

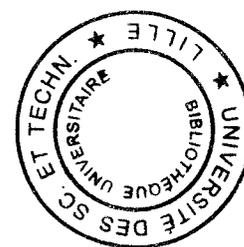
50376
1998
321

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

N° d'ordre :

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES DE LILLE**
EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE



PAR

Ricardo GONZALEZ

TRANSFERT DE GENES DANS LES LEUCEMIES AIGUES

Soutenu le 11 Décembre 1998 devant la Commission d'Examen :

Président :	Geneviève SPIK
Rapporteurs :	Thierry VELU Hédi HADDADA
Examineur :	Eric WATTEL
Directeur de thèse :	Pierre FENAUX

A mon Bébé et Emilie, tout mon amour et toute ma gratitude.

*A mi Papá y mi Mamá, por todo el amor,
por toda la vida que fué la nuestra y nos permitió de salir adelante.*

A Duane, Mahina, Tanguy et Natacha, pour leur amour et leur soutien.

A mis abuelos.

A mes beaux parents et leurs enfants.

A toda mi familia.

A mi patria, a los caldos y todos los que luchan contra el facismo.

A tous mes amis.

Mes remerciements sincères aux membres de mon jury de thèse :

Madame le Professeur Geneviève SPIK qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

*Monsieur le Docteur Hedi HADDADA et Monsieur le Professeur Thierry VELU
Qui ont accepté d'être les rapporteurs et de juger ce travail.*

A Monsieur le Docteur Eric Wattel qui a accepté de siéger dans ce jury.

*A Monsieur le Professeur Pierre FENAUX qui m'a accepté au sein de son laboratoire.
Toute ma reconnaissance et mon estime pour m'avoir permis de participer à ce projet
ambitieux.*

Ma sincère reconnaissance à Monsieur le Docteur Bruno QUESNEL qui dirige ce projet ambitieux auquel j'ai eu l'honneur et la joie de participer. Merci de m'avoir accordé ta confiance et permis de partager ton enthousiasme pour un projet où tout était à faire.

Mes remerciements à Monsieur le Docteur Jean-Pierre KERCKAERT de m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM 124.

Mes remerciements à Monsieur le Professeur Jacques Vanlerenberghe, directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

Toute mon amitié et ma gratitude à Monsieur Rodolphe VEREECQUE avec lequel nous avons initié et développé ce projet. Merci d'avoir partagé avec moi tous ces moments forts, bons et mauvais mais en gardant la tête dans les étoiles. Que la force soit avec toi !

Mes sincères remerciements et mon amitié à Mademoiselle Géraldine BUFFENOIR qui a intégré notre équipe et dont l'entrée à l'académie française ne fait plus aucun doute.

Mes remerciements et mon amitié à Monsieur Michaël VANRUMBEKE qui a largement contribué à ce travail et dont la rigueur et les qualités ont largement contribué au développement de notre laboratoire.

Mes remerciements et mon amitié à Madame Dominique HETUIN qui a participé activement à ce travail et qui a souffert le martyr mais qui a finalement saisi le sens profond de mon humour douteux.

Toute mon amitié et remerciements au One's Dance Team : India LECLERCQ et Franck MORTREUX qui m'ont témoigné tout leur soutien et leur amitié ainsi qu'à Matthias GERARD, Emmanuelle PRUDHOMME, Perrine MICHEL et Céline GUARRACINO qui reprend le flambeau.

Je tiens à remercier également tout le personnel de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et de l'INSERM U124 qui ont largement contribué à ce travail et m'ont chaleureusement accueilli.

Ce travail effectué à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille au sein du laboratoire d'Oncohématologie Moléculaire INSERM U124 a été financé par le CHRU de Lille et la région Nord-Pas de Calais ainsi que par l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	6
ABREVIATIONS	8
LISTE DES PUBLICATIONS	9
INTRODUCTION	10
GENERALITES	12
I . THÉRAPIE GÉNIQUE ET CANCER	14
II . THÉRAPIE GÉNIQUE ET LEUCÉMIES	14
II . 1 . Généralités	14
II . 2 . Transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques	15
II . 3 . Transfert de gènes dans les cellules leucémiques	16
III . LES VECTEURS	18
III . 1 . Les vecteurs Rétroviraux	19
III . 1 . 1 . Les vecteurs dérivés des virus murins	19
III . 1 . 2 . Les vecteurs rétroviraux modifiés.	21
III . 1 . 2 . 1 . Modifications de la protéine d'enveloppe	22
III . 1 . 2 . 2 . Modifications des promoteurs.	24
III . 1 . 2 . 3 . Modifications de la lignée d'encapsulation.	26
III . 1 . 2 . 4 . Modifications des vecteurs	28

III . 2 . Les vecteurs adénoviraux	29
III . 2 . 1 . Les vecteurs classiques	30
III . 2 . 2 . Les vecteurs modifiés	32
III . 2 . 2 . 1 . Modifications de la fibre	33
III . 2 . 2 . 2 . Modifications immunologiques.	36
III . 2 . 2 . 3 . Modification de l'immunogénicité.	37
III . 3 . Les vecteurs issus de Virus Associés à l'Adénovirus (AAV).	39
III . 4 . Les vecteurs issus du Virus de l'Herpes Simplex (HSV).	40
III . 5 . Les vecteurs non viraux.	41
III . 5 . 1 . Les Liposomes cationiques.	41
III . 5 . 2 . Les Polyéthylénimines.	44
III . 5 . 3 . L'Electroporation.	45
RESULTATS	46
I . MISE AU POINT DE LA CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES DE LAM.	47
II . ETUDE DES MODALITÉS DE TRANSFERT DE GÈNES PAR DES VECTEURS NON-VIRAUX.	49
II . 1 . Transfert de gènes par vecteur chimique.	49
II . 2 . Etude des modalités de transfert de gènes dans les cellules de LAM par électroporation.	50
II . 2 . 1 . Test fonctionnel du vecteur pcDNA3-EGFP	51
II . 2 . 2 . Optimisation des conditions d'électroporation dans la lignée K562.	52
II . 2 . 3 . Electroporation des lignées leucémiques K562 et HL60.	55
II . 2 . 4 . Transfert de gène par électroporation dans les cellules de LAM en culture primaire.	56
II . 2 . 5 . Survie et expression à long terme des blastes électroporés	58

III . TRANSFERT DE GÈNE DANS LES CELLULES DE LEUCÉMIES AIGÜES MYELOBLASTIQUES PAR UN ADÉNOVIRUS PORTEUR D'UNE FIBRE MODIFIÉE.	60
III . 1 . Transfection de lignées cellulaires.	61
III . 2 . Transfection de cellules de leucémie aiguë myéloblastique en culture primaire.	64
III . 2 . 1 . Etablissement d'une gamme de transfection en nombre de particules physiques par cellule.	64
III . 2 . 2 . Transfection de 25 échantillons de patients atteints de LAM	67
III . 2 . 3 . Taux de transfection des échantillons de LAM en fonction du type FAB	70
III . 2 . 4 . Evaluation de l'expression à long terme des cellules transfectées par l'AdZ.F(pK7).	71
III . 2 . 5 . Effet des facteurs de croissance sur l'efficacité de transfert de l'AdZ.F(pK7).	72
III . 3 . Inhibition du transfert par l'AdZ.F(pK7).	72
III . 3 . 1 . Inhibition compétitive par l'héparine	72
III . 3 . 2 . Inhibition enzymatique par clivage des glycosaminoglycanes.	75
IV . TRANSFERT DU GÈNE DE LA β-GALACTOSIDASE DANS LES MYELOMES PAR LE VECTEUR ADÉNOVIRAL MODIFIÉ ADZ.F(PK7)	77
IV . 1 . Transfection de la lignée plasmocytaire RPMI 8226.	77
IV . 2 . Culture de cellules plasmocytaires tumorales	77
IV . 3 . Etablissement d'une gamme de transfection des plasmocytes tumoraux en culture primaire.	79
IV . 4 . Transfection de myélomes en culture primaire.	81
IV . 4 . 1 . Transfection de 10 échantillons de myélomes en culture primaire	81
IV . 4 . 1 . Analyse de l'expression à long terme.	82
IV . 5 . Inhibition compétitive	83
DISCUSSION	84

MATERIELS ET METHODES	94
I. MATERIELS.	95
I . 1 . Les cellules.	95
I . 1 . 1 . Les lignées cellulaires.	95
I . 1 . 2 . Les cellules Tumorales « fraîches »	95
I . 2 . Les Bactéries	96
I . 3 . Les Vecteurs	96
I . 3 . 1 . Les vecteurs plasmidiques	96
I . 3 . 2 . Les vecteurs adénoviraux.	98
I . 4 . Les anticorps	100
II . METHODES.	101
II . 1 . Culture cellulaire.	101
II . 1 . 1 . Culture des lignées cellulaires	101
II . 1 . 2 . Culture primaire des cellules tumorales.	102
II . 1 . 2 . 1 . Récupération des cellules tumorales	102
II . 1 . 2 . 2 . Culture primaire des cellules de Leucémies Aïgues Myéloblastiques (LAM).	102
II . 1 . 2 . 3 . Culture primaire des cellules de Myélomes	102
II . 1 . 3 . Déplétion et sélection des cellules.	103
II . 1 . 3 . 1 . Déplétion de lymphocytes T et B.	103
II . 1 . 3 . 2 . Sélection des cellules de LAM et des plasmocytes tumoraux par cytométrie en flux.	103
II . 2 . Techniques d'analyse et de purification de l'ADN.	104
II . 2 . 1 . Electrophorèse en gel d'agarose	104
II . 2 . 2 . Purification des fragments d'ADN	104
II . 2 . 3 . Ligature des fragments d'ADN	104
II . 2 . 4 . Transformation bactérienne	105
II . 2 . 5 . Identification des clones recombinés	105
II . 2 . 6 . Purification d'ADN plasmidique.	105

II . 3 . Construction des vecteurs plasmidiques pcDNA3-EGFP et PCDNA3-β-Galactosidase	106
II . 3 . 1 . Le pcDNA3-EGFP	106
II . 3 . 2 . Le pcDNA3- β -Galactosidase	106
II . 4 . Transfection des cellules tumorales ex-vivo.	107
II . 4 . 1 . Transfection par Electroporation.	107
II . 4 . 2 . Transfection chimique.	107
II . 4 . 3 . Transfection adénovirale.	108
II . 5 . Inhibition de la transfection adénovirale.	109
II . 5 . 1 . Inhibition compétitive.	109
II . 5 . 2 . Inhibition enzymatique.	109
II . 6 . Techniques d'analyse.	110
II . 6 . 1 . Cytométrie en flux	110
II . 6 . 1 . 1 . Analyse de l'activité β -Galactosidase	110
II . 6 . 1 . 2 . Marquage immunofluorescent.	110
II . 6 . 1 . 3 . Analyse de la fluorescence de l'EGFP	110
II . 6 . 2 . Microscopie à fluorescence	111
II . 6 . 3 . Analyse de l'activité β -Galactosidase par Coloration des cellules au X-Gal	111
BIBLIOGRAPHIE	112
ANNEXES	129
Annexe I . INCREASED GENE TRANSFER IN ACUTE MYELOID LEUKEMIC CELLS BY AN ADENOVIRUS VECTOR CONTAINING A MODIFIED VECTOR FIBER PROTEIN	
Annexe II . EFFICIENT GENE TRANSFER IN ACUTE MYELOID LEUKEMIC CELLS BY ELECTROPORATION	
Annexe III . A NEW MURINE AGGRESSIVE MYELOID LEUKEMIC MODEL	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

