le groupe 6 a reçu 25×10^8 ufp (5/1) de AdCMVtTA. Les sacrifices ont eu lieu au jour 10. La quantification de la protéine IL-6 s'est effectué par ELISA commerciale. Les résultats sont exprimés en pg/mL et les barres d'erreurs sont des écarts type en plus d'une analyse de variance ($p < 0,05$) représenté par les chiffres. L'explication de ces lettres se retrouvent à la figure 14. Les rapports 0,5/1, 1/1, 2,5/1 induisent la production de protéines de façon semblable. (annexe F)

4.4.3 Niveau d'expression de la protéine IL-6 dans le temps

Cette expérience nous a été utile pour déterminer le pic d'expression des cytokines dans le temps. On a pu déterminer avec cette expérience le meilleur moment pour les prochains sacrifices.

On observe un niveau maximal de production de protéines au jour 2 et déjà après le jour 4, on perçoit une diminution de production et ainsi de suite pour les jours 10 et 16. La chute est radicale entre les jours 4 et 10 et quasi nul au jour 16. Dans les expériences qui suivent, on s'est basé sur ces résultats pour cibler le temps maximal d'expression de la protéine. On a donc considéré ces résultats pour sacrifier nos souris plus tôt après l'instillation du virus. Une analyse de variance à un facteur a déterminé que les jours 2 et 4 sont statistiquement différents des jours 10 et 16 avec un $p=0,0003$.

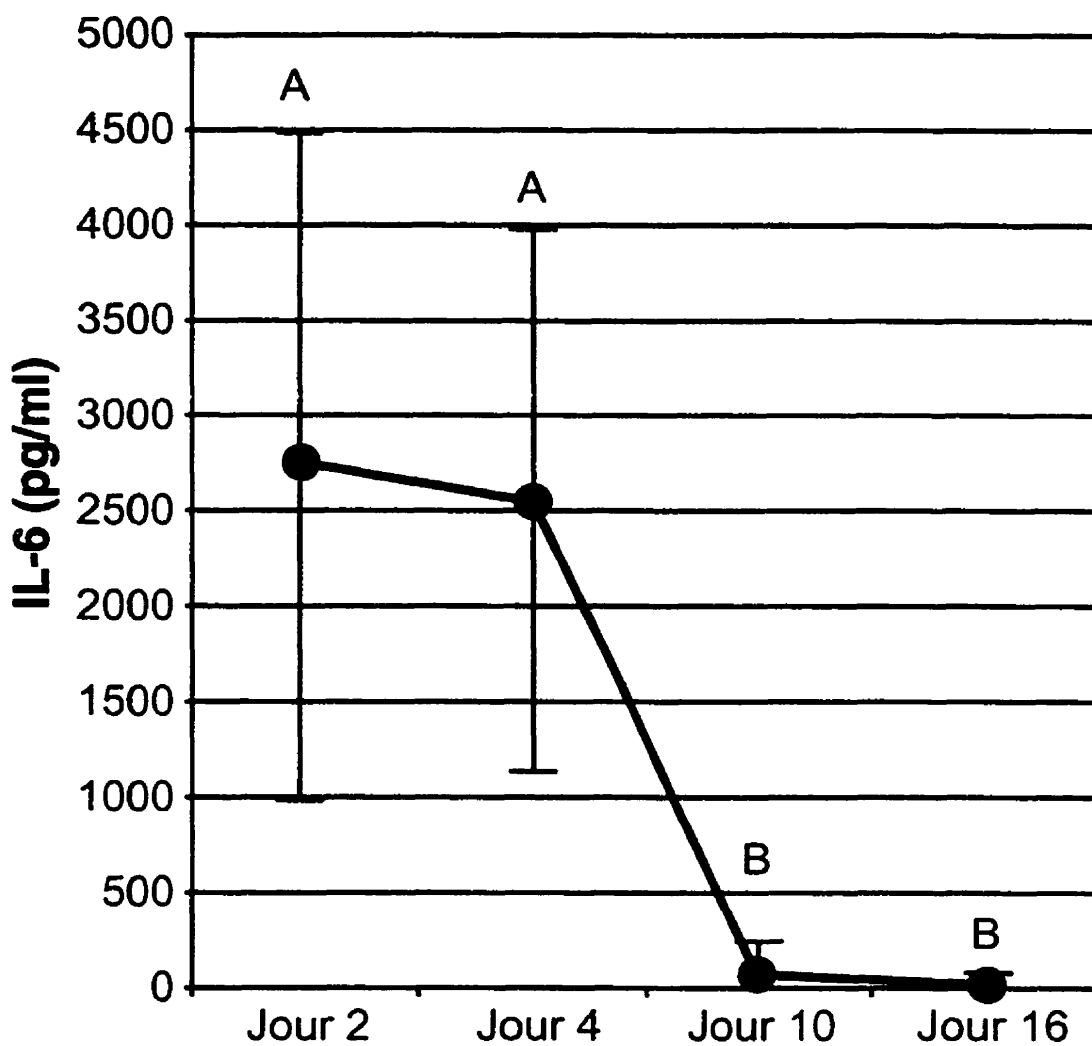


Figure 17 Graphique du niveau d'expression de l'IL-6 dans le temps dans le LBA de souris C57BL/6.

On a instillé des souris normales avec une seule dose AdTR5F/IL-6 5×10^8 ufp plus $12,5 \times 10^8$ AdCMVtTA au jour 1. Les sacrifices ont eu lieu au jour 2, 4, 10 et 16 ($n=6$ souris/groupe). On a ensuite mesuré la quantité de protéines par un ELISA commerciale de souris IL-6. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mL et les barres d'erreurs sont des écarts type en plus d'une analyse de variance ($p < 0,05$) représenté par les lettres. L'explication de ces lettres se retrouvent à la figure 14. On observe une diminution de production importante entre les jours 4 et 10. (annexe G)

4.5 Expression de l'IL-6 et de l'IL-10 après l'instillation de vecteurs viraux dans le LBA de souris dans un modèle d'alvéolite allergique extrinsèque

4.5.1 Données cellulaires

On a effectué le compte cellulaire des LBA pour déterminer le taux d'inflammation des différents groupes de souris. On a fait le compte des macrophages, des lymphocytes et des neutrophiles pour avoir un indice sur le degré de l'inflammation et surtout pour détecter la présence de l'AAE.

La première partie de cette dernière étape de notre projet était de faire le décompte des cellules totales retrouvées dans le LBA ainsi que le décompte différentiel pour les macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles. Le décompte cellulaire nous donne une indication du niveau d'inflammation des poumons tandis que le décompte différentiel nous donne une indication sur le degré de l'AAE dans tous les groupes de souris. Le degré de l'AAE est mesuré par le pourcentage de lymphocytes retrouvés dans le LBA comme on l'a indiqué dans l'introduction.

Les résultats de la figure 18 a et b, sont exprimés en nombre de cellules du LBA par ml avec +/- un écart-type. Les différences statistiques entre les groupes pour un $p < 0,05$ (test de Schéffé), sont représentés par des lettres. Par exemple, deux groupes ayant une différence statistique vont avoir la lettre A et B. Par contre, si les groupes ne sont pas statistiquement différents, ils vont avoir tous les deux la lettre A.

Les comptes de cellules totales pour les différents groupes de souris se retrouvent à la figure 18. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules du LBA par ml $\times 10^{-3}$ avec +/- un écart-type. La comparaison de la moyenne du nombre de

cellules par ml du groupe de souris traitées à la saline (ce groupe sera désigné par la suite par groupe saline), nous indique qu'il y a vraiment très peu de cellules par rapport aux autres groupes ($10,2 \times 10^3$). On a donc la preuve que l'expérience a été réalisée dans les bonnes conditions de confinement, c'est-à-dire que les souris n'ont pas été contaminées par les virus des autres groupes et donc que notre contrôle négatif est fiable. Les groupes SR et saline + tTA quant à eux ont une quantité de cellules statistiquement plus élevées mais obtiennent tout de même une quantité de cellules moindre que les groupes saline + IL-6 + tTA, saline + IL-10 + tTA, SR + tTA, SR + IL-6 + tTA et SR + IL-10 + tTA. Lorsque l'on observe les 4 groupes de souris traitées à la salines, le groupe qui se différencie des autres a été instillé avec le virus IL-6 (223×10^3). C'est ce groupe qui obtient le plus haut niveau de cellules/ml de LBA. Il n'y a pas de différence entre les groupes salines + tTA ($42,4 \times 10^3$) et saline + IL-10 + tTA ($55,8 \times 10^3$). Lorsqu'on observe les groupes du modèle d'AAE (SR), rien n'est statistiquement différent d'un groupe à l'autre. On ne peut rien affirmer pour la quantité de cellules par ml dans le LBA pour ces quatre groupes avec le virus. On peut seulement dire que la présence de virus augmente la quantité de cellules totales étant donné que le groupe SR seul a une quantité plus faible de cellules que les trois autres groupes SR en présence de virus.

