

Table des matières

Table des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction	8
Etude bibliographique :	10
I. Vaccination.....	10
I.A. Généralités	11
I.B. Les différents types de vaccins. Avantages et limites	13
I.B.1 Vaccins vivants	14
I.B.2 Vaccins inertes	15
I.C. Place du vaccin vectorisé en médecine humaine et vétérinaire	16
II. Vecteurs adénoviraux	17
II.A. Biologie des adénovirus.....	18
II.A.1 Structure	18
II.A.2 Génome	20
II.A.3 Cycle viral	21
II.B. Historique du développement des vecteurs adénoviraux. Potentialités, limites	24
II.B.1 Vecteurs réplicatifs.....	24
II.B.2 Vecteurs défectifs pour la réplication.....	24
II.B.3 Nouvelle génération de vecteurs	25
II.C. Modification du tropisme des adénovirus pour une vectorologie ciblée	26
III. Vaccination orale par vecteur adénoviral.....	27
III.A. Intérêts de l'administration orale.....	27
III.B. Obstacles rencontrés lors d'une vaccination orale.....	28
III.C. Mécanisme d'induction d'une réponse immunitaire acquise dans l'intestin	30
III.D. Limites de l'administration d'adénovirus par voie orale	32
III.E. La stratégie adoptée dans ce travail : Utilisation de la variété de comportements des sérotypes d'adénovirus humains.....	33
III.E.1 Présentation des sérotypes d'adénovirus humains	33
III.E.2 Utilisation de la variété de tropisme des virus pseudotypés pour la fibre	35
Etude des interactions moléculaires des adénovirus avec la muqueuse intestinale	37
I. Matériels et méthodes.....	37

Table des matières

I.A.	Cellules	37
I.B.	Virus	39
I.B.1	Amplification	40
I.B.2	Préparation des stocks viraux	40
I.B.3	Purification	41
I.B.4	Titration	41
I.C.	Infection cellulaire	42
I.D.	Mesure de la transduction des cellules	43
I.D.1	Luminométrie	43
I.D.2	Révélation de l'activité β -galactosidase <i>in situ</i>	44
I.E.	Attachement viral	44
I.F.	Quantification de l'attachement sur cellules non différenciées : cytométrie en flux	45
I.G.	Quantification de l'attachement et de la translocation virale : PCR quantitative en temps réel des génomes viraux et cellulaires	47
I.H.	Localisation du récepteur CAR par microscopie confocale	49
II.	Résultats	51
II.A.	Différences de transduction des cellules Caco-2 clone Tc7 et mICcl2 par deux virus à fibre CAR-dépendante	51
II.B.	Relation avec la localisation du récepteur d'attachement CAR	53
II.C.	Capacités de transduction des différents vecteurs adénoviraux	54
II.D.	Efficacité comparée de l'attachement des différents vecteurs adénoviraux	57
II.E.	Translocation des adénovirus	60
III.	Discussion	62
III.A.	Etude complète des interactions des adénovirus humains avec la muqueuse intestinale	62
III.B.	Différences de susceptibilité à l'infection par les adénovirus des lignées entérocytaires Caco-2 humaine et mICcl2 murine	63
III.C.	Sélection de vecteurs viraux aux comportements différents vis-à-vis de la muqueuse intestinale (traversée vs infection de l'épithélium)	63
III.D.	Perspectives : importance des interactions adénovirus-cellules épithéliales dans l'induction d'une immunité muqueuse chez la souris et la biodistribution du virus	66
	Conclusion	67
	Références bibliographiques	68

Table des figures

<u>Figure 1</u> :	Mise en jeu de l'immunité innée et de l'immunité acquise après infection par un pathogène	11
<u>Figure 2</u> :	Induction d'une réponse immunitaire acquise dirigée contre une infection virale. ...	12
<u>Figure 3</u> :	Particules adénovirales visualisées au microscope électronique	18
<u>Figure 4</u> :	Structure d'une particule adénovirale	19
<u>Figure 5</u> :	Structure de la fibre de l'adénovirus	20
<u>Figure 6</u> :	Organisation génomique de l'adénovirus de sérotype 2	20
<u>Figure 7</u> :	Interactions séquentielles des adénovirus de sérotype 2 et 5 avec la surface cellulaire	22
<u>Figure 8</u> :	Etapas de la phase précoce du cycle adénoviral	23
<u>Figure 9</u> :	Barrières physiques et mécaniques de la muqueuse intestinale	29
<u>Figure 10</u> :	Réponse immunitaire intestinale après franchissement de la muqueuse intestinale par les antigènes	31
<u>Figure 11</u> :	Culture sur filtre de cellules Caco-2 Tc7	38
<u>Figure 12</u> :	Suivi de la polarisation des cellules Caco-2 et mICcl2 sur filtre	39
<u>Figure 13</u> :	Génération de la banque d'adénovirus non répliatifs et pseudotypés pour la fibre	40
<u>Figure 14</u> :	Observation d'un tapis cellulaire de 293 non infecté et d'un tapis présentant un effet cytopathique	42
<u>Figure 15</u> :	Infection des cellules polarisées sur filtre	43
<u>Figure 16</u> :	Emission de photons après décarboxylation oxydative du substrat luciférine par la luciférase de luciole	43
<u>Figure 17</u> :	Coloration X-Gal	44
<u>Figure 18</u> :	Diagramme obtenu après passage de cellules marquées au FACS	46
<u>Figure 19</u> :	2 étapes de la réaction de PCR en présence de la molécule fluorescente Sybr Green	47
<u>Figure 20</u> :	Courbes de fluorescence du Sybr Green pour la gamme plasmidique lors d'une PCR luciférase.	48
<u>Figure 21</u> :	Transduction des cellules Caco-2 et mICcl2 polarisées sur filtre par les virus pseudotypés avec la fibre longue du sérotype 40 ou par le vecteur sérotype 5	51

Table des figures

<u>Figure 22</u> : Localisation du récepteur CAR à la surface des cellules Caco-2 et mICcl2 polarisées sur filtre	53
<u>Figure 23</u> : Transduction des Caco-2 clone Tc7 polarisées sur filtre par l'ensemble des vecteurs pseudotypés pour la fibre et portant le transgène luciférase	55
<u>Figure 24</u> : Transduction des mICcl2 polarisées sur filtre par l'ensemble des vecteurs pseudotypés pour la fibre et portant le transgène luciférase	56
<u>Figure 25</u> : Attachement des vecteurs pseudotypés pour la fibre et portant le transgène luciférase à la surface des cellules Caco-2 clone Tc7	58
<u>Figure 26</u> : Attachement des vecteurs pseudotypés pour la fibre et portant le transgène luciférase à la surface des cellules mICcl2	59
<u>Figure 27</u> : Translocation du pôle apical au pôle baso-latéral des particules virales des vecteurs pseudotypés pour la fibre	61

Liste des tableaux

<u>Tableau I</u> :	Classification des sérotypes d'adénovirus humains	33
<u>Tableau II</u> :	Diversité des tropismes naturels des adénovirus humains dont sont dérivées les fibres des virus pseudotypés	34
<u>Tableau III</u> :	Synthèse des résultats de transduction, d'attachement et de translocation sur les cellules Caco-2 et mICcl2	64

Liste des abréviations

AAV :	virus associé à l'adénovirus (« <u>a</u> d <u>e</u> n <u>o</u> - <u>a</u> s <u>s</u> o <u>c</u> i <u>a</u> t <u>e</u> d <u>v</u> i <u>r</u> u <u>s</u> »)
Ad :	adénovirus
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
CAR :	récepteur commun au virus coxsackie B3 et à l'adénovirus (« <u>c</u> o <u>s</u> a <u>c</u> k <u>i</u> e <u>a</u> n <u>d</u> <u>a</u> d <u>e</u> n <u>o</u> v <u>i</u> r <u>u</u> s <u>r</u> e <u>c</u> e <u>p</u> t <u>o</u> r »)
CAV :	adénovirus canin (« <u>c</u> a <u>n</u> i <u>n</u> e <u>a</u> d <u>e</u> n <u>o</u> v <u>i</u> r <u>u</u> s »)
CELO :	adénovirus aviaire de type 1, souche CELO du poulet (« <u>c</u> h <u>i</u> c <u>k</u> e <u>n</u> <u>e</u> m <u>b</u> r <u>y</u> o <u>l</u> e <u>t</u> h <u>a</u> l <u>o</u> r <u>p</u> h <u>a</u> n »)
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	cytomégalovirus humain
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
CsCl :	chlorure de césium
DECP ₅₀ :	dose pour laquelle on observe un effet cytopathogène sur 50% des cellules infectées
DMEM :	milieu de Eagle modifié par Dulbecco (« <u>D</u> u <u>l</u> b <u>e</u> c <u>c</u> o's <u>m</u> i <u>n</u> i <u>m</u> u <u>m</u> <u>e</u> s <u>s</u> e <u>n</u> t <u>i</u> a <u>l</u> <u>m</u> o <u>d</u> i <u>f</u> i <u>e</u> d <u>m</u> e <u>d</u> i <u>u</u> m »)
EBV :	virus d'Epstein Barr (« <u>E</u> p <u>s</u> t <u>e</u> i <u>n</u> <u>B</u> a <u>r</u> r <u>v</u> i <u>r</u> u <u>s</u> »)
ECP :	effet cytopathogène
EGF :	facteur de croissance épithélial (« <u>e</u> p <u>i</u> t <u>h</u> e <u>l</u> i <u>a</u> l <u>g</u> r <u>o</u> w <u>t</u> h <u>f</u> a <u>c</u> t <u>o</u> r »)
FAE :	épithélium associé au follicule (« <u>f</u> o <u>l</u> l <u>i</u> c <u>l</u> e- <u>a</u> s <u>s</u> o <u>c</u> i <u>a</u> t <u>e</u> d <u>e</u> p <u>i</u> t <u>h</u> e <u>l</u> i <u>u</u> m »)
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine (« <u>f</u> l <u>u</u> o <u>r</u> e <u>s</u> c <u>e</u> i <u>n</u> <u>i</u> s <u>o</u> t <u>h</u> i <u>o</u> c <u>y</u> a <u>n</u> a <u>t</u> e »)
gC, gE, gI :	glycoprotéine C, E ou I du virus d'Aujeszky
HAM's F12 :	milieu nutritif de Ham
HBV :	virus de l'hépatite B (« <u>h</u> e <u>p</u> a <u>t</u> i <u>t</u> i <u>s</u> <u>B</u> <u>v</u> i <u>r</u> u <u>s</u> »)
Ig :	immunoglobuline
ITR :	répétitions terminales inversées (« <u>i</u> n <u>v</u> e <u>r</u> t <u>e</u> d <u>t</u> e <u>r</u> m <u>i</u> n <u>a</u> l <u>r</u> e <u>p</u> e <u>a</u> t <u>s</u> »)
L _{Tc} :	lymphocyte T cytotoxique

Liste des abréviations

Luc :	luciférase
MLP :	promoteur tardif majeur (« <u>m</u> ajor <u>l</u> ate <u>p</u> romotor »)
moi :	multiplicité d'infection (« <u>m</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection »)
NK :	cellule tueuse (« <u>n</u> atural <u>k</u> iller »)
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne (« <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction »)
pIgR :	récepteur polymérique aux immunoglobulines
RID :	récepteur d'internalisation et de dégradation
RIMH :	réponse immunitaire à médiation humorale
RIMC :	réponse immunitaire à médiation cellulaire
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
SV40 :	virus simien 40 (« <u>s</u> imian <u>v</u> irus »)
SVF :	sérum de veau fœtal
TNF :	facteur de nécrose tumorale (« <u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor »)
TRITC :	isothiocyanate de tétraméthyle rhodamine (« <u>t</u> etramethyl <u>r</u> hodamine <u>i</u> sothiocy <u>a</u> nate)
UV :	ultraviolet
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
X-Gal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D galactopyranoside

Introduction

Les maladies infectieuses constituent la première cause de mortalité chez les enfants et les jeunes adultes principalement dans les pays en voie de développement. D'après le rapport de l'OMS de 1999, on compte ainsi plus de 13 millions de décès par an à la suite d'une maladie infectieuse.

Malgré l'action combinée des thérapeutiques et des mesures sanitaires qui avait beaucoup diminué l'impact de nombreux agents infectieux, nous avons pu assister, ces dernières décennies, à l'émergence de nouvelles maladies infectieuses (avec comme exemples frappants, les fièvres hémorragiques virales, le SIDA, les encéphalopathies spongiformes transmissibles, le syndrome respiratoire aigu sévère ou SRAS) et à l'augmentation de la prévalence de nombreuses affections connues (parmi lesquelles le paludisme, la tuberculose, le choléra, les trypanosomiasés). Ces émergences ou réémergences inquiétantes mettent l'accent sur le renouvellement permanent de la menace des maladies infectieuses, qui est lié à des changements de l'environnement, du mode de vie ou du comportement humain. Il apparaît ainsi indispensable d'accroître la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et de rechercher un nouvel arsenal vaccinal et thérapeutique, d'autant plus que se développent de plus en plus de résistances des agents infectieux aux thérapeutiques actuelles (antibiotiques ou antiviraux).

Les vaccins actuels ont démontré leur capacité à limiter l'incidence des maladies infectieuses visées (rougeole, diphtérie,...), voire à éliminer l'agent pathogène ciblé après l'établissement de campagnes mondiales d'éradication. Ainsi, l'éradication de la variole de la surface de la planète déclarée en 1980 par l'OMS ou l'éradication en cours de la poliomyélite sont des exemples prouvant le grand intérêt de cette méthode préventive. Mais il semble fondamental de renouveler les stratégies vaccinales. Les vaccins conventionnels ont en effet montré leurs limites dans la lutte contre les maladies chroniques comme le SIDA ou l'hépatite C, avec l'obtention d'une protection partielle et insuffisante le plus souvent.

Dans le laboratoire de virologie (UMR 1161) de l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort, nous nous intéressons aux vaccins vectorisés et plus particulièrement aux vecteurs adénoviraux, qui ont montré dans de nombreux essais leur potentialité d'induction d'une

réponse vaccinale forte et durable après administration parentérale (intramusculaire et sous-cutanée tout particulièrement). Cependant, ces vecteurs se sont révélés moins efficaces lors d'administration muqueuse. La voie orale allie facilité d'administration et efficacité de protection au site même d'entrée de multiples pathogènes animaux et nous cherchons donc à optimiser les vecteurs adénoviraux pour une administration orale.

Je me suis donc penchée sur l'étude des étapes limitantes de l'interaction des vecteurs adénoviraux humains actuels avec la muqueuse intestinale, reconstituée *in vitro* et sur la recherche d'adénovirus plus efficaces.

Cette thèse est divisée en deux parties. La première partie présente les stratégies de vaccination actuellement étudiées et évaluées, la place et le développement de la vaccination vectorisée en mettant l'accent sur les vaccins adénoviraux et enfin les contraintes découlant d'une immunisation orale. Dans la deuxième partie, figure mon étude des interactions des adénovirus avec l'épithélium intestinal.

Etude bibliographique :

Utilisation des vecteurs adénoviraux pour la vaccination

I. Vaccination

La découverte du concept de vaccination remonte à la fin du XVIII^e siècle. A cette époque, la variole, due à l'infection par un poxvirus, était une maladie redoutable et hautement contagieuse, pouvant tuer des dizaines de milliers de personnes lors d'épidémie. Or les fermiers en contact avec des bovins atteints de vaccine (ou variole de la vache, dont l'agent étiologique est également un poxvirus) et présentant les lésions cutanées bénignes (pustules) associées à cette maladie n'étaient jamais malades de variole humaine. Le médecin anglais Edward Jenner entreprit alors, sur cette constatation, la première expérience de vaccination : quelques mois après l'injection à un jeune garçon de matériel provenant d'une pustule due à une infection par le virus vaccine, ce garçon fut protégé contre l'injection du virus variole, démontrant une protection croisée à partir de virus apparentés. Cette protection croisée est aujourd'hui mise à profit dans quelques vaccins vétérinaires. Ainsi ce type d'approche est utilisé pour la vaccination des lapins contre la myxomatose, des poules contre la maladie de Marek ou des chiens contre l'hépatite de Rubarth.

Cependant, ce n'est qu'une centaine d'années après l'expérience de Jenner que Louis Pasteur mit au point les premiers vaccins, s'attaquant au choléra de la poule, au rouget du porc, au charbon des ovins ou à la rage. Ces développements ne furent possibles qu'après la découverte fortuite de l'atténuation des pathogènes dans certaines conditions expérimentales (chaleur,...) et constituèrent la pierre fondatrice de la vaccination actuelle.

La vaccination présente un double intérêt dans la lutte contre un agent pathogène : au niveau individuel, en protégeant de l'infection ou du moins de la maladie l'individu vacciné et au niveau collectif, en diminuant la circulation du pathogène au sein d'une population (par diminution de l'excrétion de l'agent pathogène et augmentation du seuil de réceptivité des individus sains).

I.A. Généralités

La vaccination consiste en l'introduction d'antigènes ou fragments immunogènes d'un agent pathogène, en vue de la stimulation d'une immunité protectrice spécifique contre ce pathogène. Elle sollicite donc la constitution d'une immunité acquise ou adaptative.

La réponse immunitaire des vertébrés à un pathogène se caractérise par la co-existence d'une immunité innée et d'une immunité acquise, complémentaires et coopératives. Le système immunitaire inné, plus ancien sur le plan évolutif, constitue une première défense contre les agents infectieux. Activé très précocement après l'entrée du pathogène au travers de la peau ou des muqueuses (voir figure 1), il est dirigé contre des structures partagées par des groupes de pathogènes et met en jeu la phagocytose des micro-organismes par les phagocytes (macrophages ou polynucléaires neutrophiles), la cytotoxicité naturelle des cellules NK et l'activation du système du complément principalement. Il va également réguler et orienter la réponse acquise.

Le système immunitaire acquis n'intervient que plusieurs jours après l'infection, après stimulation au niveau des organes lymphoïdes des cellules lymphocytaires spécifiques et ayant une forte affinité pour les antigènes. Ce système possède de plus une mémoire, capable d'amplifier et d'accélérer la réponse immunitaire lors d'un contact ultérieur avec le même pathogène. Les autres particularités de ce système sont sa diversité, caractérisée par un large répertoire lymphocytaire (pouvant reconnaître jusqu'à 10^9 à 10^{11} antigènes différents).

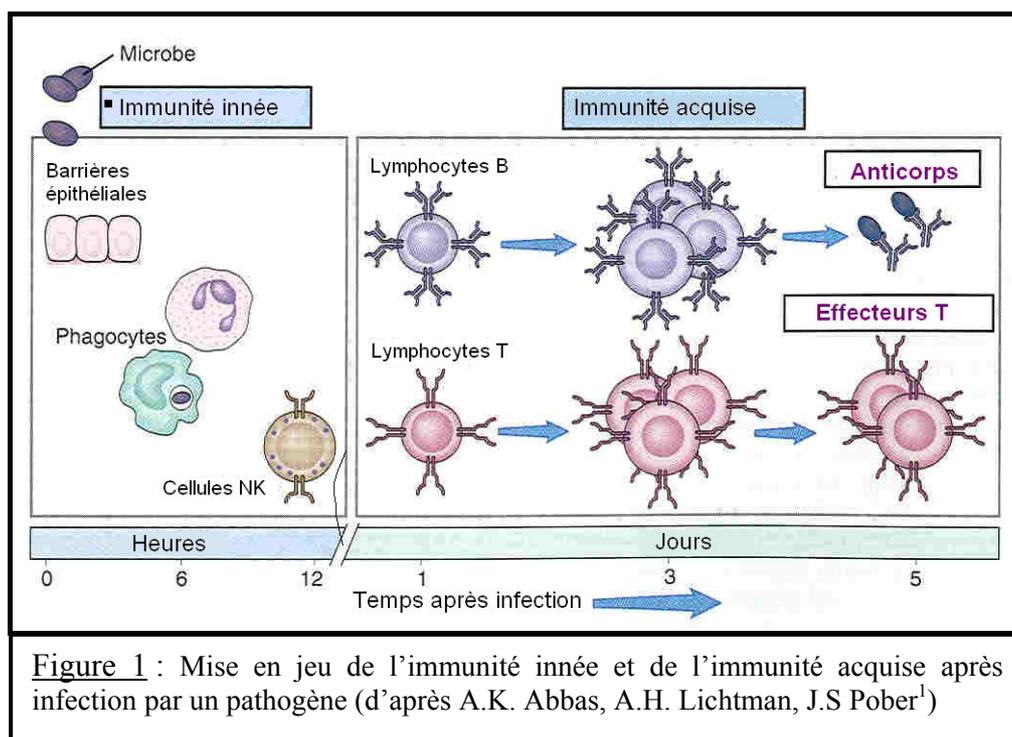


Figure 1 : Mise en jeu de l'immunité innée et de l'immunité acquise après infection par un pathogène (d'après A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S Pober¹)

La réponse immunitaire acquise peut être schématisée en deux : la réponse immunitaire à médiation humorale (RIMH), caractérisée par la sécrétion d'anticorps et la réponse immunitaire à médiation cellulaire (RIMC), aboutissant à la lyse des cellules présentant des antigènes étrangers (voir figure 2).

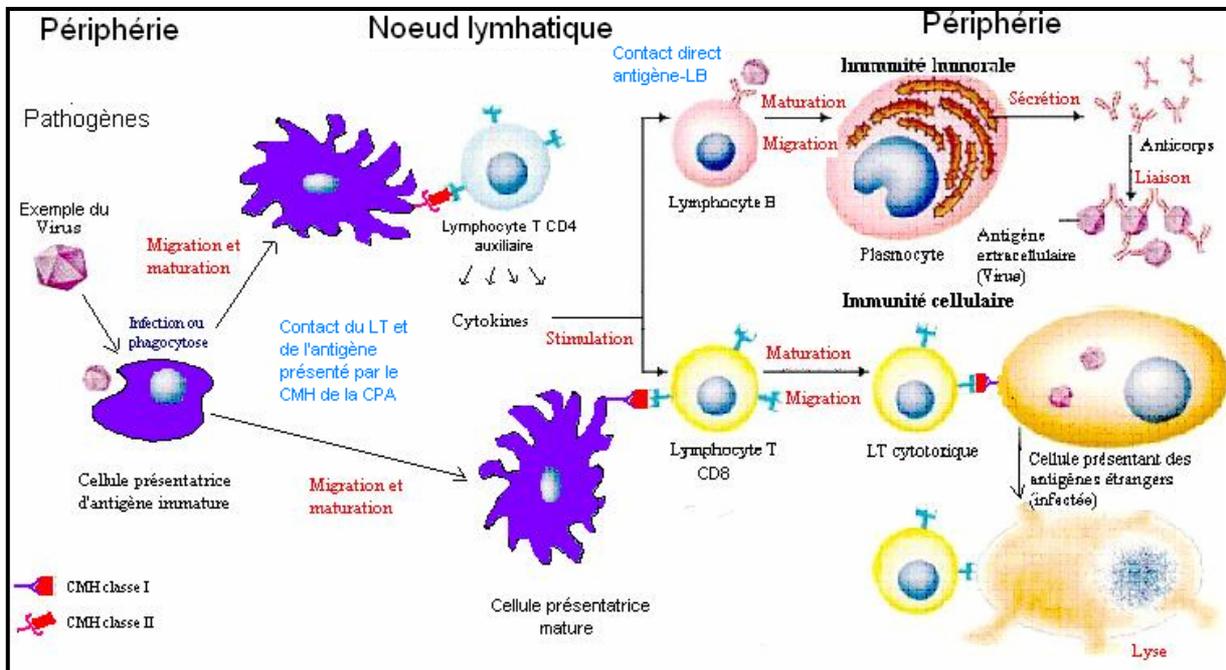


Figure 2 : Induction d'une réponse immunitaire acquise dirigée contre une infection virale. Organisation d'(adapté d'après ¹).

La RIMH assure la protection contre les pathogènes extracellulaires et les toxines grâce à la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B activés. Elle nécessite la reconnaissance directe de l'antigène par un lymphocyte B spécifique, ce qui entraîne la maturation et la différenciation de cette cellule en plasmocyte sécréteur d'anticorps après coopération avec des lymphocytes T auxiliaires. Les anticorps produits peuvent :

- neutraliser un pathogène libre en se fixant à sa surface et en bloquant ainsi sa liaison sur ses cellules cibles²²,
- entraîner l'opsonisation des pathogènes, ce mécanisme correspondant à une phagocytose médiée par les anticorps
- provoquer la lyse des pathogènes complexés aux anticorps après activation de la voie du complément.

On reconnaît 5 types d'anticorps ou immunoglobulines (Ig) : IgA, D, E, G et M. Les IgM sont présentes sur les lymphocytes B non activés et correspondent aux premières immunoglobulines synthétisées lors d'une première stimulation antigénique (lors d'une première vaccination par exemple), alors que les IgG, plus affines, sont les anticorps les plus

abondants par la suite ou lors de restimulation. Un autre type d'immunoglobuline nous intéresse particulièrement : les IgA sécrétoires spécifiques des muqueuses.

La RIMC intervient dans la détection de pathogènes intracellulaires ou de cellules tumorales, à la suite d'une présentation d'antigènes anormaux à la surface des cellules. Elle a pour point de départ l'interaction d'un lymphocyte T avec une cellule présentatrice d'antigènes (ou CPA, spécialisée comme le macrophage ou la cellule dendritique, ou non spécialisée). La cellule dendritique constitue la CPA la plus efficace pour la stimulation des lymphocytes T naïfs. La reconnaissance par le lymphocyte T à la surface de la CPA mature d'un peptide provenant de la fragmentation de l'antigène anormal et complexé à une molécule de l'hôte, le CMH (ou complexe majeur d'histocompatibilité) conduit à sa stimulation. Dans le cas d'un lymphocyte T CD8+, cette reconnaissance passe par la présentation peptidique dans le contexte du CMH de type I. Par la suite, la présentation du peptide anormal dans le même contexte à la surface de cellules infectées ou tumorales aboutit à la lyse de la cellule inspectée par le lymphocyte T CD8+ cytotoxique (L_{TC}) activé. Cette lyse découle soit d'un processus direct basé sur des altérations de la membrane plasmique par la perforine ou le granzyme libérés par le L_{TC} ou indirect suite à l'envoi d'un signal de mort cellulaire ou apoptose (en empruntant la voie du Tumor Necrosis Factor (TNF) par exemple).

Ces deux types de réponses humorale et cellulaire sont complémentaires et reliés grâce à l'existence d'une communication constante entre les différents effecteurs de la réponse immunitaire innée ou acquise. Cette communication est assurée par la sécrétion de protéines, appelées cytokines, par les CPA et lymphocytes auxiliaires essentiellement. Elle assure une orchestration de la réponse immunitaire en fonction du pathogène et de sa localisation (intra ou extracellulaire), de la voie de présentation de l'antigène et donc du type de vaccin administré.