GENERALITES

Tableau 1G : Vecteurs utilisés sur les cellules leucémiques	p 18
Tableau 2G : Modifications des vecteurs rétroviraux	p 21
Tableau 3G : Modifications des vecteurs adénoviraux.	p 32

RESULTATS

Figure 1 : Effets des facteurs de croissance sur la prolifération des blastes de LAM en culture primaire.	p 48
Figure 2 : Transfection par vecteur chimique.	p 49
Cliché 1 : Electroporation de cellules Hela par le vecteur pcDNA3-EGFP	p 51
Figure 3 : Optimisation des conditions d'électroporation.	p 53
Cliché 2 : Gamme d'électroporation du pcDNA3-EGFP dans les cellules K562 à 1500 μ F	p 54
Figure 4 : Electroporation des lignées K562 et HL60.	p 55
Figure 5 : Electroporation de blastes de LAM en culture primaire.	p 56
Figure 5bis : Représentation biparamétrique des cellules de LAM électroporées	p 57
Figure 6 : Prolifération et expression des blastes électroporés.	p 59
Figure 7 : Prolifération des cellules non électroporées.	p 59
Figure 8 : Transfection de lignées cellulaires par le vecteur AdZ.F(pK7)	p 61
Figure 9 : Résultats en cytométrie en flux des lignées transfectées.	p 62
Cliché 3 : Coloration X-Gal de cellules K562 transfectées.	p 63
Tableau n°4 : Equivalence entre les particules adénovirales physiques et actives	p 64
Figure 10a : Gamme de transfection des cellules de LAM	p 65
Figure 10b : Représentation bi-paramétrique de la gamme de transfection.	p 66
Figure 11 : Transfection adénovirale de 25 échantillons de LAM	p 68
Cliché 4 : Coloration x-Gal de cellules de LAM transfectées par l'AdZ.F(pK7)	p 69
Figure 12 : Taux de transfection des LAM selon le type FAB.	p 70
Figure 13 : Expression à long terme des blastes transfectés.	p 71

Figure 14 : Effets des facteurs de croissance sur la transfection	p 73
Figure 15 a et b: Effets de l'Héparine sur la transfection.	p 74
Figure 15c : Inhibition enzymatique de la transfection.	p 76
Figure 16 : Transfection des lignées RPMI 8226 et K562.	p 78
Tableau n°5 : Equivalence entre particules adénovirales physiques et actives.	p 79
Figure 17a et b : Gamme de transfection adénovirale des myélomes.	p 80
Figure 18 : Transfection adénovirale de myélomes en culture primaire.	p 81
Figure 19 : Expression à long terme des myélomes transfectés.	p 82
Figure 20 : Inhibition de la transfection par l'héparine et la fibre.	p 83

MATERIELS ET METHODES

Figure 1M, 2M, 3M : Plasmides utilisés.	p 97
Figure 4M : Schéma de la fibre modifiée.	p 99

ABREVIATIONS

μF :	Microfarad.
ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ADNc :	ADN complémentaire.
ATL :	Leucémie T de l'Adulte (Adult T-cell Leukemia)
cm :	Centimètres.
CMV :	Cytomégalovirus
DMSO :	Diméthylsulfoxyde.
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra acétique.
FAB :	Classification French, American, British
g :	Accélération de la pesanteur.
g/l	Grammes par litres.
kb :	Kilobases
LAM :	Leucémie aiguë myéloblastique.
ml :	Millilitres
MLV :	Virus de la leucémie murine (Murine leukemia virus)
MoMLV :	Virus de la leucémie murine de Moloney (Moloney Murine leukemia virus)
pb :	Paire de bases.
pfu :	Unités formant plages. (plaque forming units)
SVF :	Sérum de Veau Fœtal.
U/ml :	Unités par millilitres.
V :	Volts
PBS :	Tampon phosphate salin.
LLC :	Leucémie lymphoïde chronique
LLC B :	Leucémie lymphoïde chronique à lymphocytes B.
LMC :	Leucémie myéloïde chronique.
CAR :	Récepteur des Adénovirus et des Coxsakievirus

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications

INCREASED GENE TRANSFER IN ACUTE MYELOID LEUKEMIC CELLS BY AN ADENOVIRUS VECTOR CONTAINING A MODIFIED VECTOR FIBER PROTEIN.

Ricardo GONZALEZ, Rodolphe VEREECQUE, Thomas J. WICKHAM, Michael VANRUMBEKE, Imre KOVESDI, Francis BAUTERS, Pierre FENAUX, Bruno QUESNEL.

Accepté à Gene Therapy. Sous presse. Manuscrit en ANNEXE I.

EFFICIENT GENE TRANSFER IN ACUTE MYELOID LEUKEMIC CELLS BY ELECTROPORATION.

Ricardo GONZALEZ, Rodolphe VEREECQUE, Geraldine BUFFENOIR, Michael VANRUMBEKE, Dominique HETUIN, Pierre FENAUX, Bruno QUESNEL (**soumis**) **Annexe II.**

INCREASED GENE TRANSFER IN FRESH MYELOMA CELLS WITH A MODIFIED ADENOVIRUS.

Ricardo GONZALEZ, Rodolphe VEREECQUE, Thomas.J.WICKHAM, Thierry FACON, Dominique HETUIN, Geraldine BUFFENOIR, Imre KOVESDI, Pierre FENAUX, Bruno QUESNEL. (**soumis**)

A NEW MURINE AGGRESSIVE MYELOID LEUKEMIC MODEL.

Rodolphe VEREECQUE, Geraldine BUFFENOIR, **Ricardo GONZALEZ**, Malika HAMDANE, Claude PREUDHOMME, Michael VANRUMBEKE, Dominique HETUIN, Pierre FENAUX, Bruno QUESNEL.

Accepté à Leukemia Research. Sous presse. Manuscrit en ANNEXE III.

Communications

VARIABLE EFFECT ON TUMORIGENICITY OF EXPRESSION OF B7-1 AND/OR GM-CSF IN SYNGENEIC MYELOID LEUKEMIC MOUSE MODEL

Blood, 1997, 90 (10) : 188, supl 1A

Rodolphe VEREECQUE, **Ricardo GONZALEZ**, Geraldine BUFFENOIR, Dominique HETUIN, Michael VANRUMBEKE ; Pierre FENAUX, Bruno QUESNEL

INCREASED GENE TRANSFER IN FRESH MYELOMA CELLS WITH A MODIFIED ADENOVIRUS.

Ricardo GONZALEZ, Rodolphe VEREECQUE, Thomas.J.WICKHAM, Thierry.FACON, Dominique HETUIN, Geraldine BUFFENOIR, Imre KOVESDI, Pierre FENAUX, Bruno QUESNEL.

Accepté pour le congrès de l'ASH 1998

INTRODUCTION

Le problème majeur de la thérapie génique des hémopathies malignes, en dehors de la définition des gènes d'intérêt, est la vectorisation. En effet, malgré des résultats expérimentaux intéressants obtenus sur des modèles animaux (Matulonis *et al.* 1995) et sur des lignées de cellules leucémiques (Wattel *et al.* 1996), le transfert de gènes dans les cellules leucémiques en culture primaire ou *in-vivo* demeure un obstacle, les résultats obtenus en absence de sélection (Hirst *et al.* 1997) avec des vecteurs classiques étant relativement modestes. Certains travaux montrent que ces résultats sont dus aux difficultés de la culture primaire des cellules leucémiques mais également à la faible expression de récepteurs viraux à la surface de celles-ci ou à la difficulté de délivrer l'ADN dans le noyau par les vecteurs non-viraux.

Actuellement plusieurs nouveaux vecteurs viraux et non-viraux, ayant tous pour point commun des modifications de structure permettant d'accroître leur efficacité en fonction des cellules cibles, sont en cours d'évaluation. Cependant les travaux concernant les cellules leucémiques en culture primaire sont rares ou les résultats obtenus sont peu satisfaisants. L'objectif de ce travail est de déterminer les conditions de transfert de gènes dans les cellules leucémiques de Leucémie Aiguë Myéloblastique (LAM) en culture primaire par de nouveaux vecteurs cationiques, par électroporation et par un vecteur adénoviral modifié.

Dans ce travail nous avons également abordé le transfert de gènes dans les myélomes en culture primaire, différentes études ayant montré l'intérêt d'un traitement par transfert de gènes dans ce type de pathologie (Saggio *et al.* 1997; Kopantzev *et al.* 1998) dont l'issue avec les traitements conventionnels est constamment fatale. Le transfert de gènes dans cette hémopathie a été abordé avec succès sur des lignées (Wendtner *et al.* 1997) par des vecteurs conventionnels. Cependant ces mêmes vecteurs s'avèrent peu efficaces sur les cellules en culture primaire (Wattel *et al.* 1996; Prince *et al.* 1998). La nécessité d'un vecteur efficace pour un traitement par thérapie génique de ces hémopathies et nos résultats sur les LAM nous ont permis d'étendre le travail de vectorisation aux Myélomes en culture primaire en utilisant un vecteur adénoviral modifié.

GENERALITES

Les progrès réalisés dans la connaissance des mécanismes moléculaires à l'origine des maladies et la stagnation des thérapeutiques classiques face à celles-ci ont permis d'envisager de nouvelles stratégies basées sur la modification ou le remplacement de gènes. Le développement des techniques de transfert de gènes dans un but d'investigation scientifique a renforcé cette idée et a permis de poser les bases de la thérapie génique.

Envisagée en premier lieu pour faire face aux maladies génétiques dans le but de réparer des gènes altérés, cette stratégie s'est vite heurtée aux difficultés techniques laissant la place au remplacement de gènes complets qui offre l'avantage de pouvoir contribuer au traitement de nombreuses maladies d'origines héréditaires ou acquises.