Le compte pour les macrophages, lymphocytes et neutrophiles se retrouve à la figure 18b. La quantité de macrophages est beaucoup plus importante dans le groupe de souris salines par rapport à tous les autres groupes. La présence du virus dans les groupes de souris salines diminue de peu la présence de macrophages tout en augmentant de peu le nombre de lymphocytes dans le LBA par rapport aux groupes SR. Lorsque l'on calcule le nombre de macrophages dans les lavages des groupes d'AAE, on constate une diminution importante du nombre de macrophages. Ceci se traduit par une augmentation marquée du nombre de lymphocytes dans le LBA. Le décompte de neutrophile n'a jamais été très important sauf dans le groupe de souris saline + IL-6 + tTA dans lequel on a observé une légère augmentation.

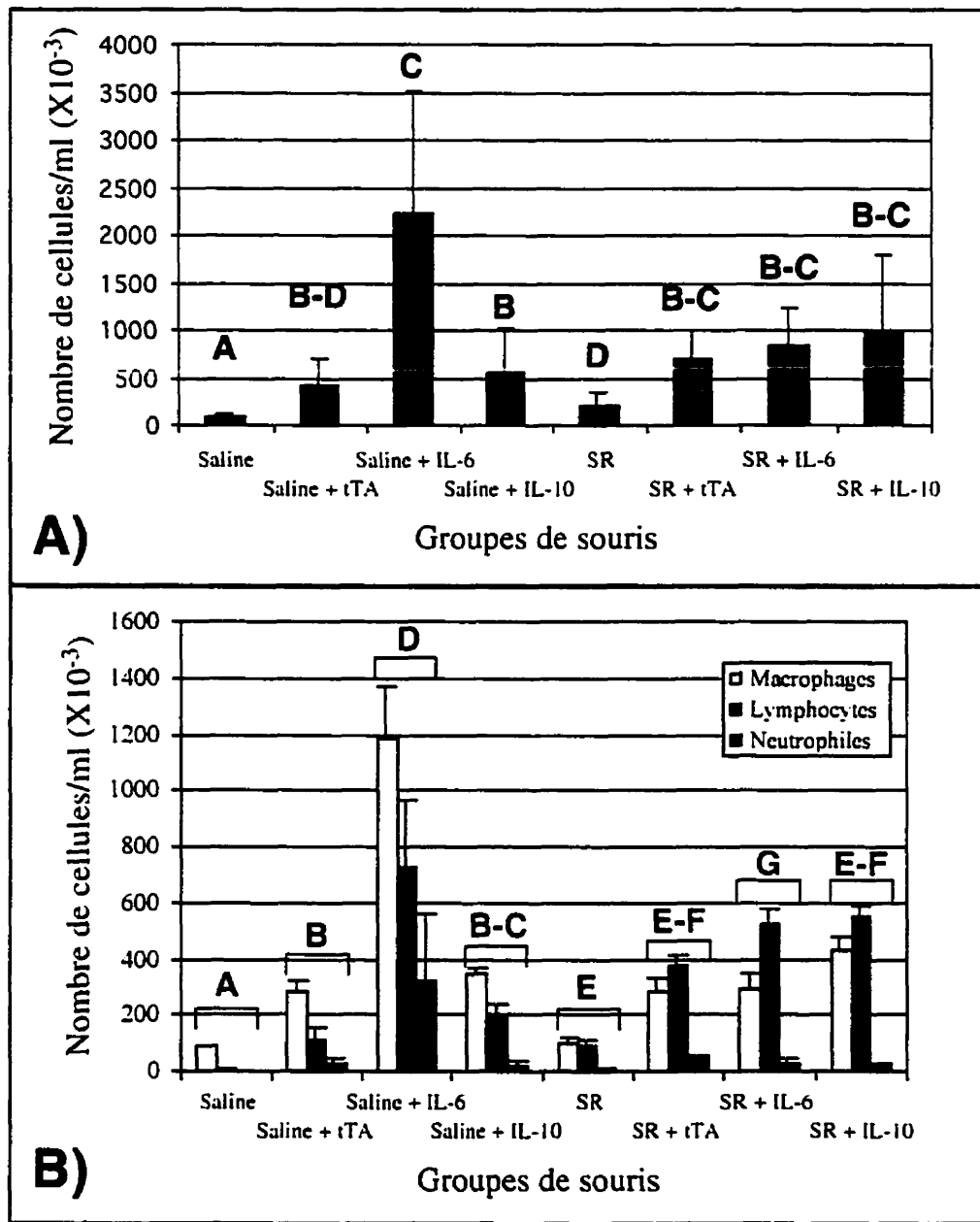


Figure 18 Décompte du nombre de cellules/ml ainsi que du nombre de macrophages, lymphocytes et neutrophiles dans le LBA de différents groupes de souris C57BL/6.

Chaque groupe a reçu saline/SR, tTA, IL-6 ou IL-10 tout dépendant. On a donné une dose de saline/SR trois fois par semaine durant trois semaines et ensuite on a donné une dose de virus (tTA, IL-6 ou IL-10) à la fin de la deuxième et une autre à la fin de la troisième semaine. Les LBA ont été effectués 5 jours après la dernière instillation de saline/SR et de virus (n=10 pour tous les groupes). A) Décompte des cellules

totales B) Décompte des populations cellulaires. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mL et les barres d'erreurs sont des écarts type en plus d'une analyse de variance ($p < 0,05$) représenté par les lettres. S'il y a une population qui est statistiquement différente, les lettres vont indiquer une différence statistique (voir figure 14 pour plus ample explication). Le groupe saline + IL-6 est le seul groupe qui se démarque le plus des autres par sa grande quantité de cellules. (annexe H)

4.5.2 Index pulmonaire

Les résultats de l'index pulmonaire (figure 19) nous donne une confirmation supplémentaire sur le niveau d'inflammation. On peut donc confirmer les résultats des décomptes cellulaires avec les index pulmonaires.

Les résultats de l'index pulmonaire ne démontrent aucune différence entre les groupes salins et les groupes AAE. On observe seulement que le groupe de souris saline obtient un score de 1 pour l'index pulmonaire ce qui est normal pour des souris traitées à la saline.