I.B. Les différents types de vaccins. Avantages et limites

Suite aux avancées de l'immunologie fondamentale, des technologies de production et à la meilleure connaissance des interactions hôte-pathogène, de nouvelles approches vaccinales ou des améliorations des approches classiques sont apparues ces quinze dernières années, pour les deux types de vaccins existant : les vaccins vivants et les vaccins inertes.

I.B.1 Vaccins vivants

Parmi les approches classiques, les **vaccins vivants atténués** constituent la stratégie vaccinale la plus couramment utilisée. Ils reposent sur l'utilisation d'un microorganisme apparenté apathogène ou peu pathogène pour l'espèce cible (par exemple, utilisation de l'adénovirus canin de type 2 (CAV2) pour la vaccination contre l'hépatite de Rubarth associée au virus CAV1, anciennement de la vaccine contre la variole) ou d'un microorganisme atténué par passages successifs en culture cellulaire ou sur une espèce différente de l'espèce cible, permettant alors l'apparition et la sélection de mutants avirulents ou très peu virulents. Ces virus atténués gardent la capacité de se multiplier chez l'hôte, et cette multiplication est associée à une bonne réponse immunitaire humorale et cellulaire, proche de celle observée dans la nature contre le pathogène ciblé. Mais cette propriété de multiplication laisse craindre une possible réversion vers un phénotype virulent, comme il a été décrit lors de la vaccination contre la poliomyélite par la souche atténuée Sabin⁶⁸. Aussi, aujourd'hui, une méthode plus rationnelle reposant sur une délétion ou une mutagenèse ciblée des gènes de virulence des pathogènes est préférée. On peut citer en exemple les vaccins commercialisés contre la maladie d'Aujeszky du porc, où des mutations ou délétions visent au moins un des 4 gènes de virulence thymidine kinase, gE, gC ou gI.

Vaccins vivants de conception récente, les **vaccins vectorisés** sont des vaccins recombinants obtenus par manipulation du génome de vecteurs bactériens ou viraux, dans lesquels les gènes codant les protéines immunogènes d'un pathogène (ou transgène) sont insérés. Salmonelles, Listeria et colibacilles peuvent servir de vecteurs bactériens. Les principaux vecteurs viraux à l'étude actuellement sont les poxvirus, les herpèsvirus et les adénovirus. Ils suscitent des réponses immunitaires à la fois humorales et cellulaires contre les antigènes apportés^{82,139}. Le choix d'un vecteur viral répliquatif ou non répliquatif repose sur un compromis entre la dose nécessaire à l'induction d'une immunité et les aspects de biosécurité, puisque les vecteurs non répliquatifs doivent souvent être utilisés à des doses plus élevées mais sont aussi plus sûrs en terme de diffusion. Ces deux types de vecteurs ont fait leur preuves dans le contexte des vecteurs poxviraux : le virus de la vaccine répliquatif porteur du gène de la glycoprotéine G du virus rabique s'est montré capable de vacciner le renard contre la rage par voie orale¹⁹, permettant d'éliminer le réservoir sauvage de la rage de vastes zones européennes ; un canarypoxvirus non répliquatif chez les mammifères¹¹⁶ et exprimant des immunogènes du rétrovirus de la leucose féline est aujourd'hui utilisé en médecine vétérinaire¹¹⁵.

I.B.2 Vaccins inertes

La production des vaccins inertes a d'abord fait appel à la réalisation d'une étape d'inactivation du pathogène grâce à un traitement chimique (formol, éthylène imine,...) ou physique (chaleur, rayonnement UV,...). Ces traitements assurent une bonne stabilité et innocuité au **vaccin inactivé** mais peuvent altérer l'immunogénicité des protéines³⁵. Afin d'obtenir une réponse immune satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une quantité importante de l'agent pathogène inactivé et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvant, deux facteurs qui expliquent leur coût de production plus élevé. De plus, ces vaccins ne donnent souvent qu'une immunité courte et ne comportant qu'une composante humorale, nécessitant des rappels assez rapprochés.

On compte aussi parmi les vaccins inertes les **vaccins sous unitaires**, à base de protéines purifiées ou recombinantes très immunogènes d'un micro-organisme, correspondant souvent aux protéines de surface exposées naturellement au système immunitaire (par exemple, vaccination du chat contre l'herpès virus félin ou vaccination humaine contre le virus de l'hépatite B par administration des protéines d'enveloppe de ces virus). Cependant, ils donnent une immunité variable.

L'aboutissement ultime de la démarche réductionniste qui consiste à définir de plus en plus finement les cibles de la réponse immune, et donc les constituants nécessaires d'un vaccin, est représenté par les **vaccins peptidiques**. Ne sont inclus dans ces vaccins que les peptides ou épitopes reconnus dans le cadre de la réponse immunitaire acquise par les lymphocytes B ou T. De manière à obtenir une immunogénicité correcte, ces peptides doivent le plus souvent être couplés à une protéine porteuse (comme l'ovalbumine) et être adjuvés. De tels peptides ont pu être utilisés avec succès pour vacciner le chien contre la parvovirose canine⁵⁹. Néanmoins cette approche n'a pas débouché pour l'instant sur un vaccin commercialisé.

Ces deux derniers types de vaccins, protéiques et peptidiques, présentent une très grande innocuité.

Les progrès des biotechnologies ont permis la mise au point des **vaccins à ADN**, dans lesquels le gène vaccinal codant une protéine immunogène d'un pathogène est cloné dans un plasmide bactérien, sous le contrôle d'un promoteur eucaryote pour une expression optimale dans les cellules de l'individu vacciné. Ces vaccins, faciles à produire et stables, sont parfois capables d'induire des réponses cellulaires fortes, après administration intramusculaire ou

intradermique. Mais ce type de vaccin soulève un problème potentiel de sécurité : le risque d'intégration de l'ADN vaccin dans le génome cellulaire. En plus, ces vaccins donnent pour l'instant des résultats décevants chez l'homme⁹¹, et de manière générale dans les espèces autres que la souris.

I.C. Place du vaccin vectorisé en médecine humaine et vétérinaire

Les vaccins vivants vectorisés représentent a priori un bon compromis entre les vaccins vivants atténués et les vaccins inertes. Ils présentent l'antigène de façon adéquate au système immunitaire, sans poser les problèmes de réversion vers la pathogénicité qui peuvent être craints avec les vaccins vivants atténués.

Ces vaccins pourraient répondre au besoin en nouvelles technologies vaccinales, afin de prévenir ou de soigner efficacement certains cancers ou maladies infectieuses telles que le SIDA. Les études expérimentales avec les différents systèmes vectorisés disponibles démontrent l'efficacité de nombreux vecteurs viraux. Les alphavirus ont été testés dans le cadre de la vaccination contre la malaria chez la souris¹²¹ et les poxvirus contre la rougeole chez le macaque¹¹¹. Les orthomyxovirus (virus responsables de la grippe) peuvent susciter une réponse immunitaire contre une protéine accessoire du virus VIH (virus de l'immunodéficience humaine)³⁷. Les virus associés à l'adénovirus (AAV) se sont montrés efficaces dans l'induction d'une réponse protectrice contre le VIH¹³⁶, sans oublier l'adénovirus, qui apparaît comme un vecteur vaccinal intéressant contre le SIDA¹⁰⁷ ou le virus Ebola¹¹².

Pourtant, en médecine humaine préventive, il n'existe pas aujourd'hui de vaccin basé sur l'utilisation de vecteurs viraux. En médecine vétérinaire, comme on l'a vu précédemment, un petit nombre de vaccins vectorisés sont aujourd'hui commercialisés, dans le cadre de la lutte contre la rage des renards (en Europe) ou des coyotes (aux Etats-Unis), ou pour empêcher la maladie causée par le virus de la leucose féline, la maladie de Carré du chien (aux Etats-Unis) ou la rage féline (Etats-Unis).

Le domaine de la vaccination est en constante évolution et cette évolution tend à s'accélérer sous la pression du renouvellement de ses objectifs, résultant de l'apparition de nouvelles formes d'agents pathogènes et de nouvelles exigences en matière de sécurité et

d'efficacité, ainsi que de l'amélioration des techniques et des connaissances sur les pathogènes et le système immunitaire. Les vecteurs vaccinaux viraux s'inscrivent dans cette évolution et offrent des résultats encourageants, avec des vaccins vétérinaires maintenant commercialisés et des essais en cours chez l'homme. Les vecteurs adénoviraux, bien qu'encore au stade de développement, fournissent des résultats plus que prometteurs contre les maladies humaines^{71,107} ou vétérinaires^{24,120}.

II. Vecteurs adénoviraux

Le premier adénovirus fut découvert par Rowe en 1953 à partir d'explants d'amygdales humaines, à la suite de la visualisation d'effets cytopathogènes dus à la multiplication d'un virus⁹².

Depuis, son étude a profité à de multiples disciplines de la biologie : en biologie cellulaire, Sharp et ses collègues ont ainsi utilisé l'adénovirus et mis en évidence l'épissage des ARN messagers¹⁴ ; de plus, l'adénovirus humain sérotype 12 a été le premier virus humain à démontrer un potentiel oncogène dans une espèce non permissive (le hamster nouveau-né)¹³⁷.

Malgré cette dernière caractéristique ne concernant d'ailleurs que certains adénovirus, il n'existe actuellement aucune preuve en faveur d'un rôle oncogène des adénovirus chez l'homme. Les adénovirus, dont on compte aujourd'hui plus d'une centaine de sérotypes et qui sont retrouvés dans pratiquement toutes les espèces animales de mammifères et d'oiseaux, sont associés chez l'homme à des infections mineures des surfaces épithéliales du tractus respiratoire et digestif ou de l'œil (conjonctivites, kérato-conjonctivites, pharyngites, broncho-pneumonies, gastro-entérites)¹²⁶. Par contre, les infections à adénovirus sont parfois associées à des maladies sévères chez le chien (hépatite de Rubarth), chez la dinde (entérite hémorragique), chez la poule (virus CELO),...

Les vecteurs adénoviraux actuels dérivent principalement des adénovirus humains. Nous allons donc surtout nous intéresser aux caractéristiques de ces virus du point de vue structural, génomique et de leurs interactions avec leurs cellules cibles, qui peuvent avoir des répercussions sur leur développement en tant que vecteur vaccinal.

II.A. Biologie des adénovirus

Actuellement, ont été isolés une cinquantaine de sérotypes d'adénovirus humains, qui sont répartis en 6 sous-groupes A, B, C, D, E et F. Cependant, les virus les plus étudiés et utilisés dans les essais de vaccination appartiennent essentiellement au sous-groupe C (il s'agit des adénovirus sérotype 2 et 5).

II.A.1 Structure

Les particules adénovirales d'un diamètre de 60 à 110 nm sont non enveloppées et constituées extérieurement d'une capsidie icosaédrique (voir figure 3). La capsidie est essentiellement composée de trois protéines de structure : l'hexon constituant les faces de l'icosaèdre, la base du penton et la fibre s'associant pour former le complexe penton à chacun des 12 sommets (voir figure 4).

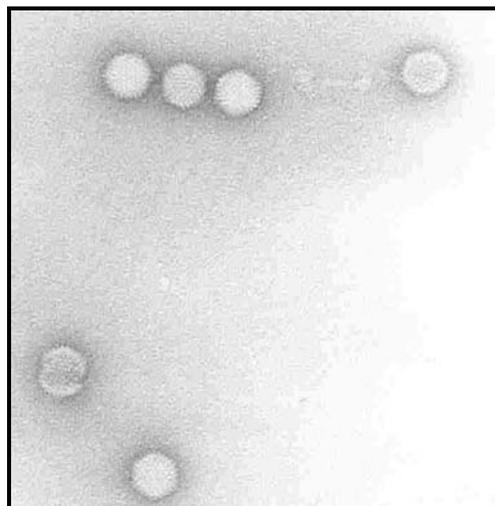
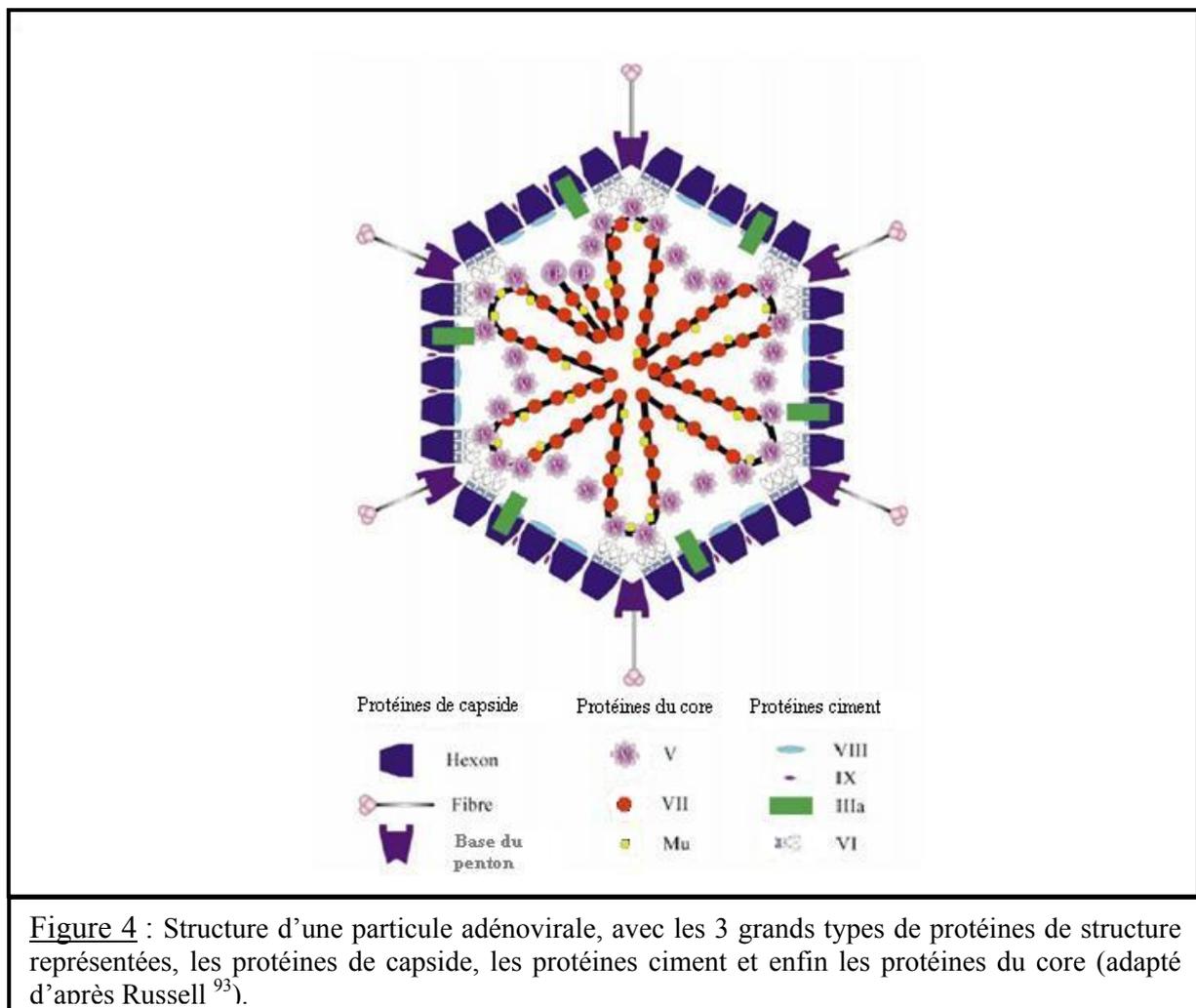


Figure 3 : Particules adénovirales visualisées en microscopie électronique, après coloration négative au molybdate d'ammonium. Grossissement : 35000 fois.

La stabilité de la capsidie est assurée par les protéines internes IIIa, VI, VIII et IX associées aux hexons et pentons. Trois protéines basiques V, VII et μ s'associent étroitement à l'ADN pour former une structure de type nucléoprotéine (voir figure 4). La protéine TP (Terminal Protein), présente en 2 exemplaires dans la particule virale, est liée de façon covalente aux extrémités 5' des 2 brins d'ADN⁸⁵.



Une structure qui nous intéresse tout particulièrement est le penton, puisque c'est la protéine fibre appartenant au penton qui a été modifiée dans le cadre de cette étude pour créer de nouveaux vecteurs. Le penton est constitué du penton base impliqué dans l'internalisation du virus¹³⁰ et d'une fibre saillante responsable de l'attachement du virus au récepteur cellulaire⁷⁹.

La fibre est un assemblage trimérique du polypeptide IV (voir figure 5)²⁶. Sa queue N-terminale de 40 acides aminés assure l'ancrage de la fibre sur le penton base¹⁷. La tige est constituée de plusieurs répétitions d'un motif d'une quinzaine d'acides aminés, avec 6 à 22 répétitions selon le sérotype considéré. Elle joue un rôle fondamental dans la capacité d'infection du virus, en gouvernant la flexibilité de la fibre^{4,104}. Enfin, la tête globulaire C-terminale (180-200 acides aminés) organisée selon une succession de feuilletts β nommés de A à J est la partie impliquée dans la reconnaissance du virus avec son récepteur primaire et dans l'attachement sur la cellule cible⁵¹.



Les protéines codées par E1 (E1A et E1B), premières protéines virales traduites, sont importantes pour la régulation du cycle viral. Ainsi, E1A contrôle la transcription des autres régions E du génome adénoviral⁷⁵ et en particulier la région E2 codant les enzymes nécessaires à la réplication virale. Les protéines E1A et E1B sont également impliquées dans la modification de l'environnement cellulaire, en inhibant la traduction des ARNm cellulaires par blocage de leur transport vers le cytoplasme⁶ et en induisant l'entrée de la cellule infectée en phase S du cycle cellulaire, afin de préparer la cellule à la multiplication de l'ADN. La région E1 est donc indispensable à la réplication virale et constitue un site de délétion intéressant dans la synthèse de vecteurs non répliatifs.

La région E3 est une autre région intéressante à modifier pour les vecteurs vaccinaux de par ses fonctions immunorégulatrices¹³¹. En effet, E3 code pour des protéines permettant l'échappement aux défenses antivirales de l'hôte. Elle diminue la réaction inflammatoire de l'hôte et intervient aussi dans l'établissement de la réponse acquise : une première protéine (la gp19K) retient les molécules de CMH I dans le réticulum endoplasmique¹⁰, empêchant la présentation des antigènes viraux à la surface de la cellule et permettant aux cellules d'échapper à la lyse par les L_{Tc}, tandis qu'un complexe protéique RID $\alpha\beta$ entraîne l'internalisation et la dégradation des récepteurs pro-apoptotiques (par exemple Fas ou le récepteur au TNF)¹⁰⁶.

II.A.3 Cycle viral

Le cycle viral complet dure de 30 à 36 heures et aboutit à la production d'un grand nombre de particules filles (environ 10 000 néo-virions par cellule infectée). Il se découpe schématiquement en 3 grandes phases : la phase précoce, la phase de réplication de l'ADN viral et la phase tardive.

Phase précoce

Cette phase débute avec l'interaction de la particule adénovirale avec la membrane plasmique de la cellule cible. Les adénovirus ont été les premiers virus pour lesquels la participation d'une série de récepteurs cellulaires pour l'attachement ou l'internalisation a pu être montrée (voir figure 7).

Cette interaction débute donc par l'attachement à un récepteur primaire, qui a d'abord été déterminé pour les adénovirus des sérotypes 2 et 5^{12,119}. Il s'agit de la molécule CAR,

récepteur commun au virus coxsackie B3 (appartenant à la famille des picornaviridae), d'où son acronyme (Coxsackie and Adenovirus Receptor). Ce récepteur est en fait partagé par au moins un des membres de chaque sous-groupe, excepté le sous-groupe B⁹⁰. Cette glycoprotéine membranaire appartenant à la famille des immunoglobulines et à la fonction encore inconnue est présente sur la plupart des cellules sauf les cellules hématopoïétiques, propriété qui participe au tropisme large des adénovirus.

Il n'existe cependant pas de corrélation claire entre l'expression de CAR dans les tissus et la biodistribution du virus *in vivo* après inoculation systémique chez la souris, laissant supposer que des récepteurs de plus faible affinité (sulfates d'héparanes³³ ou chaîne lourde du CMH classe I⁵²,...) ou des récepteurs non identifiés pourraient influencer sur l'efficacité d'infection *in vivo*.

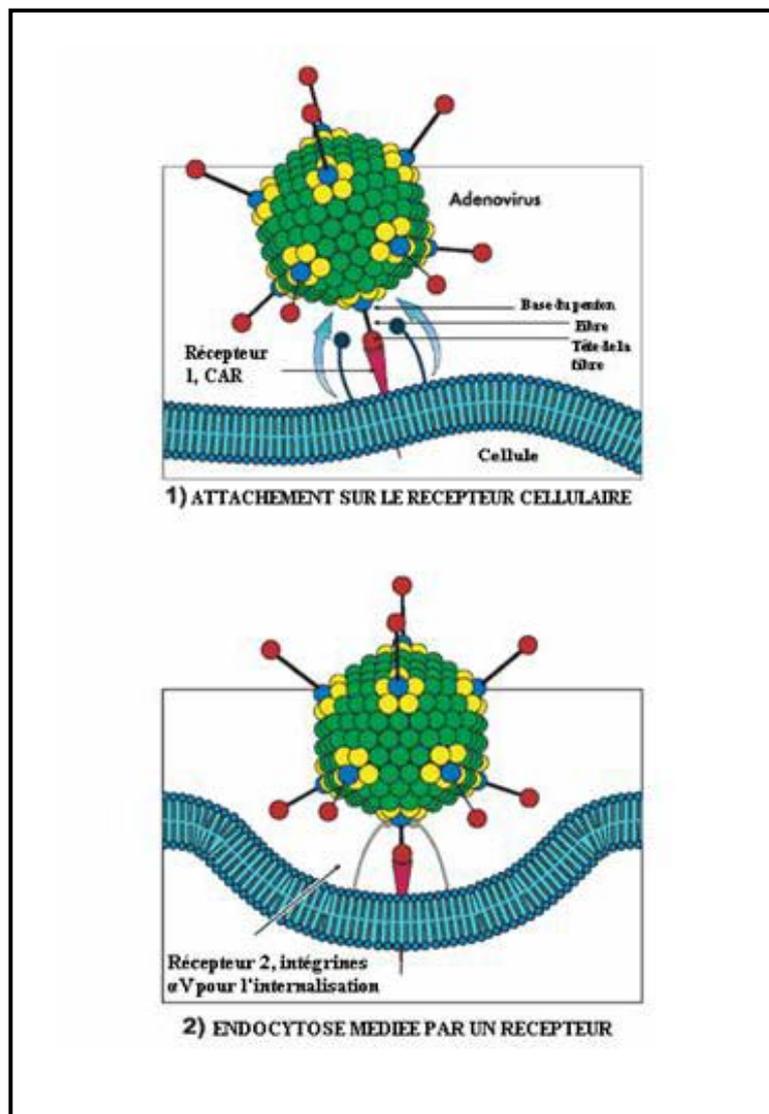


Figure 7 : Interactions séquentielles des adénovirus de sérotype 2 et 5 avec la surface cellulaire, permettant l'attachement puis l'internalisation de la particule virale (d'après http://qbiogene.com/products/adenovirus/ch7_intro.shtml).

Par la suite, l'internalisation fait appel à l'interaction entre le penton base (et son motif RGD) et les intégrines membranaires $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ ^{61,130}. Le regroupement des intégrines ainsi crée facilite l'entrée de l'adénovirus par endocytose, principalement au sein de vésicules à clathrine⁶⁴.

Après décrochage séquentiel des protéines structurales composant la capsid et le ciment⁴⁶, le core est libéré dans le cytoplasme (voir figure 8).

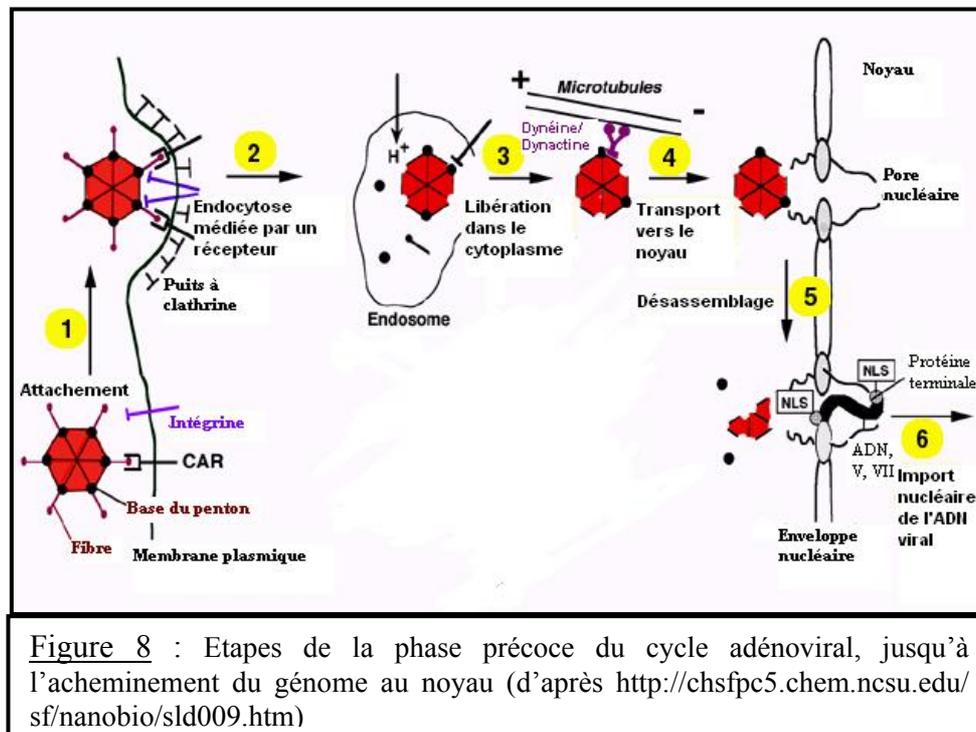


Figure 8 : Etapes de la phase précoce du cycle adénoviral, jusqu'à l'acheminement du génome au noyau (d'après <http://chsfpc5.chem.ncsu.edu/sf/nanobio/sld009.htm>)

Réplication de l'ADN viral

L'ADN viral est finalement acheminé au noyau, permettant le début de la réplication dès 2 heures post-infection.