Cependant si les maladies génétiques restent la première cible de cette technique pour leur fréquence et leur gravité, ce sont les maladies acquises qui en seront les premières bénéficiaires. En effet, malgré le ciblage précis des gènes impliqués dans la plupart des maladies héréditaires monogéniques, l'expression de ces gènes après transfert est mal maîtrisée car avec une expression trop faible elle risque de ne pas aboutir à un effet thérapeutique efficace et une expression trop forte risque d'aboutir à une nouvelle pathologie. Ce facteur est beaucoup moins limitant pour les maladies non héréditaires puisqu'il s'agit dans ce cas d'éliminer une maladie acquise et donc de traiter la pathologie jusqu'à rémission ou instauration d'une protection naturelle par l'organisme. Cependant les gènes candidats sont moins bien connus et il faudra à terme disposer de gènes thérapeutiques très efficaces pour chaque pathologie considérée. D'autre part un facteur essentiel pour toute forme de thérapie génique est le développement de vecteurs très efficaces et adaptés aux différentes applications de celle-ci. En dehors des gènes thérapeutiques la vectorisation demeure le premier problème de la thérapie génique.

I . THERAPIE GENIQUE ET CANCER

Initialement orienté vers les maladies génétiques monogéniques, le transfert de gènes s'est rapidement ouvert aux maladies acquises comme le cancer, les infections chroniques et les maladies dégénératives.

Actuellement plus de 150 essais cliniques sont en cours dans le monde et plus de 50% de ceux-ci sont orientés contre le cancer. Plusieurs approches sont à l'étude dont les principales sont l'immunothérapie (Tan *et al.* 1996), le transfert de gènes suicide (Wilson *et al.* 1996), la chimio-protection (Devereux *et al.* 1998) et le transfert de gènes supresseurs de tumeur (Soussi 1997).

II . THERAPIE GENIQUE ET LEUCEMIES

II . 1 . Généralités

Les leucémies aiguës représentent des cibles potentielles intéressantes pour une thérapie génique. Malgré les progrès réalisés en chimiothérapie par la mise au point de nouveaux médicaments et l'association de nouvelles drogues, l'efficacité des traitements classiques a tendance à stagner. L'accroissement des doses de chimiothérapie se heurte à une limite de toxicité. D'autre part les progrès réalisés dans le domaine des greffes médullaires autologues n'ont pas entièrement résolu le problème de la persistance de la maladie résiduelle dans le greffon ou chez l'hôte.

Il semble possible d'imaginer une thérapie génique des leucémies aiguës, soit par le biais de la délivrance *in vivo* en systémique d'un vecteur dont le tropisme est dirigé vers les cellules blastiques, soit par un transfert *ex vivo* de gènes d'immunomodulation dans ces mêmes cellules afin de générer une réponse efficace vis à vis de la maladie résiduelle.

II . 2 . Transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques

Dans une perspective de lutte anti-cancéreuse, le transfert de gènes marqueurs et de gènes protecteurs dans les cellules souches hématopoïétiques font l'objet de recherches et de certains protocoles cliniques (Devereux *et al.* 1998). En effet le transfert d'un gène marqueur dans les cellules souches hématopoïétiques *ex-vivo*, puis la ré-injection de ces cellules au patient après traitement permet de suivre la reconstitution hématologique après greffe. De plus cette technique permet de vérifier si le greffon est contaminé par des cellules tumorales, ce qui est souvent le cas après autogreffe. Les gènes utilisés pour cette technique sont le gène de résistance à la néomycine (Neor), de la β -galactosidase et de la GFP (Green Fluorescent Protein) (Cheng *et al.* 1997).

L'introduction d'un gène protecteur dans les cellules souches permet d'accroître l'efficacité de la chimiothérapie ainsi que la pureté des greffons préparés *ex-vivo*. Le transfert du gène MDR-I (Multi Drug Résistance) est en cours d'évaluation. L'intérêt de celui-ci est de conférer aux cellules transfectées une résistance à plusieurs drogues utilisées en chimiothérapie, ce qui permet d'intensifier les traitements et de réduire les risques de maladie résiduelle. D'autre part cette technique peut-être appliquée aux greffons *ex-vivo* afin d'éliminer le maximum de cellules tumorales et par conséquent de réduire le risque de contamination du patient par le greffon. Cette stratégie nécessite une expression stable et à long terme du transgène, les vecteurs utilisés sont par conséquent principalement rétroviraux et s'avèrent relativement efficaces sur ces cellules *ex-vivo* (Abe *et al.* 1997). Cependant l'utilisation de ce type de vecteur requiert des cellules en division (Roe *et al.* 1993) ce qui implique l'utilisation de facteurs de croissance qui risquent d'aboutir à la différenciation de celles-ci. D'autres vecteurs sont en cours d'évaluation, notamment des vecteurs dérivés de l'Adeno Associated Virus (AAV) qui présentent l'avantage d'infecter de façon stable des cellules quiescentes (Goodman *et al.* 1994). L'emploi de vecteurs chimiques est également exploré, cependant l'efficacité de ces deux types de vecteurs par rapport aux vecteurs rétroviraux n'a pas été démontrée ou leur mise en œuvre reste trop complexe.

II . 3 . Transfert de gènes dans cellules leucémiques

De nouvelles approches s'avèrent nécessaires afin de pallier l'échec des thérapeutiques conventionnelles. Le transfert de gènes dans les cellules leucémiques est une alternative intéressante. Ce nouvel outil permet en effet d'envisager diverses approches thérapeutiques et préventives et par conséquent une réponse mieux adaptée à chaque cas.

Trois stratégies sont envisagées :

- l'Immunothérapie qui consiste à rendre les cellules du système immunitaire immunocompétantes vis à vis des cellules tumorales. Après transfert *ex-vivo* de gènes codant une cytokine ou une molécule de co-stimulation dans les cellules tumorales les cellules sont réinjectées au patient après irradiation afin d'induire une réponse immune. Des injections répétées de cellules modifiées peuvent être nécessaires afin d'aboutir à un effet thérapeutique. Cette stratégie permet en outre de maintenir une immunité antitumorale à long terme et de protéger contre les récurrences à la manière d'un vaccin. Des résultats expérimentaux ont permis de démontrer que le transfert du gène codant le CD80 (B7.1) dans des blastes de LAM aboutissait à l'activation des lymphocytes T allogéniques CD8⁺ et CD4⁺ *in-vitro* (Hirst *et al.* 1997). Dans un modèle murin, l'injection de blastes irradiés exprimant le CD80 dans des souris leucémiques engendre le rejet des cellules tumorales et le maintien d'une immunité systémique contre des challenges répétés avec des cellules non modifiées (Dunussi-Joannopoulos *et al.* 1996). D'autres gènes sont à l'étude dont ceux codant le GM-CSF, le CMH I, et différentes interleukines. L'association de ces molécules est également étudiée. Du point de vue de la vectorisation, cette technique nécessite l'emploi de vecteurs capables de transférer efficacement les cellules *ex-vivo* avec un taux d'expression suffisant pour avoir un effet biologique, l'expression du transgène à long terme n'étant pas nécessaire.

- Le transfert de gènes suicides *in-vivo* dans les cellules tumorales permet d'éliminer sélectivement celles-ci grâce à une chimiothérapie. Les cellules tumorales non transduites subiraient le même sort grâce à un effet de voisinage. L'exemple le plus connu étant le transfert du gène issu du virus de l'Herpès *HSV-tk* qui confère la sensibilité au gancyclovir (Obaru *et al.* 1996). Il a également été démontré que la destruction des cellules tumorales transduites par le gancyclovir était capable de générer une immunité systémique à long terme (Hall *et al.* 1998). Ce mécanisme ferait intervenir le système immunitaire qui reconnaîtrait les antigènes tumoraux libérés lors de l'apoptose des cellules. Malgré des résultats intéressants cette stratégie est difficilement applicable pour des masses tumorales diffuses avec les vecteurs actuels et ne peut se concevoir pour les leucémies que par la génération d'une réponse immune.
- Le transfert d'un gène suppresseur de tumeur *in-vivo* permet aux cellules de rétablir leur potentiel de mort programmée par apoptose suite aux multiples dommages génétiques ou de les rendre plus chimiosensibles. Un des gènes candidats pour cette stratégie est *p53* (Rizzo *et al.* 1998). Il a été montré que le transfert du gène *p53* dans des cellules tumorales induisait une augmentation de la chimiosensibilité et rétablissait la mort par apoptose de ces cellules (Miyake *et al.* 1998). Cette stratégie nécessite des vecteurs capables de transduire toutes les cellules tumorales et de limiter le nombre de copies de celui-ci présentes dans les cellules saines.

Contrairement au transfert dans les cellules souches, le transfert de gènes dans les cellules leucémiques est directement à visée thérapeutique et a pour objectif la destruction des cellules tumorales. Dans cette optique l'intégration du transgène dans le génome et son expression à long terme ne sont pas essentiels, par contre le taux de transfection et le niveau d'expression de celui-ci seront des éléments importants dans la mesure où l'efficacité du gène d'intérêt est dose dépendant.

III . LES VECTEURS

Les principaux systèmes de vectorisation envisagés dans les leucémies aiguës sont représentés sur le Tableau 1G :

TYPE DE VECTEUR	TYPE DE LEUCEMIE	TAUX DE TRANSFECTION	REFERENCES
Rétroviral de type MoMLV	LAM	1 à 16% 35 à 70% avec sélection	(Hirst <i>et al.</i> 1997).
Rétroviral de type MoMLV et Adénoviral type 5	Leucémies myéloïdes	Très efficace MOI de 200	(Tani <i>et al.</i> 1995b)
Adénoviral type 5 RSV	LLC B	10 à 70% MOI de 500 pfu	(Cantwell <i>et al.</i> 1996)
Adénoviral type 5 RSV	LMC LLC B	50 à 80% MOI de 13pfu 50 à 75% MOI de 13pfu	(Huang <i>et al.</i> 1997)
AAV type 2	LAM lignée K562	15 à 20% (LAM) 90% (K562)	(Anderson <i>et al.</i> 1997) (Malik <i>et al.</i> 1997)
Liposomes cationiques Plasmide CMV	LAM	0 à 15,8 %	(Stoepck <i>et al.</i> 1998)
DISC-HSV	LAM, LAL	80 à 100%	(Dilloo <i>et al.</i> 1997)

Tableau 1G : Vecteurs utilisés pour le transfert de gènes dans les cellules leucémiques.

III . 1 . Les vecteurs Rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux sont actuellement les plus utilisés en thérapie génique notamment pour le transfert de gènes dans les cellules hématopoïétiques, en effet plus de 70% des protocoles cliniques utilisent ce type de système de transfert de gènes. Ce choix est dû à la grande efficacité de ces vecteurs sur certains types cellulaires, leur facilité de mise en œuvre et leur propriété d'intégration dans le génome qui permet de maintenir une expression stable du transgène. Cette dernière caractéristique est également une restriction à son utilisation puisque pour s'intégrer ce type de virus nécessite des cellules en prolifération.