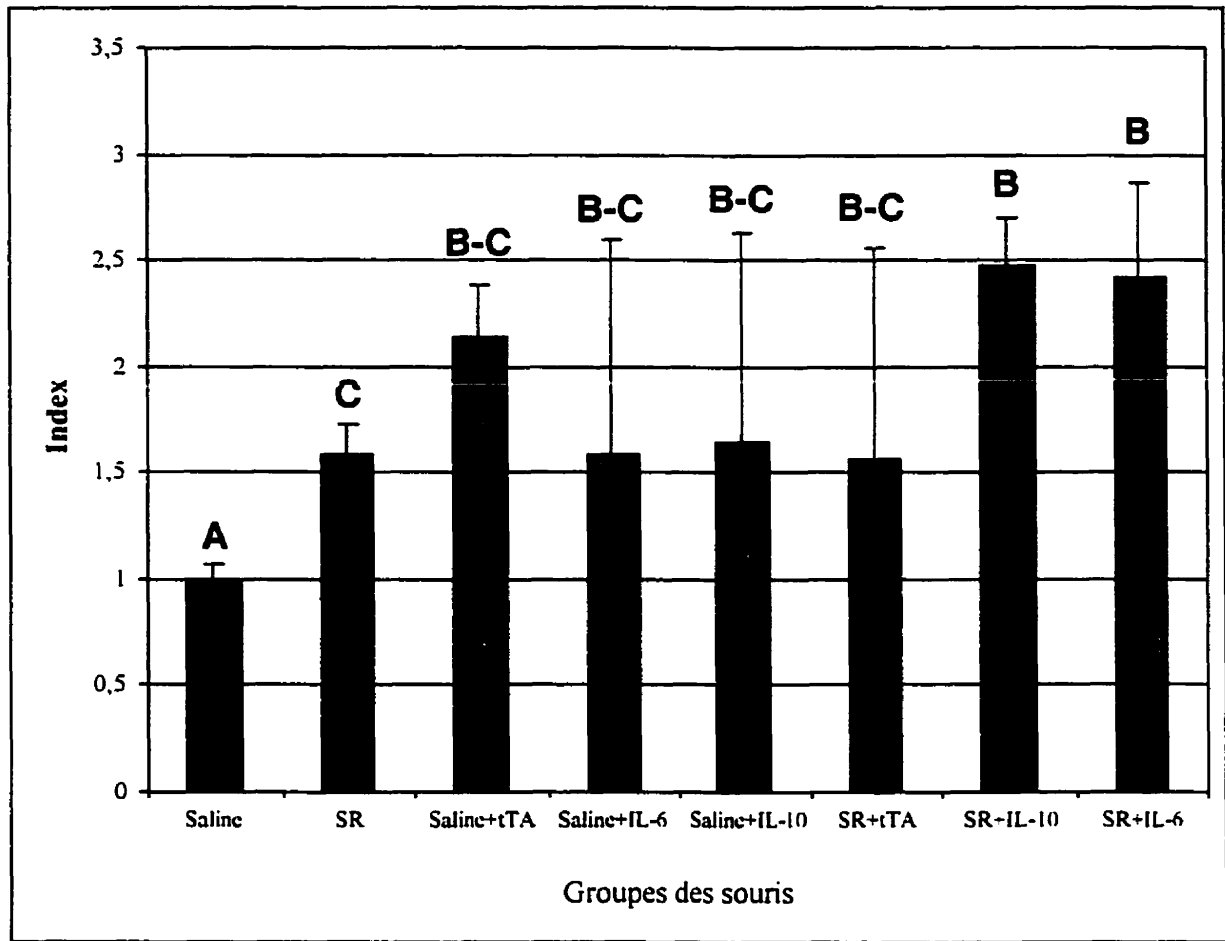


Figure 19 Graphique de l'index pulmonaire de 8 groupes de souris C57BL/6. Chaque groupe a reçu saline/SR, tTA, IL-6 ou IL-10 tout dépendant. On a donné une dose de saline/SR trois fois par semaine durant trois semaines et ensuite on a donné une dose de virus (tTA, IL-6 ou IL-10) à la fin de la deuxième et de la troisième semaine. Les poumons non lavés ont été prélevés 5 jours après la dernière instillation virale. On a pesé la souris et ensuite le poumon pour faire le rapport de l'index pulmonaire. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mL et les barres d'erreurs sont des écarts type en plus d'une analyse de variance ($p < 0,05$) représenté par les lettres. Une explication plus approfondie se retrouve à la figure 14. L'index pulmonaire n'indique rien de particulier pour les différents groupes. (annexe I)

4.5.3 ELISA

Les ELISAs sont un atout important pour avoir une mesure précise de la quantité de cytokines retrouvés dans le LBA. Ces mesures nous aident à comprendre certains mécanismes dans lesquels ces cytokines jouent un rôle.

La figure 20(a) montre la quantité d'IL-6 produit par chaque groupe de souris. On détecte peu ou pas de protéines pour les groupes de souris traitées à la saline, saline + tTA, SR et SR + tTA. Les quatre groupes restant soient : saline + IL-6 + tTA, saline + IL-10 + tTA, SR + IL-6 + tTA et SR + IL-10 + tTA ont une quantité plus importante de protéine mais aucun groupe ne se distingue des autres. En ce qui concerne le graphique de la figure 20b, il nous démontre qu'il y a peu de groupes qui ont produit en grande quantité l'IL-10. En effet, seul le groupe saline + IL-10 + tTA nous montre une grande quantité de protéine produite (125 μ g). Les trois autres groupes avec les souris salines ont une production très faible ou quasi absente. En ce qui concerne les groupes dans le modèle de l'AAE (SR), il n'y a peu ou pas de présence de protéine même dans le groupe SR + IL-10 +tTA.

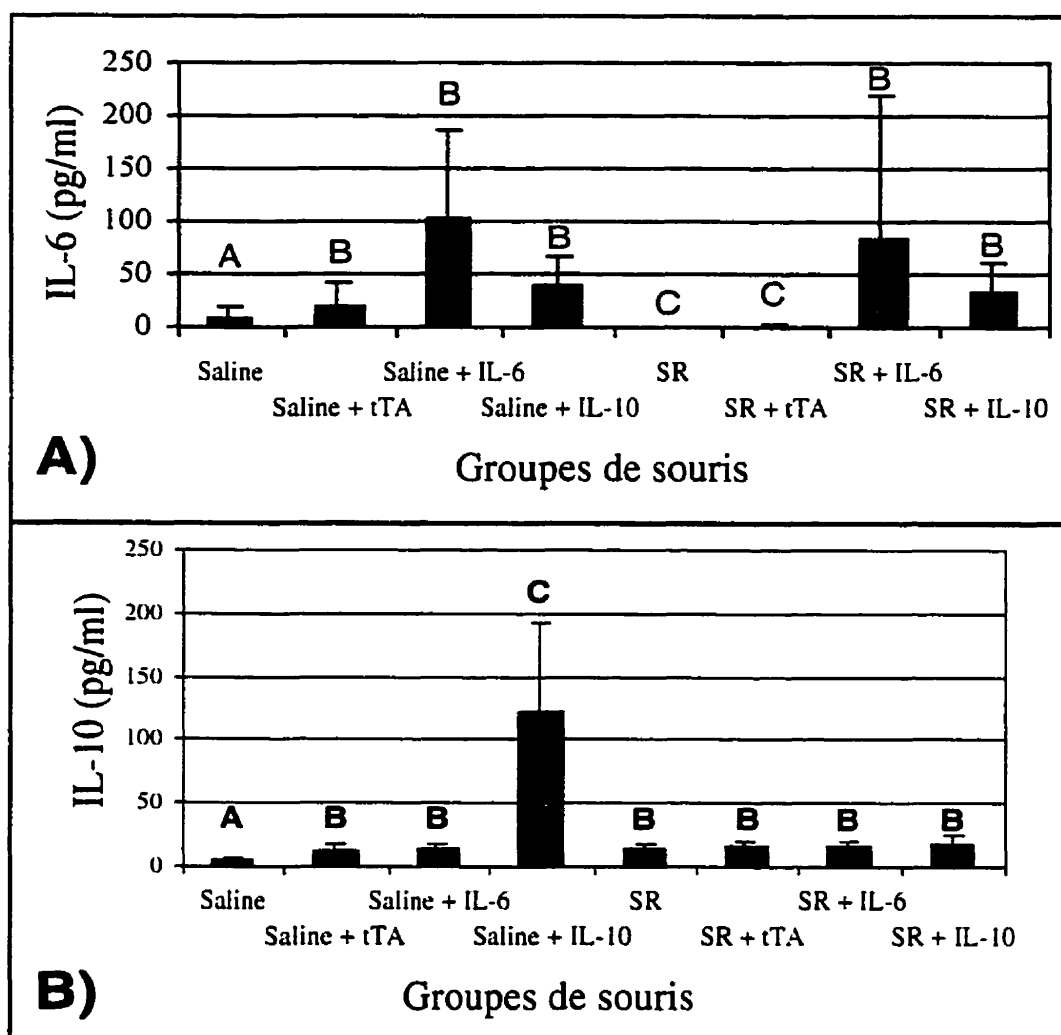


Figure 20 Graphique de la quantification de cytokines dans le LBA de souris C57BL/6.

Chaque groupe a reçu saline/SR, tTA, IL-6 ou IL-10 tout dépendant. On a donné une dose de saline/SR trois fois par semaine durant trois semaines et ensuite on a donné une dose de virus (tTA, IL-6 ou IL-10) à la fin de la deuxième et une autre à la fin de la troisième semaine. Les LBA ont été effectués 5 jours après la dernière instillation de saline/SR et de virus (n=10 pour tous les groupes). A) IL-6, les groupes qui sont induits ont une quantité d'IL-6 produite plus grande que les autres groupes et B) IL-10, seul le groupe saline + IL-10 présente une production d'IL-10. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mL et les barres d'erreurs sont des écarts type en plus d'une analyse de variance ($p < 0,05$) représenté par les lettres. (annexe J)

5.0 Discussion

L'inflammation chronique est impliquée dans plusieurs maladies. Cette inflammation peut atteindre l'intégrité cellulaire et causer des dommages irréversibles (fibrose, granulôme) comme ceux que l'on voit dans l'AAE.¹⁸ Il faut donc trouver une façon de remédier à ce problème.

Le but de cette étude était d'effectuer une modulation de l'inflammation par l'introduction de vecteurs viraux produisant de l'IL-10 ou de l'IL-6 afin de mieux comprendre les mécanismes et les rôles de ces deux cytokines dans un modèle AAE. Plusieurs étapes étaient nécessaires à la réalisation de cette étude telles que l'amplification de l'ADNc de l'IL-6 et l'IL-10 à partir de macrophages alvéolaires de souris, la construction d'un vecteur inductible efficace pour l'expression *in vitro* et *in vivo* sur des souris saines et finalement la modulation de l'inflammation dans un modèle murin d'AAE.

5.1 Amplification des ADNc de souris et construction des vecteurs de transfert

Tout d'abord, on a réussi à caractériser l'ADNc que l'on voulait utiliser pour insérer dans le vecteur. On a fait la preuve que l'ADNc isolé était bien ceux que l'on voulait obtenir par des études exactes pour la longueur des fragments obtenus.^{30,40} De plus, le risque d'amplifier un contaminant était minime puisque les oligonucléotides employés étaient très spécifiques aux séquences voulues. Le séquençage des fragments obtenus a assuré l'absence d'erreur qui auraient pu survenir lors de la transcription par la Taq polymérase. La présence d'erreurs telles que des mutations ponctuelles, délétions ou ajouts de nucléotides,⁵⁷ qui peuvent rendre le gène inactif, n'ont pas été détectées. À partir de là, on a pu commencer la construction des virus recombinants.