Phase tardive

La transcription virale pendant cette phase est sous contrôle d'un seul promoteur MLP (Major Late Promotor). Elle entraîne la synthèse des protéines structurales, s'assemblant dans le noyau pour former des capsides dans lesquelles l'ADN nu pénètre⁹⁶. Ce mode d'assemblage impose une limite de taille pour l'ADN viral encapsidé correspondant à 105% de la taille du génome sauvage¹⁵, qu'il faut prendre en considération lors de la construction de vecteurs recombinants. Le dépassement de cette limite conduirait à l'obtention de mutants se multipliant lentement et à la sélection rapide de virus porteurs de gènes tronqués.

Les adénovirus présentent donc des caractéristiques intéressantes en vectorologie. Ce sont des virus nus donc peu fragiles, qui infectent un large spectre de cellules (dont les cellules qui ne se divisent plus) et présentent un faible pouvoir pathogène naturel. Le génome viral persiste en position extra chromosomique et n'est donc pas intégré au génome cellulaire. Les vecteurs recombinants sont relativement faciles à construire et à produire en grande quantité (obtention de stocks viraux à haut titre) et leur capacité de clonage importante (8000 nucléotides environ) permet l'insertion dans leur génome de grands transgènes. Plusieurs sérotypes (du sous-groupe C principalement) sont bien caractérisés sur le plan génétique et biochimique, permettant leur utilisation contrôlée comme vecteurs d'expression *in vitro* et *in vivo*.

II.B. Historique du développement des vecteurs adénoviraux.

Potentialités, limites

Le développement des vecteurs adénoviraux comme vecteurs de gènes remonte aux années 1990. Il a d'abord conduit à la construction de vecteurs réplicatifs puis non réplicatifs, essentiellement pour des raisons de biosécurité.

II.B.1 Vecteurs réplicatifs

Ces vecteurs vont être capables d'une multiplication dans les cellules permissives, suite à la délétion d'une région non essentielle à la réplication du virus, comme E3. Ils sont à l'origine de l'induction de fortes réponses immunes²⁴ quelle que soit la voie d'administration et sont capables d'induire une réponse muqueuse après administration locale²¹.

Ces vecteurs vaccinaux très efficaces posent cependant d'importants problèmes de biosécurité, avec d'une part une possible dissémination non contrôlée au sein de l'organisme dans des tissus ou cellules différentes des cibles attendues et d'autre part un risque de dissémination via l'environnement vers d'autres sujets.

Ces risques ont été nettement atténués avec la génération de vecteurs défectifs⁷⁸.

II.B.2 Vecteurs défectifs pour la réplication

La première génération de ces vecteurs a été rendue défective pour la réplication par délétion de E1, et de E3 si on s'intéresse à la vaccination. Ces virus, incapables de se multiplier, doivent être produits sur cellules transcomplémentant la région E1. Ces virus

assurent une réponse immunitaire dirigée contre le transgène longue et durable, avec des anticorps pouvant être détectés plusieurs mois après injection dans certains modèles⁵³ et une réponse cytotoxique forte. Ces réponses sont toutefois très dépendantes de la dose inoculée, de la voie d'injection, de l'expression et de l'immunogénicité du transgène, ainsi que de l'hôte vacciné.

Ils offrent ainsi de nombreux exemples de protection vaccinale : contre l'HBV (virus de l'hépatite B)⁶⁰, le VIH ou son homologue simien^{20,23,107}, des flavivirus parmi lesquels le virus de la fièvre jaune¹⁰⁹, l'EBV (virus Epstein Barr)⁸³, le virus de la rougeole⁹⁵ ou contre des maladies vétérinaires comme l'Aujeszky², la fièvre aphteuse⁷⁰, l'herpèsvirus bovin de type 1⁴³ ou la péritonite infectieuse féline⁴⁴.

Pourtant, ces vecteurs présentent aussi des limitations. De nombreuses études montrent en effet chez les animaux immunocompétents une diminution rapide, dès 2-3 semaines post-injection, de l'expression du produit du transgène au sein des tissus infectés⁶⁷. Cet effet particulièrement gênant lors de l'utilisation des vecteurs adénoviraux en thérapie génique, est dû à une faible expression résiduelle des protéines de l'adénovirus à l'origine d'une inflammation importante au site d'administration et d'une immunité anti-vecteur faisant disparaître les cellules infectées. L'immunité et plus particulièrement les anticorps circulants anti-vecteur peuvent également perturber un protocole vaccinal, en diminuant l'efficacité des réadministrations du même vecteur par des mécanismes de neutralisation⁹.

Cependant, les vecteurs adénoviraux sont souvent très efficaces dès leur première injection pour induire une réponse protectrice, la réponse anti-vecteur restant marginale par rapport à celle dirigée contre le produit du transgène. De plus, il est possible de détourner la réponse anti-vecteur en utilisant des vecteurs dérivés d'autres sérotypes⁵⁴ ou en utilisant des vecteurs avec des délétions supplémentaires²⁹ comme les vecteurs de deuxième génération.

Ces derniers comportent des délétions additionnelles dans les régions E2 ou E4, qui résultent en une diminution de l'expression des protéines virales et en une expression prolongée du transgène *in vivo*¹²⁹. Mais on constate toujours l'induction d'une réponse humorale et cytotoxique dirigée contre le vecteur à partir de l'inoculum viral.

II.B.3 Nouvelle génération de vecteurs

De nouveaux vecteurs ont vu le jour récemment afin de répondre aux limitations des vecteurs défectifs, parmi lesquels les virus gutless³⁸, dépourvus de l'ensemble des protéines

virales et ne conservant que les extrémités du génome viral, les vecteurs hybrides⁸⁷ associant la capacité d'infection des adénovirus et la capacité d'intégration des rétrovirus ou des virus associés à l'adénovirus (AAV).

On assiste aussi au développement de vecteurs à partir des adénovirus animaux pour une utilisation dans leur espèce respective afin de pallier la spécificité d'hôte restreinte de l'adénovirus humain⁴².

Au bilan, les adénovirus recombinants sont de plus en plus utilisés comme vecteurs dans les essais de thérapie génique et de vaccination dans les modèles animaux. Dans le domaine de la vaccination, les vecteurs défectifs de première génération ont prouvé leur efficacité et sont largement utilisés. Pourtant, les approches visant à cibler plus spécifiquement certains types cellulaires, et particulièrement les cellules présentatrices d'antigènes (comme les cellules dendritiques), par une modification du tropisme naturel des vecteurs, pourraient encore augmenter l'efficacité des vecteurs adénoviraux. De plus, une modification de tropisme pourrait rediriger le vecteur vers d'autres tissus que ceux transduits naturellement *in vivo*, et aider à diminuer la toxicité hépatique parfois associée à l'injection intraveineuse de certains vecteurs, dont ceux dérivant du sérotype 5¹⁰².

II.C. Modification du tropisme des adénovirus pour une vectorologie ciblée

Les développements actuels en vectorologie ciblée visent à promouvoir une entrée du virus dans des cellules dépourvues de récepteurs adénoviraux ou une entrée préférentielle des adénovirus modifiés dans un tissu ciblé.

Une première possibilité pour modifier le tropisme des vecteurs adénoviraux consiste à modifier la fibre des adénovirus⁷. Dans cet objectif, plusieurs stratégies existent, comme l'insertion dans la tête de la fibre (au niveau de la boucle HI)⁵⁸ d'un peptide autorisant la reconnaissance d'un nouveau récepteur, ou l'utilisation de ligands bispécifiques (anticorps par exemple) masquant d'un côté les séquences de liaison au CAR maintenant bien connues et de l'autre redirigeant le virus vers un récepteur spécifique¹¹⁸. Une autre approche retenue dans le cadre de ce travail et par d'autres équipes correspond à l'échange de la fibre du vecteur par une fibre provenant d'un autre adénovirus, au tropisme naturel intéressant^{50,97}. On parle alors de virus pseudotypés pour la fibre.

Plus récemment, des tentatives de modification d'autres protéines ont été entreprises, parmi lesquelles l'hexon¹⁴⁰ ou le polypeptide IX¹²⁴.

Malgré tous ces développements, les vecteurs adénoviraux défectifs pour la réplication restent peu efficaces pour l'induction de réponses immunitaires mucoales après administration locale^{69,101,135}, par rapport aux vecteurs réplcatifs. A cet égard, il faut souligner l'importance de la voie d'inoculation dans l'établissement d'une protection vaccinale par un vecteur non réplcatif. Différentes voies parentérales ont déjà montrées des efficacités variables dans l'induction de réponses immunitaires systémiques⁸⁹ : les voies intra péritonéales et intraveineuses sont apparues moins efficaces que les voies intramusculaires ou sous cutanées. La vaccination orale avec des vecteurs non réplcatifs nécessite des doses plus élevées de virus que les administrations systémiques¹²⁵, ce qui n'est pas sans danger.

III. Vaccination orale par vecteur adénoviral

III.A. Intérêts de l'administration orale

La voie d'administration orale présente de multiples intérêts. D'une part, il s'agit d'une voie d'administration aisée pour les animaux. D'autre part, les surfaces orales et plus généralement muqueuses constituent de vastes portes d'entrée empruntées par la plupart des pathogènes (parmi lesquels des pathogènes majeurs comme le VIH, les rotavirus, les virus grippaux ou les salmonelles). Afin de combattre les infections par ces micro-organismes, l'immunité mucoale tient une place de choix comme première ligne de défense susceptible d'intercepter les pathogènes avant leur entrée dans l'organisme⁷⁷. Or la stimulation d'une immunité mucoale protectrice nécessite généralement l'administration des antigènes vaccinaux au contact de ces surfaces muqueuses^{55,134}.

En conséquence d'un rôle important de barrière contre les agressions extérieures, les muqueuses sont pourvues d'un système immunitaire très développé, regroupant presque les $\frac{3}{4}$ des cellules du système immunitaire de l'organisme. Si les difficultés posées par le franchissement de la barrière muqueuse par les antigènes vaccinaux étaient surmontées, il serait alors possible d'obtenir une réponse immunitaire locale et générale particulièrement efficace.

Mais il nous faut d'abord prendre en compte le grand nombre d'obstacles s'opposant à la pénétration des antigènes ou des pathogènes dans la muqueuse intestinale.

III.B. Obstacles rencontrés lors d'une vaccination orale

Le premier obstacle correspond à une possible inactivation des micro-organismes au niveau stomacal, de par l'acidité importante de ce compartiment (le pH peut chuter jusqu'à une valeur de 2, après synthèse d'acide chlorhydrique par les cellules de la paroi stomacale) et le déversement d'enzymes protéolytiques et glycolytiques (amylase salivaire, pepsinogène). Plus loin dans le tube digestif, au niveau du duodénum, les micro-organismes doivent encore résister aux enzymes pancréatiques (trypsine surtout) et aux sels biliaires.

Le deuxième obstacle important est constitué d'une série de barrières physiques et mécaniques liées à la composition de l'épithélium intestinal. Ce dernier est un épithélium simple, constitué principalement d'entérocytes et de cellules mucipares (voir figure 9). Les entérocytes sont les cellules majoritaires, spécialisées dans l'absorption des nutriments et l'échange avec le milieu extérieur, et présentent par voie de conséquence une grande polarisation : de multiples invaginations de la muqueuse caractérisent le pôle apical, augmentant la surface de contact (atteignant jusqu'à 400m² chez l'homme) et d'absorption. Ces invaginations sont entourées d'un feutrage de glycocalyx, constitué de protéines fortement glycosylées, empêchant la diffusion des virus et bactéries. Le glycocalyx constitue donc un véritable piège par adsorption des molécules. Les entérocytes assurent de plus l'étanchéité de l'épithélium de par l'existence de jonctions serrées et adhérentes entre les cellules. Malgré ces obstacles, les antigènes finalement dirigés vers les entérocytes sont généralement dégradés¹⁶ et possiblement présentés aux cellules de l'immunité dans le contexte des molécules de CMH pouvant assurer le démarrage d'une réponse immunitaire acquise. Les cellules mucipares sont, elles, responsables de la sécrétion du mucus, gel adhérent à la muqueuse, dont le composant principal est la mucine et qui inhibe l'adhésion des microorganismes²⁵.

De plus, les germes commensaux naturellement présents dans le tube digestif, bien plus nombreux que les cellules eucaryotes de l'organisme, s'opposent à la colonisation de la muqueuse intestinale par d'autres microorganismes. On parle d'équilibre protecteur assuré par

la flore, qui est caractéristique de l'espèce animale considérée et qui peut être remis en cause lors de modification du régime alimentaire ou lors d'un traitement antibiotique.

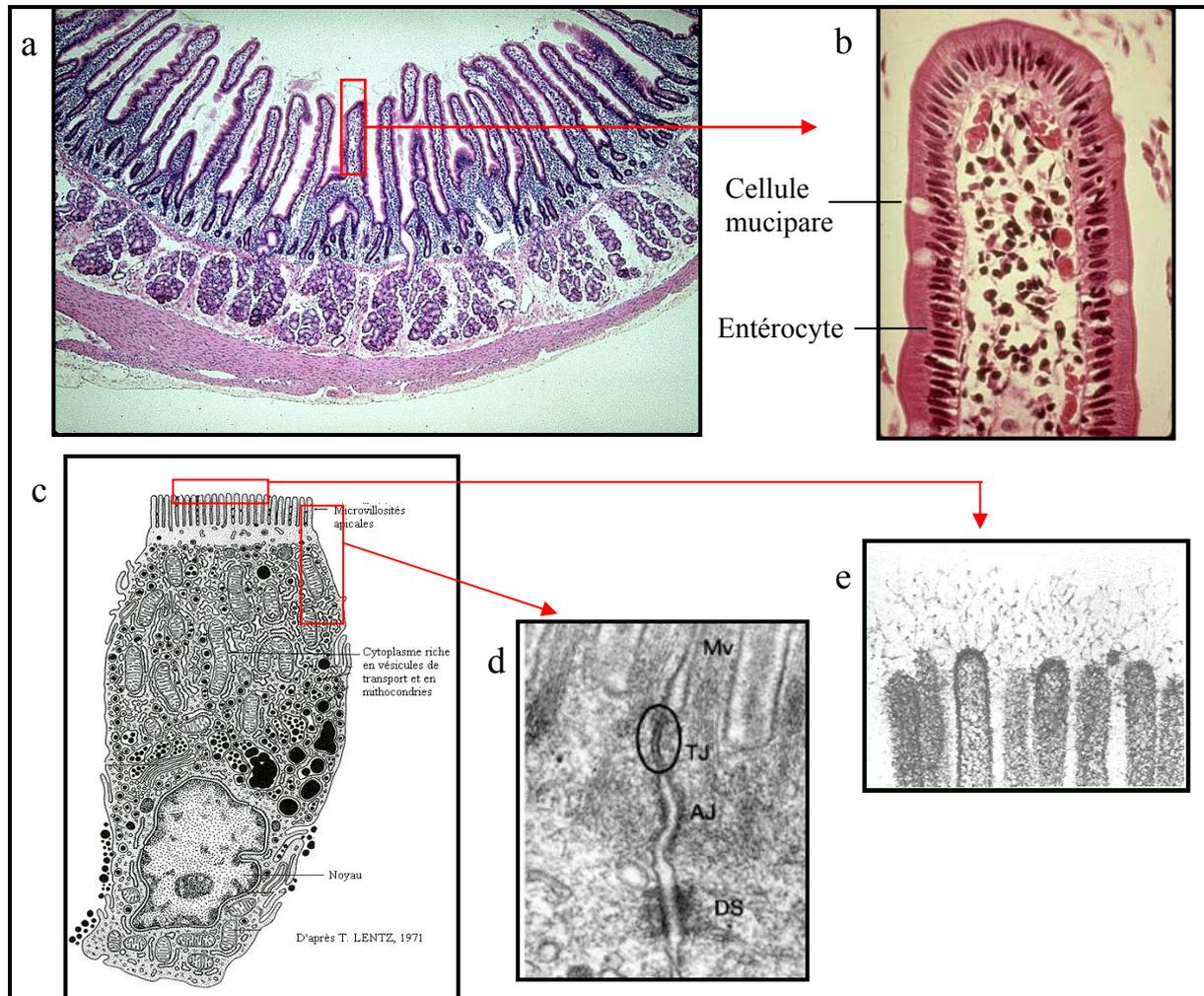


Figure 9 : Barrières physiques et mécaniques de la muqueuse intestinale. **a**, Coupe transversale de l'intestin grêle au niveau du duodénum (x100). **b**, Villosité intestinale montrant les deux types cellulaires principaux de cette muqueuse, les entérocytes et les cellules mucipares (x400). **c**, Représentation schématique de l'observation en microscopie électronique d'un entérocyte polarisé et visualisation de la bordure en brosse apicale. **d**, Positionnement des jonctions cellulaires entre deux entérocytes adjacents : TJ= jonctions serrées et AJ=jonctions adhérentes assurant l'étanchéité de la muqueuse, DS= desmosomes participant aux communications intercellulaires (Mv= microvillosités). **e**, Feutrage de glycocalyx formant un piège au-dessus des microvillosités apicales.

D'autres obstacles découlent de la mise en jeu du système immunitaire inné. En particulier, l'épithélium sécrète des peptides anti-microbiens, appelés défensines, qui jouent un rôle important dans la protection contre l'infection adénovirale⁴⁷. La phagocytose et la sécrétion de cytokines par les macrophages résidents participent à l'induction de la réponse inflammatoire aboutissant à l'élimination précoce des virus libres et des cellules infectées.



III.C. Mécanisme d'induction d'une réponse immunitaire acquise dans l'intestin

Une fois tous les obstacles franchis, le vecteur vaccinal doit encore stimuler le système immunitaire de façon optimale.

Au niveau de l'intestin grêle, le système immunitaire est constitué d'un compartiment inducteur composé essentiellement par des formations lymphoïdes organisées, que sont les plaques de Peyer et le nœud lymphatique mésentérique (voir figure 10). Les plaques de Peyer sont surmontées d'un épithélium particulier, nommé FAE (pour « épithélium associé au follicule »), constitué de cellules spécifiques, les cellules M (M pour « microfold »), car les cellules M présentent de petites invaginations de leur membrane apicale. Le FAE perd les fonctions de digestion et de défense anti-bactérienne de l'épithélium intestinal. Il existe à son niveau très peu de cellules mucipares, d'où une faible couche de mucus favorisant l'approche des particules et des microorganismes. Ces cellules M semblent dériver des entérocytes⁷⁶ mais présentent des particularités autorisant le passage des antigènes particulaires et solubles, faisant de ces cellules le lieu de transport prédominant des antigènes depuis la lumière intestinale vers les sites d'initiation de la réponse immunitaire⁷⁴. Ces particularités reposent sur la disparition des villosités, un glycocalyx réduit, un faible nombre de lysosomes laissant les antigènes intacts, une lame basale discontinue et des replis cytoplasmiques où se logent des lymphocytes B et T, des macrophages et des cellules dendritiques, ce qui permet un contact étroit et rapide entre antigènes et cellules immunitaires. Des études montrent ainsi le transport de nombreuses bactéries (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*⁹⁴) et de virus (réovirus, poliovirus, VIH) à leur niveau.

L'initiation de réponses immunitaires intestinales peut aussi débiter au niveau de l'épithélium intestinal, après capture des antigènes par les cellules dendritiques s'insinuant entre les cellules épithéliales⁸⁶. Les cellules dendritiques peuvent en effet émettre des prolongements cytoplasmiques passant au travers des jonctions serrées des entérocytes sans pour autant modifier l'étanchéité de la muqueuse.

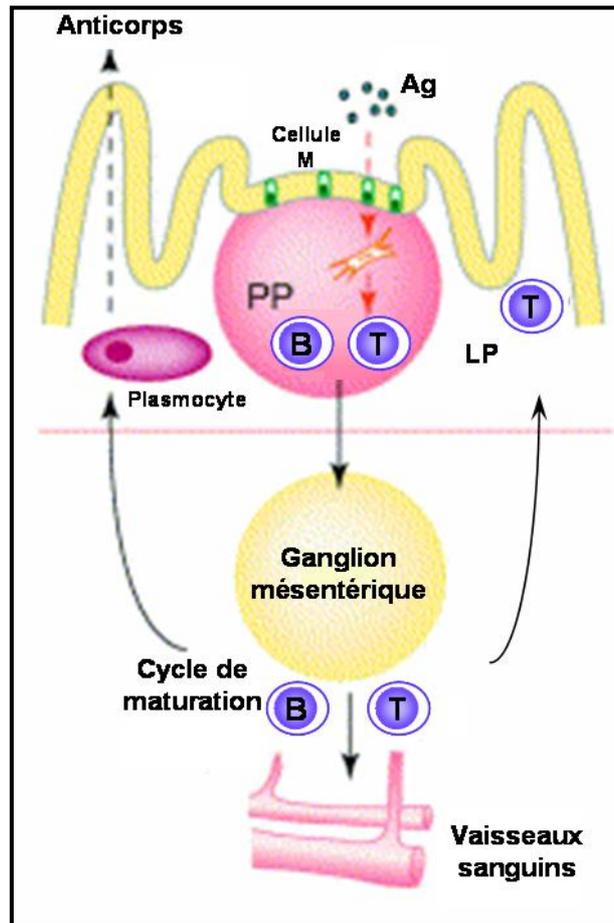


Figure 10 : Réponse immunitaire intestinale après franchissement de la muqueuse intestinale par les antigènes (Ag). PP= plaque de Peyer, LP= lamina propria, B= lymphocyte B, T= lymphocyte T (adapté de Bouvet J.-P. et coll.¹⁸).

Le compartiment inducteur est en liaison par les voies hémolymphatiques avec le compartiment effecteur constitué des lymphocytes T matures et des plasmocytes disséminés dans la muqueuse intestinale. Les lymphocytes T se répartissent dans la lamina propria ou sous-muqueuse, qui compte une majorité de lymphocytes CD4⁺ auxiliaires et dans l'épithélium, où presque tous les lymphocytes T présentent les caractéristiques de cellules cytotoxiques. Les plasmocytes retrouvés dans la lamina propria sont essentiellement sécrétors d'IgA. L'IgA sécrétée est sous forme dimérique et transportée activement du pôle basal au pôle apical des entérocytes après fixation sur un récepteur spécifique, le récepteur polymérique aux immunoglobulines pIgR. Le domaine extracellulaire du récepteur reste lié à l'IgA et forme le composant sécrétoire protégeant l'IgA de l'action protéolytique des enzymes digestives et assurant son adhésion au mucus. Les IgA peuvent alors interférer avec la liaison des pathogènes sur l'épithélium.

L'induction de réponses immunes après administration orale constitue un véritable challenge, et pour preuve, très peu de vaccins sont actuellement autorisés pour une administration muqueuse (exemple de la seule souche atténuée du poliovirus chez l'homme). Les efforts actuellement déployés pour surmonter les différents obstacles s'orientent vers la recherche de moyens plus efficaces de délivrance des antigènes au système immunitaire muqueux, et parmi ceux-ci les vecteurs viraux⁷².

III.D. Limites de l'administration d'adénovirus par voie orale

Les vecteurs adénoviraux appartenant aux sérotypes 2 et 5 ont un tropisme respiratoire et sont mal adaptés à une administration par voie orale pour plusieurs raisons.

Les travaux de Favier et coll. ont montré une perte d'infectivité de l'adénovirus de type 2 après une courte exposition à un pH acide de 2, reproduisant le pH stomacal. Une solution peut être trouvée ici dans l'utilisation de sérotypes humains au tropisme gastro-intestinal, comme l'adénovirus 40 ou 41, qui résistent beaucoup mieux à un pH acide du fait d'une charge globalement basique de la particule et de la grande stabilité de la fibre de ces sérotypes³⁶.

Comme présenté plus haut, les adénovirus 2 et 5 utilisent les molécules CAR et intégrines dans leur premières interactions avec la cellule cible. Un faible niveau d'expression de ces molécules au pôle apical des cellules muco-sales a été démontré pour la muqueuse respiratoire ou intestinale *in vitro* et semble limiter la transduction des cellules épithéliales^{28,81,128}. De plus, le glycocalyx pourrait servir de barrière répulsive, empêchant la particule adénovirale d'atteindre la surface cellulaire⁸⁰.

Il ne faut cependant pas considérer que la barrière épithéliale représente le seul obstacle à la vaccination orale. Le travail de Mercier et coll. suggère qu'il serait nécessaire d'infecter directement certaines cellules présentatrices d'antigènes, et surtout les cellules dendritiques afin de stimuler efficacement les réponses immunes⁶⁵. Or l'infection de ces cellules par les adénovirus 2 et 5 apparaît assez faible⁵⁰ et il semble important d'améliorer la délivrance des vecteurs adénoviraux aux cellules impliquées dans la présentation antigénique.

III.E. La stratégie adoptée dans ce travail : Utilisation de la variété de comportements des sérotypes d'adénovirus humains

Dans l'objectif d'améliorer les performances des vecteurs adénoviraux pour la vaccination orale, notre étude repose sur l'analyse des capacités de vecteurs adénoviraux dérivés du sérotype 5 et pseudotypés par la fibre d'autres adénovirus humains à interagir avec la muqueuse intestinale. Cette stratégie d'utilisation de vecteurs pseudotypés permet en effet d'étudier et par la suite d'utiliser la variété des comportements des différents sérotypes adénoviraux.

III.E.1 Présentation des sérotypes d'adénovirus humains

On dénombre aujourd'hui 51 sérotypes d'adénovirus humains³¹, qui ont été classés en 6 sous-groupes de A à F sur des critères de composition nucléotidique de leur génome, de capacité à agglutiner les globules rouges de différentes espèces et d'oncogénicité chez les rongeurs.

Sous-Gruppe	Sérotype	%G-C	Propriétés d'hémagglutination	Oncogénicité chez les rongeurs	Longueur de la fibre
A	12, 18, 31	48-49%	Faible ou absente	Très oncogènes	28-31 nm
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	50-52%	complète sur les érythrocytes de singe	peu ou non oncogènes	9-11 nm
C	1, 2, 5, 6	57-59%	partielle sur les érythrocytes de rat	peu ou non oncogènes	23-31 nm
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 à 30, 32, 33, 36 à 39, 42 à 49, 51		complète sur les érythrocytes de rat	peu ou non oncogènes (tumeurs mammaires)	12-13 nm
E	4	57-61%	partielle sur les érythrocytes de rat	non oncogène	17 nm
F	40,41	57-59%	partielle sur les érythrocytes de rat	non oncogènes	2 fibres : 22 et 33 nm

Tableau I : Classification des sérotypes d'adénovirus humains, en fonction de leurs caractéristiques structurales ou fonctionnelles (%G-C : composition en nucléotides G et C du génome viral). (D'après¹⁰⁵).