III . 1 . 1 . Les vecteurs classiques

Les vecteurs rétroviraux sont en grande partie issus du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMLV) qui a servi à la mise au point du premier vecteur déficient et des premières lignées d'encapsidation (Wei *et al.* 1981). Ces vecteurs sont généralement constitués d'un gène d'intérêt d'une taille maximum de 8kb placé sous le contrôle d'un LTR en 5' et situé en aval d'une séquence d'encapsidation Psi. La plupart de ces vecteurs portent également un gène de résistance à la Néomycine (Neo^R) sous le contrôle d'un promoteur SV40 permettant la sélection des cellules transfectées. La production de particules virales est assurée par une lignée d'encapsidation porteuse des gènes *gag* et *pol* du MoMLV et du gène *env* généralement issu de la souche 4070 du MLV qui code une protéine d'enveloppe amphotrope reconnue par les transporteurs de phosphate sodium dépendants GLVR-2/RAM-1 présents à la surface des cellules humaines (Miller and Rosman 1989).

Si ce type de vecteur rétroviral se montre très efficace sur la plupart des lignées et sur les tumeurs solides (Jaffee *et al.* 1993), son efficacité demeure modeste sur les cellules leucémiques en absence de sélection (Hirst *et al.* 1997), les taux de transfert obtenus étant de l'ordre de 1 à 15%. Une des raisons de la faible efficacité de ces vecteurs est liée au tropisme conféré par la protéines d'enveloppe. En effet, les lignées d'encapsidation utilisées couramment sont pour la plupart issues de la lignée murine 3T3 (Jolly 1994) et portent des gènes codant une protéine d'enveloppe amphotrope issue de la souche 4070 du MLV. Ces lignées conviennent pour l'infection de la plupart des cellules animales mais ne sont pas optimisées pour les cellules hématopoïétiques humaines qui semblent exprimer plus faiblement les récepteurs amphotropes GLVR-2/RAM-1 (Orlic *et al.* 1996).

D'autre part il est difficile d'obtenir des titres viraux importants avec ces lignées qui généralement délivrent des titres inférieurs à 10^6 pfu/ml ce qui empêche la transfection de grandes quantités de cellules, oblige à procéder à des transfusions répétées et augmente le temps de transfection. Ces manipulations impliquent également une culture *ex-vivo* plus longue des cellules à transférer et de ce fait une mortalité plus importante de celles-ci.

La plupart des vecteurs de type MoMLV servant au transfert de gènes *in-vivo* produits à partir de lignées d'encapsulation murines portent sur leur enveloppe des molécules reconnues par le complément comme la protéine p15E (Bartholomew *et al.* 1978) et des sucres de type Galactosyl (α 1,3) Galactose caractéristiques des cellules non-primates (Takeuchi *et al.* 1994; Rother *et al.* 1995; Takeuchi *et al.* 1996). Ces molécules sont très immunogènes et activent le complément via des anticorps naturels, ce phénomène aboutit à l'inactivation rapide des particules virales.

Indépendamment du taux de transfection, la faible expression du transgène peut s'expliquer par l'origine des promoteurs utilisés qui peuvent avoir une activité réduite dans certains types cellulaires (Walther and Stein 1996). Dans les cellules hématopoïétiques la comparaison de l'activité de différents promoteurs a montré que dans les vecteurs classiques porteurs d'un gène de résistance, en complément du gène d'intérêt, le promoteur CMV était le plus efficace par rapport au LTR et au promoteur SV40 (Byun *et al.* 1996).

L'utilisation de vecteurs rétroviraux implique l'intégration du provirus dans le génome et nécessite des cellules en prolifération, afin d'atteindre le noyau. Ce problème concerne les stratégies de transfert de gène *ex-vivo* mais aussi la culture primaire des cellules leucémiques. Il a été montré que le taux de transfection est lié à l'expression des récepteurs amphotropes à la surface de ces cellules (Sabatino *et al.* 1997). Certaines études ont permis de mettre en évidence l'intérêt de certains facteurs de croissance (IL3, SCF, IL6, G-CSF) sur l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules leucémiques et hématopoïétiques en culture primaire (Kavanaugh *et al.* 1994; Bodine *et al.* 1998). D'autres travaux ont montré que la privation en ions phosphate dans le milieu de culture augmentait l'expression des récepteurs amphotropes par un mécanisme de régulation positive de ces pompes sodium-phosphate Ram-1 (Kavanaugh *et al.* 1994).

III . 1 . 2 . Les vecteurs rétroviraux modifiés.

Afin d'améliorer l'efficacité de transfection des vecteurs rétroviraux par rapport aux vecteurs classiques plusieurs modifications ont été apportées, celles-ci concernent principalement les protéines d'enveloppe, les promoteurs, les lignées d'encapsulation et le vecteur rétroviral. Ces modifications tendent à optimiser les performances des vecteurs en les adaptant aux cellules cibles.

Sur le Tableau 2G sont présentées certaines de ces modifications apportées aux vecteurs rétroviraux, destinées aux cellules souches hématopoïétiques et aux lymphocytes principalement qui pourraient être appliquées aux cellules leucémiques.

TYPE DE MODIFICATION	REPLACE PAR :	Cellules Cibles/Résultats	Auteurs
Enveloppe MoMLV	Env RD114	Lymphocytes, cellules souches, pleiotrope et insensible au complément	(Cosset <i>et al.</i> 1995) (Porter <i>et al.</i> 1996)
	Env GALV	Lymphocytes, K562, taux de transfert 4 à 18 fois supérieurs à env MLV.	(Lam <i>et al.</i> 1996) (Sabatino <i>et al.</i> 1997)
	Env VSV-G	CD34+, titres élevés insensible au complément	(Burns <i>et al.</i> 1993)
	MoMLV + env avec fragments de c-Kit	Cellules humaines hématopoïétiques, LAM, ciblage des tissus <i>in-vivo</i>	(Yajima <i>et al.</i> 1998)
Promoteur CMV, SV40, LTR MoMLV	LTR du MSCV	CD34+, Lin-.Expression 30 fois supérieure à MLV	(Cheng <i>et al.</i> 1998)
	LTR du SFFV et PBS du MESV	K562, TF1. Myélotrope avec gène MDR protection 100 fois supérieure à MLV	(Baum <i>et al.</i> 1996)
	Promoteur du CD11b	HL60 différenciée en granulocytes et en macrophages. Expression spécifique.	(Malik <i>et al.</i> 1995)
Lignée d'encapsulation PA 317, ψ crip (3T3)	FLY RD18 origine humaine	Cellules humaines, <i>in-vivo</i> , pleiotrope Insensible au complément, Titres $>10^7$.	(Cosset <i>et al.</i> 1995)
	293-SPA origine humaine	Amphotrope, taux de transfert 10 fois supérieurs à lignée murine.	(Davis <i>et al.</i> 1997)
Vecteur MoMLV	HIV	Macrophages, cellules quiescentes.	(Naldini <i>et al.</i> 1996)
	Fr-MuLV souche FB29	Cellules souches hématopoïétiques Taux de transfection 35% $>$ MoMLV	(Cohen-Haguenaer <i>et al.</i> 1998)

Tableau 2G : Modifications des vecteurs rétroviraux

III . 1 . 2 . 1 . Modifications de la protéine d'enveloppe

Le spectre infectieux du virus dépend en grande partie de la nature de la protéine d'enveloppe. Cette glycoprotéine codée par le gène *env* est reconnue par des molécules qui joueront le rôle de récepteurs à la surface des cellules cibles, comme les pompe à phosphate sodium dépendante Ram-1 à la surface des cellules de mammifères.

Le remplacement des protéines d'enveloppe amphotropes par des protéines issues de virus infectant d'autres espèces animales peut s'avérer efficace sur les cellules hématopoïétiques humaines :

- Il a été montré que l'enveloppe des virus amphotropes était responsable de l'inactivation des particules virales chez les primates (Takeuchi *et al.* 1994), ce phénomène empêche les application *in-vivo* par ce type de vecteur chez l'Homme. L'utilisation de l'enveloppe du virus félin endogène RD114 a permis de résoudre ce problème, cette protéine n'étant pas inactivée par le système immunitaire. Cette protéine est reconnue par différents récepteurs cellulaires, des récepteurs aux virus félins et aussi simiens de type D présents à la surface des cellules humaines (Sommerfelt and Weiss 1990; Sommerfelt *et al.* 1990; Sommerfelt *et al.* 1993), ce qui rend les virus munis de ce type d'enveloppe très efficaces sur les cellules hématopoïétiques (Cosset *et al.* 1995).
- L'enveloppe du virus de la leucémie du Gibbon (GALV) (Lam *et al.* 1996) s'avère très efficace sur les lymphocytes, son récepteur GLVR-1 est plus abondant dans ces cellules que celui des virus murins amphotropes GLVR-2. L'étude de l'expression de ces récepteurs à la surface de lignées leucémiques myéloïdes a été entreprise et une différence d'expression de l'un ou l'autre de ces récepteurs selon le type de leucémie a été observée (Sabatino *et al.* 1997). Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de vecteurs porteurs d'une enveloppe de type GALV dans les cellules leucémiques myéloïdes intransfectables par les vecteurs amphotropes.

- La protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse s'est avérée efficace (Burns *et al.* 1993) sur des cellules CD34⁺. De plus les particules virales sont résistantes au complément humain et peuvent être concentrées facilement, ce qui permettrait une utilisation *in-vivo*.
- La modification de l'enveloppe par la fixation d'un ligand dirigé contre certains récepteurs spécifiques aux cellules hématopoïétiques constitue une perspective intéressante et permettrait de cibler des populations cellulaires *in-vivo*. La fixation d'un fragment du SCF murin (mC-Kit) sur l'enveloppe d'un vecteur issu du MoMLV a augmenté l'efficacité de ce vecteur sur des cellules humaines exprimant le récepteur murin de cette protéine (Yajima *et al.* 1998). L'utilisation de ce type de vecteur peut s'avérer intéressante pour le transfert de gènes dans les leucémies aiguës myéloblastiques dont les cellules expriment fortement le récepteur au SCF (Sperling *et al.* 1997).
- Certaines équipes s'intéressent également à l'enveloppe du HIV (Yu *et al.* 1996) qui permettrait de cibler les lymphocytes, cependant malgré son efficacité *ex-vivo* l'enveloppe pourrait s'avérer neurotoxique et avoir des propriétés immunosuppressives (Toggas *et al.* 1994).

III . 1 . 2 . 2 . Modifications des promoteurs.