L'étape d'amplification devait être suivie de très près pour s'assurer qu'une souche sauvage (adénovirus sans l'incorporation du plasmide) n'avait pas été amplifiée. La GFPq était un bon moyen de différencier les clones viraux qui avaient incorporé le plasmide par rapport à celles qui ne l'avaient pas. En effet, les souches sauvages ne possédaient pas de GFPq puisqu'elles n'avaient pas incorporé le plasmide qui possédait l'insert et la GFPq. Par contre, on a rencontré quelques clones lors de l'amplification d'AdTR5F/IL-6 où la GFPq était présente mais où il n'y avait pas de production de protéines. Le western de la figure 11 montre que certains des clones qui avaient été sélectionnés pour leur fluorescence, ne produisaient aucune protéine (IL-6). On a analysé la provenance des clones non productifs et on s'est rendu compte qu'ils provenaient tous de la même plage isolée de la transfection initiale (1 sur 12 plages éluées). Il ne s'est donc produit qu'un événement marquant lors de la transfection initiale. On a amplifié ce clone déficient durant plusieurs étapes jusqu'à ce qu'on ait vérifié sa productivité par western, d'où l'importance du western à chaque étape. Ces événements peuvent être dû à un réarrangement de l'insert ou la perte de cet insert dans la cellule infectée.⁵⁷ Les vecteurs pAdTR5F-K7-GFPq sont moins stables que les vecteurs, comme par exemple, les vecteurs dicistroniques. On s'est rendu compte, qu'il y avait plus souvent des réarrangements lorsque l'on utilisait les vecteurs K7 que les dicistroniques. La principale raison de ces réarrangements est, croit-on, la grande homologie entre les deux promoteurs présent dans le vecteur K7 soient TR5 et CMV. Cette homologie permet à la cellule d'effectuer ces réarrangements, ce peut causer parfois la perte de l'insert. Une fois amplifié, les stocks viraux nous ont semblé stables mais nous n'avons pas effectué de test particulier pour confirmer ce fait. Par contre, on a fait l'observation, dans un autre projet, que les stocks viraux pour une protéine toxique soit moins stable (plus de révertants). Ces observations ont été obtenues dans le laboratoire de Dr. Massie (Mullick et al, manuscrit en préparation).

Les titres viraux ont atteint les niveaux de production de particules attendues (tableau 6). On a pu s'assurer que l'amplification a été très efficace par le nombre de particules infectieuses produites. En effet, on s'attendait à ce qu'il y ait plus de 1000 particules virales de produites par cellules donc pour 6 milliards de cellules une quantité totale de plus de 6×10^{12} particules infectieuses.⁴⁶ Les travaux effectués dans le laboratoire de Dr. Massie, indiquent que la quantité de particules infectieuses devrait être d'au moins 10% du nombre de particules totales. On a obtenu $1,7 \times 10^{13}$ de particules totales pour AdTR5F/IL-6 pour toute la production et le pourcentage de particules infectieuses était de 20 % ce qui est excellent. On a obtenu $2,9 \times 10^{13}$ particules totales pour AdTR5F/IL-10 pour toute la production et le pourcentage de particules infectieuses était de 11%. Les techniques employée pour l'amplification et la production virales ont donc on donc produit les résultats attendus.

5.2 Expériences préliminaires *in vivo*

Une fois la construction et l'amplification des vecteurs AdTR5F/IL6 et 10 K7 GFPq furent terminées, nous avons vérifié l'effet de ces vecteurs dans un modèle *in vivo* chez la souris comme modèle inflammatoire murin. Premièrement, nous avons déterminé la quantité de particules infectieuses nécessaires pour infecter des souris de 20g. Se basant sur les travaux antérieurs qui ont montré que le niveau de particules infectieuses utilisé variait entre 1×10^7 et 1×10^9 ,^{28,36} on a déterminé que 5×10^8 était le meilleur choix parce qu'il y avait une augmentation de production des cytokines cibles marquées comparé à la dose inférieure. De plus, une trop grande quantité de virus pouvait augmenter le niveau de base de l'inflammation chez l'animal.

On a dû déterminer le rapport d'AdCMVtTA par rapport à AdTR5F/IL pour qu'il y ait une induction maximale. On a supposé qu'on avait besoin d'une dose plus forte de l'inducteur pour augmenter les chances de rencontre entre les deux virus dans les cellules. Les résultats ont indiqué qu'il n'y a pas vraiment de différence de production

de protéines entre les rapports 0.5/1, 1/1, 1.5/1 et 2.5/1. Par contre, on a obtenu une diminution de la quantité de protéines produites lorsqu'on a utilisé 5 particules d'inducteur pour une particule d'inductible *in vivo* (figure 16). Lorsqu'on ajoute trop de vecteurs viraux ceux-ci, plutôt que d'être induits, pourraient entrer en compétition pour les mêmes cellules. Ceci pourrait expliquer la forte diminution lorsqu'une forte dose virale est atteinte. La courbe de la production de protéines dans le temps a révélé une chute de cette production assez rapide.

On se serait attendu à une longévité plus longue pour le type de vecteurs employé. Ce genre de vecteurs pouvait être normalement induit durant quelques semaines.⁵³ On s'est posé la question sur ce qui est arrivé à l'induction virale pour avoir une chute de production entre le jour 4 et 10 de l'expérience. Étant donné que l'IL-6 a augmenté la quantité de cellules inflammatoires (figure 14), on soumet l'hypothèse que les cellules inflammatoires pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de l'expression du transgène. Ce sujet sera abordé plus amplement un peu plus tard.

5.3 Mécanismes et modulation de l'AAE

La partie la plus intéressante au niveau mécanisme et modulation de l'inflammation dans un modèle murin a démontré des résultats auxquels on ne s'attendait pas. Les résultats qu'on a obtenus pour le compte cellulaire et les différentielles des quatre groupes de souris traitées à la saline ont confirmé les résultats obtenus lors de la caractérisation *in vivo* de l'expression des cytokines (figure 18). La quantité de protéines produite dans le LBA des souris traitées à la saline qui ont reçu le virus IL-6 ou IL-10, est diminuée par rapport aux résultats obtenus préalablement (figure 15). Les quantités produites sont assez semblables mais avec 5 jours de différences. Lorsque le graphique de la quantité produite d'IL-6 en fonction du temps (figure 17) a été fait, les quantités au jour 5 aurait dû se situer au alentour de 2000 ng ce qui ne fut pas le cas. Étant donné que ce graphique

(figure 17) à été réalisé avec des souris traitées à la saline et non avec un modèle AAE de souris, on a pu comprendre que la comparaison ne se faisait pas. Une courbe de la quantité en fonction du temps aurait pu donner une meilleure idée sur la quantité réelle produite dans un modèle où des molécules inflammatoires sont relâchées. Le groupe SR se compare aux résultats préalablement obtenus par notre groupe pour le compte des cellules et les différentielles.^{17,19} On a donc la certitude que le modèle d'AAE chez la souris a été implanté correctement. Par contre, les autres groupes SR n'ont démontré aucune différence significative dans le nombre de cellules par ml d'un groupe à l'autre. La quantité de lymphocytes était conforme dans un modèle d'AAE c'est-à-dire environ 50% des cellules.^{18,5} On n'a retrouvé qu'une faible quantité d'IL-10 semblable aux groupes de souris traitées à la saline. On a vu le même phénomène pour l'IL-6. Il y a présence d'une faible quantité d'IL-6 pour les groupes SR+IL-6 et SR+IL-10 mais les groupes étaient si variables qu'on n'a pu déduire aucune tendance. En ce qui concerne la production d'IL-10 dans un modèle d'AAE, aucune production n'a été observée dans le groupe SR+IL-10. L'index pulmonaire a reflété le même genre de résultats. Le groupe de souris traitées à la saline avait un indice pulmonaire de 1 ce qui est tout à fait normal pour un groupe contrôle. En ce qui concerne les autres groupes, ils étaient tous identique pour l'index pulmonaire. Les groupes contrôle (saline, SR, SR+TTA, saline+TTA) étaient tous normaux, on a pu dire que techniquement l'expérience s'était bien déroulée. On a constaté que les souris ont été isolées dans des conditions satisfaisantes et qu'aucune d'entre elle n'avait été contaminée de quelque façon que ce soit. On a pu remarquer que l'administration du virus seul n'induisait pas une réaction inflammatoire importante étant donné qu'il y avait peu de molécules d'inflammation recrutées et qu'il y avait une faible quantité d'IL-6 produit. Les résultats qu'on a obtenus mettent en doute l'efficacité de l'induction de l'expression dans un modèle inflammatoire. Certains auteurs ont mis en cause la présence d'interféron (INF) relargué lors de la réaction inflammatoire.^{4,34} L'interféron est reconnu pour jouer un rôle antiviral. Il aurait pu avoir influencé l'efficacité de transfert du gène ou de son expression.⁴ La raison la plus probable est que l'INF inhibe l'expression du

transgène qui était sous le contrôle des promoteurs simian virus 40 (SV40) ou cytomégalovirus (CMV).⁴⁵ On a donc pu dire que s'il y avait une inhibition pour ces promoteurs, il pouvait sûrement y avoir une inhibition aussi pour le promoteur TR5. Une étude de Gudmundsson⁴³ a démontré qu'il y avait présence d'interféron dans l'AAE et que la présence de cette molécule augmentait la présence de granulômes. On a donc la preuve de la présence d'interféron dans notre modèle. Une expérience simple pour déterminer le rôle que joue l'INF dans l'induction virale serait d'infecter des cellules *in vitro*, d'ajouter une quantité d'INF et de quantifier la production de protéine. Pour améliorer l'induction dans ce modèle on pourrait utiliser un bloqueur d'INF tel que Fk 506^{58,59} lors de l'instillation du vecteur. Une autre solution aurait été de construire un autre vecteur avec un promoteur qui est inductible dans un modèle inflammatoire ou d'utiliser des vecteurs $\Delta E4$.^{61,62} Ces vecteurs sont moins pro-inflammatoire et on une plus longue expression.