Les adénovirus humains ont été identifiés comme les agents de maladies très diverses, en relation avec leur tropisme varié¹²⁶: infections gastro-intestinales (sous-groupe F¹²³ et A), infections respiratoires (sous-groupes B, C et E) sans oublier les infections oculaires (sous-groupes D et E). Ces infections peuvent rester asymptomatiques et la moitié des infections par les membres du sous-groupe C passent ainsi inaperçues.

Ces différentes physiopathologies spécifiques d'une muqueuse dépendent de l'utilisation de récepteurs cellulaires distincts pour l'entrée. Comme nous l'avons évoqué précédemment, c'est la tête C-terminale de la fibre qui est responsable de la spécificité de

reconnaissance du récepteur cellulaire⁵¹, le CAR pour les adénovirus du sous-groupe C et certains membres des sous-groupes A, D, E et F⁹⁰ (voir tableau II).

Sous-groupe	Sérotype	Pathogénie	Récepteur primaire
A		Infection entéritique cryptique	
	12	SNC, I	CAR ⁵⁷
B		Infections respiratoires (épidémie), infections rénales persistantes	
	7, 7b, 11, 16 35, 50	O, SNC, R, U	CD46 ^{39,100,108}
C		Infections respiratoires endémiques, persistance dans les tissus lymphoïdes	
	5	SNC, I, H, R	CAR ¹²
D		kératoconjonctivite	
	8	O	sialo-glycoconjugué ⁵ , CD46 ¹³³
	9, 17	O	CAR ⁵⁷
	10	O	?
	13, 24, 27, 33, 38, 45, 47		?
	30		ND
	32	(SNC)	?
F		Gastro-entérite infantile	
	40	I	40-S: ND 40-L: CAR ^{57,90}

Tableau II : Diversité des tropismes naturels des adénovirus humains dont sont dérivées les fibres des virus pseudotypés
 Pathogénie: SNC= système nerveux central, I= intestinal, O= oculaire, R= respiratoire, U= urinaire, H= hépatique
 Récepteurs : CAR= coxsackievirus and adenovirus receptor, ND= non déterminé (mais différent du CAR). ?= non étudié.

Les adénovirus du sous-groupe B sont les premières exceptions à ce schéma d'interaction fibre-CAR³⁴ et il a déjà été montré que certains adénovirus du sous-groupe B, les sérotypes 11 et 35 (Ad11 et 35) infectent les cellules épithéliales plus efficacement que le sérotype 5⁶³. La molécule CD46, intervenant dans la régulation de l'activation du complément, a été récemment identifiée comme le récepteur d'attachement pour ces virus^{39,100,108}. Le sous-groupe B est de plus subdivisé en B1 (Ad3, 7 et 50) et B2 (11 et 35), qui présentent différents tropismes *in vivo*, les sérotypes B1 étant associés à des épidémies

d'infections respiratoires aiguës et les virus B2 à des infections chroniques rénales, ce qui laisse supposer l'existence d'un récepteur spécifique au groupe B2⁹⁹.

Une autre classe à part est composée des adénovirus du sous-groupe F entérique, regroupant les sérotypes 40 et 41. Ces virus sont intrinsèquement intéressants dans le cadre d'une vaccination orale suite à leur tropisme naturel et strict pour le tube digestif³². Leurs propriétés physicochimiques particulières leur assurent une résistance à des conditions de pH extrême³⁶. Leur arrangement génomique unique code deux fibres^{56,138}, une fibre longue interagissant avec CAR et une fibre courte ne se fixant pas à CAR⁹⁰ et dont la fonction reste encore non élucidée^{73,97}. De plus, ces sérotypes ne comportent pas de motif RGD au niveau de leur protéine penton base³, indiquant leur indépendance vis à vis des intégrines pour leur entrée.

Certains sérotypes du sous-groupe D ne se servent pas de CAR comme récepteur. En particulier, les sérotypes à tropisme oculaire et à l'origine de kérato-conjonctivites épidémiques (sérotypes 8, 19 et 37) semblent utiliser les résidus acides sialiques⁵ ainsi qu'une autre protéine qui vient juste d'être identifiée comme étant la molécule CD46¹³³. Les acides sialiques sont des groupements sucrés attachés aux protéines, présents au pôle apical des entérocytes et déjà connus comme des molécules facilitant la pénétration des surfaces muqueuses par de nombreux pathogènes (les rotavirus²⁷, les réovirus⁸, les parvovirus¹¹⁷, les coronavirus⁹⁸, ...).

III.E.2 Utilisation de la variété de tropisme des virus pseudotypés pour la fibre

Les vecteurs pseudotypés pour la fibre, c'est-à-dire comportant le génome du vecteur bien connu, l'Ad2 ou 5, et dont tout ou partie de la fibre a été remplacée par celle d'autres sérotypes, ont été construits afin de tirer profit de la diversité de tropisme et d'utilisation de récepteurs cellulaires. Il a été montré par un grand nombre d'équipes que ces vecteurs présentaient une modification du tropisme cellulaire par rapport aux vecteurs Ad2 ou 5, en accord avec la fibre insérée dans la particule virale^{40,110}. Ainsi, le vecteur pseudotypé avec la fibre du sérotype 35 s'avère particulièrement efficace pour transduire les cellules dendritiques humaines *in vitro*⁸⁴. Les vecteurs pseudotypés sont également utilisés pour

infecter plus efficacement certains tissus, comme les tissus cardiovasculaires⁴⁹, ou l'épithélium respiratoire¹⁴¹.

Ces vecteurs portant des fibres différentes et reflétant la diversité naturelle de tropisme des adénovirus humains (voir tableau II) nous servent à élucider les mécanismes impliqués dans le franchissement de la barrière épithéliale intestinale. Dans la suite de ce mémoire, les interactions entre une monocouche épithéliale intestinale polarisée reconstituée *in vitro* et les vecteurs pseudotypés pour la fibre seront étudiées. Chaque étape de ces interactions a été prise en compte: liaison, infection et translocation des particules virales à l'autre pôle de la cellule. Cette étude constitue une première étape dans l'obtention d'une meilleure compréhension des interactions des vecteurs adénoviraux nécessaires à l'induction de réponses muqueuses efficaces, ce qui permettrait de disposer d'une base rationnelle pour la mise au point et le développement de vaccins vectorisés utilisables par voie orale chez les animaux.

Etude des interactions moléculaires des adénovirus avec la muqueuse intestinale

I. Matériels et méthodes

I.A. Cellules

Les cellules 293, cellules rénales embryonnaires humaines ont servi à l'amplification et à la production des stocks d'adénovirus. Il s'agit de cellules transformées par le fragment gauche du génome de l'adénovirus 5 (environ 4000 nucléotides) et exprimant en particulier les protéines de la région E1 de cet adénovirus⁴⁵. Les cellules 293 autorisent ainsi par transcomplémentation la multiplication des adénovirus 5 défectifs pour la réplication à la suite de la délétion de la région E1 du génome adénoviral. Elles sont cultivées en milieu DMEM à haute teneur en glucose (4,5g/L) (InVitrogen, FRANCE) contenant 10% de sérum de veau fœtal (InVitrogen, FRANCE), 1mM de pyruvate de sodium et les antibiotiques pénicilline (50UI/mL)/streptomycine (50µg/mL), dans une étuve maintenue à 37°C et à 5% CO₂.

Afin d'étudier le comportement des adénovirus vis-à-vis de cellules épithéliales intestinales, deux modèles *in vitro* ont été choisis : les lignées cellulaires Caco-2 clone Tc7 dérivées d'un adénocarcinome colique humain (fournies par E. Pringault, Institut Pasteur) et mICcl2 obtenues par clonage de cellules épithéliales de l'intestin grêle de souris C57Bl6 transgéniques, exprimant les antigènes transformants du virus SV40 sous contrôle d'un promoteur tissu-spécifique (fournies par A. Vandewalle, Faculté de Médecine X. Bichat)¹¹. Les cellules Caco-2 malgré leur origine colique présentent les caractéristiques structurales et fonctionnelles des entérocytes des sommets des villosités de l'intestin grêle. Les mICcl2 quant à elles présentent les caractéristiques des entérocytes des cryptes, avec maintien de l'expression de certaines enzymes ou protéines (comme le pIgR). Ces cellules sont cultivées sur filtre Transwell en polycarbonate de diamètre 6,5mm et de porosité 3µm (Corning, PAYS-BAS) (voir figure 11). Cent mille cellules sont déposées initialement sur le filtre et se multiplient jusqu'à l'obtention d'une monocouche. Les cellules se différencient alors progressivement, avec le pôle basal des cellules s'appuyant sur le filtre. La polarisation complète des cellules, signée par la reconstitution d'une bordure en brosse apicale et

l'augmentation de la résistance transépithéliale, est obtenue en 14 et 10 jours pour les Caco-2 et mICcl2 respectivement.

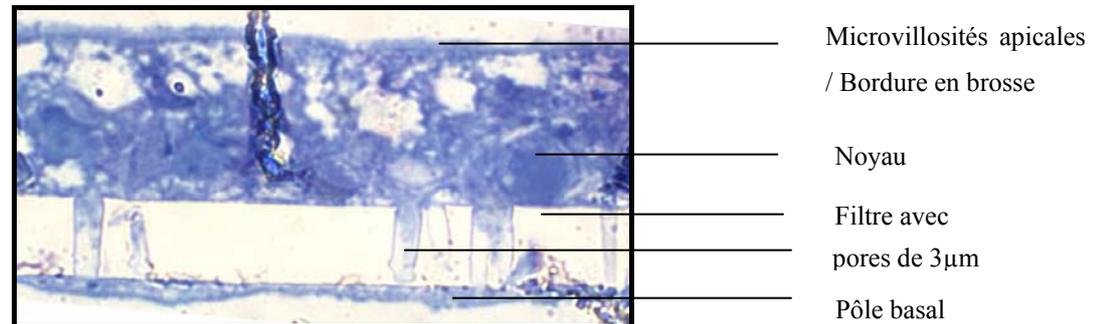


Figure 11 : Culture sur filtre de cellules Caco-2 Tc7 jusqu'à polarisation complète et établissement des microvillosités apicales. Coloration au bleu de toluidine après inclusion en résine LR white (x1000).

Les cellules Caco-2 clone Tc7 sont cultivées en milieu DMEM à haute teneur en glucose, avec 20% de sérum de veau fœtal (Eurobio, FRANCE), du pyruvate de sodium, des antibiotiques et acides aminés non essentiels, à 37°C sous 8% CO₂. Le milieu de culture des mICcl2 est composé pour moitié de DMEM à faible teneur en glucose (1g/L glucose) (InVitrogen, FRANCE), et pour moitié de HAM's F12 (InVitrogen, FRANCE), supplémenté avec 5µg/mL d'insuline (Sigma, FRANCE), 5x10⁻⁸ M de triiodothyronine (Sigma, FRANCE), 0,02µg/mL (5x10⁻⁸ M) de dexaméthasone (Sigma, FRANCE), 0,01µg/mL (60nM) de sélénium (Sigma, FRANCE), 10ng/mL d'EGF murin (Sigma, FRANCE), 5µg/mL de transferrine (Sigma, FRANCE), 2% de sérum de veau fœtal (InVitrogen, FRANCE), 0,22% de glucose (Sigma, FRANCE), 1mM de pyruvate de sodium, 2mM de L-glutamine (InVitrogen, FRANCE), des acides aminés non essentiels et des antibiotiques. Le milieu de culture est remplacé tous les 2 jours et les résistances transépithéliales suivies grâce à un ohmmètre (Milicell ERS, Millipore, FRANCE) pour s'assurer de la bonne croissance et polarisation des cellules (voir figure 12).

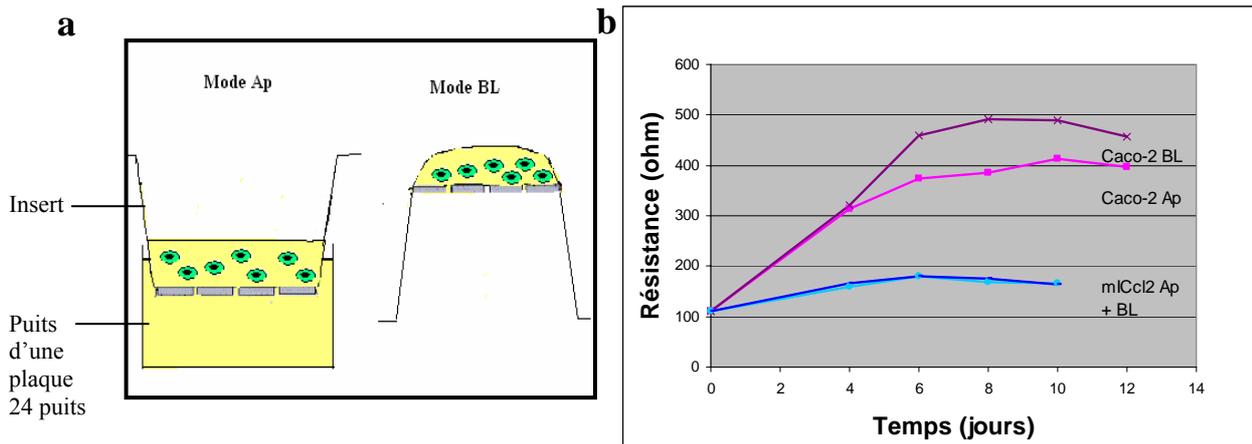
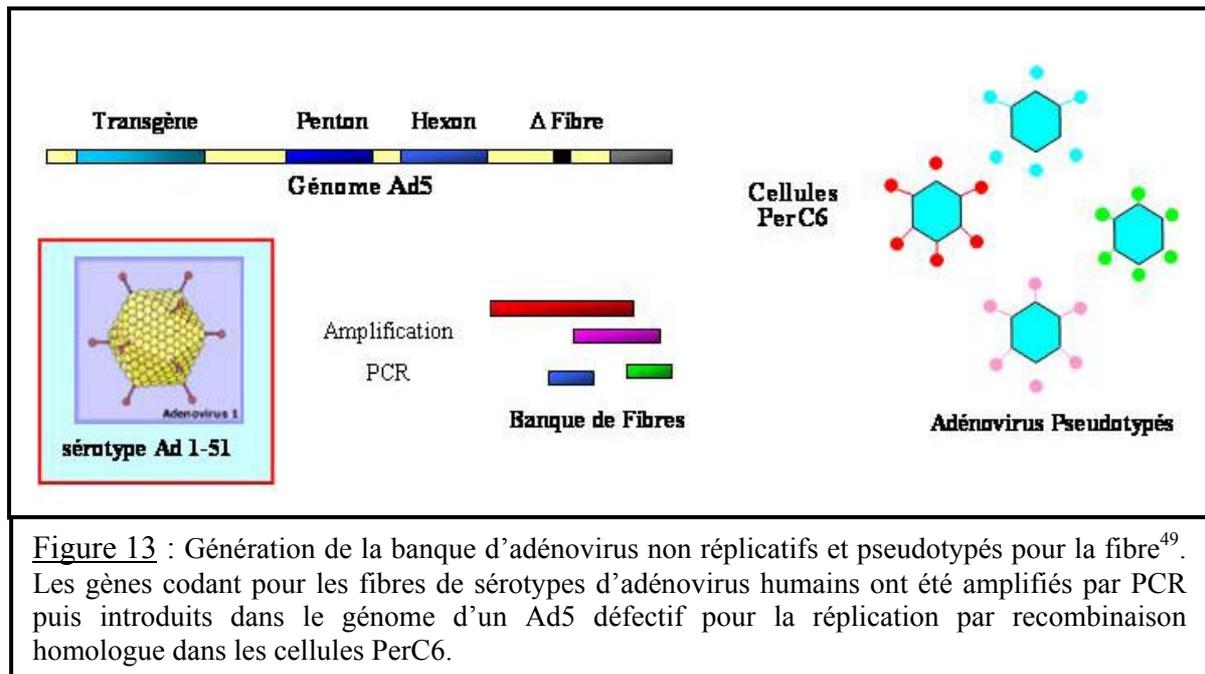


Figure 12 : Suivi de la polarisation des cellules Caco-2 et mICcl2 sur filtre. **a**, Mode d'ensemencement des cellules. Les cellules sont soit déposées à l'intérieur de l'insert (mode Ap), permettant l'accès dans l'insert au pôle apical des cellules, soit sous l'insert (mode BL) pour l'accès dans l'insert au pôle baso-latéral des cellules. **b**, Augmentation progressive puis stabilisation de la résistance trans-épithéliale, permettant d'apprécier le niveau de polarisation des deux types cellulaires au cours du temps.

I.B. Virus

Les virus utilisés dans l'étude ont été fournis par la société Crucell (Leiden, PAYS-BAS). Ils ont été générés par recombinaison homologue dans les cellules Per-C6⁴⁹. Chaque virus comporte le génome recombinant de l'adénovirus humain de type 5 délété de la région E1, zone d'insertion du transgène Luc (codant le produit luciférase, enzyme dérivée de la luciole *Photynus pyralis*) ou LacZ (codant le produit β -galactosidase) sous le contrôle du promoteur fort des protéines très précoces du CMV. Suite à l'existence d'un changement de cadre de lecture dans la région de la protéine E3 10,4kDa, le complexe RID est non fonctionnel dans ces virus. La séquence codant pour la fibre de l'adénovirus de type 5 a été remplacée par les séquences codant les fibres de différents sérotypes humains, permettant de disposer d'un panel d'une vingtaine de virus différant seulement par leur fibre (voir figure 13).



I.B.1 Amplification

Les virus ont d'abord été amplifiés une à deux fois sur 2 boîtes de cellules 293 de diamètre 10 cm ; cette limitation du nombre de passages sur cellules 293 permet d'éviter les risques d'apparition de virus sauvages après recombinaison avec le fragment gauche de l'Ad5 présent dans les cellules 293⁶². Le virus est déposé sous 1mL de milieu complet au contact d'un tapis de cellules 293 confluent à 70-90%, à raison d'une multiplicité d'infection comprise entre 0,2 et 20 particules infectieuses par cellule en fonction des virus considérés. Après 1h heure de contact à 37°C, 9mL de milieu complet sont ajoutés et les cellules sont replacées à l'étuve. Les cellules et le milieu de culture sont récupérés après l'obtention d'un effet cytopathogène complet (cellules arrondies et perdant leur adhésion au support). Ils subissent 3 cycles de congélation (-80°C) -décongélation (37°C) afin de libérer les particules virales intracellulaires puis sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Ces suspensions virales sont appelées souches mères de virus.

I.B.2 Préparation des stocks viraux

Les stocks viraux ont été constitués sur 20 boîtes de cellules 293 de diamètre 10cm à partir des souches mères, en suivant la même procédure d'infection. Une fois l'ECP total observé (en 2 à 3 jours), les cellules sont récupérées, centrifugées à 1000 tr/min pendant 10 minutes. Les culots cellulaires sont remis en suspension dans 15mL de milieu de culture, puis lysés par

3 cycles de congélation/décongélation. Après centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 minutes, le surnageant comportant les particules virales est isolé et purifié.

I.B.3 Purification

Les particules virales sont purifiées par 2 ultracentrifugations successives sur gradient de chlorure de césium (CsCl). La première étape de purification nécessite le dépôt du surnageant viral au dessus d'un coussin constitué par deux solutions de chlorure de césium de densité 1,45 et 1,20 suivi d'une ultracentrifugation à 30000 tr/min pendant 90 minutes à 25°C (ultracentrifugeuse Beckman Coulter, avec rotor fixe). La bande blanche située à l'interface entre les deux solutions et correspondant aux particules virales complètes est récupérée et placée dans les tubes d'ultracentrifugation (Beckman Coulter, GRANDE-BRETAGNE), qui sont ensuite complétés avec une solution de chlorure de césium de densité 1,34. La centrifugation à l'équilibre sur gradient de CsCl est effectuée à 30000 tr/min pendant 20 heures. La bande de virus observée est récoltée au niveau de la zone de densité 1,34 soit à mi-hauteur du tube d'ultracentrifugation. Le chlorure de césium est éliminé par chromatographie d'exclusion sur colonne PD-10 (Amersham Biosciences, FRANCE) selon le protocole du fournisseur et le virus élué dans 2 ou 3 fractions successives (soit 1 ou 1,5mL de PBS). Le virus est conservé à -80°C dans une solution de PBS contenant 10% de glycérol, sous forme d'aliquotes de 25 ou 50µL.

I.B.4 Titrage

Plusieurs méthodes de titrage des virus ont été utilisées.

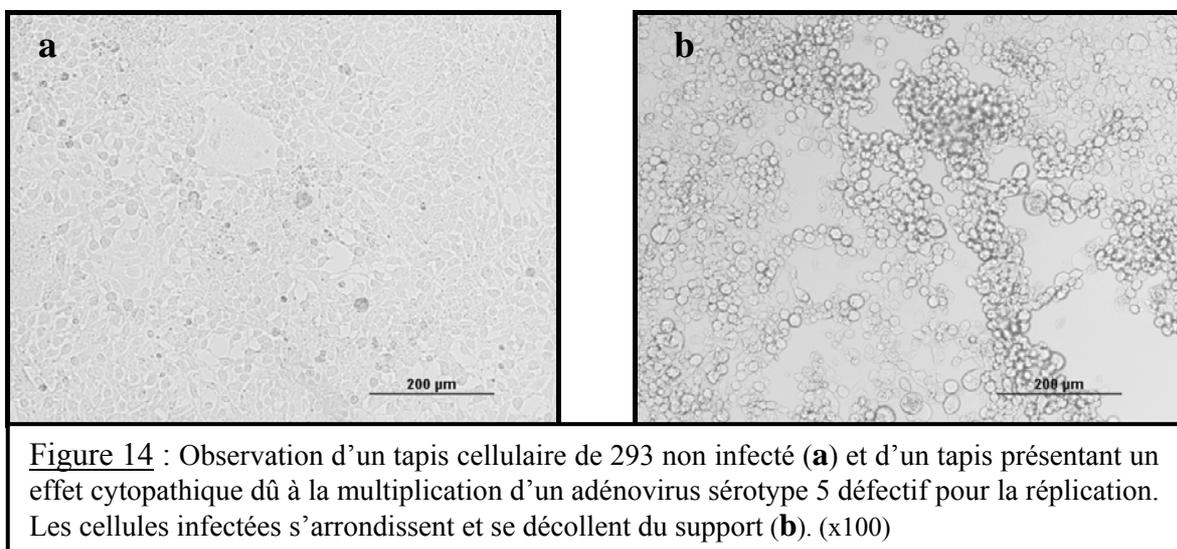
a) *Le titrage des particules physiques.* Après lyse des particules virales diluées au 1/10 en tampon SDS 1%, à 100°C pendant 4 minutes, la lecture de la densité optique à la longueur d'onde 260 nm permet de déterminer le nombre de particules physiques/mL du stock viral initial selon la formule :

Titre en particules physiques/mL = $D.O_{260nm} \times \text{facteur de dilution} \times 1,8 \cdot 10^{12}$ (d'après ¹¹⁴)

b) *La quantification des génomes viraux* (voir I.G.). La détermination du titre en génomes viraux, avec la méthode de PCR quantitative en temps réel intégrant le transgène Luc ou LacZ, permet de vérifier le titrage en particules physiques et donne un rapport

reproductible et assez constant du titre en particules physiques par rapport au titre en génomes viraux de 2,5 (2-3,9).

c) *Le titrage des particules infectieuses (DECP₅₀)*. Les différents virus sont dilués en milieu DMEM complet de 10 en 10 pour réaliser une gamme de dilutions allant de 10⁻¹ à 10⁻¹² puis les dilutions virales sont réparties en plaques 96 puits en réalisant 5 cupules par dilution virale, sous un volume de 50µL. 85000 cellules 293 sous 170µL sont ensuite ajoutées dans chaque puits et les plaques placées à l'étuve. Les plaques sont observées à partir de J+3 jusqu'à J+7, afin de compter les cupules comportant des effets cytopathiques (ECP) (voir figure 14).

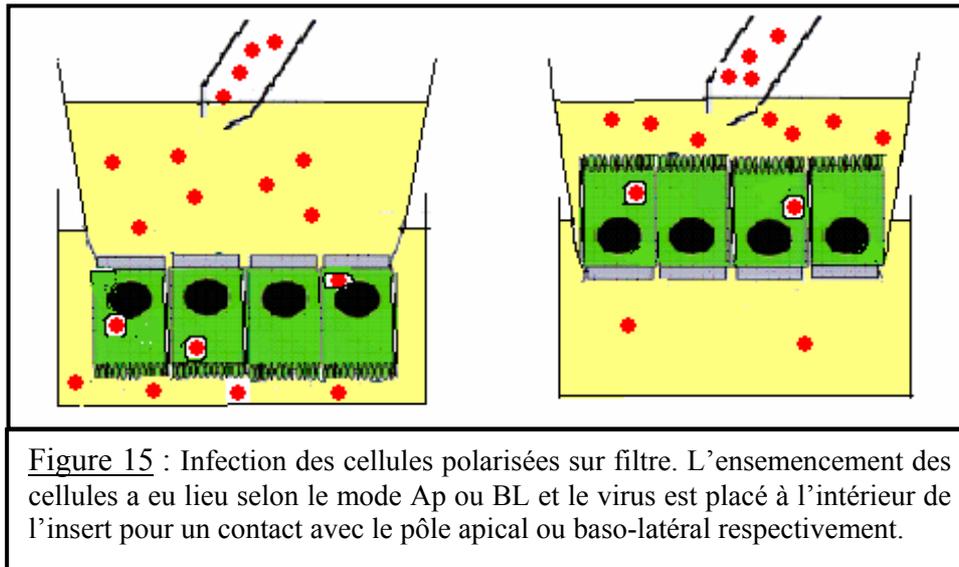


Le titre en DECP₅₀ de la suspension virale est alors déterminé par la méthode de Reed et Muench⁴¹. Pour chaque dilution virale, le nombre de puits comportant un ECP est noté. Si on appelle « x » la dernière dilution virale pour laquelle on observe plus de 50% des puits avec ECP (soit dans notre cas, au moins 3 cupules), et « y » la dilution suivante alors le titre en DECP₅₀ sera donné par la formule :

$$\log \text{DECP}_{50} = \log x + \frac{\% \text{ cupules avec ECP à la dilution } x - 50\%}{\% \text{ cupules avec ECP à la dilution } x - \% \text{ cupules avec ECP à la dilution } y} \times \log (\text{facteur dilution})$$

I.C. Infection cellulaire

Les cellules polarisées sur filtre ont été mises en contact pendant 2h à 37°C avec 10⁹ génomes viraux par filtre. Le virus est déposé à l'intérieur de l'insert sous 100µL de milieu complet (voir figure 15).