Des travaux ont montré que malgré un transfert efficace le transgène n'est pas toujours exprimé dans certains types cellulaires et notamment dans les cellules hématopoïétiques, les raisons essentielles étant le mauvais fonctionnement du promoteur :

- La méthylation du LTR est une de ces raisons (Challita and Kohn 1994), celle-ci pourrait être due à la différenciation des cellules *in vivo* ou en culture primaire sous l'effet des facteurs de croissance (Lu *et al.* 1996). Le remplacement des LTR du MoMLV par ceux du MSCV (virus des cellules souches murines) a montré des résultats intéressants (Tableau 2) dans les cellules souches puisque les LTR de ce type de virus sont insensibles à la méthylation lors de la différenciation de celles-ci (Cheng *et al.* 1998).
- Il a été montré que des éléments cis-régulateurs responsables de la sous-expression du transgène dans certains types cellulaires se trouvaient dans les régions U3 du LTR et dans le site d'initiation de la rétrotranscription (PBS) de la séquence *Leader* du rétrovirus. La région U3 du MoMLV par exemple est fortement lymphotrope et peu active dans les cellules myéloïdes (Li *et al.* 1987; Speck *et al.* 1990). Contrairement au MoMLV, le virus de la leucémie murine de Friend (FMuLV) porte des LTR qui ont un tropisme prononcé pour les cellules érythroïdes. Le PBS du MoMLV dont la fonction est d'assurer l'intégration du virus inhibe l'expression du transgène dans les cellules myéloïdes (Kempler *et al.* 1993). Ce phénomène observé dans les cellules de carcinome embryonnaire murin serait dû à la méthylation du PBS, ce qui aurait pour résultat d'inhiber l'expression à long terme dans ces cellules (Challita *et al.* 1995). Un nouveau vecteur le pFMEV porteur de modifications permettant d'accroître son efficacité dans les cellules myéloïdes a été construit (Baum *et al.* 1996). Dans ce vecteur rétroviral les régions U3 des LTR ont été remplacées par leurs homologues du virus déficient pSFFV, issu du virus de la leucémie murine de Friend, possédant des LTR qui ont une forte expression dans les cellules myéloïdes (Friel *et al.* 1990).

La mutation du *PBS* du virus de la leucémie murine de Moloney a permis la mise au point de vecteurs ayant une expression à long terme dans les cellules myéloïdes, comme le MESV dont est issu le *PBS* du FMEV (Grez *et al.* 1990; Hawley *et al.* 1992). Ce vecteur a été utilisé sur la lignée de cellules leucémiques K562, de progéniteurs myéloïdes TF-1 et sur des cellules souches CD34+. Les résultats obtenus montrent une expression du transgène plus de deux fois supérieure à celle obtenue avec des vecteurs classiques et un maintien de l'expression dans les cellules CD34+ jusqu'à sept semaines contre trois semaines avec un vecteur classique (Baum *et al.* 1996; Mazurier *et al.* 1998).

- L'emploi de nouveaux promoteurs peut également servir au ciblage d'une population cellulaire. Certains travaux montrent que l'utilisation de promoteurs humains comme celui du CD-11 dans les lignées myélomonocytaires (Malik *et al.* 1995) peut aboutir à une expression restreinte à ce type de cellules et supérieure à celle obtenue avec un promoteur viral non spécifique.

III . 1 . 2 . 3 . Modifications de la lignée d'encapsidation.

La grande majorité des lignées d'encapsidation utilisées actuellement dérivent de la lignée murine NIH 3T3 dans laquelle ont été insérées les séquences rétrovirales du MoMLV codant les gènes *gag* et *pol* et le gène *env* de la souche du MLV 4070. Les principales modifications effectuées sur ces lignées ont consisté au remplacement du gène *env* codant la protéine d'enveloppe afin de modifier le tropisme des particules virales et de rendre celles-ci plus résistantes au complément en vue d'une application *in-vivo*. L'emploi de nouvelles lignées cellulaires d'encapsidation d'origine humaine présente l'avantage de réduire le risque de génération de virus compétents pour la réplication en absence de séquences virales murines endogènes et de produire des particules virales plus résistantes au complément humain :

- La lignée d'encapsidation d'origine humaine FLYRD18 a été optimisée pour la production de particules rétrovirales utilisables *in-vivo*. Les modifications concernent tout d'abord la lignée cellulaire utilisée issue du fibrosarcome humain HT1080 qui permet la production de particules virales plus résistantes au complément, ne présente pas de virus endogènes murins et permet la production de titres viraux importants. Cette lignée intègre en plus le gène *env* codant une protéine d'enveloppe du virus félin RD114 qui est résistante au complément et qui est reconnue par les récepteurs simiens présents dans les cellules humaines. De plus les gènes *gag* et *pol* ont été transfectés séparément du gène *env* et les séquences de ces trois gènes ont été réduites afin d'éviter les risques de recombinaison avec des virus endogènes. D'autre part les gènes de sélection sont décalés du cadre de lecture des gènes viraux ce qui accroît la production de protéines virales permettant l'obtention de titres élevés tout en laissant la possibilité de sélectionner les cellules portant ces séquences (Cosset *et al.* 1995).

- D'autres lignées ont été mises au point et découlent des recherches précédemment décrites dont la lignée d'encapsidation 293-SPA qui est issue de la lignée de rein embryonnaire humaine 293. Les séquences rétrovirales sont celles d'une lignée amphotrope classique, cependant les résultats obtenus avec celle-ci sont nettement supérieurs à ceux des lignées murines. De plus cette lignée se montre plus résistante au complément et par ailleurs limite fortement la production de virus compétents pour la réplication (Davis *et al.* 1997).

III . 1 . 2 . 4 . Modifications des vecteurs

Parallèlement aux modifications effectuées sur les vecteurs rétroviraux issus du MoMLV, des vecteurs issus d'autres virus ont été mis au point ou sont à l'étude :

- Des vecteurs rétroviraux issus du virus de la leucémie murine de Friend (Fr-MuLV) ont été mis au point afin d'améliorer les taux de transfert obtenus avec les vecteurs basés sur le MoMLV (Cohen-Haguenauer *et al.* 1996), cependant les résultats obtenus n'étant pas satisfaisants leur usage ne s'est pas généralisé. Des travaux récents ont permis d'envisager leur utilisation dans les cellules hématopoïétiques, après modification de séquences cis régulatrices situées dans la région U3 du LTR de la souche FB29 (Cohen-Haguenauer *et al.* 1998) qui permettent d'obtenir d'importants titres viraux. Les résultats obtenus sur des cellules souches *ex-vivo* montrent un taux de transfert de 42% avec ce nouveau vecteur contre 21% avec un vecteur issu du MoMLV.
- L'utilisation de nouveaux vecteurs rétroviraux issus de Lentivirus comme le VIH pour le transfert de gènes dans les cellules hématopoïétiques et leucémiques *ex-vivo* est en cours d'évaluation. En effet ce type de virus est capable d'infecter des cellules quiescentes ou qui prolifèrent peu et de s'intégrer dans le génome. Conçus principalement pour le transfert de gène dans les neurones, leur efficacité à été également démontrée sur des macrophages irradiés en culture primaire (Weinberg *et al.* 1991; Naldini *et al.* 1996) et sur la lignée leucémique issue de la Leucémie T de l'Adulte (ATL) MT2 (Obaru *et al.* 1996). Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de tels vecteurs pour le transfert de gènes dans les cellules leucémiques en culture primaire.

III . 2 . Les vecteurs adénoviraux

D'un usage moins généralisé que les vecteurs rétroviraux, les vecteurs adénoviraux sont utilisés dans plus de 25% des essais cliniques de thérapie génique dans le monde. La limitation à leur utilisation provient surtout de leur caractère non répliatif et leur caractère extrachromosomique ce qui ne permet pas le maintien d'une expression à long terme du transgène et par conséquent une utilisation pour le traitement de maladies génétiques. De plus de part leur nature ces vecteurs se montrent très immunogènes (Yang and Wilson 1995) ce qui limite leur utilisation *in-vivo* (Yang *et al.* 1995).

Malgré ces limitations ces vecteurs offrent de multiples avantages, ils permettent de transférer efficacement de multiples types cellulaires (Bramson *et al.* 1995), le transfert de séquences supérieures à 7,5kb et ils sont très stables. De plus, ils sont faciles à concentrer et à lyophiliser, ce qui permet l'obtention de titres viraux très élevés et la transfection avec des MOI importantes aboutissant à une expression élevée du transgène (Kovesdi *et al.* 1997). Par ailleurs, ils permettent la transfection de cellules quiescentes ou à faible pouvoir prolifératif, ce qui en fait de bons candidats pour le transfert de gènes thérapeutiques dans les cellules leucémiques en culture primaire dans le cadre d'un protocole de thérapie génique du cancer.

III . 2 . 1 . Les vecteurs classiques

Les adénovirus sont des virus à ADN linéaire bicaténaire de 35kb, à large spectre d'hôte dont plus de 50 sérotypes humains ont été répertoriés et entraînent généralement des signes cliniques bénins touchant les voies respiratoires.

Les vecteurs adénoviraux sont généralement issus des sérotypes Ad2 et Ad5 dont les génomes sont bien caractérisés et les régions E1A et E1B ont été délétées afin de les rendre défectifs pour la réplication. La région E3 est également délétée dans les vecteurs actuels et permet l'augmentation de la taille du transgène jusqu'à 8kb sans affecter les propriétés du vecteur.

L'ADN recombiné est inséré sous forme de cassette dans le génome viral à la place des régions E1A et E1B délétées, il est composé d'une répétition inversée terminale de 100pb, d'un signal d'encapsidation, d'une région amplificatrice de E1A, du transgène en aval de son promoteur et d'un signal de polyadénylation du virus SV40. Les promoteurs utilisés sont généralement issus du RSV et plus récemment de type CMV qui se montre plus efficace (Jolly 1994).

La production de particules virales se fait par transfert du vecteur recombiné dans la lignée embryonnaire humaine 293. Cette lignée contient les régions E1A et E1B (Aiello *et al.* 1979) qui vont transcomplémenter les gènes adénoviraux portés par le vecteur et permettre la production de particule adénovirales défectives pour la réplication, portant le transgène.

L'entrée des particules virales dans les cellules cibles s'effectue après attachement du domaine KNOB de la fibre adénovirale sur des récepteurs cellulaires spécifiques (Bergelson *et al.* 1997; Hong *et al.* 1997; Tomko *et al.* 1997; Bergelson *et al.* 1998), puis reconnaissance d'autres molécules de surface par le penton, les intégrines et en particulier les récepteurs à la vitronectine ($\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_3$), et fixation au moyen d'une séquence de type RGD afin d'être internalisé par endocytose (Wickham *et al.* 1993).

L'utilisation de ce type de vecteur s'est avérée d'une grande efficacité dans les cellules leucémiques issues de LLC-B et LMC en culture primaire, les taux de transduction obtenus dans ces deux cas étant respectivement de 50 à 80% et de 70 à 100% (cf tableau n°1). Certains travaux font état de taux de transfert très élevés dans les cellules leucémiques myéloïdes sans toutes fois donner de précision sur le type de leucémie et le taux de transduction (Tani *et al.* 1995b). Par contre d'autres travaux ont montré que ce type de vecteur muni d'un promoteur RSV s'avérait inefficace sur les cellules de leucémies aiguës myéloblastiques en culture primaire malgré de très bons résultats sur les lignées.