La seconde raison qui justifie les problèmes d'induction, est la double instillation de virus à une semaine d'intervalle. En effet, le fait de donner deux doses virales a sûrement permis une stimulation préalable du système immunitaire.⁷⁴ Pour remédier à ce problème, on ne devrait donner qu'une seule inhalation de virus mais avec une dose peut-être plus importante ou tout simplement plus tard dans l'expérience. On pourrait aussi donner la dose virale quelques jours avant les premières instillations au SR. On pourrait peut-être constater une protection au préalable par IL-10. Une stimulation avec des cytokines avant le début de la réaction inflammatoire peut peut-être changer le déroulement de l'inflammation.

On cherchait à infecter aussi les macrophages en plus des cellules épithéliales pulmonaires. Le problème est que les macrophages alvéolaires est une très mauvaise cible pour l'infection par l'adénovirus étant donné leur faible quantité de récepteur CAR à leur surface.⁵¹

On aurait pu réaliser plus d'expériences *in vitro*. Par exemple, on aurait pu utiliser les cellules du LBA et les infecter *in vitro* avec les vecteurs et regarder ce qu'elles relâchent comme molécules. Étant donné que les macrophages sont des cellules très importantes dans l'AAE, on aurait pu déterminer leur potentiel à être infecté par des vecteurs viraux. On n'a pas optimiser l'utilisation de la GFPq dans les tissus. En effet, on aurait pu mettre au point la technique pour voir le niveau d'infection du tissu.

En conclusion, on a cloné avec succès des ADNc de souris dans un vecteur adénovirus. Les vecteurs ont été amplifiés et produits à un titre très élevé. Ces mêmes vecteurs ont été induits *in vitro* et *in vivo* avec un niveau de protéines intéressant. La courbe du niveau de protéines en fonction du temps nous démontre une baisse importante de l'efficacité 10 jours après l'administration. Finalement, l'efficacité des vecteurs en présence d'un modèle d'AAE s'est avéré nulle.

Bibliographie

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. Cellular and molecular immunology. *W.B. Saunders Compagny Edition* . First Edition. 160-166. 1991.
2. Abbas, A.K., and Richard, A.F. Genetic models of immune and inflammatory diseases. *Serono Symposia USA Edition*. 89-92. 1996.
3. Acsadi, G., Massie B., and Jani A. Adenovirus-mediated gene transfer into striated muscles. *J.Mol.Med.* 73:165-180. 1995.
4. Acsadi, G., O'Hagan D., Lochmuller H., Prescott S., Laroche N., Nalbantoglu J., Jani A., and Karpati G. Interferons impair early transgene expression by adenovirus-mediated gene transfer in muscle cells. *J.Mol.Med.* 76:442-450. 1998.
5. Ando, M. and Suga, M. Hypersensitivity pneumonitis. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 3:391-395. 1997.
6. Apparailly, F., Verwaerde C., Jacquet C., Auriault C., Sany J., and Jorgensen C. Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* 160:5213-5220. 1998.
7. Balmes, J. R. Occupational and Environmental Respiratory Disease. Harber, Schenker et al. First Edition, 1038. 1996. Mosby-Year Book.
8. Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S. Crowell, R.L., and Finberg, R.W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275 :1320-1323. 1997.
9. Berkman, N., John M., Roesems G., Jose P.J., Barnes P.J., and Chung K.F. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL- 10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J.Immunol.* 155:4412-4418. 1995.
10. Bett, A. J., Prevec L., and Graham F.L. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J.Virol.* 67:5911-5921. 1993.
11. Bohl, D., Salvetti A., Moullier P., and Heard J.M. Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* 92:1512-1517. 1998.
12. Bramson, J. L., Graham F.L., and Gauldie J. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. *Curr.Opin.Biotechnol.* 6:590-595. 1995.

- 13 Cambell, J. M. Acute symptoms following work with hay. *Br.Med.J.* 2:1143-1144. 1932.
- 14 Chalfie, M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., and Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805. 1994.
- 15 Côté, J., Bouget, L., Garnier, A., and Kamen, A. Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring. *Biotechnol. Prog.* 13:109-114. 1997
- 16 Cormier, Y. and Belanger J. Long-term physiologic outcome after acute farmer's lung. *Chest* 87:796-800. 1985.
- 17 Cormier, Y., Israel-Assayag E., Fournier M., and Tremblay G.M. Modulation of experimental hypersensitivity pneumonitis by Sendai virus. *J.Lab.Clin.Med.* 121:683-688. 1993.
- 18 Cormier, Y. and Laviolette, M. Alvéolite allergique extrinsèque. *Encycl.Med.Chir.* 2-6. 1996.
- 19 Cormier, Y., Tremblay G.M., Fournier M., and Israel-Assayag E. Long-term viral enhancement of lung response to *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 149:490-494. 1994.
- 20 Crystal, R. G., West, J. B, Weibel, E. R, and Barnes, P. J. Pulmonary macrophages dans *The Lung*. 2ème édition 1, 859-875. 1999. Philadelphia.
- 21 Dakhama, A., Israel-Assayag E., and Cormier Y. Role of interleukin-2 in the development and persistence of lymphocytic alveolitis in farmer's lung. *Eur.Respir.J.* 11:1281-1286. 1998.
- 22 Denis, M. Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 151:164-169. 1995.
- 23 Denis, M., Cormier Y., Fournier M., Tardif J., and Laviolette M. Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 5:477-483. 1991.
- 24 Denis, M., Cormier Y., and Laviolette M. Murine hypersensitivity pneumonitis: a study of cellular infiltrates and cytokine production and its modulation by cyclosporin A. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 6:68-74. 1992.
- 25 Dinarello, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* . 112:321S-329S. 1997.
- 26 Dodet, B. Les voies de la thérapie génique. *Biofutur* . 20-35. 1992.

- 27 Draghia, R., Caillaud C., Manicom R., Pavirani A., Kahn A., and Poenaru L. Gene delivery into the central nervous system by nasal instillation in rats. *Gene Ther.* 2:418-423. 1995.
- 28 Drazan, K. E., Wu L., Bullington D., and Shaked A. Viral IL-10 gene therapy inhibits TNF-alpha and IL-1 beta, not IL-6, in the newborn endotoxemic mouse. *J.Pediatr.Surg.* 31:411-414. 1996.
- 29 Fei, R., Gott K., Edwards B., and Schuyler M. Experimental hypersensitivity pneumonitis: in vitro effects of interleukin-2 and interferon-gamma. *J.Lab.Clin.Med.* 126:485-494. 1995.
- 30 Feng, L., Tang W.W., Chang J.C., and Wilson C.B. Molecular cloning of rat cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) cDNA and expression in spleen and macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 192:452-458. 1993.
- 31 Garnier,A., Cote,J., Nadeau,I., Kamen,A., and Massie,B. Scale-up the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotech.* 15(1-3):145-155. 1994.
- 32 Gauldie, J., Graham, F., Xing, Z., Braciak, T., Foley, R., and Sime, P.J. Adenovirus-vector-mediated cytokine gene transfer to lung tissue. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 796 :235-244. 1996.
- 33 Ghadirian, E. and Denis M. Murine hypersensitivity pneumonitis: interleukin-4 administration partially abrogates the disease process. *Microb.Pathog.* 12:377-382. 1992.
- 34 Ghazizadeh, S., Carroll J.M., and Taichman L.B. Repression of retrovirus-mediated transgene expression by interferons: implications for gene therapy. *J.Virol.* 71:9163-9169. 1997.
- 35 Goodman, R. E., Oblak J., and Bell R.G. Synthesis and characterization of rat interleukin-10 (IL-10) cDNA clones from the RNA of cultured OX8- OX22- thoracic duct T cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189:1-7. 1992.
- 36 Greenberger, M. J., Kunkel S.L., Strieter R.M., Lukacs N.W., Bramson J., Gauldie J., Graham F.L., Hitt M., Danforth J.M., and Standiford T.J. IL-12 gene therapy protects mice in lethal Klebsiella pneumonia. *J.Immunol.* 157:3006-3012. 1996.
- 37 Graham, F. L. and Prevec L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology* 20:363-90:363-390. 1992.
- 38 Graham, F. L. and Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol.Biotechnol.* 3:207-220. 1995.