Après 30 minutes, 1h, 2h, 12h, 24h et 48h de contact, 100 μ L des 600 μ L du milieu se trouvant en dessous de l'insert ont été prélevés afin de quantifier les virus ayant traversé la monocouche cellulaire (phénomène de transcytose ou translocation). Au bout des 2 heures, le milieu a été complètement renouvelé pour chaque filtre. Les cellules sont analysées pour la transduction, se manifestant par l'expression de luciférase ou de β -galactosidase en fonction du transgène inséré dans le génome viral, après 48 heures d'infection.

I.D. Mesure de la transduction des cellules

I.D.1 Luminométrie

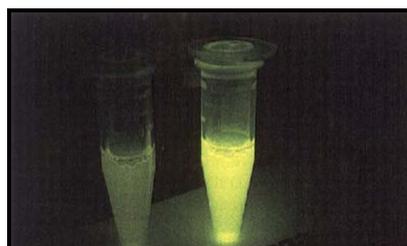


Figure 16 : Emission de photons après décarboxylation oxydative du substrat luciférine par la luciférase de luciole. A gauche, un tube contrôle sans luciférase et à droite un échantillon comportant de la luciférase.

L'émission de photons (voir figure 16) à la longueur d'onde 562 nm, proportionnelle à la quantité de luciférase présente dans l'échantillon, en présence de luciférine, le substrat de la luciférase et d'ATP, est mesurée par luminométrie avec le kit Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity (Roche Diagnostics, FRANCE).

Les cellules sur filtre, infectées par les différents virus, ont été lavées trois fois en PBS. Les filtres découpés en périphérie ont été lysés en présence du tampon de lyse présent dans le kit pendant 1h à température ambiante puis placés à -80°C . La concentration en protéines des lysats décongelés a été quantifiée en utilisant le kit MicroBC Assay (Uptima). 20 μL des lysats ont été placés en dupliqua dans les puits d'une plaque 96 puits de micro titrage à fond blanc et l'émission lumineuse moyennée sur 1 minute a été mesurée immédiatement après ajout de 50 μL de la solution substrat sur le luminomètre Fluoroskan Ascent FL.

I.D.2 Révélation de l'activité β -galactosidase *in situ*



Figure 17 : Coloration X-Gal, faisant apparaître en bleu les cellules exprimant la β -galactosidase (cellules infectées par un adénovirus portant le transgène LacZ).

Les cellules dans lesquelles s'exprime le gène LacZ et présentant une activité β -galactosidase sont colorées en bleu (voir figure 17), à la suite de l'hydrolyse du substrat chromatogène X-Gal. Les cellules polarisées sur filtres et infectées par les virus portant le transgène LacZ sont rincées avec du PBS, puis fixées 10 minutes à température ambiante dans une solution PBS-1% paraformaldéhyde-0,2% glutaraldéhyde. Après un nouveau rinçage, les cellules sont mises en contact avec une solution contenant 4mM de ferricyanide de potassium, 4mM de ferrocyanure de potassium, 2mM de MgCl_2 , 0,4mg/mL de X-Gal dans du PBS pendant 1h à 37°C , en surveillant l'apparition de la coloration. Les cellules sont rincées avec du PBS, et conservées à 4°C . La coloration des cellules a été observée sur un microscope inversé et des clichés photographiques ont été pris. Le nombre de cellules bleues a été compté sur le cliché et rapporté au nombre total de cellules.

I.E. Attachement viral

L'attachement viral a été mesuré sur cellules non différenciées ou sur cellules polarisées sur filtre.

Dans le premier cas, les cellules Caco-2 ou mICcl₂ ont été trypsinées, puis 250000 cellules en milieu complet ont été placées par puits dans une plaque 96 puits à fond rond (Nunc). Les cellules refroidies dans la glace ont été mises en contact sous 50µL final avec 2500 génomes viraux par cellule pendant 2h dans la glace. Les cellules sont maintenues à une température inférieure à 4°C afin d'empêcher l'étape active d'internalisation du virus.

Les cellules Caco-2 ou mICcl₂ polarisées sur filtre (soit environ 2x10⁶ cellules) ont été placées 30 minutes dans la glace avant la mise en contact avec les différents virus froids. 10⁹ génomes viraux par filtre sous 100µL de milieu complet froid ont été ajoutés à l'intérieur de l'insert pendant 2h dans la glace. Puis, les cellules ont été lavées deux fois en PBS froid, les filtres découpés en périphérie à l'aide d'un scalpel. L'ADN associé aux cellules a été extrait à l'aide du kit QIAamp DNA blood (QIAGEN SA, FRANCE), en suivant les instructions recommandées par le fournisseur et stocké à -20°C.

I.F. Quantification de l'attachement sur cellules non différenciées : cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique d'analyse multiparamétrique sur plusieurs milliers de cellules en suspension. Les mesures simultanées des caractéristiques physiques et biologiques sont effectuées isolément sur chacune d'entre elles après l'entraînement à grande vitesse des cellules par un fluide circulant au centre d'une veine liquide et leur traversée d'un faisceau laser argon (source d'excitation). Après intersection du rayon incident, la cellule diffracte la lumière. L'intensité de la lumière diffractée dans l'axe est proportionnelle à la taille de la cellule ; la lumière diffractée à 90° est représentative de son contenu cytoplasmique (on parle de granularité). Chaque cellule passant devant le faisceau laser peut aussi émettre de la fluorescence à diverses longueurs d'ondes (de 3 à 6 signaux de fluorescence peuvent être analysés simultanément suivant les appareils). Cette fluorescence peut être naturelle ou le plus souvent résulter de l'incorporation ou de la fixation de sondes spécifiques (fluorochromes, anticorps marqués). Les signaux détectés par le système optique sont amplifiés, convertis en signaux électroniques puis en valeurs numériques. Elles sont analysées grâce à l'unité informatique du cytofluorimètre.

Cette technique permet ainsi de faire individuellement et simultanément l'analyse quantitative et qualitative de plusieurs paramètres fluorescents après avoir choisi la population cellulaire d'intérêt sur les critères de taille et granularité. En fonction du marqueur fluorescent utilisé, il

est possible de suivre la présence d'un antigène, la quantité d'ADN ou d'ARN cellulaire, une activité enzymatique, la viabilité des cellules,...

Dans le cadre de cette étude, la cytométrie en flux nous permet de mettre en évidence la liaison des adénovirus à la surface de cellules isolées, par marquage d'une protéine présente à la surface des particules virales (la protéine penton).

Après l'étape d'attachement à 4°C des virus aux cellules non différenciées, les cellules sont lavées trois fois en PBS froid et centrifugées à 2000 tr/min pendant 3 minutes à 4°C (centrifugeuse réfrigérante SORVALL). Le surnageant d'hybridome contenant l'anticorps anti-penton 1D2 est alors ajouté à la dilution 1/2 sous 50µL en tampon PBS-BSA 0,5%-sérum de lapin 3% (tampon A) pendant 1h dans la glace dans tous les puits étudiés excepté dans les puits contrôles non marqués. Les cellules sont lavées 3 fois en PBS froid. La révélation de la fixation de l'anticorps primaire 1D2 est réalisée à l'aide de l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la R-phycoérythrine DAKO dilué au 1/20 sous 50µL en tampon A et mis en contact avec les cellules pendant 15 minutes dans la glace (sauf pour les contrôles non marqués). Les cellules sont lavées 5 fois en PBS froid puis fixées pendant 20 minutes à 4°C par une solution de paraformaldéhyde 1%. La mesure de l'attachement en cytométrie en flux est déduite de l'analyse des fluctuations de la fluorescence rouge (canal F2) associée aux cellules sur l'appareil FACScan Flow Cytometer (Beckton Dickinson, FRANCE) (voir figure 18).

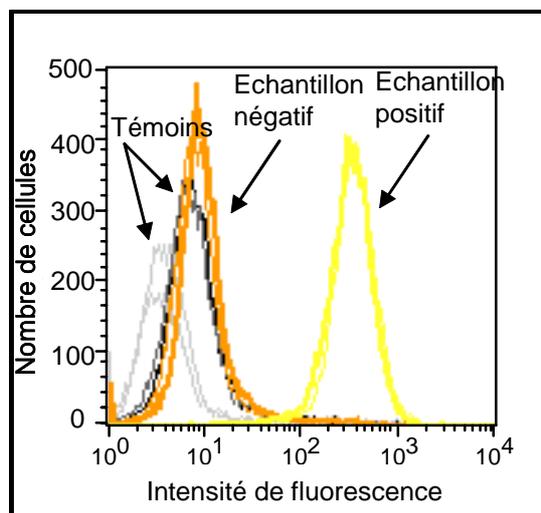


Figure 18 : Diagramme obtenu après passage de cellules marquées en cytométrie en flux, représentant la courbe de fluorescence de chaque échantillon. Les courbes noires et grises correspondent aux témoins (témoin sans anticorps ou sans virus). Les courbes colorées sont obtenues après fixation de deux virus différents et montrent un décalage de pic plus ou moins important en fonction de l'efficacité d'attachement viral (efficacité bonne pour l'échantillon positif, très faible pour l'échantillon négatif).

I.G. Quantification de l'attachement et de la translocation virale : PCR quantitative en temps réel des génomes viraux et cellulaires

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est une technique qui permet l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN spécifique (amplicon) à partir de deux amorces situées de part et d'autre de ce fragment. A l'issue d'un cycle d'amplification comportant une dénaturation de l'ADN double brin à température élevée, une hybridation des amorces et une étape d'élongation, la quantité d'amplicon est idéalement multipliée par deux. La PCR fait ici appel à la technologie «Hotstart», qui permet un démarrage de la PCR à température élevée, du kit «Quantitect SybrGreen PCR» (Qiagen SA, FRANCE). En effet, l'ADN polymérase Taq est modifiée par fixation sur quelques acides aminés de groupements bloquant l'activité de polymérisation. Ces groupements sont uniquement libérés lors du chauffage à 95°C des réactions, ce qui permet d'éviter une élongation non spécifique au cours de la préparation de la PCR.

La quantification de l'amplicon synthétisé est permise par l'utilisation d'une molécule intercalante fluorescente, le SybrGreen, qui se positionne régulièrement et non spécifiquement le long de l'ADN double brin, ce qui autorise alors une émission détectable de fluorescence (faible fluorescence du SybrGreen libre en solution) (voir figure 19). L'intensité de fluorescence verte associée au SybrGreen est donc proportionnelle à la quantité d'amplicon présente dans le milieu réactionnel.

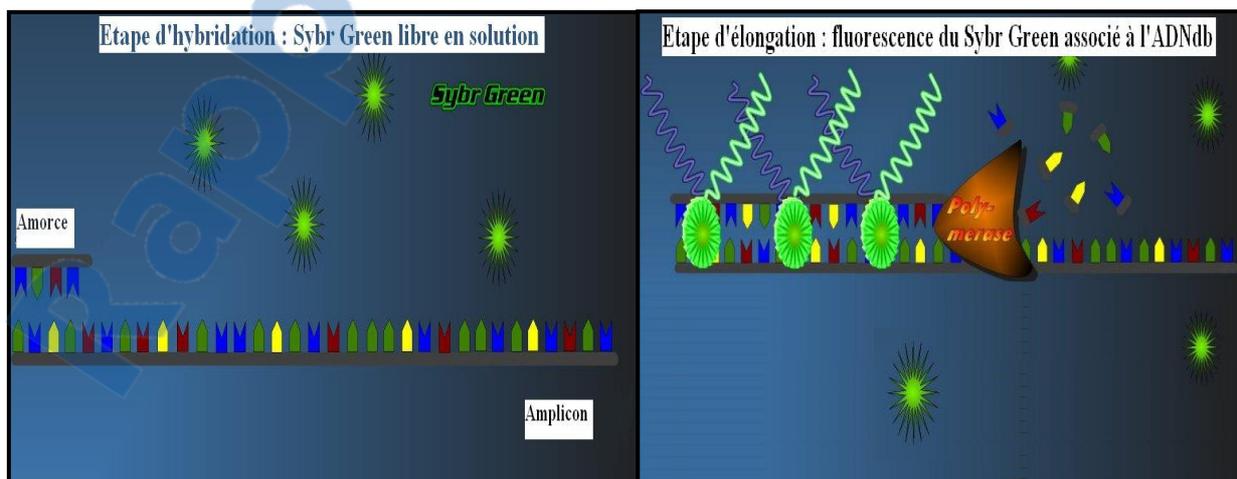


Figure 19 : 2 étapes de la réaction de PCR en présence de la molécule fluorescente Sybr Green. La fixation du SybrGreen le long de l'ADNdb néosynthétisé par la polymérase Taq au cours de l'élongation déclenche une émission forte de fluorescence (d'après <http://www.med.uni-giessen.de/gk-repro/Telelearning/kuhnert/realtimePCR.html>)

L'appareil Light Cycler (Roche Diagnostics, FRANCE) offre la possibilité d'une quantification en temps réel, par détection du niveau de fluorescence à l'issue de chaque cycle d'amplification. Il est alors possible de tracer les courbes d'amplification (fluorescence en fonction du temps). Or plus la quantité de séquence cible initialement présente est importante, plus la fluorescence sera détectée tôt. En comparant les courbes obtenues avec les échantillons testés à celles d'une gamme de concentration connue contenant la même séquence amplifiée, il est possible de déduire la quantité d'ADN initialement présente dans les échantillons, à l'aide du logiciel de quantification du Light Cycler (version 3.35) (voir figure 20).

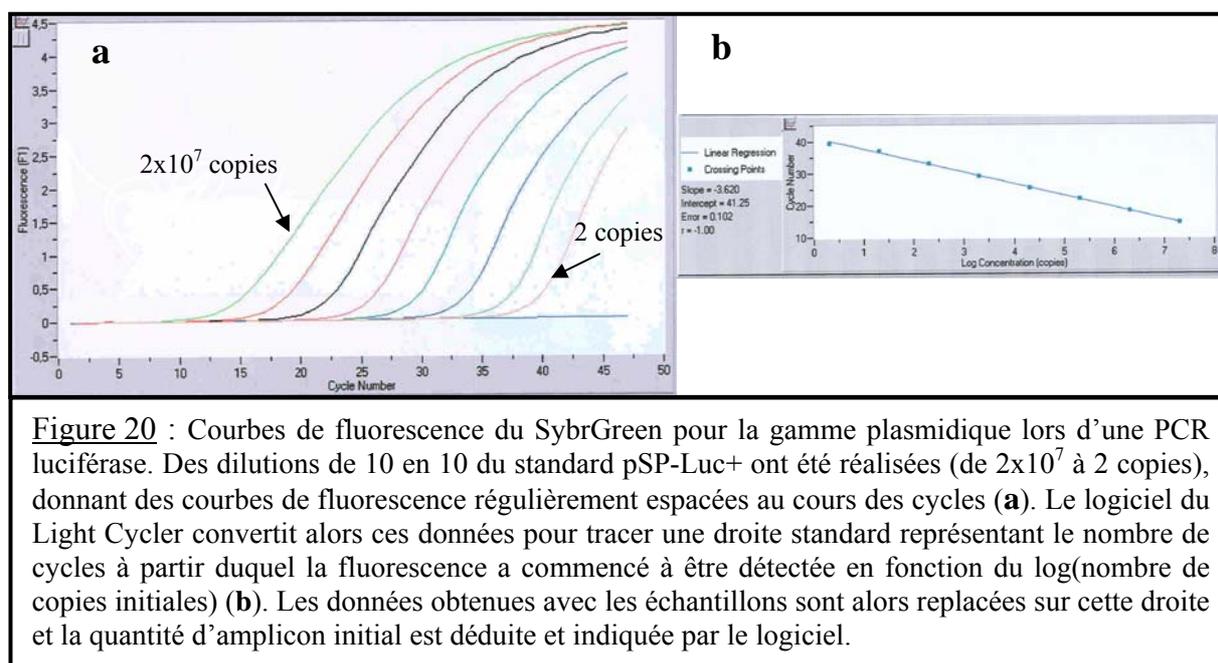


Figure 20 : Courbes de fluorescence du SybrGreen pour la gamme plasmidique lors d'une PCR luciférase. Des dilutions de 10 en 10 du standard pSP-Luc+ ont été réalisées (de 2×10^7 à 2 copies), donnant des courbes de fluorescence régulièrement espacées au cours des cycles (**a**). Le logiciel du Light Cycler convertit alors ces données pour tracer une droite standard représentant le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence a commencé à être détectée en fonction du log(nombre de copies initiales) (**b**). Les données obtenues avec les échantillons sont alors replacées sur cette droite et la quantité d'amplicon initial est déduite et indiquée par le logiciel.

De plus, l'utilisation de la molécule fluorescente SybrGreen nous permet de vérifier à l'issue de la réaction de PCR la spécificité de l'amplification, par réalisation d'une courbe de fusion. En chauffant très lentement l'ADNdb contenu dans la réaction, il est possible de déterminer une température où la fluorescence chute subitement, correspondant à un détachement des deux brins d'ADN. Cette température est spécifique du ou des produits amplifiés, car dépendant de la composition en bases G-C et de la longueur de l'amplicon.

L'amplicon correspond ici à un fragment du gène Luc pour la quantification des génomes viraux ou β -globine (séquence X14061 murine : 38339-38403 et 53548-53612) pour la quantification des génomes cellulaires (gène β -globine présent en 2 copies dans le génome humain et 4 copies dans le génome murin).

La gamme est constituée de dilutions successives de 10 en 10 du plasmide pSP-Luc+ (Promega, FRANCE)(comportant le gène Luc) (de 1 à 10^8 copies par μL) ou d'ADN génomique extrait à partir de fragments de queue de souris C57Bl6 (de 2 à 2×10^4 copies de β -globine par μL).

La réaction est réalisée dans des capillaires en verre dans un volume final de $20\mu\text{L}$, dont $2\mu\text{L}$ d'ADN de la gamme ou des échantillons. Chaque réaction comporte 700nM des amorces Luc1f (CAT gCC AgA gAT CCT ATT TTT gg) et Luc1R (AAg ACg ACT CgA AAT CCA CAT ATC) ou 500nM des amorces bglobF1 (CAT ggT gCA CCT gAC T) et bglobR1 (CTC ACC ACC AAC TTC ATC), le mélange réactionnel (QIAGEN SA, FRANCE) dilué au $\frac{1}{2}$ comportant les dNTP, la Taq polymérase et 4mM de MgCl_2 , et $1,5\text{mM}$ additionnel de MgCl_2 (MgCl_2 25mM , Roche Diagnostics, FRANCE) pour la PCR Luciférase.

La PCR comporte une étape d'activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 15 minutes, suivi d'un nombre variable de cycles d'amplification (dénaturation à 94°C pendant 15s, puis hybridation à 61°C pendant 15s pour Luc ou 52°C pendant 20s pour β -globine et élongation à 72°C pendant 10s) : 47 cycles pour la PCR Luc et 40 pour la PCR β -globine. Afin de vérifier la spécificité de la PCR réalisée, une courbe de fusion est systématiquement réalisée à la fin de chaque PCR, par chauffage à 95°C pendant 10s, puis hybridation de toutes les matrices à 55°C pendant 1min et enfin une étape d'augmentation lente de la température ($0,1^\circ\text{C}/\text{s}$) de 55°C à 90°C .

I.H. Localisation du récepteur CAR par microscopie confocale

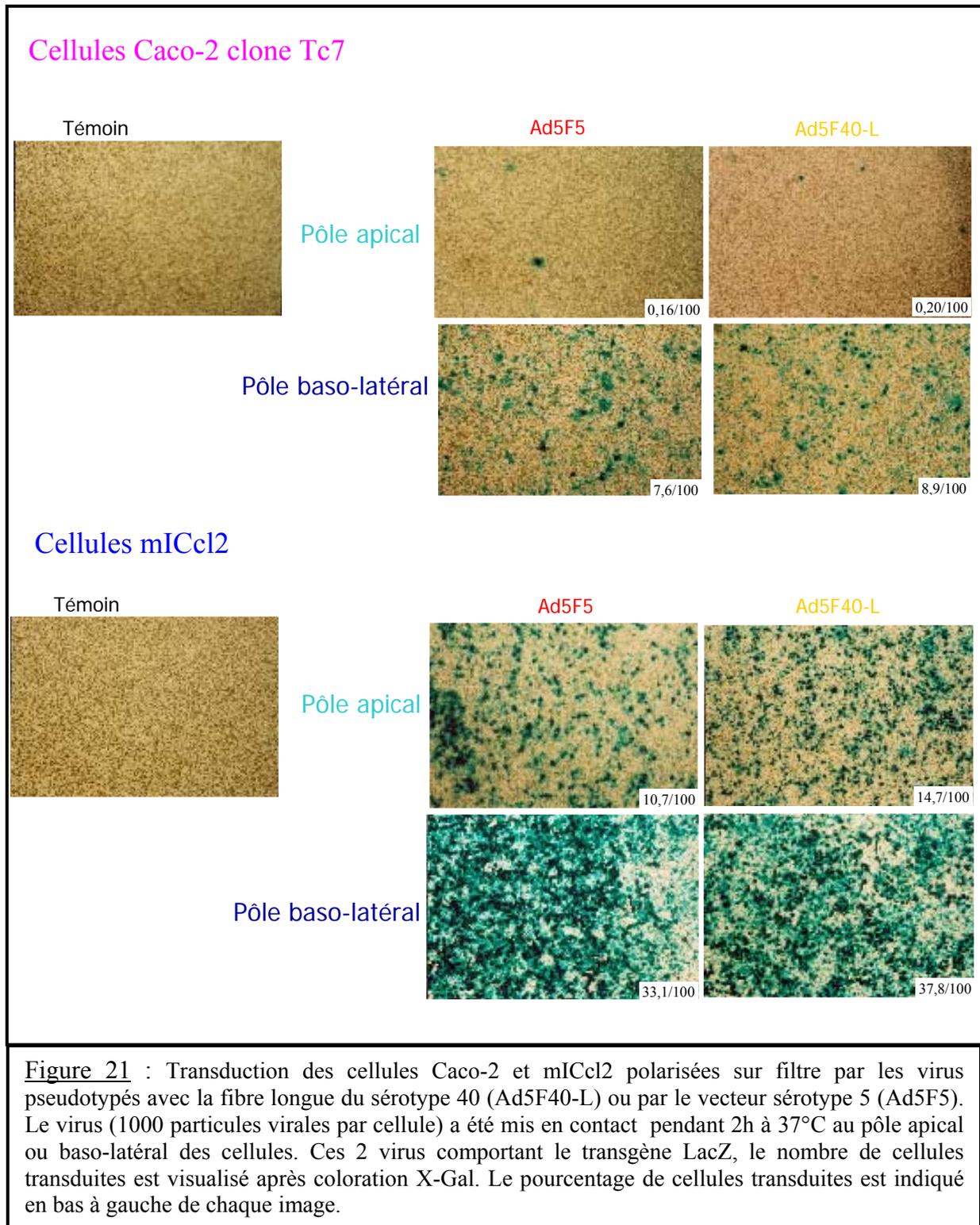
Les différentes étapes du marquage sont réalisées à température ambiante. Les cellules cultivées sur filtres sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes, puis les groupements aldéhydes libres sont bloqués avec du NH_4Cl 50mM pendant 20 minutes. Les cellules sont perméabilisées en PBS - Saponine 0,05% pendant 10 minutes, le même tampon étant utilisé par la suite pour les marquages et lavages. Après 1h30 de saturation en présence de BSA 2%, le premier marquage est réalisé durant 1h30. Deux anticorps anti-CAR, fournis par Bradd Spiller, ont été utilisés : un anticorps polyclonal de lapin reconnaissant le récepteur murin et humain ou un anticorps monoclonal de souris reconnaissant le CAR humain, dilués au 1/50 ou 1/10 respectivement. L'anticorps anti-ZO1 polyclonal de lapin de chez Zymed est utilisé au 1/200. Puis les anticorps secondaires (anti-lapin couplé FITC DAKO au 1/100, anti-lapin couplé TRITC DAKO au 1/50, anti-souris

couplé FITC TEBU au 1/40) sont placés au contact des cellules pendant 1h. Pour marquer les noyaux, l'iodure de propidium (5mg/mL, 1/5000) est ajouté pendant 3 minutes sur les cellules. Les filtres sont ensuite découpés et placés entre lame et lamelle, après dépôt d'une goutte du milieu de montage Vectashield, qui protège la fluorescence associée aux cellules.

Les lames ont été observées sur un microscope confocal Leica TCS NT/SP (Hôpital Tenon), à l'objectif 40, avec une acquisition séquentielle permettant d'enregistrer l'une après l'autre la fluorescence des différents fluorochromes. Les images obtenues selon un plan parallèle ou perpendiculaire au filtre permettent de localiser finement la ou les molécules d'intérêt.

II. Résultats

II.A. Différences de transduction des cellules Caco-2 clone Tc7 et mICcl2 par deux virus à fibre CAR-dépendante.



Plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent une diminution de l'efficacité de transduction des entérocytes, au fur et à mesure de leur différenciation^{30,48,127}. Croyle et coll. ont ainsi démontré une diminution importante de l'efficacité de liaison et d'internalisation des particules adénovirales du sérotype 5 lors de la différenciation des cellules Caco-2, contrairement à ce qui est observé avec le sérotype 41. Aussi dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au comportement des deux lignées de cellules épithéliales intestinales Caco-2 Tc7 humaines et mICcl2 murines vis-à-vis du vecteur le plus étudié actuellement en vaccination, dérivé du sérotype 5 et défectif pour la réplication ainsi que du vecteur pseudotypé avec une autre fibre CAR-dépendante, la fibre longue du sérotype 40 (qui appartient au sous-groupe F comme le sérotype 41).

Ces deux virus, comportant le transgène LacZ, ont été appliqués, pendant 2h à 37°C, au pôle apical ou baso-latéral de la monocouche cellulaire polarisée sur filtre. 48h post-infection, le nombre de cellules Caco-2 ou mICcl2 infectées par chacun des virus est visualisé par coloration X-Gal (voir figure 21). Le premier fait marquant est la différence de transduction par les deux virus en fonction du pôle cellulaire en contact avec le virus. En effet, le nombre de cellules infectées est toujours bien plus faible après contact apical. Les deux virus considérés sont assez semblables dans leurs capacités d'infection par le pôle apical et baso-latéral des deux types cellulaires étudiés, avec un nombre de cellules transduites similaire.

On note également une infectabilité très supérieure des cellules mICcl2 par ces deux virus à la fibre CAR-dépendante. Après infection par un nombre équivalent de génomes viraux par cellule, le nombre de cellules mICcl2 infectées est plus de 4 fois supérieur au nombre de cellules Caco-2 transduites, que l'on considère un contact apical ou baso-latéral. La différence entre cellules mICcl2 et Caco-2 est encore plus nette si l'on ne considère que l'infection par le pôle apical, avec ici environ 50 fois plus de mICcl2 transduites.

Ces données documentent donc une différence de comportement d'infectabilité des cellules mICcl2 par rapport aux cellules Caco-2 clone Tc7 vis-à-vis de certains vecteurs adénoviraux.