Ces résultats tendent à montrer que les vecteurs adénoviraux classiques peuvent s'avérer très efficaces et induire des taux d'expression très élevés du transgène dans certaines cellules leucémiques. Cependant leur tropisme est restreint à un certain type de cellules et le nombre de particules virales nécessaires pour obtenir une transduction efficace est très élevé. Des résultats similaires ont été rapportés sur les cellules médullaires, les taux de transfection étant plus ou moins importants selon le type de cellule cible.

L'entrée dans la cellule semble être la principale limitation de ce type de vecteur, l'expression du transgène placé généralement sous la dépendance d'un promoteur CMV étant généralement forte. En effet l'étude des molécules permettant l'entrée de ce type de virus à la surface des cellules du sang périphérique a montré que les récepteurs CAR étaient très peu présents à la surface de celles-ci (Mentel *et al.* 1997). De plus exception faite des monocytes et des cellules de LLC activées respectivement par le CD40 et par le GM-CSF, les cellules d'origine hématopoïétique expriment à un faible niveau les intégrines $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_v\beta_3$ (Huang *et al.* 1995; Huang *et al.* 1996).

III . 2 . 2 . Les vecteurs modifiés

Afin d'améliorer l'efficacité de transfection des vecteurs adénoviraux des recherches ont permis de mettre au point des vecteurs modifiés ou de nouvelles techniques de transfection permettant d'étendre leur tropisme ou de faciliter leur entrée dans les cellules cibles. Certaines modifications apportées à ces vecteurs pouvant servir au transfert de gènes dans les cellules leucémiques sont représentées sur le Tableau 3G.

TYPE DE MODIFICATION	CELLULES CIBLES / RESULTATS	AUTEURS
Fixation d'un complexe anticorps-ligand dirigé contre le domaine KNOB de la fibre.	Les particules adénovirales se fixent sur les cellules portant les récepteurs au ligand. Selon le type de ligand (Folate, FGF-2) et les cellules cibles, le tropisme est augmenté ou restreint.	(Douglas <i>et al.</i> 1996) (Goldman <i>et al.</i> 1997) (Rogers <i>et al.</i> 1997)
Modification de la fibre dont la partie C terminale porte des polylysines.	Augmentation du tropisme et du taux de transfert. Les particules adénovirales se fixent aux Héparanes-Sulfates en plus de leurs récepteurs naturels. Les taux de transduction sont de 10 à 300 fois supérieurs aux vecteurs classiques.	(Wickham <i>et al.</i> 1996a) (Wickham <i>et al.</i> 1997c)
Modification des boucles HI du domaine KNOB de la fibre par insertion d'un peptide.	Augmentation du tropisme sans modification de l'infectibilité naturelle. Le spectre et la spécificité sont augmentées selon le peptide inséré.	(KRASNYKH, DMITRIEV <i>ET AL.</i> 1998)
Modification de la fibre de l'Ad5 par insertion de la tête de l'Ad3.	Le tropisme de l'Ad5 est étendu à celui de l'Ad3. Permet de transférer des cellules non permissives à l'Ad5 avec des taux de transfert supérieurs à l'Ad3.	(Stevenson <i>et al.</i> 1997) (Krasnykh <i>et al.</i> 1996)

Tableau 3G : Modifications des vecteurs adénoviraux.

III . 2 . 2 . 1 . Modifications de la fibre

La modification de la fibre permet d'augmenter ou de restreindre le tropisme des vecteurs adénoviraux, elle a permis de mettre au point des vecteurs capables de cibler les cellules selon leurs caractéristiques membranaires ou de transduire des cellules intransfectables par les vecteurs classiques.

Trois méthodes ont été utilisées :

- La première a consisté à modifier la région C-terminale de la fibre par l'insertion d'un peptide pouvant être reconnu par des récepteurs ou d'autres ligands cellulaires. Cela a été réalisé par insertion dans la partie terminale du gène de la fibre d'une séquence qui va décaler le cadre de lecture et aboutir à la traduction de la queue polyA ce qui se traduit par l'addition de polylysines en fin de protéine. L'addition de polylysines crée une accumulation de charges positives en fin de fibre qui permettront la fixation de celle-ci sur des molécules riches en charges négatives sur la membrane cellulaire et notamment sur les Héparanes-Sulfate (Wickham *et al.* 1996a). Cette technique a permis de modifier un vecteur adénoviral qui, tout en gardant ses propriétés d'origine, permet de transfecter avec une très grande efficacité les cellules riches en Héparanes-Sulfates présents sur de nombreux types cellulaires dont certaines cellules sanguines (Sanderson *et al.* 1989; Rawstron *et al.* 1997; Sun *et al.* 1997). Un autre vecteur modifié a été construit par la même équipe, l'insertion d'une séquence RGD du penton permet la fixation des particules virales sur des cellules riches en intégrines α_v , cependant ce type de modification est peu applicable aux cellules leucémiques étant donné la faible expression de ce type d'intégrines à leur surface (Huang *et al.* 1995).

- La seconde méthode est basée sur la modification du domaine KNOB de la fibre sans altérer ses propriétés et permettant de cibler des molécules à la surface des cellules. Contrairement aux autres travaux comme celui présenté précédemment, cette nouvelle stratégie se propose de modifier le domaine KNOB par insertion d'un peptide dans celui-ci en tenant compte de sa structure tridimensionnelle.

Le peptide est inséré dans les boucles HI du domaine KNOB et ne modifie pas les propriétés naturelles de celui-ci, les boucles HI ne jouant aucun rôle dans l'interaction entre la fibre et son récepteur. Les avantages de cette technique sont multiples, l'insertion du peptide ligand dans le KNOB protège mieux celui-ci de la dégradation par les enzymes cellulaires, la fixation à la membrane cellulaire par le KNOB n'est pas perturbée, les boucles très flexibles et se trouvant en périphérie du KNOB permettent une grande accessibilité du peptide ligand par les récepteurs cellulaires. De plus ce type de modification permet l'insertion de différents peptides adaptés aux cellules cibles mais également l'insertion de peptides dans la région C-terminale de la fibre afin d'accroître sa spécificité (Krasnykh *et al.* 1998).

Ces deux méthodes modifiant directement le tropisme des vecteurs permettent d'adapter celui-ci au type cellulaire désiré selon le ligand inséré dans la fibre tout en augmentant considérablement les taux de transfert obtenus actuellement avec les vecteurs classiques.

- Une troisième méthode a également été mise au point et consiste à remplacer la partie externe de la fibre de l'adénovirus de type 5 par celle de l'adénovirus de type 3. Cette modification permet de générer des particules virales capables de transfecter des cellules intransfectables par l'Ad5 mais qui le sont par l'Ad3 tout en bénéficiant des propriétés de l'Ad5 qui génère des taux de transduction plus élevés. Ce type de vecteur a été utilisé sur la lignée myélomonocytaire THP-1 et les résultats obtenus montrent que malgré l'efficacité de l'Ad5, le vecteur porteur de la fibre de l'Ad3 se montre plus efficace. Ce type de vecteur permettrait d'accroître les taux de transduction obtenus actuellement avec les vecteurs classiques notamment dans certaines cellules leucémiques et hémopathies comme les LLC et les Myélomes (Cantwell *et al.* 1996; Prince *et al.* 1998).

III . 2 . 2 . 2 . Modifications immunologiques.

Cette méthode basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre la fibre ou le penton a permis de modifier le tropisme des vecteurs adénoviraux. Celle-ci consiste à utiliser des anticorps dirigés contre le virus portant dans la partie Fc une molécule qui sera reconnue par un récepteur cellulaire qui permettra la fixation des particules virales à la surface des cellules. Deux approches ont été abordées :

- La première approche consiste à utiliser des anticorps dirigés contre la fibre. Le tropisme des particules virales est complètement modifié, elles ne peuvent plus se fixer à leur récepteur naturel mais exclusivement au récepteur du ligand porté par l'anticorps (Goldman *et al.* 1997). Selon le ligand utilisé le taux de transfert est plus ou moins élevé, par contre le tropisme modifié permet de cibler une population cellulaire et une utilisation *in-vivo*. Cette méthode a été testée sur des lignées de sarcomes de Kaposi en utilisant des anticorps porteurs du FGF2 dont les récepteurs sont exprimés abondamment à la surface de ce type de cellules. Les taux de transfert obtenus sont de 7 à 44 fois supérieurs à ceux des vecteurs adénoviraux classiques.
- La seconde approche consiste à utiliser un anticorps bispécifique dirigé contre la séquence FLAG du penton et contre les intégrines α_v des récepteurs cellulaires (Wickham *et al.* 1996b). Les résultats montrent un accroissement du taux de transfert dans les cellules musculaires et endothéliales. Cette approche permet d'élargir le tropisme du virus et d'augmenter son taux de transfection, la pénétration s'effectuant d'ailleurs à l'aide des intégrines α_v . Pour le transfert de gènes dans les cellules leucémiques, le grand avantage de cette méthode est sa flexibilité qui permet de cibler une population cellulaire en fonction des spécificités membranaires. On peut envisager des anticorps porteurs de fragments de SCF ou de CD33 spécifiques des cellules myéloïdes pour un transfert *ex-vivo* ou de molécules plus spécifiques pour un transfert *in-vivo*.

III . 2 . 2 . 3 . Modification de l'immunogénicité.

L'induction d'une réponse immune par les vecteurs adénoviraux est une limitation importante à leur utilisation. Si ce phénomène n'intervient pas directement sur le taux de transfection et l'expression du transgène, il limite fortement son utilisation *in-vivo* et le maintient d'une expression à long terme. Deux mécanismes entrent en jeu, la synthèse par l'organisme d'anticorps neutralisants dirigés contre les particules virales et une réponse de type CTL dirigée contre les protéines virales issues des gènes tardifs exprimées à la surface des cellules cibles. Ces mécanismes auront pour conséquence de limiter l'usage de tels vecteurs pour certaines applications. La production d'anticorps neutralisants limite fortement les applications *in-vivo* en empêchant les injections répétées (Yang *et al.* 1996). Cependant certains travaux montrent que cette réponse peut être limitée par l'administration de faibles doses de particules virales, ce qui implique l'utilisation de vecteurs très efficaces (Clesham *et al.* 1998). L'activation d'une réponse de type CTL, plus tardive, provoque la destruction des cellules transduites et limite de ce fait les applications nécessitant une expression à long terme du transgène ainsi que les injections répétées (Yang *et al.* 1995). Sans modifications, ce type de vecteur s'avère cependant très efficace pour des applications nécessitant une expression transitoire et permettant un transfert *ex-vivo*.

Afin de diminuer l'immunogénicité plusieurs modifications ont été décrites :

- Certains travaux ont montré qu'il était possible de réduire l'immunogénicité des vecteurs adénoviraux, permettant ainsi d'élargir leur champ d'action à des applications alors réservées aux rétrovirus. Il a été montré que l'inactivation des gènes de la région E2 réduit fortement la réponse immune et permet de maintenir une expression à long terme (Yang *et al.* 1994). Cela a abouti à la mise au point de vecteurs portant des mutations thermosensibles dans les gènes E2A ou E2B. La délétion totale de ces gènes et leur transcomplémentation dans la lignée d'encapsidation 293 ayant des effets toxiques pour ces cellules.