- 39 Graham, F. L., Smiley J., Russell W.C., and Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* 36:59-74. 1977.
- 40 Grenett, H. E., Fuentes N.L., and Fuller G.M. Cloning and sequence analysis of the cDNA for murine interleukin-6. *Nucleic.Acids.Res.* 18:6455. 1990
- 41 Grunig, G., Corry D. B. , Leach M. W. , Seymour B. W. , Kurup V. P. , and Rennick D.M. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J.Exp.Med.* 185:1089-1099. 1997.
- 42 Gudmundsson, G., Bosch A., Davidson B.L., BergD.J., and Hunninghake G.W. Interleukin-10 modulates the severity of hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 19:812-818. 1998.
- 43 Gudmundsson, G. and Hunninghake G. W. Interferon-gamma is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J.Clin.Invest.* 99:2386-2390. 1997.
- 44 Gudmundsson, G., Monick M.M., and Hunninghake G.W. IL-12 modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J.Immunol.* 161:991-999. 1998.
- 45 Harms, J. S. and Splitter G.A. Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum.Gene Ther.* 6:1291-1297. 1995.
- 46 Jani, A., Lochmuller, H., Acsadi,G., Simoneau,M., Huard,J., Garnier,A.,Karpati,G. and Massie,B. Generation, validation, and large scale production of adenoviral recombinants with large size inserts such as a 6.3 kb human dystrophin cDNA. *J.Virol Methods.* 64(2):111-124. 1997
- 47 Jolly, D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 1:51-64. 1994.
- 48 Jordan,M., Schallhorn, A., and Wurm, F.M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* 24:596-601. 1996.
- 49 Kaltreider, H. B. Hypersensitivity pneumonitis [see comments]. *West.J.Med.* 159:570-578. 1993.
- 50 Kambayashi, T., Jacob C.O., Zhou D., Mazurek N., Fong M., and Strassmann G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J.Immunol.* 155:4909-4916. 1995.

- 51 Kaner, R. J., Worgall S., Leopold P.L., Stolze E., Milano E., Hidaka C., Ramalingam R., Hackett N.R., Singh R., Bergelson J., Finberg R., Falck-Pedersen E., and Crystal R.G. Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors in vitro is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20:361-370. 1999
- 52 Kelley. J. Cytokines of the lung [see comments]. *Am.Rev.Respir.Dis.* 141:765-788. 1990.
- 53 Kozarsky, K. F. and Wilson J.M. Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 3:499-503. 1993.
- 54 Lalancette, M., Carrier G. , Laviolette M. , Ferland S., Rodrique J., Begin R., Cantin A., and Cormier Y. Farmer's lung. Long-term outcome and lack of predictive value of bronchoalveolar lavage fibrosing factors. *Am.Rev.Respir.Dis.* 148:216-221. 1993.
- 55 Laviolette, M., Carreau M., and Coulombe R. Bronchoalveolar lavage cell differential on microscope glass cover. A simple and accurate technique. *Am.Rev.Respir.Dis.* 138:451-457. 1988
- 56 Laye, S., Parnet P., Goujon E., and Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 27:157-162. 1994.
- 57 Lewin, B. Gene V. 1272. 1999.
- 58 Lochmuller, H., Petrof, B.J., Allen,C., Prescott, S., Massie, B., and Karpati, G. Immunosuppression by FK506 markedly prolongs expression of adenovirus-delivered transgene in skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15;213(2):569-574. 1995.
- 59 Lochmuller, H., Petrof, B.J., Pari, G., Larochelle, N., Dodelet, V., Wang, Q., Allen, C., Prescott, S., Massie, B., Nalbantoglu, J., and Karpati, G. Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Gene Ther.* 3(8):706-716. 1996
- 60 Lowe, W. L. and Da Silva, B. A. Cytokines. *Principles of Molecular Medicine.* 267-271. 1998.

- 61 Lusky, M., Christ M., Rittner K., Dieterle A., Dreyer D., Mourot B., Schultz H., Stoeckel F., Pavirani A., and Mehtali M. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J.Virol.* 72:2022-2032. 1998.
- 62 Lusky, M., Grave, L., Dieterle, A., Dreyer, D., Christ, M., Ziller, C., Furstenberger, P., Kintz, J., Hadji, D.A., Pavirani, A., and Mehtali, M. Regulation of adenovirus-mediated transgene expression by the viral E4 gene products: requirement for E4 ORF3. *J. Virol.* 73(10):8308-8319. 1999.
- 63 Massie, B., Mosser, D. D., koutroumanis, M., Vitté-Mony, I., Lamoureux, L., Couture, F., Paquet, L., Guilbault, C., Dionne, J., Chahla, D., Jolicoeur, P., and Langelier, Y. New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotech.* 28 :53-64. 1998.
- 64 Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D. D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., and Langelier, Y. Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline regulatable expression cassette. *J. Virol.* 72:2289-2296. 1998.
- 65 Moore, K. W., O'Garra A., de Waal M., Vieira P., and Mosmann T.R. Interleukin-10. *Annu.Rev.Immunol.* 11:165-90. 1993.
- 66 Moore, K. W., Vieira P., Fiorentino D.F., Trounstein M.L., Khan T.A., and Mosmann T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein- Barr virus gene BCRF1 *Science* 248:1230-1234. 1990.
- 67 Moriyoshi, K., Richards L.J., Akazawa C., O'Leary D.D., and Nakanishi S. Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane- targeted GFP. *Neuron* 16:255-260. 1996.
- 68 Mullick, A. and Massie B. Transcription, translation, and the control of gene expression. Wiley. In *Encyclopedia of cell technology* 1-3. 1999.
- 69 Nemerow, G.R. and Stewart, P.L. Role of alpha(v) Integrin in Adenovirus Cell Entry and Gene Delivery. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63 :725-734. 1999.
- 70 Perricaudet, M., Stratford-Perricaudet, L., Schaffar, L., and Tursz, T. La thérapie génique par adénovirus. *Pour la science* . 204 : 32-40. 1994.
- 71 Reijula, K. E. Two bacteria causing farmer's lung: fine structure of *Thermoactinomyces vulgaris* and *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Mycopathologia* 121:143-147. 1993.

- 72 Richards, C.D., Braciak, T., Xing, Z., Graham, F., and Gauldie, J. Adenovirus vector for cytokine gene expression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 762 :282-292. 1995.
- 73 Rosenberg, H. F. and Gallin, J. I. Inflammation. *Fundamental Immunology* . 1051-1066. 1999.
- 74 Russi, T. J., Hirschowitz E.A., and Crystal R.G. Delayed-type hypersensitivity response to high doses of adenoviral vectors. *Hum.Gene Ther.* 8:323-330. 1997.
- 75 Salvaggio, J. E. and Millhollon B. W. Allergic alveolitis: new insights into old mysteries. *Respir.Med.* 87:495-501. 1993.
- 76 Schultze, N., Burki Y., Lang Y., Certa U., and Bluethmann H. Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat.Biotechnol.* 14:499-503. 1996.
- 77 Shenk, T. Adenoviridae : The virus and their replication. Knipe, D.M and Hawley, P.M. Fields Virology Third Edition, 2119-2148. 1996. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
- 78 Sironi, M., Munoz C., Pollicino T., Siboni A., Sciacca F.L., Bernasconi S., Vecchi A., Colotta F., and Mantovani A. Divergent effects of interleukin-10 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells. *Eur.J.Immunol.* 23:2692-2695. 1993.
- 79 Tilg, H., Dinarello C.A., and Mier J.W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol.Today* 18:428-432. 1997.
- 80 Walters, R. W., Grunst T., Bergelson J.M., Finberg R.W., Welsh M.J., and Zabner J. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J.Biol.Chem.* 274:10219-10226. 1999.
- 81 Wollenberg, G. K., DeForge L. E. , Bolgos G., and Remick D.G. Differential expression of tumor necrosis factor and interleukin-6 by peritoneal macrophages in vivo and in culture. *Am.J.Pathol.* 143:1121-1130. 1993.
- 82 Xing, Z., Braciak, T., Jordana M., Croitoru K., Graham F.L., and Gauldie J. Adenovirus-mediated cytokine gene transfer at tissue sites. Overexpression of IL-6 induces lymphocytic hyperplasia in the lung. *J.Immunol.* 153:4059-4069. 1994.



Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

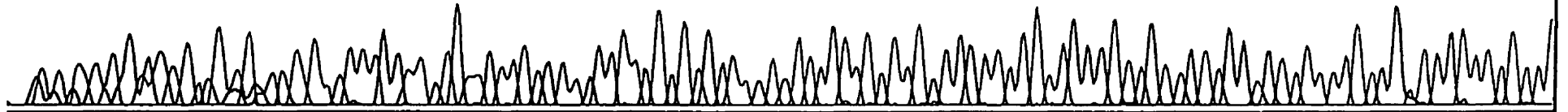
17PJ2
IL-6 + p.MARIA
17PJ2
Lane 17

Signal G:144 A:249 C:222 T:154
DT (dR Set Any-Primer)
dRhod
Points 938 to 8268 Base 1: 938

Page 1 of 2
Thu, Feb 26, 1998 12:10
Wed, Feb 25, 1998 14:17
Spacing: 10.01(10.01)

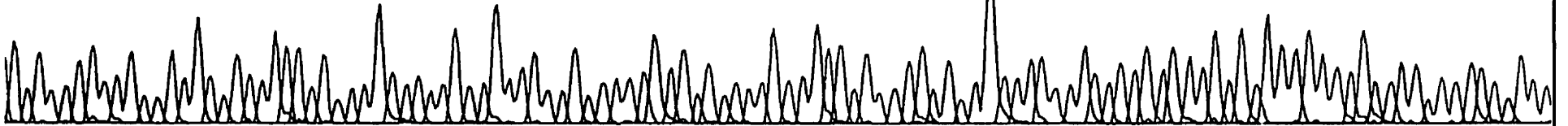
NTCCTCAAGGGTCAC C CACCTCAAGTTGCAAGATCCCAATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACTTCCA TCCAGT TGCCTTCTTGGGACTGA TGCTGGTGACAACCA CGGCCTTCCCTACTT

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120



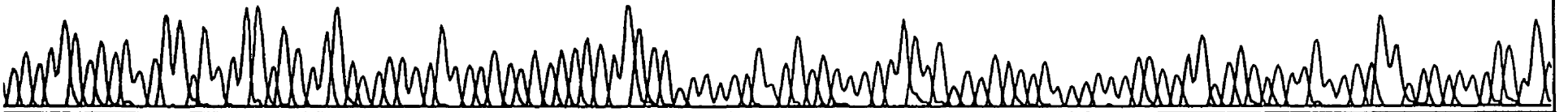
ACAAGTCGGAGAGGAGACTTACAGAGGATACCA CTCCCAACAGACCTG TCTA TAC CA CT TCACA AG TOG GA GGCTTAA TTACA CA TG TTC TC TGGGAAATCG TGAA A TGAGAAA

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240



GAGTTGTGCAA TGCAA TTC TGA TTG TA TGAA CAA CGA TGA TGCA CTMG CAGA AAACA ATC TGAA AC TTCCA GAG ATACAAA GAA ATGATGATGC TACCA AACTGGATA TAATCAGGA

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360



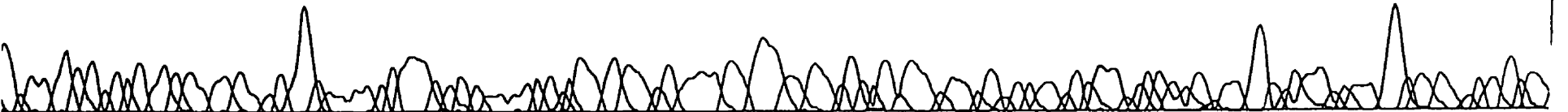
ATTGTCCTAT TGAAAATT TCTCTGGTCTTC TGGA GTACCA TAGCTACCTG GAG TACA TGA AGA ACA ACTTAA AAGATA ACAA GAAAGACAAGCCAGAGTC CTTCAGAGATACAGAAC

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480



TAATTCATATC TTCAACCA A GGG TAAAGATT TACA TAAA ATAGC CTCC TACCC CA ATTC A ATG C TC C TA ACAGA TAAGCTGAGAGT ACA GA A GAGTGGCTAA GACCAAGACCATTC

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610



Annexe A



Model 377
Version 3.0
ABI100
Version 3.0

20•IL-10
IL-10...
Lane 20

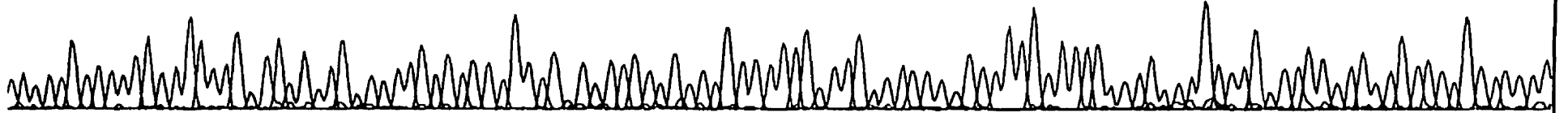
Signal G:73 A:88 C:77 T:75
DT (dR Set Any-Primer)
dRhod
Points 960 to 8256 Base 1: 960

Page 1 of 2
Fri, Mar 6, 1998 11:30 AM
Thu, Mar 5, 1998 5:56 PM
Spacing: 10.23(10.23)

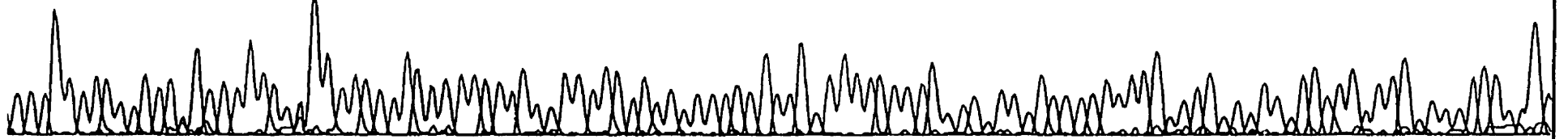
TTCACAGCTGTGATCTCCAGATCCAAGTTGGGAAGATCTGCCATGCTGGCTCAGCACIGCTATGCTGCCCTGCTCTTACTGACIGGCCATGAGGATCAGCAGGGGCCAGTACAGCCGGGAAGACA
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130



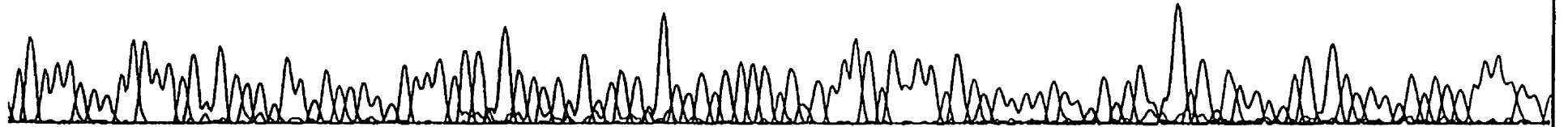
TAACTGCACCCACTTCCCAGTCGGCCAGAGCCACATGCTCCTAGAGCTGGGGACTGCCCTCAGCCAGGTGAA GACTTCTTTCAAAACAAAGGACCA GCTGGACAACA TACTGC TAACC
140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240



ACTCC TTAATG CANGACTTTAAGGGTTACTTTGGGTTGCCAAGCCTTATCGGAAATGATCCAGTTTCTCTGGTACAGCTGATGCCCAAGGAGAGCATGGCCCA GAAATCAAGGA
50 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360



CAATTGAA TTCCTGGG TGAGAAGCTGAAGACCTCANGATGGGGCIGANGCGCTGTCA TCGATTTCTCCCTG TGAAAATAAGAGCAAGGCAGTGGAGCAGG TGAAGAGTATTTAAT
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480



AGCTCCAAGACCAANGTCTTACAATGCCATGATGAATTTGACATCTTCA TCAAC TIGCA TAGAA CATACATGATGATCAAAAATGAA AAGCTAAAACKCTG CAGTGTGTATTG AGTCNGO
90 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610



Annexe B

Interleukine-6

atgaagttcctctctgcaagagacttccatccagttgccttcttgggactgatgctggtgacaaccacggccttccctactt
cacaagtccggagaggagacttcacagaggataccactcccaacagacctgtctataccacttcacaagtcggagg
cttaattacacatgttctctgggaaatcgtggaaatgagaaaagagttgtgcaatggcaattctgattgatgaacaacg
atgatgcactgcagaaaacaatctgaaacttccagagatacaaagaaatgatggatgctaccaactggataataat
aggaaattgcctattgaaaattcctctcggcttctggagtacatagctacctggagtacatgaagaacaacttaaag
ataacaagaaagacaaagccagagtccttcagagagatacagaaactctaattcatatcttcaaccaagaggtaa
agattacataaaaatagtccttctaccccaattccaatgctctcctaacagataagctggagtacagaaggagtggc
taaggaccaagaccatccaattcatcttgaaatcactgaagaatttctaaaagtcactttgagatctactcggcaaacct
agtgcggtatgcctaagcatatc