II.B. Relation avec la localisation du récepteur d'attachement CAR.

Il est décrit que la faible efficacité de transduction des vecteurs adénoviraux du sous-groupe C à partir du pôle apical des cellules épithéliales est due en partie à la localisation baso-latérale du principal récepteur cellulaire CAR, et aussi des intégrines¹²⁸. Or les deux lignées cellulaires à l'étude différant par leur efficacité de transduction par le vecteur Ad5, la localisation de la molécule CAR diffère-t-elle entre Caco-2 et mICcl2 ?

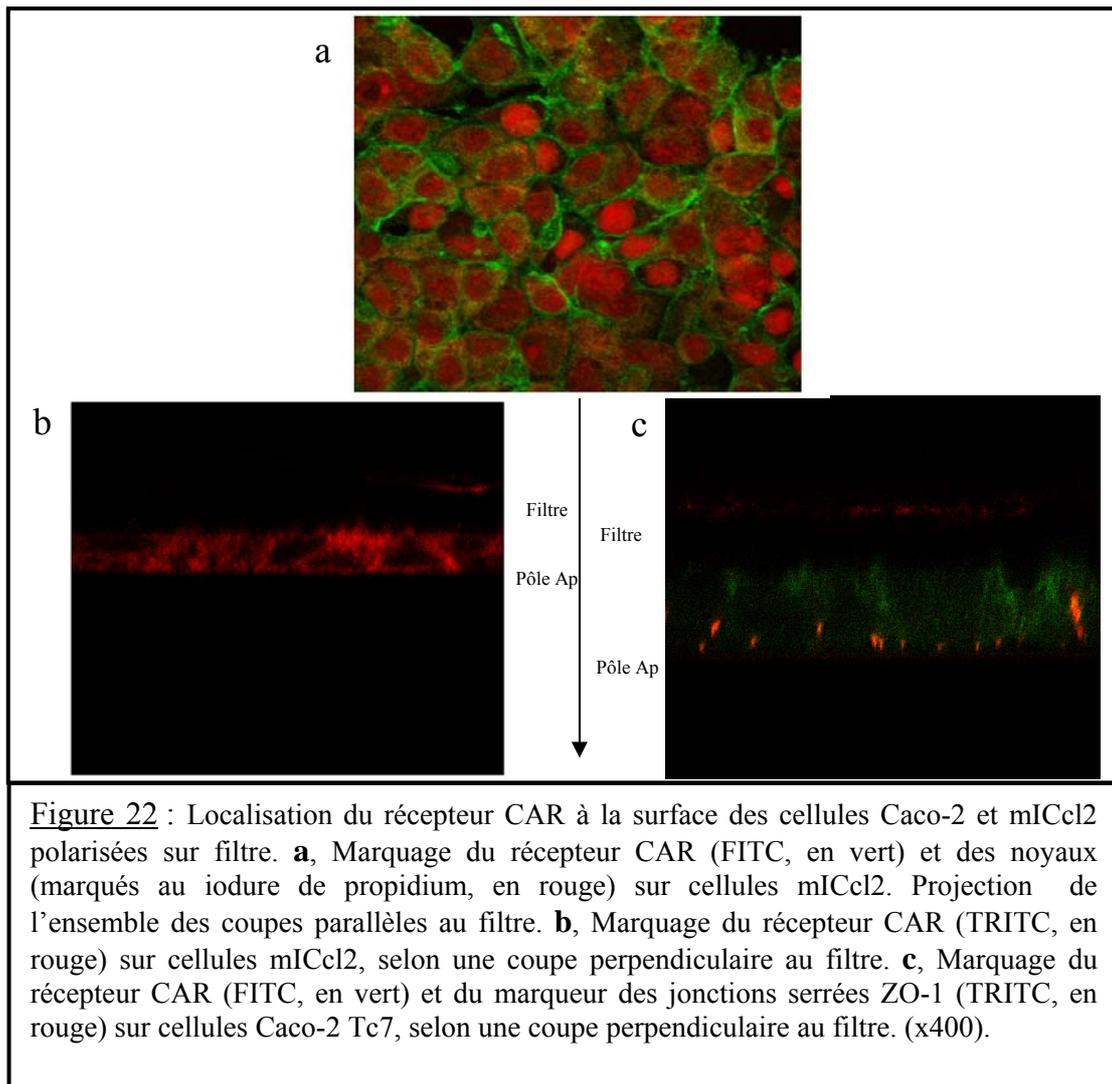


Figure 22 : Localisation du récepteur CAR à la surface des cellules Caco-2 et mICcl2 polarisées sur filtre. **a**, Marquage du récepteur CAR (FITC, en vert) et des noyaux (marqués au iodure de propidium, en rouge) sur cellules mICcl2. Projection de l'ensemble des coupes parallèles au filtre. **b**, Marquage du récepteur CAR (TRITC, en rouge) sur cellules mICcl2, selon une coupe perpendiculaire au filtre. **c**, Marquage du récepteur CAR (FITC, en vert) et du marqueur des jonctions serrées ZO-1 (TRITC, en rouge) sur cellules Caco-2 Tc7, selon une coupe perpendiculaire au filtre. (x400).

Afin de localiser finement la distribution du récepteur CAR dans les cellules Caco-2 et mICcl2, nous avons fait appel à la microscopie confocale qui permet d'obtenir la distribution spatiale d'une molécule selon plusieurs plans de coupe virtuels.

Comme il apparaît sur la figure 22, la molécule CAR est essentiellement localisée à la surface des entérocytes, avec les limites intercellulaires des cellules bien marquées. Afin d'apprécier la localisation apicale ou baso-latérale de CAR en fonction du type cellulaire, nous avons réalisé une coupe perpendiculaire au filtre. On peut observer une distribution de CAR homogène sur toute la surface des cellules mICcl2, différente de la distribution essentiellement baso-latérale de CAR pour les cellules Caco-2. Afin de bien visualiser la limite entre le pôle apical et baso-latéral sur les cellules Caco-2, les jonctions serrées ont été marquées à l'aide d'un anticorps anti-ZO-1 (zonula occludens 1).

On peut ainsi constater une différence dans la localisation du récepteur CAR à la surfaces des deux types cellulaires Caco-2 et mICcl2, avec une restriction baso-latérale seulement retrouvée pour les Caco-2.

II.C. Capacités de transduction des différents vecteurs adénoviraux.

La différence de localisation du récepteur CAR à la surface des cellules Caco-2 et mICcl2 n'est sans doute pas la seule caractéristique opposant ces cellules en ce qui concerne leur interaction avec les vecteurs adénoviraux pseudotypés pour la fibre. Il apparaît donc intéressant de comparer les capacités de transduction des différents vecteurs entre eux et entre les deux lignées.

Nous regardons ici non plus le nombre de cellules transduites exprimant l'enzyme β -galactosidase mais le niveau d'activité de la luciférase, reflétant son niveau d'expression, pour l'ensemble de la monocouche cellulaire. Les cellules polarisées sur filtre ont été infectées par les différents vecteurs portant le transgène luciférase, à une multiplicité d'infection de 1000 particules virales par cellule. 2 jours après l'infection, l'activité luciférase a été évaluée à partir des lysats cellulaires en luminométrie.

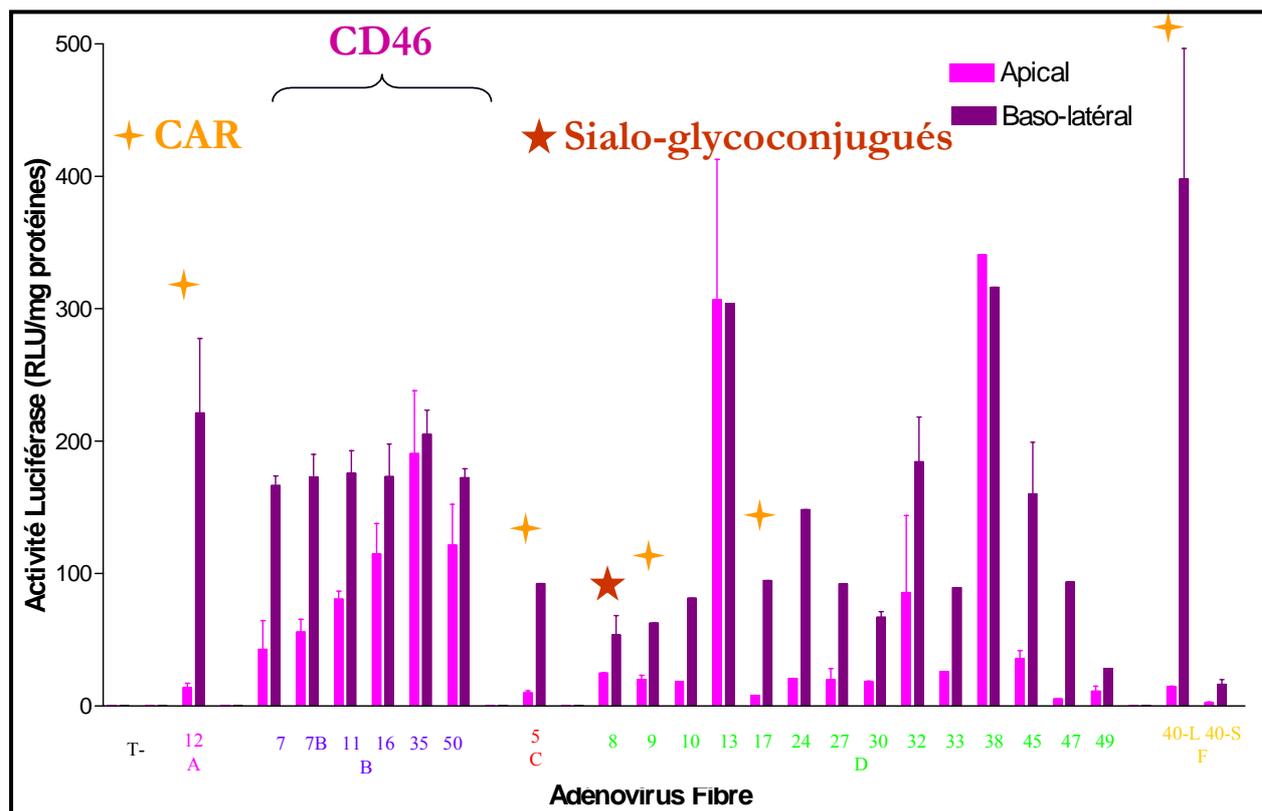


Figure 23 : Transduction des Caco-2 clone Tc7 polarisées sur filtre par l'ensemble des vecteurs pseudotypés pour la fibre et portant le transgène Luciférase. Les résultats sont exprimés en activité luciférase, normalisée par rapport à la quantité de protéines du lysat cellulaire. Figurent sur ce schéma les récepteurs identifiés pour certaines fibres. Ces résultats sont la synthèse de 3 expériences indépendantes, avec dupliqua. Les écart-types sont indiqués.

Comme le montre la figure 23 concernant les cellules Caco-2 clone Tc7, les 24 virus étudiés diffèrent par leur efficacité de transduction après contact apical ou baso-latéral. La majorité des virus infectent plus efficacement ces cellules par le pôle baso-latéral (activité luciférase après contact baso-latéral supérieure à celle après contact apical), ce qui rejoint les résultats du II.A. Si on ne considère que la transduction à partir du pôle apical (situation lors de l'administration orale de ces vecteurs), les fibres des sérotypes du sous-groupe B ainsi que certaines fibres des sérotypes du sous-groupe D (13, 32 et 38) apportent un avantage par rapport à la fibre 5. Ainsi, la transduction des cellules Caco-2 est au minimum multipliée par un facteur 5 lorsque les vecteurs portent les fibres B et d'un facteur 10 avec les fibres D. Les vecteurs les plus intéressants ici sont ceux portant la fibre 35, 13 ou 38.

Par contre, le vecteur portant la fibre courte du sérotype 40 (40-S) est inefficace pour infecter ces cellules.

De plus, les virus à fibre CAR-dépendante ne présentent pas la même efficacité de transduction par le pôle baso-latéral, même si la transduction par le pôle apical est similaire. Ainsi, les virus fibre 9 ou 17 sont équivalents au virus fibre 5, alors que les virus fibre 12 et 40 longue ou 40-L (provenant de sérotypes à tropisme entéritique) sont plus efficaces pour une infection par le pôle baso-latéral.

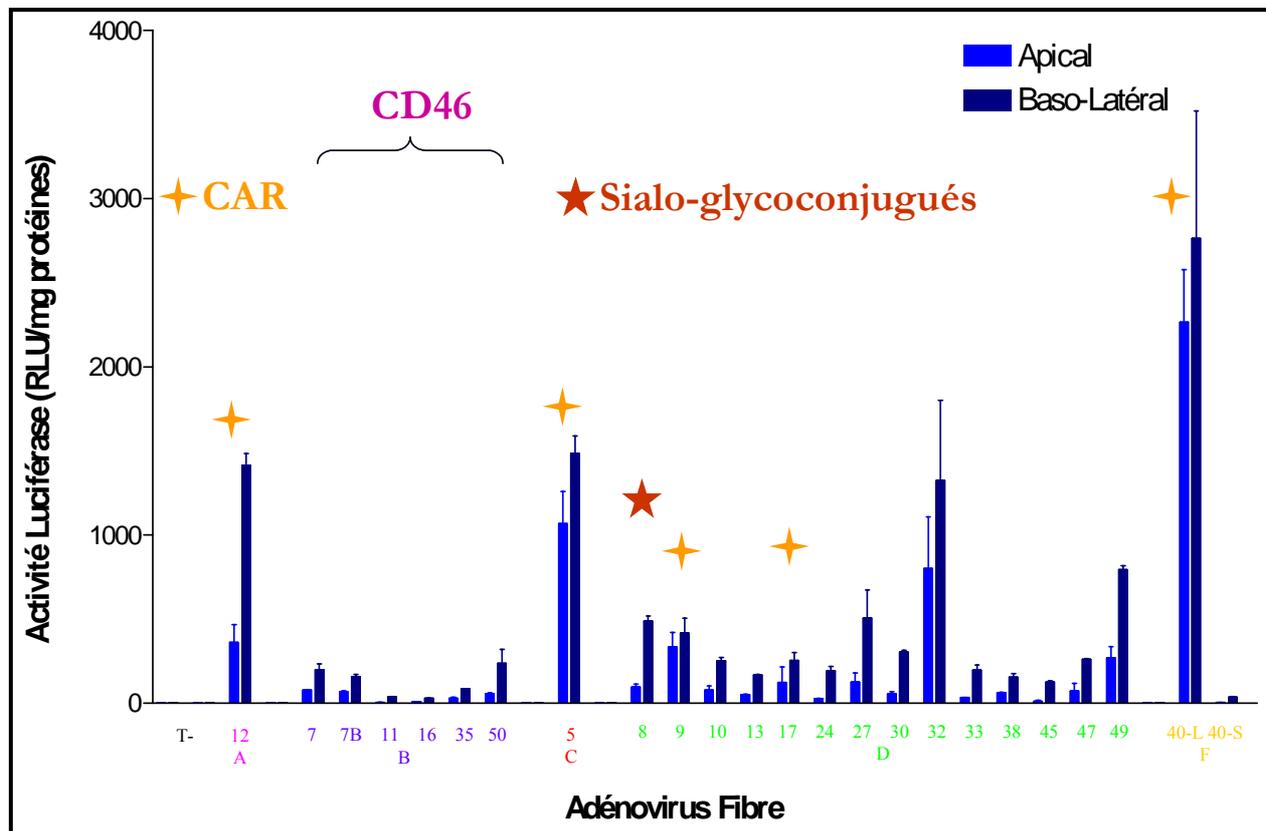


Figure 24 : Transduction des mICcl2 polarisées sur filtre par l'ensemble des vecteurs pseudotypés pour la fibre et portant le transgène luciférase. Les résultats sont exprimés en activité luciférase, normalisée par rapport à la quantité de protéines du lysat cellulaire. Ces résultats sont la synthèse de 2 expériences indépendantes, comprenant chacune deux répétitions. Les écart-types sont indiqués.

Si on s'intéresse maintenant à l'infection des mICcl2 polarisées par les différents vecteurs, on observe que les différences de transduction après contact apical ou baso-latéral sont atténuées par rapport à celles constatées avec les cellules Caco-2 (voir figure 24). Il existe des vecteurs faiblement efficaces pour infecter les cellules mICcl2 : ceux portant les fibres B et la plupart de ceux comportant les fibres D, et enfin des vecteurs qui infectent les mICcl2 efficacement à la fois par le pôle apical et baso-latéral : il s'agit des vecteurs avec certaines fibres CAR-dépendantes (5, 12 et 40 longue) ainsi que le virus fibre 32. L'efficacité

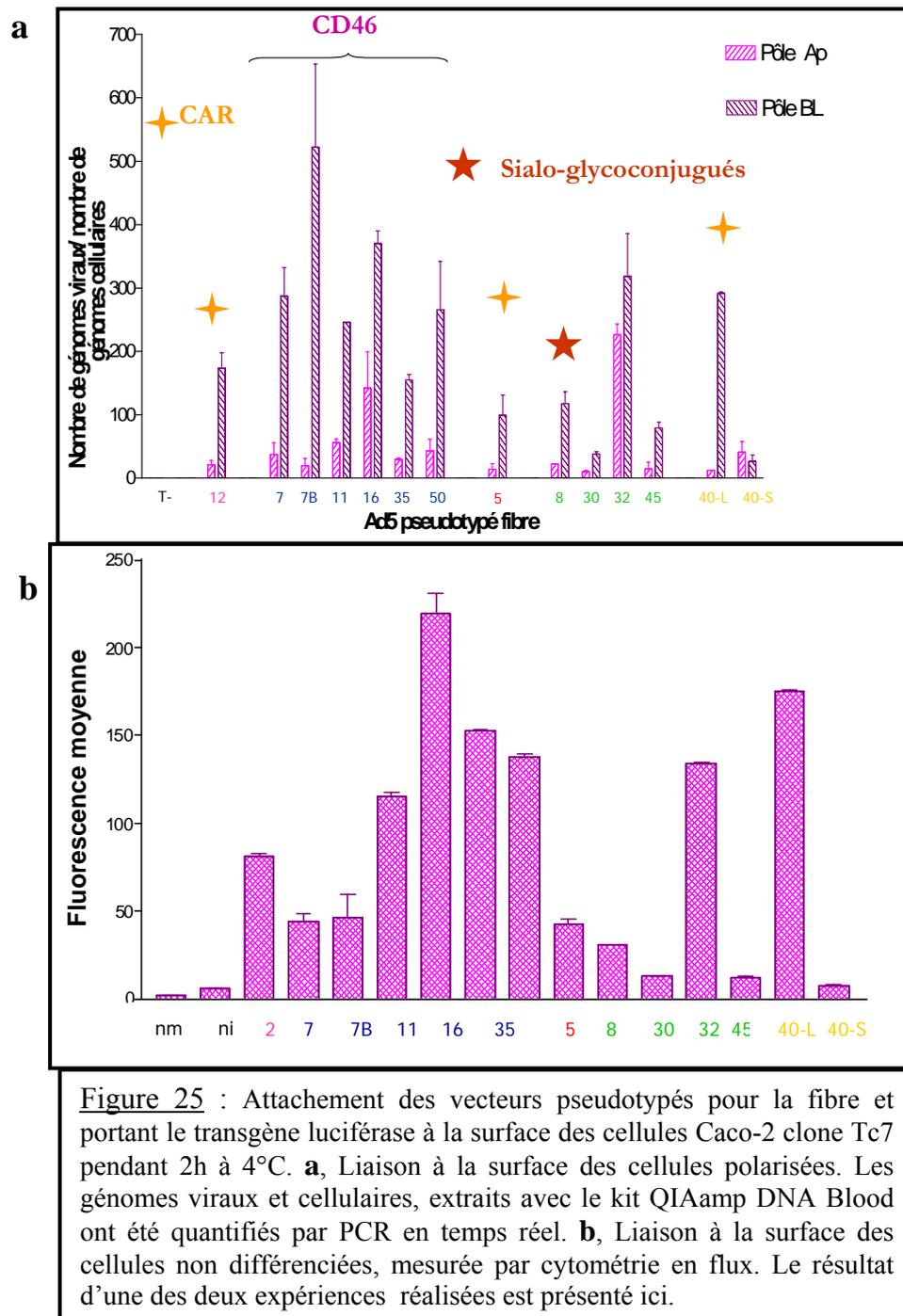
de transduction des cellules mICcl2 par les vecteurs mentionnés en dernier est bien plus importante ici (voir le rapport d'échelle entre les deux graphiques 23 et 24).

Nous retrouvons donc la meilleure infectabilité des cellules mICcl2, mais seulement pour un nombre restreint de vecteurs intéressants. Nous avons en effet retenus après étude des virus sur cellules Caco-2 les vecteurs portant les fibres du sous-groupe B et certaines fibres du sous-groupe D pour leur efficacité d'infection par le pôle apical. Pour les cellules mICcl2, les vecteurs à fibre B sont moins efficaces que le vecteur Ad5 (portant la fibre 5), et on trouve une transduction efficace mais équivalente pour certains virus à fibre CAR-dépendante (5, 12 et 40-L) et à fibre 32.

II.D. Efficacité comparée de l'attachement des différents vecteurs adénoviraux.

Afin de déterminer si les différences de transduction constatées pouvaient être reliées à des différences dans la première étape d'interaction des vecteurs avec les cellules épithéliales, c'est-à-dire l'attachement, les différents adénovirus portant le transgène luciférase ont été mis au contact des cellules Caco-2 ou mICcl2 pendant 2 heures à 4°C. Le maintien d'une telle température empêche le déroulement de la phase active d'internalisation des virus.

Nous avons comparé ici pour chaque type cellulaire l'attachement sur cellules polarisées après quantification par PCR quantitative en temps réel et l'attachement sur cellules non différenciées après quantification en cytométrie en flux. La PCR quantitative en temps réel nous donne le nombre absolu de génomes viraux (après PCR luciférase) associés aux cellules et normalisé par rapport au nombre de génomes cellulaires (après PCR β -globine). La cytométrie en flux nous renseigne sur l'intensité de fluorescence des cellules après marquage des protéines virales, qui est fonction du nombre de particules virales présentes à la surface cellulaire. Cette dernière technique ne peut pas être utilisée dans le cas d'une monocouche cellulaire polarisée, car il est alors très difficile de dissocier les cellules les unes des autres. La comparaison des résultats entre cellules polarisées et non polarisées nous permet d'appréhender l'influence de la polarisation cellulaire sur l'expression et la distribution des récepteurs des adénovirus étudiés.



Concernant les cellules Caco-2, les résultats obtenus avec les deux méthodes sont tout à fait superposables si on considère le seul pôle baso-latéral des cellules polarisées ou l'ensemble de la surface cellulaire des cellules non différenciées (voir figure 25). Ces résultats laissent penser que la plupart des récepteurs adénoviraux sont redirigés vers le pôle baso-latéral des cellules Caco-2 au cours de leur polarisation. On observe un attachement plus important au pôle apical ou au pôle baso-latéral, des virus portant les fibres B, 32 ou CAR-

dépendantes 12 et 40 longue par rapport au vecteur fibre 5. Là encore, le virus avec la fibre courte du sérotype 40 se lie très peu à la surface des cellules. Les seuls virus à se lier significativement plus que le sérotype 5 à la surface apicale des Caco-2 sont les vecteurs à fibre 16 et 32 (199 et 243 génomes viraux par cellule respectivement contre seulement 23 pour le virus fibre 5).

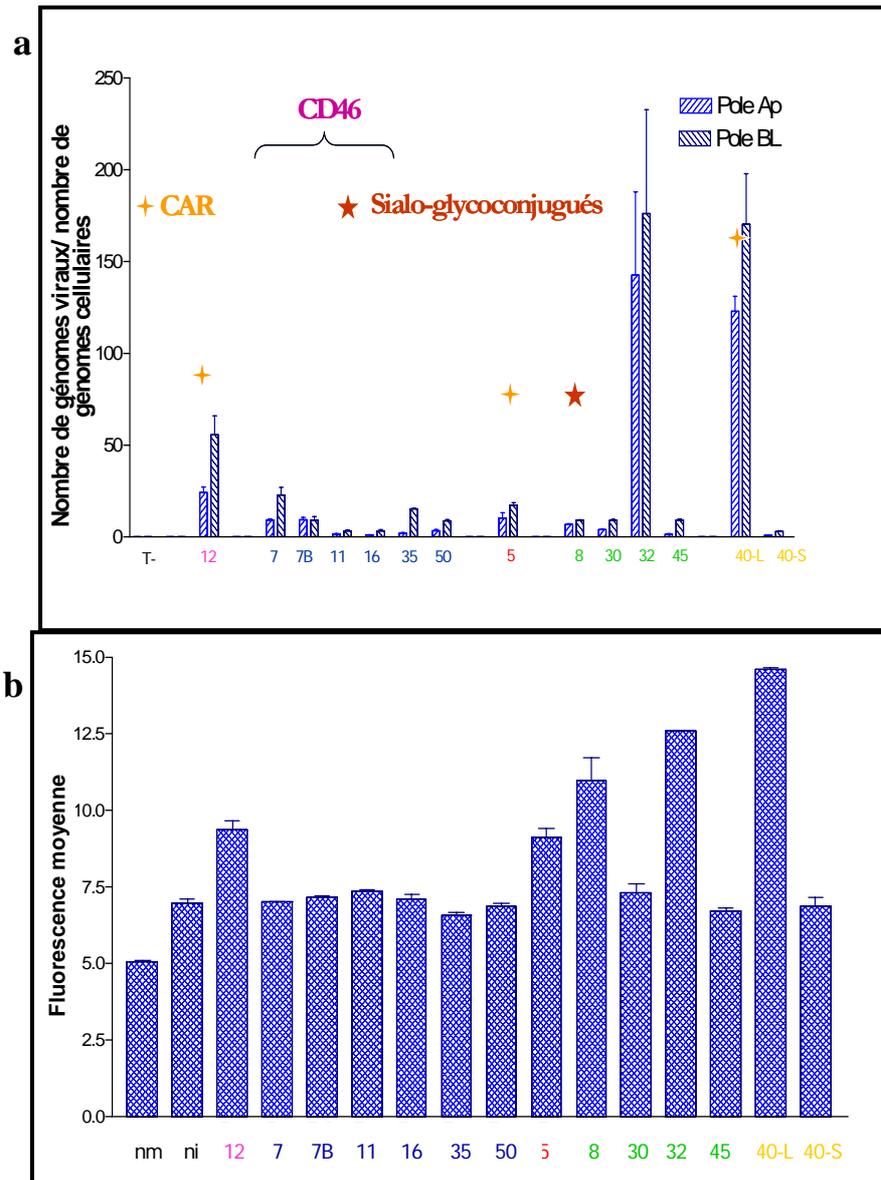


Figure 26: Attachement des vecteurs pseudotypés pour la fibre et portant le transgène luciférase à la surface des cellules mICcl2 pendant 2h à 4°C. **a**, Liaison à la surface des cellules polarisées. Les génomes viraux et cellulaires, extraits avec le kit QIAamp DNA Blood, ont été quantifiés par PCR en temps réel. **b**, Liaison à la surface des cellules non différenciées, quantifiée par cytométrie en flux. Le résultat d'une des deux expériences réalisées est présenté ici.