- D'autres gènes impliqués dans l'immunogénicité ont été mis en évidence, comme le gène *gp19k* situé dans la région E3 qui est délétée dans la plupart des vecteurs actuels. Ce gène code une protéine, la Gp19k, localisée dans le réticulum endoplasmique, elle empêche l'expression du CMH-I à la surface des cellules et par conséquent l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T CD8⁺. La construction d'un vecteur co-exprimant la Gp19K et un gène rapporteur a permis de mettre en évidence son rôle immunomodulateur dans un modèle murin. Les cellules transduites par ce vecteur ne sont pas détruites par les lymphocytes CD8⁺ et permettent l'induction d'une expression à long terme et une application *in-vivo* avec des injections répétées (Lee *et al.* 1995).
- Des travaux récents décrivent la construction d'un vecteur adénoviral dépourvu de séquences virales codantes qui, outre la capacité de transférer de grandes séquences d'ADN, génère une très faible réponse et permet ainsi le maintien de l'expression du transgène à un taux élevé 10 mois après transfert (Schiedner *et al.* 1998).

III . 3 . Les vecteurs issus de Virus Associés à l'Adénovirus (AAV).

Les AAV sont des Parvovirus à ADN monocaténaire dont les extrémités portent des séquences inversées-répétées (ITR) de 145 bases dont les 125 premières forment une épingle en T qui lui permet de s'intégrer au génome de l'hôte. La particularité de ces virus est d'être dépendants pour la réplication de virus assistants comme l'adénovirus ou le virus de l'Herpès.

Les AAV de type 2 utilisés en thérapie génique ne semblent pas causer de pathologies connues et sont capables d'infecter de nombreux types cellulaires y compris les cellules hématopoïétiques (Lubovy *et al.* 1996). Les vecteurs défectifs basés sur les AAV se composent des deux ITR situés de part et d'autre du gène d'intérêt. La production de particules virales recombinées est assurée par co-transfection de la lignée 293, infectée par un adénovirus, avec un plasmide porteur des gènes *rep* et *cap* de l'AAV et le plasmide portant le transgène.

Peu utilisés, ces vecteurs font actuellement l'objet de travaux en vue de leur utilisation en thérapie génique. En effet les AAV modifiés offrent l'avantage de s'intégrer dans le génome des cellules quiescentes. Ils sont de ce fait intéressants pour le transfert de gènes dans les cellules leucémiques qui prolifèrent peu en culture primaire.

Les résultats obtenus sur des lignées leucémiques lymphoïdes et myéloïdes sont intéressants, avec des taux de transfection respectifs de 70 et 90% pour les lignées lymphoïde LP-1 et érythroïde K562 (Chiorini *et al.* 1995; Malik *et al.* 1997). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les meilleurs vecteurs rétroviraux et adénoviraux.

Le transfert du gène de l'IL-12 par un nouveau vecteur AAV sur des cellules de LAM en culture primaire s'est avéré efficace, les cellules transduites activant de façon significative des cellules NK in vitro (Anderson *et al.* 1997). Malgré des taux d'expression qui demeurent inférieurs à ceux obtenus avec des vecteurs adénoviraux et rétroviraux (Bramson *et al.* 1996), la sécrétion d'IL-12 s'est avérée suffisante pour induire un effet biologique, démontrant ainsi l'efficacité d'un tel vecteur pour ce type d'application. Cependant, pour d'autres cytokines nécessitant des taux d'expression importants, son efficacité reste à démontrer. L'utilisation d'un tel vecteur demeure donc difficilement envisageable pour le transfert de gènes suppresseurs de tumeur ou des molécules de costimulation du système immunitaire, les taux de transfert du transgène étant relativement faibles.

Par ailleurs la production de ce type de vecteur reste complexe et instable. De plus l'utilisation de virus auxiliaires n'est pas actuellement compatible avec une application chez l'Homme.

III . 4 . Les vecteurs issus du Virus de l'Herpes Simplex (HSV).

Le HSV appartient à la sous-famille des virus de l'Herpès de type E. C'est un virus enveloppé à ADN bicaténaire de 152Kb possédant 3 régions avec des séquences répétées et deux séquences codantes U1 et Us. Ce virus s'intègre au génome de l'hôte pour se répliquer et son tropisme lui permet d'infecter de multiples types cellulaires. Il est en outre capable d'infecter des cellules quiescentes et persiste généralement dans les cellules sans s'intégrer.

Les vecteurs issus de ce virus sont très peu utilisés parce qu'ils sont très difficiles à produire. De plus les stocks sont généralement contaminés par des virus compétents et les virus défectifs peuvent produire des protéines toxiques pour les cellules (Johnson *et al.* 1992).

Afin de permettre une utilisation plus sûre et une production plus efficace, des travaux ont abouti à la mise au point d'un nouveau vecteur, le DISC-HSV. Ce vecteur est un virus à un cycle répliatif qui lui permet de se répliquer dans les premières cellules qu'il infecte. Les virus modifiés sont d'abord produits par une lignée de transcomplémentation, transfectée par des vecteurs délétés du gène de la glycoprotéine H qui a été remplacé par un transgène. Les particules virales obtenues produiront de nouvelles particules défectives pour la répliation dans les premières cellules infectées permissives, ces particules infecteront d'autres cellules, augmentant ainsi l'efficacité du transfert. Ce vecteur porteur du gène de la β -galactosidase ou du GM-CSF a été testé sur des cellules leucémiques en culture primaire issues de LAL et de LAM. Les taux de transduction (Tableau 1G) sont largement supérieurs à ceux obtenus avec des vecteurs rétroviraux et adénoviraux (Dilloo *et al.* 1997). Ce vecteur se montre très efficace à des MOI très faibles ce qui limite sa toxicité et le risque d'avoir des virus sauvages. Cependant il ne semble pas être capable de délivrer une expression du transgène à long terme dans les cellules leucémiques, puisque les niveaux d'expression sont fortement réduits après sept jours. Ces résultats constituent néanmoins à ce jour le seul exemple de transfert de gène complètement efficace sur ces types de leucémie *ex-vivo*.

III . 5 . Les vecteurs non viraux.

Plus d'un quart des essais cliniques de thérapie génique font appel à des vecteurs non viraux et ce type de vectorisation est en constante augmentation. L'intérêt suscité par ces vecteurs est dû à leur facilité de mise en œuvre et surtout à leur sécurité d'emploi théorique par rapport aux vecteurs viraux. Plusieurs moyens de transfert de gène non viral sont à l'étude dont les principaux et les plus efficaces sont les liposomes cationiques, les polyéthylènimines et l'électroporation. Toutes ces méthodes sont basées sur le transfert d'ADN plasmidique de façon passive (endocytose) ou active (électroporation).

Les taux de transfert obtenus par ces méthodes varient en fonction du transporteur et des cellules cibles, cependant ils demeurent généralement inférieurs à ceux obtenus avec des vecteurs viraux. De plus les taux d'expression du transgène sont plus faibles et l'expression transitoire, ce qui limite leur champ d'application.

Peu de travaux faisant appel à ces méthodes de transfert de gènes dans les cellules leucémiques ont été décrits. La plupart ont été réalisées sur des lignées cellulaires et des cellules souches CD34+.

III . 5 . 1 . Les Liposomes cationiques.

Les Liposomes cationiques sont des complexes lipidiques portant une tête polaire chargée positivement qui aura pour effet de condenser l'ADN et de fixer ce nouveau complexe à la membrane plasmique .

Ces complexes ADN-Liposome pénètrent dans la cellule par endocytose (Gao and Huang 1995). Les lipopolyamines qui portent des polyamines sur leur tête polaire font partie des vecteurs non viraux les plus efficaces .

Des vecteurs de ce type ont été testés sur des cellules de leucémie aiguë myéloblastique en culture primaire (LAM) (Stopeck *et al.* 1998) dans le cadre d'un projet d'immunothérapie par transfert du gène de l'IL-2. Les taux de transfert obtenus dans ces cellules tumorales sont relativement modestes (0 à 15%) cependant ils sont similaires à ceux obtenus par la plupart des vecteurs viraux en absence de sélection. D'autres produits comme les phosphonolipides ont été testés avec succès sur les lignées de cellules leucémiques K562 et TF1. Le taux de transfert sur les cellules souches CD34⁺ atteignent 45% (Floch *et al.* 1997).

Deux types de modifications sont à l'étude pour les vecteurs liposomaux :

- La première modification vise à augmenter l'affinité des complexes ADN-liposomes pour certaines cellules et la deuxième à permettre la libération de l'ADN de l'endosome sans dégradation enzymatique. Contrairement aux virus, ces vecteurs n'ont pas de tropisme, leur fixation à la membrane est uniquement dépendante des interactions entre les charges de la membrane et celles du complexe ADN-Liposome. La fixation d'une molécule reconnue par des récepteurs cellulaires sur les liposomes permet d'introduire la notion de tropisme pour ces complexes et de cibler des types cellulaires. Des vecteurs portant des fragments de C-Kit ont démontré l'efficacité de cette technique sur des cellules exprimant le récepteur de cette molécule (Schwarzenberger *et al.* 1996). Cependant ces modifications s'accompagnent généralement d'une baisse d'efficacité de transduction (Remy *et al.* 1995).

- L'efficacité de ce type de vecteur ne dépend pas uniquement de la pénétration des complexes dans la cellule par endocytose mais également de la libération de l'ADN dans la cellule et son passage dans le noyau. C'est en effet ce dernier mécanisme qui constitue le principal obstacle de cette méthode. Malgré la très grande efficacité des liposomes pour pénétrer dans la cellule, beaucoup de complexes ADN-Liposome sont dégradés par les enzymes lysosomiales. En effet les complexes ADN-Liposome entrent dans la cellule par endocytose. Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les lysosomes dont les enzymes dégradent le contenu. Seules les molécules d'ADN qui échappent à ce mécanisme et aux endosomes arrivent au noyau, ce qui réduit de façon significative l'efficacité. Afin de limiter ce problème, certains travaux décrivent l'association de certaines protéines ou d'adenovirus défectifs aux complexes ADN-Liposome. Ces protéines ou ces virus associés permettent la rupture de l'endosome et la libération de l'ADN avant la lyse lysosomiale, augmentant ainsi l'efficacité de transduction de ces vecteurs (Veelken *et al.* 1994).

Les modifications apportées à ces vecteurs sont d'un grand intérêt car elles permettront à terme d'obtenir de véritables virus artificiels défectifs porteurs de plusieurs molécules d'ADN et capables de cibler les cellules malignes.

III . 5 . 2 . Les Polyéthylènimines.