Interleukine-10

atgcctggctcagcactgctatgctgcctgcttactgactggcatgaggatcagcaggggcccagtacagccgggaa
gacaataactgcacccacttcccagtcggccagagccacatgctcctagagctgaggactgccttcagccaggtgaa
gactttcttcaaacaaaggaccagctggacaacatactgctaaccgactccttaatgcaggactttaagggttacttgg
gttgccaagccttatcggaatgatccagtttacctggtagaagtgatgccccaggcagagaagcatggcccagaaa
tcaaggagcattgaattccctgggtgagaagctgaagaccctcaggatgcccgtgaggcgtgcatcgatttctaaa
atgtgaaaataagagcaaggcagtgaggcaggtgaagagtgatttaataagctggaagaccaaggtgtctacaag
gcatgaatgaattgacatctcatcaactgcatagaagcatacatgatgatcaaatgaaaagctaaaacacctgc
agtgtgattgagctgctggactccaggacctagacagagctctctaaatcigatccagggatcttagctaacggaaac
aactccttgaaaacctcgtttgtacctctccgaaatattattacctctgataacctcagttccat

Annexe B

A	293A-Lovernight	IC5589 Mnlx=126.8			Barrière A		
MOI	V	C	Y(brut)	Ypos	V/C	-LN(1-Y)	reg
0.00	0.00E+00	1.84E+06		0.00%	0.00E+00	0	0.123
0.04	4.00E-07	1.84E+06	2.80%	1.80%	2.17E-13	0.018	0.157
0.09	1.00E-06	1.84E+06	11.80%	10.80%	5.43E-13	0.114	0.212
0.27	3.00E-06	1.84E+06	38.50%	37.50%	1.63E-12	0.470	0.391
0.89	1.00E-05	1.84E+06	77.50%	76.50%	5.43E-12	1.448	1.017
2.68	3.00E-05	1.84E+06	94.00%	93.00%	1.63E-11	2.659	2.805
8.94	1.00E-04	1.84E+06	96.50%	95.50%	5.43E-11	3.101	

pente(m) 1.65E+11 1.23E-01 b LINEST
 (y,x,1,1)
 se(m) 1.79E+10 1.26E-01 se(b) Matrice
 5 x2
 r2 9.55E-01 2.54E-01 sev
 F 8.45E+01 4.00E+00 df pente
 =titre
 ssreg 5.45E+00 2.58E-01 ssresid

AdTR5F/IL-6 K7 GFPq

A	293A-Lovernight	IC5589 Mnlx=126.8			Barrière A		
MOI	V	C	Y(brut)	Ypos	V/C	-LN(1-Y)	reg
0.00	0.00E+0	1.84E+06		0.00%	0.00E+00	0.00	0.50
0.05	4.00E-07	1.84E+06	18.80%	17.80%	2.17E-13	0.20	0.54
0.11	1.00E-06	1.84E+06	40.20%	39.20%	5.43E-13	0.50	0.61
0.34	3.00E-06	1.84E+06	70.50%	69.50%	1.63E-12	1.19	0.84
1.14	1.00E-05	1.84E+06	93.60%	92.60%	5.43E-12	2.60	1.64
3.42	3.00E-05	1.84E+06	98.20%	97.20%	1.63E-11	3.58	3.92
11.41	1.00E-04	1.84E+06	97.60%	96.60%	5.43E-11	3.38	

pente(m) 2.10E+11 4.99E-01 b LINEST
 (y,x,1,1)
 se(m) 4.39E+10 3.10E-01 se(b) Matrice
 5 x2
 r2 8.51E-01 6.23E-01 sev
 F 2.29E+01 4.00E+00 df pente
 =titre
 ssreg 8.88E+00 1.55E+00 ssresid

Adtr5F/IL-10 k7 GFPq

Annexe C

Données de la quantité de IL-10 en ng/ml sur des cellules KB pour déterminer le meilleur rapport entre tTA et AdTR5F/IL-10

Rapport tTA/IL-10	1/8	1/4	1/2	1	2	KBrTA
	193.89	260.98	305.70	321.88	219.58	619.03
	186.98	269.77	244.08	397.29	255.50	494.13
Moyenne	190.43	265.37	274.89	359.59	237.54	556.58
écart type +/-	4.88	6.21	43.57	53.32	25.39	88.31

Données de la quantité de IL-6 en ng/ml sur des cellules KB pour déterminer le meilleur rapport entre tTA et AdTR5F/IL-6

Rapport tTA/IL-6	1/8	1/4	1/2	1	2	KBrTA
	1420.84	1422.38	1548.72	1687.91	1513.28	3647.00
	1880.23	2031.23	2707.12	3032.74	2668.09	1707.94
Moyenne	1650.53	1726.80	2127.92	2360.32	2090.68	2677.47
écart type +/-	324.84	430.52	819.11	950.93	816.56	1,371.12

ANNEXE D

Expérience *In vivo* pour voir la réaction inflammatoire de différentes doses d'AdTR5 chez la souris

Saline				tTA			
	Vol LBA	Cellules totales	Cellules/ml	Vol LBA	Cellules totales	Cellules/ml	
	1.00	2.50	140.00	16.80	2.00	234.00	35.10
	2.00	2.00	70.00	10.50	2.50	185.00	22.20
	3.00	2.00	110.00	16.50	2.75	93.00	10.15
	4.00	2.00	145.00	21.75	2.40	86.00	10.75
	5.00				2.50	164.00	19.68
Moyenne			16.39				19.58
Ecart Type			4.60				11.76

IL-6 1E+8				IL-6 5E+8			
	Vol LBA	Cellules totales	Cellules/ml	Vol LBA	Cellules totales	Cellules/ml	
	1.00	2.50	227.00	27.24	2.50	750.00	90.00
	2.00	2.00	215.00	32.25	2.50	990.00	118.80
	3.00	2.50	186.00	22.32	2.70	47.00	5.22
	4.00	1.75	66.00	11.31	2.00	580.00	87.00
	5.00						
Moyenne			23.28				75.26
Ecart Type			8.95				48.84

IL-6 1E+9				IL-10 1E+8			
	Vol LBA	Cellules totales	Cellules/ml	Vol LBA	Cellules totales	Cellules/ml	
	1.00	2.50	500.00	60.00	2.00	159.00	23.85
	2.00	2.40	650.00	81.25	2.70	270.00	30.00
	3.00	2.50	125.00	15.00	2.50	75.00	9.00
	4.00	1.20	570.00	142.50	2.00	105.00	15.75
	5.00				2.50	60.00	7.20
Moyenne			74.69				17.16
Ecart Type			52.98				9.19

IL-10 5E+8			IL-10 1E+9			
	Vol LBA	Cellules totales	Cellules/ml	Vol LBA	Cellules	Cellules/ml

				totales		
1.00	0.75	114.00	45.60	2.50	157.00	18.84
2.00	2.00	149.00	22.35	2.50	460.00	55.20
3.00	2.50	157.00	18.84	1.00	60.00	18.00
4.00	2.00	78.00	11.70	2.50	370.00	44.40
5.00	1.75	90.00	15.43	2.00	80.00	12.00
Moyenne			22.78			29.69
Ecart Type			14.67			18.65

Annexe E

ELISA IL-6 dans le LBA de souris saline

Qté virus		0.00E+00	1.00E+08	5.00E+08	1.00E+09
	1	0	57.983	142.073	128.883
	2		44.792	143.31	298.712
	3				
	4		34.075	618.586	294.59
Moyenne		0	45.6166667	301.323	240.728333
Ecart type		#DIV/0!	11.9753151	274.758514	96.8828244

ELISA IL-10 dans le LBA de souris saline

Qté virus	saline		1.00E+08	5.00E+08	1.00E+09
	1	0	33.321	157.64	5.874
	2		18.387	120.102	0
	3		15.965	29.285	1.838
	4			182.665	10.314
	5		4.663		
Moyenne		0	18.084	122.423	4.5065
Ecart type		#DIV/0!	11.7880077	67.2046867	4.5835411

Annexe F

Détermination de la quantité max de TTA nécessaire pour avoir une production max de protéine

	0/0	0,5/1,0	1,0/1,0	1,5/1,0	2,5/1,0	5,0/1,0
1	0	158.01	326.38	0.00	677.57	56.00
2	0	144.18	963.32	42.17		49.86
3		355.57		865.61	161.08	4.69
4		374.62	220.38	146.95	224.07	11.45
5		113.46	0.00	50.78	304.26	124.52
6				692.94	285.52	162.62
Moyenne	0	229.17	377.52	299.74	330.50	68.19
Ecart Type	0	125.31	413.52	378.50	201.99	62.97

Annexe G

Temps versus la quantité d'IL-6 produit dans le LBA de souris

	saline	Jour 2	Jour 4	Jour 10	Jour 16
1	0	1484.19	3465.68	0	53.016
2		0	1246.66	0	28.35
3		5719.08	1231.04	9.59	0
4		655.97	3281.28	0	45.373
5		7813.08	4718.96	161.754	6.463
6		777.86	1393.56	233.319	0
fact dil 10					
Moyenne	0	2741.69667	2556.19667	67.4438333	22.2003333
Ecart Type	.#DIV/0!	3221.45539	1473.30251	103.346075	23.4851845