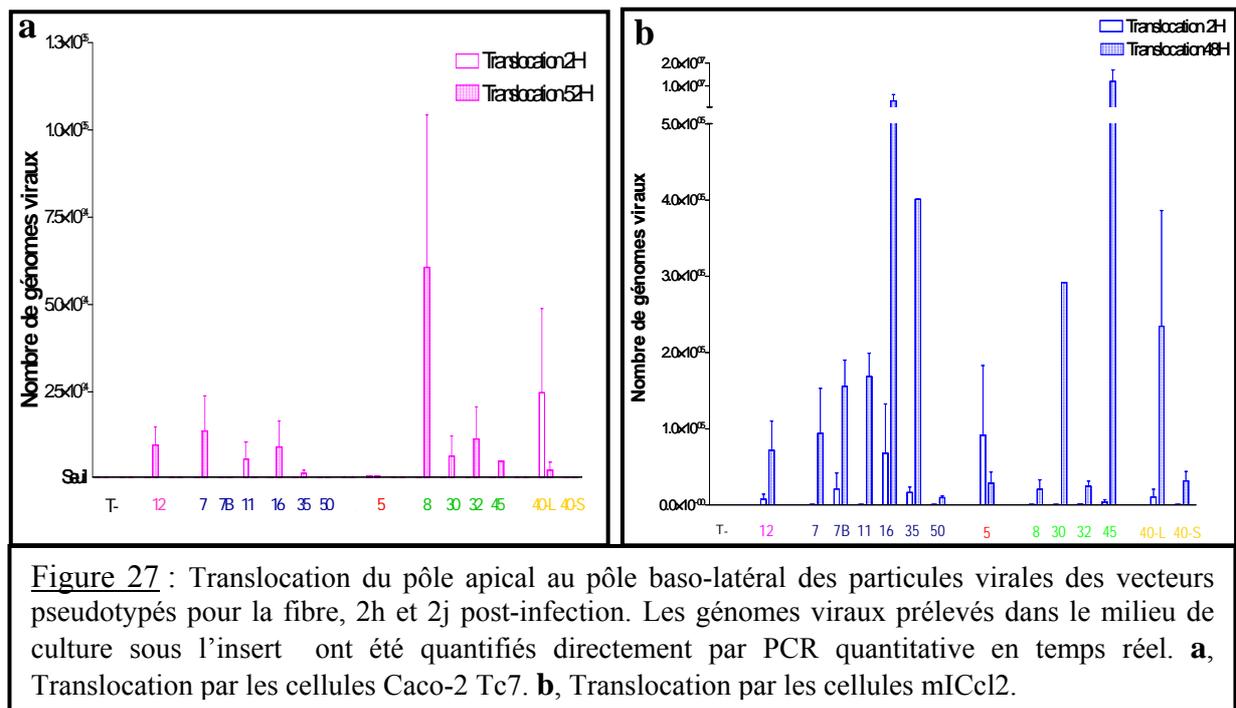
Les données obtenues pour les cellules mICcl2 montrent là aussi une similitude entre cellules différenciées ou non. On peut néanmoins noter que les écarts en cytométrie en flux en fonction des virus sont assez faibles, et que cette technique apparaît donc moins discriminante que la PCR quantitative. Les virus se fixent moins à la surface des cellules mICcl2 (fluorescence enregistrée plus faible et nombre de génomes viraux par cellules là aussi un peu plus faible que dans le cas des Caco-2) et très peu de vecteurs s'attachent mieux que l'adénovirus fibre 5 au pôle apical ou baso-latéral des mICcl2 : il s'agit des virus avec les fibres 12, 32 et 40 longue (voir figure 26).

Au final, les capacités de liaison et de transduction de nos cellules épithéliales polarisées par les différents vecteurs pseudotypés pour la fibre apparaissent superposables. Ainsi l'infection des cellules Caco-2 et mICcl2 polarisées semble directement dépendre de l'efficacité d'attachement des différents virus à leur surface apicale ou baso-latérale. Cette superposition n'est pourtant que partielle, avec un décalage entre une plus faible liaison sur les cellules mICcl2 et une meilleure transduction de ces cellules par les virus portant les fibres 12, 32 ou 40 longue. De plus, si on regarde l'attachement et la transduction virus par virus, on peut s'apercevoir que la très forte capacité de liaison de l'adénovirus fibre 32 ne se traduit pas complètement dans son efficacité d'infection : équivalent voire même meilleur en attachement que le virus avec la fibre longue du sérotype 40, il s'avère moins efficace en transduction, ce qui suppose pour ce virus une internalisation moins efficace.

II.E. Translocation des adénovirus

Une translocation sélective assurant le passage de la barrière muqueuse des particules virales intactes pourrait être intéressante pour assurer la transduction des types cellulaires sous-jacents à la muqueuse, parmi lesquels les cellules présentatrices d'antigènes, qui jouent un rôle fondamental dans l'initiation de la réponse immune acquise⁶⁵. Aussi il est intéressant de regarder la propriété de franchissement de l'épithélium intestinal par translocation des différents vecteurs adénoviraux.

Les particules virales transloquées depuis le pôle apical ou baso-latéral des cellules ont été prélevées à différents temps après le début de l'infection. Elles ont été quantifiées par PCR quantitative en temps réel, en utilisant la PCR luciférase.



On note à nouveau ici des différences entre vecteurs, en fonction de la lignée cellulaire considérée (voir figure 27). Afin de s'assurer du maintien de l'étanchéité du filtre au cours de l'infection, des mesures régulières de résistance trans-épithéliale ont été effectuées, ainsi que parfois la mesure du passage de billes fluorescentes (passage alors quantifié par cytométrie en flux). Les Caco-2 Tc7 assurent une translocation tardive (très faible au point 2h post-infection) et sélective des virus portant les fibres du sous-groupe D, dont le virus comportant la fibre 8 qui est le virus transporté le plus efficacement, ainsi que d'autres virus et en particulier ceux portant la fibre 40 longue, 16 et 7.

Les mICcl2 transloquent beaucoup plus rapidement (dès 2h post-infection) les virus portant les fibres du sous-groupe B et les fibres CAR-dépendantes, c'est-à-dire les fibres 5, 12 et 40 longue. Plus tardivement, à 48h post-infection, tous les virus testés sont efficacement transportés du pôle apical au pôle baso-latéral.

Cette transcytose est beaucoup moins efficace, mais plus sélective que la translocation du pôle baso-latéral au pôle apical (données non montrées). En effet, il est possible de détecter le transport de tous les vecteurs étudiés depuis le pôle baso-latéral jusqu'au pôle apical des cellules Caco-2 et mICcl2 2h post-infection. De plus, les particules virales récupérées au cours de cette translocation sont alors plus nombreuses qu'au même temps de la translocation dans le sens apical-baso-latéral.

III. Discussion

III.A. Etude complète des interactions des adénovirus humains avec la muqueuse intestinale

L'étude présentée ici constitue une étude des différentes étapes d'interaction entre des vecteurs adénoviraux différant uniquement par leur fibre et un épithélium intestinal reconstitué *in vitro*. Elle nous permet donc d'appréhender l'importance du rôle de la fibre dans les différentes étapes d'attachement, de transduction et de translocation des cellules épithéliales polarisées. Nous observons dans cette étude que la fibre détermine avant tout l'efficacité d'attachement sur les cellules, puisque la transduction est généralement superposable aux données d'attachement, ce qui est en accord avec le rôle connu de la fibre dans l'interaction de haute affinité avec un ou plusieurs récepteurs cellulaires. Ce rôle est attribué essentiellement à la tête de la fibre mais est également dépendant de la taille et de la flexibilité de la tige de la fibre^{4,132}. La translocation sélective de certains vecteurs du pôle apical au pôle baso-latéral fait sans doute appel également à une liaison préalable sur un récepteur cellulaire¹¹³. La fibre semble influencer faiblement l'internalisation dans notre étude, mais pourrait participer au choix des voies d'entrée du virus (c'est-à-dire au choix du type de vésicules d'endocytose formée : vésicules à clathrine, vésicules de macropinocytose,...) et à l'efficacité d'extraction des virus depuis les vésicules d'endocytose¹⁰³.

Il manque, dans cette étude, l'évaluation de l'étape d'internalisation des différents virus, puisque la mesure de la transduction des cellules nous apporte seulement une information sur l'acheminement au noyau du génome adénoviral et sa transcription. Or il semble qu'il y ait parfois une discordance entre les résultats d'attachement et de transduction (par exemple pour le vecteur portant la fibre 32), ce qui renforce l'intérêt pour l'étude de l'internalisation des particules adénovirales. Il serait possible d'observer cette étape au microscope confocal, en utilisant des anticorps dirigés contre des protéines structurales du virus suffisamment représentées (comme la protéine capsidale hexon ou la protéine de core VII). Nos essais de quantification des génomes viraux après contact des virus à 4°C puis à 37°C et l'application de différents traitements visant à retirer les particules virales liées à la surface cellulaire selon la technique de Shayakhmetov et coll.¹⁰³ ont révélé une faible

efficacité de ces traitements sur les cellules Caco-2, rendant la méthode de PCR quantitative inutilisable ici.

De plus, l'efficacité de translocation des différents virus est à documenter plus finement, de manière cinétique et en reconfirmant les résultats obtenus.

III.B. Différences de susceptibilité à l'infection par les adénovirus des lignées entérocytaires Caco-2 humaine et mICcl2 murine

Il est apparu au cours de cette étude que les cellules mICcl2 sont beaucoup plus susceptibles à l'infection par un vecteur adénoviral dérivant du sérotype 5 (voir figure 21). Le nombre de cellules mICcl2 transduites après contact apical ou baso-latéral est ainsi au moins 4 fois supérieur à celui des cellules Caco-2.

Cette caractéristique peut être reliée à une distribution cellulaire plus homogène du récepteur de l'adénovirus sérotype 5, le CAR, à la surface des cellules mICcl2. La localisation strictement baso-latérale du CAR dans les cellules épithéliales respiratoires constitue un frein connu à l'infection par l'adénovirus 5¹²⁸, en concordance avec les résultats obtenus sur les cellules Caco-2.

De plus, on peut aussi penser que les cellules mICcl2, présentant un phénotype comparable aux cellules des cryptes intestinales¹¹, ont un glycocalyx moins développé que celui recouvrant la surface apicale des cellules Caco-2, gênant ainsi moins l'infection par les vecteurs adénoviraux⁸¹.

III.C. Sélection de vecteurs viraux aux comportements différents vis-à-vis de la muqueuse intestinale (traversée vs infection de l'épithélium)

Les vecteurs adénoviraux pseudotypés par la fibre de sérotypes d'adénovirus humains ont démontré des caractéristiques différentes de franchissement ou d'infection de l'épithélium intestinal, qui diffèrent suivant la lignée cellulaire considérée (voir tableau III).

	Caco-2 Tc7	mICcl2
Transduction	Différence de transduction en fonction du pôle cellulaire en contact avec le virus : infection apicale moins efficace	Transduction assez comparable après contact apical ou baso-latéral. Meilleure infectabilité
	Efficacité d'infection apicale par les adénovirus portant les fibres du sous-groupe B ainsi que certaines fibres du sous-groupe D (13, 32 et 38)	Transduction importante par les vecteurs présentant certaines fibres CAR-dépendantes (5, 12 et 40 longue) ainsi que la fibre 32
Attachement	Attachement efficace, à la surface apicale, des vecteurs à fibre 16 (B) et 32 (D)	Fixation plus faible des virus. Efficacité d'attachement au pôle apical pour les virus portant les fibres 12, 32 et 40 longue
Translocation	Translocation tardive et sélective des virus portant les fibres du sous-groupe D (8 en particulier) et les fibres 16, 7 (B) et 40 longue	Translocation plus rapide (détectable à 2h post-infection) des virus portant les fibres du sous-groupe B et les fibres CAR-dépendantes (5, 12 et 40 longue)

Tableau III : Synthèse des résultats de transduction, d'attachement et de translocation sur les cellules Caco-2 et mICcl2 pour les différents adénovirus étudiés.

Des vecteurs se sont révélés efficaces de manière constante en terme d'infection : les adénovirus avec la fibre du sérotype 32 ou de virus à tropisme digestif (12 et 40 longue), ou en terme de translocation, avec en particulier le virus comportant la fibre longue du sérotype 40. Ces vecteurs intéressants pourraient assurer une telle efficacité grâce à l'utilisation de différents récepteurs cellulaires, comme décrit pour la fibre d'un autre virus entérique (le sérotype 41, très proche du sérotype 40)³⁰ et comme le laisse supposer le profil de liaison de l'adénovirus fibre 32 obtenu en cytométrie en flux montrant 2 pics (un tel profil montre deux populations cellulaires aux capacités de liaison différentes, pouvant provenir de l'utilisation de récepteurs distincts en fonction de la population considérée) (données non montrées).

En opposition avec ces vecteurs, le vecteur pseudotypé avec la fibre courte du sérotype 40 ne confère aucun avantage par rapport au vecteur 5 et apparaît même très peu efficace, ce qui laisse les questions sur le rôle de cette deuxième fibre des sérotypes du sous-groupe F encore sans réponse⁹⁷. En effet de tels résultats font penser que soit le récepteur de cette fibre est absent de nos deux lignées cellulaires, soit que cette fibre n'assure pas une fonction

d'attachement. Nous souhaitons donc conserver ce vecteur par la suite afin d'étudier plus précisément cette question.

De plus, certains vecteurs présentent des profils différents sur cellules Caco-2 et mICcl2. Les vecteurs pseudotypés par les fibres du sous-groupe B ne se sont ainsi révélés efficaces que dans le cas de l'infection des cellules Caco-2. Ce résultat corrobore d'autres résultats montrant l'efficacité des vecteurs du sous-groupe B sur les seules cellules humaines et simiennes^{49,66}, supposant une interaction avec une molécule spécifique d'espèce. Or plusieurs équipes viennent de démontrer la dépendance de l'interaction fibre-CD46 pour une infection efficace par ces virus^{39,100}. Contrairement au CAR très conservé, les molécules CD46 humaine et murine ne présentent que 51% d'identité dans leur séquence protéique¹²². Ce récepteur de plus semble absent de la surface de la plupart des cellules murines. De la même façon, la translocation du pôle apical vers le pôle baso-latéral des virus présentant les fibres du sous-groupe D, et en particulier du sérotype 8, n'existe que sur les cellules Caco-2, tandis que celle des virus comportant les fibres du sous-groupe B n'est vraiment efficace que pour les cellules mICcl2.

Il serait intéressant de compléter ces résultats variables entre lignées en utilisant d'autres lignées cellulaires épithéliales intestinales issues d'espèces animales différentes (comme les cellules IPEC porcines⁸⁸), ou en essayant de reconstituer une barrière épithéliale intestinale plus physiologique à l'aide de co-cultures (de cellules épithéliales intestinales avec des cellules dendritiques⁸⁶) ou de biopsies intestinales. Néanmoins, dans l'objectif de détermination des récepteurs impliqués dans le franchissement ou l'infection de la barrière épithéliale intestinale par les différents vecteurs adénoviraux, nous continuerons d'utiliser le modèle des lignées cellulaires, plus simple à manier. Nous souhaiterions élucider les mécanismes moléculaires à l'origine des différences constatées entre virus et cellules et déterminer si les spécificités des fibres préalablement déterminées dans d'autres modèles cellulaires s'appliquent à nos lignées cellulaires. On peut en effet se demander si les récepteurs décrits à l'heure actuelle sont les seuls à participer dans l'interaction adénovirus-cellule, car en particulier, le modèle de double interaction CAR et intégrines décrit pour l'adénovirus sérotype 5 est trop rudimentaire pour expliquer les données de biodistribution du vecteur *in vivo*. De plus, les spécificités de certaines fibres (celles de la fibre 32 tout particulièrement) restent encore inconnues. L'étude de la mécanistique des interactions virus-cellule va reposer sur un blocage efficace de la fonction ou de l'expression de certaines

molécules de surface et concernera les seuls vecteurs sélectionnés à la suite de l'étude présentée, avec au moins un vecteur de chaque sous-groupe : les virus pseudotypés avec les fibres 5 (base de comparaison), 8, 12, 32, 35, 40 (longue et courte).

III.D. Perspectives : importance des interactions adénovirus-cellules épithéliales dans l'induction d'une immunité muqueuse chez la souris et la biodistribution du virus.

L'étude des interactions des vecteurs adénoviraux avec les cellules épithéliales intestinales nécessite une étude *in vivo*. En effet, un certain nombre de points ne sont pas pris en compte dans l'étude *in vitro* :

- la possible dégradation du vecteur durant le transit digestif, en particulier dans le compartiment gastrique,
- l'influence de la variabilité de la durée de contact de l'adénovirus avec l'épithélium ou les plaques de Peyer intestinales, qui va dépendre de la vitesse du transit digestif,...

Nous voulons confronter les données obtenues *in vitro* avec la biodistribution des vecteurs et les capacités d'induction de réponses immunitaires humorales et cellulaires, locales ou systémiques, par les vecteurs adénoviraux choisis après administration intra-gastrique. Ce travail pourra nous permettre de poser quelques règles gouvernant l'obtention de réponses vaccinales efficaces après administration orale.

Cependant les études *in vivo* posent le problème du choix du modèle animal pertinent dans l'étude des adénovirus. Le système immunitaire de la souris étant l'un des mieux connu et pour lequel on dispose de beaucoup d'outils d'étude, notre problématique s'inscrit dans un premier temps dans le modèle souris. Mais, les récepteurs principaux des adénovirus présentent des distributions tissulaires différentes chez l'homme et la souris avec une expression de CAR chez la souris importante dans le foie, le rein et les poumons, alors qu'elle est plus faible dans ces tissus chez l'homme¹³. Le même phénomène est décrit pour CD46 : il s'agit d'une molécule ubiquitaire chez l'homme alors que l'homologue murin est essentiellement exprimé dans les testicules¹²².

Conclusion

L'étude des interactions des vecteurs adénoviraux pseudotypés par la fibre d'autres sérotypes adénoviraux humains avec un épithélium intestinal polarisé *in vitro* a pour objectif final la détermination des étapes d'interaction avec les cellules intestinales qui sont importantes pour une vaccination orale efficace avec un vecteur adénoviral. Elle s'inscrit donc dans une thématique du laboratoire d'amélioration des vecteurs adénoviraux actuels non répliatifs et dérivant du sérotype 5 humain, en terme de franchissement de la muqueuse intestinale. Différentes stratégies sont étudiées, qui concernent toutes des modifications de la fibre virale puisque cette protéine détermine la nature des premiers contacts avec la cellule cible. Ces modifications font donc appel soit à un échange de la fibre 5 avec la fibre d'un autre sérotype, soit à l'insertion de ligands dans la fibre correspondant à des peptides conférant un avantage pour le franchissement intestinal (déterminé par criblage d'une banque de peptides) ou à des protéines provenant de virus entériques.

Cette étude pourrait aider au développement sur une base rationnelle de vaccins oraux, qui seraient faciles d'utilisation en médecine vétérinaire. Pourtant, il est facile de constater qu'aujourd'hui très peu de vaccins à administration orale sont disponibles, car des problèmes majeurs d'efficacité et de sécurité sont rencontrés. Les vaccins vivants atténués, généralement plus efficaces, peuvent être à l'origine d'effets secondaires importants, comme des invaginations intestinales aiguës décrites chez les jeunes enfants lors de vaccination orale contre les rotavirus. Cependant, la vaccination orale de la faune sauvage contre la rage et la vaccination de masse des volailles contre les coccidies offrent des exemples concluants de l'efficacité de cette voie d'administration, qui a encore besoin d'être étudiée et améliorée.

Références bibliographiques

1. **Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and J. S. Pober.** 2000. General properties of immune responses, p. 3-16. *In* W. Schmitt, H. N. Hacker, and J. Ehlers (eds.), Cellular and molecular immunology. Saunders W.B. company, Philadelphia, Pennsylvania.
2. **Adam, M., M. F. Lepottier, and M. Eloit.** 1994. Vaccination of pigs with replication-defective adenovirus vectored vaccines: the example of pseudorabies. *Vet. Microbiol.* **42**:205-215.
3. **Albinsson, B. and A. H. Kidd.** 1999. Adenovirus type 41 lacks an RGD alpha(v)-integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. *Virus Res.* **64**:125-136.
4. **Ambriovic-Ristov, A., S. Mercier, and M. Eloit.** 2003. Shortening adenovirus type 5 fiber shaft decreases the efficiency of postbinding steps in CAR-expressing and nonexpressing cells. *Virology* **312**:425-433.
5. **Arnberg, N., P. Pring-Akerblom, and G. Wadell.** 2002. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. *J. Virol.* **76**:8834-8841.
6. **Babiss, L. E., H. S. Ginsberg, and J. E. Darnell, Jr.** 1985. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell Biol.* **5**:2552-2558.
7. **Barnett, B. G., C. J. Crews, and J. T. Douglas.** 2002. Targeted adenoviral vectors. *Biochim. Biophys. Acta* **1575**:1-14.
8. **Barton, E. S., J. L. Connolly, J. C. Forrest, J. D. Chappell, and T. S. Dermody.** 2001. Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *J. Biol. Chem.* **276**:2200-2211.
9. **Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet.** 1999. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:440-447.
10. **Bennett, E. M., J. R. Bennink, J. W. Yewdell, and F. M. Brodsky.** 1999. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J. Immunol.* **162**:5049-5052.
11. **Bens, M., A. Bogdanova, F. Cluzeaud, L. Miquerol, S. Kerneis, J. P. Kraehenbuhl, A. Kahn, E. Pringault, and A. Vandewalle.** 1996. Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am. J. Physiol* **270**:C1666-C1674.
12. **Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1997. Isolation of a

- common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-1323.
13. **Bergelson, J. M., A. Krithivas, L. Celi, G. Droguett, M. S. Horwitz, T. Wickham, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1998. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J. Virol.* **72**:415-419.
 14. **Berget, S. M., C. Moore, and P. A. Sharp.** 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:3171-3175.
 15. **Bett, A. J., L. Prevec, and F. L. Graham.** 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* **67**:5911-5921.
 16. **Bockman, D. E., W. R. Boydston, and D. H. Beezhold.** 1983. The role of epithelial cells in gut-associated immune reactivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **409**:129-144.
 17. **Boudin, M. L. and P. Boulanger.** 1982. Assembly of adenovirus penton base and fiber. *Virology* **116**:589-604.
 18. **Bouvet, J. P., N. Decroix, and P. Pamonsinlapatham.** 2002. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? *Trends Immunol.* **23**:209-213.
 19. **Brochier, B., M. P. Kieny, F. Costy, P. Coppens, B. Bauduin, J. P. Lecocq, B. Languet, G. Chappuis, P. Desmettre, K. Afiademanyo, R. Libois, and P. P. Pastoret.** 1991. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* **354**:520-522.
 20. **Bruce, C. B., A. Akrigg, S. A. Sharpe, T. Hanke, G. W. Wilkinson, and M. P. Cranage.** 1999. Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice. *J. Gen. Virol.* **80** (Pt 10):2621-2628.
 21. **Buge, S. L., E. Richardson, S. Alipanah, P. Markham, S. Cheng, N. Kalyan, C. J. Miller, M. Lubeck, S. Udem, J. Eldridge, and M. Robert-Guroff.** 1997. An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge. *J. Virol.* **71**:8531-8541.
 22. **Burton, D. R., R. A. Williamson, and P. W. Parren.** 2000. Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology* **270**:1-3.
 23. **Casimiro, D. R., L. Chen, T. M. Fu, R. K. Evans, M. J. Caulfield, M. E. Davies, A. Tang, M. Chen, L. Huang, V. Harris, D. C. Freed, K. A. Wilson, S. Dubey, D. M. Zhu, D. Nawrocki, H. Mach, R. Troutman, L. Isopi, D. Williams, W. Hurni, Z. Xu, J. G. Smith, S. Wang, X. Liu, L. Guan, R. Long, W. Trigona, G. J. Heidecker, H. C. Perry, N. Persaud, T. J. Toner, Q. Su, X. Liang, R. Youil, M. Chastain, A. J. Bett, D. B. Volkin, E. A. Emini, and J. W. Shiver.** 2003. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* **77**:6305-6313.

24. **Charlton, K. M., M. Artois, L. Prevec, J. B. Campbell, G. A. Casey, A. I. Wandeler, and J. Armstrong.** 1992. Oral rabies vaccination of skunks and foxes with a recombinant human adenovirus vaccine. *Arch. Virol.* **123**:169-179.
25. **Chen, C. C., M. Baylor, and D. M. Bass.** 1993. Murine intestinal mucins inhibit rotavirus infection. *Gastroenterology* **105**:84-92.
26. **Chroboczek, J., R. W. Ruigrok, and S. Cusack.** 1995. Adenovirus fiber. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199 (Pt 1)**:163-200.
27. **Ciarlet, M., S. E. Crawford, and M. K. Estes.** 2001. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J. Virol.* **75**:11834-11850.
28. **Cohen, C. J., J. T. Shieh, R. J. Pickles, T. Okegawa, J. T. Hsieh, and J. M. Bergelson.** 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:15191-15196.
29. **Croyle, M. A., N. Chirmule, Y. Zhang, and J. M. Wilson.** 2002. PEGylation of E1-deleted adenovirus vectors allows significant gene expression on readministration to liver. *Hum. Gene Ther.* **13**:1887-1900.
30. **Croyle, M. A., M. Stone, G. L. Amidon, and B. J. Roessler.** 1998. In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther.* **5**:645-654.
31. **De Jong, J. C., A. G. Wermenbol, M. W. Verweij-Uijterwaal, K. W. Slaterus, P. Wertheim-Van Dillen, G. J. Van Doornum, S. H. Khoo, and J. C. Hierholzer.** 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3940-3945.
32. **De Jong, J. C., R. Wigand, A. H. Kidd, G. Wadell, J. G. Kapsenberg, C. J. Muzerie, A. G. Wermenbol, and R. G. Firtzloff.** 1983. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J. Med. Virol.* **11**:215-231.
33. **Dehecchi, M. C., P. Melotti, A. Bonizzato, M. Santacatterina, M. Chilosi, and G. Cabrini.** 2001. Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J. Virol.* **75**:8772-8780.
34. **Defer, C., M. T. Belin, M. L. Caillet-Boudin, and P. Boulanger.** 1990. Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. *J. Virol.* **64**:3661-3673.
35. **Duque, H., R. L. Marshall, B. A. Israel, and G. J. Letchworth.** 1989. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine* **7**:513-520.
36. **Favier, A. L., W. P. Burmeister, and J. Chroboczek.** 2004. Unique physicochemical properties of human enteric Ad41 responsible for its survival and replication in the gastrointestinal tract. *Virology* **322**:93-104.

37. **Ferko, B., J. Stasakova, S. Sereinig, J. Romanova, D. Katinger, B. Niebler, H. Katinger, and A. Egorov.** 2001. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J. Virol.* **75**:8899-8908.
38. **Fisher, K. J., H. Choi, J. Burda, S. J. Chen, and J. M. Wilson.** 1996. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* **217**:11-22.
39. **Gaggar, A., D. M. Shayakhmetov, and A. Lieber.** 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* **9**:1408-1412.
40. **Gall, J., A. Kass-Eisler, L. Leinwand, and E. Falck-Pedersen.** 1996. Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. *J. Virol.* **70**:2116-2123.
41. **Girard, M. and Hirth L.** 1989. Méthodes d'étude des virus, p. 61-120. *In* Doin Editeurs (ed.), *Virologie moléculaire*. Paris.
42. **Gogev, S. and E. Thiry.** 1999. Les adenovirus recombinants comme vecteurs vaccinaux. *Ann. Med. Vet.* **143**:323-334.
43. **Gogev, S., N. Vanderheijden, M. Lemaire, F. Schynts, J. D'Offay, I. Deprez, M. Adam, M. Eloit, and E. Thiry.** 2002. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine* **20**:1451-1465.
44. **Gonin, P., W. Oualikene, A. Fournier, M. Soulier, J. C. Audonnet, M. Riviere, and M. Eloit.** 1995. Evaluation of a replication defective adenovirus expressing the feline infectious peritonitis membrane protein as a vaccine in cats. *Vaccine Res* **4**:217-227.
45. **Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**:59-74.
46. **Greber, U. F., M. Willetts, P. Webster, and A. Helenius.** 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**:477-486.
47. **Gropp, R., M. Frye, T. O. Wagner, and J. Bargon.** 1999. Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **10**:957-964.
48. **Hamilton, T. E., S. Koide, W. Zhang, J. L. Rombeau, and S. E. Raper.** 1996. Adenoviral-mediated gene transfer to the small intestinal isograft. *Transplant. Proc.* **28**:2444.
49. **Havenga, M. J., A. A. Lemckert, J. M. Grimbergen, R. Vogels, L. G. Huisman, D. Valerio, A. Bout, and P. H. Quax.** 2001. Improved adenovirus vectors for infection of cardiovascular tissues. *J. Virol.* **75**:3335-3342.

50. **Havenga, M. J., A. A. Lemckert, O. J. Ophorst, M. van Meijer, W. T. Germeraad, J. Grimbergen, M. A. van Den Doel, R. Vogels, J. van Deutekom, A. A. Janson, J. D. de Bruijn, F. Uytdehaag, P. H. Quax, T. Logtenberg, M. Mehtali, and A. Bout.** 2002. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J. Virol.* **76**:4612-4620.
51. **Henry, L. J., D. Xia, M. E. Wilke, J. Deisenhofer, and R. D. Gerard.** 1994. Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **68**:5239-5246.
52. **Hong, S. S., L. Karayan, J. Tournier, D. T. Curiel, and P. A. Boulanger.** 1997. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J.* **16**:2294-2306.
53. **Juillard, V., P. Villefroy, D. Godfrin, A. Pavirani, A. Venet, and J. G. Guillet.** 1995. Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *Eur. J. Immunol.* **25**:3467-3473.
54. **Kass-Eisler, A., L. Leinwand, J. Gall, B. Bloom, and E. Falck-Pedersen.** 1996. Circumventing the immune response to adenovirus-mediated gene therapy. *Gene Ther.* **3**:154-162.
55. **Kaul, D. and P. L. Ogra.** 1998. Mucosal responses to parenteral and mucosal vaccines. *Dev. Biol. Stand.* **95**:141-146.
56. **Kidd, A. H., J. Chroboczek, S. Cusack, and R. W. Ruigrok.** 1993. Adenovirus type 40 virions contain two distinct fibers. *Virology* **192**:73-84.
57. **Kirby, I., R. Lord, E. Davison, T. J. Wickham, P. W. Roelvink, I. Kovesdi, B. J. Sutton, and G. Santis.** 2001. Adenovirus type 9 fiber knob binds to the coxsackie B virus-adenovirus receptor (CAR) with lower affinity than fiber knobs of other CAR-binding adenovirus serotypes. *J. Virol.* **75**:7210-7214.
58. **Krasnykh, V., I. Dmitriev, G. Mikheeva, C. R. Miller, N. Belousova, and D. T. Curiel.** 1998. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J. Virol.* **72**:1844-1852.
59. **Langeveld, J. P., J. I. Casal, A. D. Osterhaus, E. Cortes, R. de Swart, C. Vela, K. Dalsgaard, W. C. Puijk, W. M. Schaaper, and R. H. Melen.** 1994. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* **68**:4506-4513.
60. **Levrero, M., V. Barban, S. Manteca, A. Ballay, C. Balsamo, M. L. Avantaggiati, G. Natoli, H. Skellekens, P. Tiollais, and M. Perricaudet.** 1991. Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo. *Gene* **101**:195-202.
61. **Li, E., S. L. Brown, D. G. Stupack, X. S. Puente, D. A. Cheresh, and G. R. Nemerow.** 2001. Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J. Virol.* **75**:5405-5409.

62. **Lochmuller, H., A. Jani, J. Huard, S. Prescott, M. Simoneau, B. Massie, G. Karpati, and G. Acsadi.** 1994. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* **5**:1485-1491.
63. **Mei, Y. F., K. Lindman, and G. Wadell.** 2002. Human adenoviruses of subgenera B, C, and E with various tropisms differ in both binding to and replication in the epithelial A549 and 293 cells. *Virology* **295**:30-43.
64. **Meier, O., K. Boucke, S. V. Hammer, S. Keller, R. P. Stidwill, S. Hemmi, and U. F. Greber.** 2002. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J. Cell Biol.* **158**:1119-1131.
65. **Mercier, S., H. Gahery-Segard, M. Monteil, R. Lengagne, J. G. Guillet, M. Eloit, and C. Denesvre.** 2002. Distinct roles of adenovirus vector-transduced dendritic cells, myoblasts, and endothelial cells in mediating an immune response against a transgene product. *J. Virol.* **76**:2899-2911.
66. **Mercier, S., S. Verhaagh, J. Goudsmit, A. Lemckert, M. Monteil, M. Havenga, and M. Eloit.** 2004. Adenovirus fibre exchange alters cell tropism in vitro but not transgene-specific T CD8+ immune responses in vivo. *J. Gen. Virol.* **85**:1227-1236.
67. **Michou, A. I., L. Santoro, M. Christ, V. Julliard, A. Pavirani, and M. Mehtali.** 1997. Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther.* **4**:473-482.
68. **Minor, P. D.** 1993. Attenuation and reversion of the Sabin vaccine strains of poliovirus. *Dev. Biol. Stand.* **78**:17-26.
69. **Monteil, M., M. F. Le Pottier, A. A. Ristov, R. Cariolet, R. L'Hospitalier, B. Klonjowski, and M. Eloit.** 2000. Single inoculation of replication-defective adenovirus-vectored vaccines at birth in piglets with maternal antibodies induces high level of antibodies and protection against pseudorabies. *Vaccine* **18**:1738-1742.
70. **Moraes, M. P., G. A. Mayr, P. W. Mason, and M. J. Grubman.** 2002. Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine* **20**:1631-1639.
71. **Morgan, A. J.** 1992. Epstein-Barr virus vaccines. *Vaccine* **10**:563-571.
72. **Morrow, C. D., M. J. Novak, D. C. Ansardi, D. C. Porter, and Z. Moldoveanu.** 1999. Recombinant viruses as vectors for mucosal immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **236**:255-273.
73. **Nakamura, T., K. Sato, and H. Hamada.** 2003. Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J. Virol.* **77**:2512-2521.

74. **Neutra, M. R., A. Frey, and J. P. Kraehenbuhl.** 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**:345-348.
75. **Nevins, J. R.** 1995. Adenovirus E1A: transcription regulation and alteration of cell growth control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199 (Pt 3)**:25-32.
76. **Niedergang, F. and J. P. Kraehenbuhl.** 2000. Much ado about M cells. *Trends Cell Biol.* **10**:137-141.
77. **Oien, N. L., R. J. Brideau, E. E. Walsh, and M. W. Wathen.** 1994. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. *Vaccine* **12**:731-735.
78. **Oualikene, W., P. Gonin, and M. Eloit.** 1995. Lack of evidence of phenotypic complementation of E1A/E1B-deleted adenovirus type 5 upon superinfection by wild-type virus in the cotton rat. *J. Virol.* **69**:6518-6524.
79. **Philipson, L., K. Lonberg-Holm, and U. Pettersson.** 1968. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* **2**:1064-1075.
80. **Pickles, R. J., J. A. Fahrner, J. M. Petrella, R. C. Boucher, and J. M. Bergelson.** 2000. Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer. *J. Virol.* **74**:6050-6057.
81. **Pickles, R. J., D. McCarty, H. Matsui, P. J. Hart, S. H. Randell, and R. C. Boucher.** 1998. Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *J. Virol.* **72**:6014-6023.
82. **Polo, J. M. and T. W. Dubensky, Jr.** 2002. Virus-based vectors for human vaccine applications. *Drug Discov. Today* **7**:719-727.
83. **Ragot, T., S. Finerty, P. E. Watkins, M. Perricaudet, and A. J. Morgan.** 1993. Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *J. Gen. Virol.* **74 (Pt 3)**:501-507.
84. **Rea, D., M. J. Havenga, A. M. van Den, R. P. Suttmuller, A. Lemckert, R. C. Hoeben, A. Bout, C. J. Melief, and R. Offringa.** 2001. Highly efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells with subgroup B fiber-modified adenovirus vectors enhances transgene-encoded antigen presentation to cytotoxic T cells. *J. Immunol.* **166**:5236-5244.
85. **Rekosh, D. M., W. C. Russell, A. J. Bellet, and A. J. Robinson.** 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* **11**:283-295.
86. **Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* **204**:572-581.
87. **Reynolds, P. N., M. Feng, and D. T. Curiel.** 1999. Chimeric viral vectors--the best of both worlds? *Mol. Med. Today* **5**:25-31.

88. **Rhoads, J. M., W. Chen, P. Chu, H. M. Berschneider, R. A. Argenzio, and A. M. Paradiso.** 1994. L-glutamine and L-asparagine stimulate Na⁺ -H⁺ exchange in porcine jejunal enterocytes. *Am. J. Physiol* **266**:G828-G838.
89. **Rodrigues, E. G., F. Zavala, D. Eichinger, J. M. Wilson, and M. Tsuji.** 1997. Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8⁺ T cell-mediated protective immunity against malaria. *J. Immunol.* **158**:1268-1274.
90. **Roelvink, P. W., A. Lizonova, J. G. Lee, Y. Li, J. M. Bergelson, R. W. Finberg, D. E. Brough, I. Kovesdi, and T. J. Wickham.** 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* **72**:7909-7915.
91. **Rosenberg, S. A., J. C. Yang, R. M. Sherry, P. Hwu, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, N. P. Restifo, L. R. Haworth, C. A. Seipp, L. J. Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, and D. E. White.** 2003. Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen. *Hum. Gene Ther.* **14**:709-714.
92. **Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, and T. J. Ward.** 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**:570-573.
93. **Russell, W. C.** 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**:2573-2604.
94. **Sansonetti, P. J. and A. Phalipon.** 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin. Immunol.* **11**:193-203.
95. **Schindler, C., A. Fooks, J. Stephenson, and U. G. Liebert.** 1994. Replication-incompetent adenoviruses as vectors for protective immunization against measles virus infection. *Behring Inst. Mitt.* 109-115.
96. **Schmid, S. I. and P. Hearing.** 1995. Selective encapsidation of adenovirus DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199 (Pt 1)**:67-80.
97. **Schoggins, J. W., J. G. Gall, and E. Falck-Pedersen.** 2003. Subgroup B and F fiber chimeras eliminate normal adenovirus type 5 vector transduction in vitro and in vivo. *J. Virol.* **77**:1039-1048.
98. **Schwegmann, C., G. Zimmer, T. Yoshino, M. Enss, and G. Herrler.** 2001. Comparison of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus and E. coli K99. *Virus Res* **75**:69-73.
99. **Segerman, A., N. Arnberg, A. Erikson, K. Lindman, and G. Wadell.** 2003. There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *J. Virol.* **77**:1157-1162.

100. **Segerman, A., J. P. Atkinson, M. Marttila, V. Dennerquist, G. Wadell, and N. Arnberg.** 2003. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.* **77**:9183-9191.
101. **Sharpe, S., A. Fooks, J. Lee, K. Hayes, C. Clegg, and M. Cranage.** 2002. Single oral immunization with replication deficient recombinant adenovirus elicits long-lived transgene-specific cellular and humoral immune responses. *Virology* **293**:210-216.
102. **Shayakhmetov, D. M., Z. Y. Li, S. Ni, and A. Lieber.** 2004. Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors. *J. Virol.* **78**:5368-5381.
103. **Shayakhmetov, D. M., Z. Y. Li, V. Ternovoi, A. Gaggar, H. Gharwan, and A. Lieber.** 2003. The interaction between the fiber knob domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses. *J. Virol.* **77**:3712-3723.
104. **Shayakhmetov, D. M. and A. Lieber.** 2000. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J. Virol.* **74**:10274-10286.
105. **Shenk, T.** 1996. Adenoviridae: the viruses and their replication, p. 2111-2148. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
106. **Shisler, J., C. Yang, B. Walter, C. F. Ware, and L. R. Gooding.** 1997. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**:8299-8306.
107. **Shiver, J. W., T. M. Fu, L. Chen, D. R. Casimiro, M. E. Davies, R. K. Evans, Z. Q. Zhang, A. J. Simon, W. L. Trigona, S. A. Dubey, L. Huang, V. A. Harris, R. S. Long, X. Liang, L. Handt, W. A. Schleif, L. Zhu, D. C. Freed, N. V. Persaud, L. Guan, K. S. Punt, A. Tang, M. Chen, K. A. Wilson, K. B. Collins, G. J. Heidecker, V. R. Fernandez, H. C. Perry, J. G. Joyce, K. M. Grimm, J. C. Cook, P. M. Keller, D. S. Kresock, H. Mach, R. D. Troutman, L. A. Isopi, D. M. Williams, Z. Xu, K. E. Bohannon, D. B. Volkin, D. C. Montefiori, A. Miura, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, N. L. Letvin, M. J. Caulfield, A. J. Bett, R. Youil, D. C. Kaslow, and E. A. Emini.** 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* **415**:331-335.
108. **Sirena, D., B. Lilienfeld, M. Eisenhut, S. Kalin, K. Boucke, R. R. Beerli, L. Vogt, C. Ruedl, M. F. Bachmann, U. F. Greber, and S. Hemmi.** 2004. The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* **78**:4454-4462.
109. **Stephenson, J.** 1998. Defective adenoviruses as novel vaccines for the Flaviviridae. *Clin. Diagn. Virol.* **10**:187-194.
110. **Stevenson, S. C., M. Rollence, J. Marshall-Neff, and A. McClelland.** 1997. Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. *J. Virol.* **71**:4782-4790.

111. **Stittelaar, K. J., L. S. Wyatt, R. L. de Swart, H. W. Vos, J. Groen, G. van Amerongen, R. S. van Binnendijk, S. Rozenblatt, B. Moss, and A. D. Osterhaus.** 2000. Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J. Virol.* **74**:4236-4243.
112. **Sullivan, N. J., A. Sanchez, P. E. Rollin, Z. Y. Yang, and G. J. Nabel.** 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408**:605-609.
113. **Swaan, P. W.** 1998. Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharm. Res* **15**:826-834.
114. **Sweeney, J. A. and J. P. Hennessey, Jr.** 2002. Evaluation of accuracy and precision of adenovirus absorptivity at 260 nm under conditions of complete DNA disruption. *Virology* **295**:284-288.
115. **Tartaglia, J., O. Jarrett, J. C. Neil, P. Desmettre, and E. Paoletti.** 1993. Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J. Virol.* **67**:2370-2375.
116. **Taylor, J., B. Meignier, J. Tartaglia, B. Languet, J. VanderHoeven, G. Franchini, C. Trimarchi, and E. Paoletti.** 1995. Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species. *Vaccine* **13**:539-549.
117. **Thacker, T. C. and F. B. Johnson.** 1998. Binding of bovine parvovirus to erythrocyte membrane sialylglycoproteins. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 9)**:2163-2169.
118. **Tillman, B. W., T. D. de Gruijl, S. A. Luykx-de Bakker, R. J. Scheper, H. M. Pinedo, T. J. Curiel, W. R. Gerritsen, and D. T. Curiel.** 1999. Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. *J. Immunol.* **162**:6378-6383.
119. **Tomko, R. P., R. Xu, and L. Philipson.** 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:3352-3356.
120. **Torres, J. M., C. Alonso, A. Ortega, S. Mittal, F. Graham, and L. Enjuanes.** 1996. Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* **70**:3770-3780.
121. **Tsuji, M., C. C. Bergmann, Y. Takita-Sonoda, K. Murata, E. G. Rodrigues, R. S. Nussenzweig, and F. Zavala.** 1998. Recombinant Sindbis viruses expressing a cytotoxic T-lymphocyte epitope of a malaria parasite or of influenza virus elicit protection against the corresponding pathogen in mice. *J. Virol.* **72**:6907-6910.
122. **Tsujimura, A., K. Shida, M. Kitamura, M. Nomura, J. Takeda, H. Tanaka, M. Matsumoto, K. Matsumiya, A. Okuyama, Y. Nishimune, M. Okabe, and T. Seya.** 1998. Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem. J.* **330 (Pt 1)**:163-168.

123. **Uhnoo, I., G. Wadell, L. Svensson, and M. E. Johansson.** 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* **20**:365-372.
124. **Vellinga, J., M. J. Rabelink, S. J. Cramer, D. J. van den Wollenberg, M. H. Van der, K. N. Leppard, F. J. Fallaux, and R. C. Hoeben.** 2004. Spacers increase the accessibility of peptide ligands linked to the carboxyl terminus of adenovirus minor capsid protein IX. *J. Virol.* **78**:3470-3479.
125. **Vos, A., A. Neubert, E. Pommerening, T. Muller, L. Dohner, L. Neubert, and K. Hughes.** 2001. Immunogenicity of an E1-deleted recombinant human adenovirus against rabies by different routes of administration. *J. Gen. Virol.* **82**:2191-2197.
126. **Wadell, G., A. Allard, and J. C. Hierholzer.** 1999. Adenoviruses, p. 970-982. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.), *Manual of clinical microbiology*. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.
127. **Walter, E., M. A. Croyle, B. J. Roessler, and G. L. Amidon.** 1997. The absence of accessible vitronectin receptors in differentiated tissue hinders adenoviral-mediated gene transfer to the intestinal epithelium in vitro. *Pharm. Res.* **14**:1216-1222.
128. **Walters, R. W., T. Grunst, J. M. Bergelson, R. W. Finberg, M. J. Welsh, and J. Zabner.** 1999. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Biol. Chem.* **274**:10219-10226.
129. **Wang, Q., G. Greenburg, D. Bunch, D. Farson, and M. H. Finer.** 1997. Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther.* **4**:393-400.
130. **Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresh, and G. R. Nemerow.** 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**:309-319.
131. **Wold, W. S., A. E. Tollefson, and T. W. Hermiston.** 1995. E3 transcription unit of adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199 (Pt 1)**:237-274.
132. **Wu, E., L. Pache, D. J. von Seggern, T. M. Mullen, Y. Mikiyas, P. L. Stewart, and G. R. Nemerow.** 2003. Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J. Virol.* **77**:7225-7235.
133. **Wu, E., S. A. Trauger, L. Pache, T. M. Mullen, D. J. von Seggern, G. Siuzdak, and G. R. Nemerow.** 2004. Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J. Virol.* **78**:3897-3905.
134. **Xiang, Z. and H. C. Ertl.** 1999. Induction of mucosal immunity with a replication-defective adenoviral recombinant. *Vaccine* **17**:2003-2008.
135. **Xiang, Z. Q., G. P. Gao, A. Reyes-Sandoval, Y. Li, J. M. Wilson, and H. C. Ertl.** 2003. Oral vaccination of mice with adenoviral vectors is not impaired by preexisting immunity to the vaccine carrier. *J. Virol.* **77**:10780-10789.

136. **Xin, K. Q., T. Ooki, H. Mizukami, K. Hamajima, K. Okudela, K. Hashimoto, Y. Kojima, N. Jounai, Y. Kumamoto, S. Sasaki, D. Klinman, K. Ozawa, and K. Okuda.** 2002. Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses. *Hum. Gene Ther.* **13**:1571-1581.
137. **Yabe, Y., J. J. Trentin, and G. Taylor.** 1962. Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of age and of virus dose. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**:343-344.
138. **Yeh, H. Y., N. Pieniazek, D. Pieniazek, H. Gelderblom, and R. B. Luftig.** 1994. Human adenovirus type 41 contains two fibers. *Virus Res.* **33**:179-198.
139. **Yokoyama, N., K. Maeda, and T. Mikami.** 1997. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use. *J. Vet. Med. Sci.* **59**:311-322.
140. **Youil, R., T. J. Toner, Q. Su, M. Chen, A. Tang, A. J. Bett, and D. Casimiro.** 2002. Hexon gene switch strategy for the generation of chimeric recombinant adenovirus. *Hum. Gene Ther.* **13**:311-320.
141. **Zabner, J., M. Chillon, T. Grunst, T. O. Moninger, B. L. Davidson, R. Gregory, and D. Armentano.** 1999. A chimeric type 2 adenovirus vector with a type 17 fiber enhances gene transfer to human airway epithelia. *J. Virol.* **73**:8689-8695.

BASES MOLECULAIRES DES INTERACTIONS DES ADENOVIRUS AVEC LA MUQUEUSE INTESTINALE

NOM et Prénom : LECOLLINET Sylvie

RESUME :

Les vecteurs adénoviraux (Ad) permettent d'induire des réponses immunitaires fortes et durables après administration parentérale et constituent ainsi des vecteurs vaccinaux prometteurs. Toutefois, ils sont moins efficaces après administration par voie muqueuse. Nous souhaitons comprendre les bases moléculaires de l'interaction des Ad avec la muqueuse intestinale, et leurs conséquences en matière d'induction d'une réponse immunitaire muqueuse, afin de fournir une base rationnelle au développement de vecteurs administrables par voie orale. A cette fin, nous avons utilisé une banque d'adénovirus de type 5 (Ad5) non répliquatifs pseudotypés par les fibres de différents sérotypes humains de tropisme très divers. La reconstitution d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales polarisées *in vitro* a permis de suivre les différentes étapes de la pénétration de l'épithélium par les différents vecteurs : attachement, traversée de la monocouche par transcytose ont été mesurés par PCR quantitative, et l'expression du transgène (transduction) au sein des cellules a été évaluée par bioluminescence. Nos résultats montrent un comportement différent des deux lignées cellulaires étudiées (Caco-2 et mICcl2) vis-à-vis de l'infection par le vecteur Ad5, qui peut être relié à une distribution cellulaire différente de son récepteur CAR. Ils suggèrent aussi une meilleure transduction des cellules épithéliales polarisées à partir du pôle apical par les virus portant les fibres provenant de sérotypes à tropisme intestinal (12 et 40) ainsi que la fibre du sérotype 32 comparativement à l'Ad5. De plus, certains vecteurs traversent efficacement la monocouche intestinale, comme les vecteurs portant les fibres du sous-groupe B. Les virus démontrant des profils d'interaction différents *in vitro* seront sélectionnés pour l'évaluation *in vivo* de leur tropisme d'organe et de leur capacité d'induction des réponses immunitaires humorales et cellulaires locales après administration orale.

MOTS CLES : adénovirus – vecteur – vaccination – voie orale – muqueuse – intestin - entérocyte

JURY :

Président : Pr.

Directeur : Pr. ELOIT Marc

Assesseur : Dr BELLIER Sylvain

Invitée: Dr RICHARDSON Jennifer

Adresse de l'auteur :

10 rue Crespin

94170 LE PERREUX SUR MARNE

MOLECULAR BASIS OF THE INTERACTIONS BETWEEN ADENOVIRUSES AND THE INTESTINAL MUCOSA

SURNAME : LECOLLINET

Given name : Sylvie

SUMMARY :

Human adenoviral vectors (Ads) are potent inducers of strong and long-lasting immune responses after parenteral administration and therefore constitute promising vaccinal vectors. Mucosal administration of such vectors, however, seems less efficient. We wish to understand the molecular basis of the interactions between Ads and the intestinal mucosa, and their influence on the induction of mucosal immune responses, in order to provide a foundation for the rational development of orally administered vectors. To this end, we used a bank of Ad vectors, based on nonreplicative human Ad of serotype 5 (Ad5), which are pseudotyped with fibers of several human adenoviral serotypes differing in their natural tropism. The *in vitro* reconstitution of a polarized intestinal monolayer allowed us to follow the steps involved in the penetration of digestive mucosa by the different vectors: attachment, crossing through by transcytosis were evaluated by real-time quantitative PCR, and luciferase transgene expression (or transduction efficacy) within cells were measured by bioluminescence. Our results show quite different infection behaviors of the Ad5 vector in the two cell lines studied (Caco-2 and mICcl2), related in part to the different cellular distribution of its receptor CAR. Our results also suggest a substantially higher transduction of polarized epithelial cells after apical application of viruses bearing the fibers derived from serotypes presenting a natural intestinal tropism (12 and 40) or 32, compared with Ad5. Moreover, some vectors, such as those bearing subgroup B fibers, can efficiently cross the differentiated epithelium. Viruses showing differing profiles of interaction *in vitro* will be selected for evaluation *in vivo* as regards their tissue tropism and capacity to induce local humoral and cell-mediated immune responses after oral administration.

KEYWORDS : adenovirus – vector – vaccination – oral route – intestine – mucosa - enterocyte

JURY :

President :

Director : Pr ELOIT Marc

Assessor : Dr BELLIER Sylvain

Guest : Dr RICHARDSON Jennifer

Author's address:

10 rue Crespin

94170 LE PERREUX SUR MARNE - FRANCE