Des travaux menés sur le transfert de gènes par des vecteurs non viraux et notamment par les polymères cationiques ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui aboutissent à la libération de l'ADN par ces complexes. Ces études ont par ailleurs mis en évidence le relation entre le pouvoir tampon des vecteurs et l'efficacité de transfection.

En effet l'excès de charges cationiques à pH physiologique puis à pH acide permet de lutter contre les enzymes lysosomiales et permet l'entrée d'H₂O ce qui aboutit à la rupture de l'endosome et à la libération de l'ADN.

Ces molécules possèdent un taux de protonation très élevé puisqu'un chaînon du polymère sur trois est un atome d'azote. Ces protons confèrent au polymère la propriété de condenser l'ADN, de se fixer à la membrane plasmique, de retarder l'action des enzymes lysosomiales et rompre l'endosome.

Les polyéthylènimine (PEI) des polymères possédant cette qualité ont été testés sur différentes lignées dont la lignée K562, les résultats ont démontré leur efficacité par rapport à d'autres vecteurs (Boussif *et al.* 1995). Ce polymère est en cours d'évaluation et fait l'objet de travaux en vue de son utilisation comme vecteur de transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques.

III . 5 . 3 . L'Electroporation.

Développée depuis 1984 par Leder et coll (Potter *et al.* 1984) cette technique est couramment utilisée pour la transfection des cellules eucaryotes et pour la transformation bactérienne. Cette méthode est basée sur l'ouverture de pores dans la membrane cellulaire sous l'action d'une brève décharge électrique permettant ainsi la pénétration dans la cellule de macromolécules comme l'ADN plasmidique. Ses principaux avantages sont sa rapidité de mise en œuvre et sa sécurité d'emploi. Cependant, son utilisation en thérapie génique a été rarement envisagée.

Certaines applications ayant pour but l'étude de la régulation génique dans les cellules hématopoïétiques ont montré son efficacité dans des lignées difficilement transfectables comme la lignée HL60 (Pahl *et al.* 1991). L'électroporation de la lignée leucémique myéloïde U937 aboutit à des taux de transduction très élevés, cependant l'expression du transgène est très courte et disparaît complètement au bout de 48h, le promoteur RSV utilisé pourrait cependant être responsable de cette courte expression.

Des travaux visant à étudier les modalités de transfert de gène *ex-vivo* dans les cellules leucémiques ont testé cette méthode sur plusieurs lignées de lymphomes et de leucémies myéloïdes , cependant les taux de transfert demeurent relativement faibles et ne dépassent pas 16%, l'expression du transgène est par ailleurs très basse puisqu'elle n'a pu être détectée que par PCR (Toneguzzo *et al.* 1986; Keating and Toneguzzo 1990). Une étude plus approfondie de cette technique menée sur la lignée K562 à permis d'optimiser les conditions d'électroporation et de montrer que la synchronisation des cellules en phase S permettait d'augmenter de façon significative le taux de transfert. Les taux de transduction obtenus dans cette étude ne dépassent pas 12%, cependant ils sont nettement supérieurs à ceux obtenus sans synchronisation et le vecteur utilisé n'a pas été conçu pour la thérapie génique. Ces résultats montrent l'intérêt de cette technique comme outil de thérapie génique et de l'optimisation des conditions de culture des cellules leucémiques afin d'optimiser le transfert (Takahashi *et al.* 1991).

RESULTATS

I. MISE AU POINT DE LA CULTURE PRIMAIRE DES CELLULES DE LAM.

Nous avons utilisé un milieu de culture complété en facteurs de croissance (IL3, SCF, GM-CSF) pour la culture des cellules souches hématopoïétiques. Ces facteurs de croissance ayant un rôle important dans l'hématopoïèse (Wu *et al.* 1994; Piacibello *et al.* 1995) et le développement des cellules myéloïdes nous avons évalué leurs effets sur la culture primaire des cellules de LAM. Les trois facteurs de croissance ont été testés seuls et en association. La prolifération cellulaire a été étudiée sur les cellules CD33⁺,CD19⁻,CD3⁻ issues de quatre patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique par comptage et par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan. Le milieu de culture utilisé est le milieu Iscove de Gibco-BRL (USA) préconisé pour la culture des cellules souches hématopoïétiques.

Les résultats obtenus à partir des échantillons de quatre patients représentés sur la figure-1 montrent une augmentation de la prolifération cellulaire dans tous les cas considérés à partir du troisième jour de culture, suivie d'une baisse à partir du septième jour. Nous observons cependant une augmentation plus importante du nombre de cellules avec les association composées de SCF+IL3 et de GM-CSF+IL3+SCF qui induisent une augmentation moyenne de la population de 200 et de 300% respectivement.

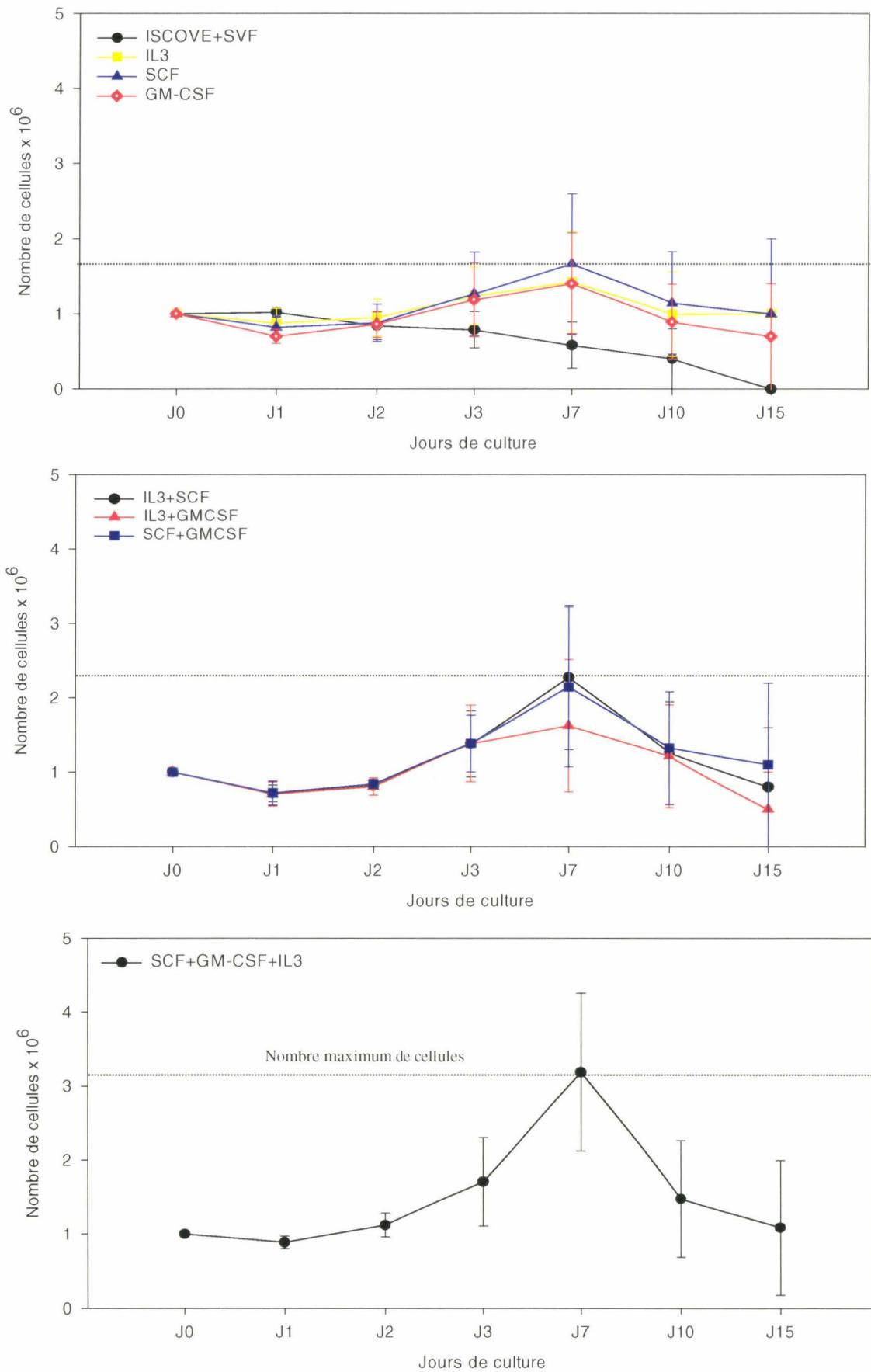


Figure 1 : Effets des facteurs de croissance sur la prolifération des blastes de LAM en culture primaire. Moyenne des échantillons de quatre patients.

II . ETUDE DES MODALITES DE TRANSFERT DE GENES PAR DES VECTEURS NON-VIRAUX.

Nous avons évalué l'efficacité de deux techniques de transfert non-viral dans le cadre de notre étude sur le transfert de gènes dans les hémopathies malignes.

II . 1 . Transfert de gènes par vecteur chimique.

Nous avons comparé l'efficacité de transfection de deux vecteurs chimiques, un liposome cationique, la lipofectamine et deux polyéthylémines de 22 et de 800kD. Ces substances ont été testées sur les lignées cellulaires K562, Hela et SKOV3 à l'aide du vecteur pcDNA3-LacZ. Les lignées adhérentes SKOV3 et Hela servent de témoin positif, ces cellules étant connues pour leur facilité de transfection, la lignée érythroïde K562 est un témoin de transfection des cellules leucémiques. Les résultats obtenus 48h après la transfection par coloration X-Gal sont représentés sur la figure 2.

Figure 2 : Transfection par vecteur chimique

	PEI	Lipofectamine
K562	10µl/2µg	6µl/1µg
Hela	5µl/1µg	12,5µl/2µg
SKOV3	5µl/1µg	12,5µl/2µg

Rapports optimums de transfection : µl de produit/µg d'ADN

	PEI 800kD	PEI 22kD	Lipofectamine
SKOV3	0%*	15	30
K562	0%*	10	37
Hela	ND	80	40

Taux de cellules transfectées en %. * :cellules mortes. ND :non déterminé

Les résultats obtenus montrent un avantage en faveur de la lipofectamine par rapport aux PEI de 22kD et surtout à celui de 800 kD qui s'est avéré très toxique, la majorité des cellules ne survivant pas au-delà de 48h.

II . 2 . Etude des modalités de transfert de gènes dans les cellules de LAM par électroporation.

Nous avons étudié l'efficacité de cette méthode sur des cellules de leucémies aiguës myéloblastiques en culture primaire à l'aide du plasmide pcDNA3 porteur du gène codant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) (Prendergast and Mann 1978). La protéine GFP est issue de la méduse *Aequoria victoria* et possède la propriété d'être naturellement fluorescente dans le vert après excitation à 488nm ce qui permet sa détection par microscopie à fluorescence et cytométrie en flux . Nos premiers travaux ont porté sur le transfert du plasmide pcDNA3-huGFP qui porte le gène de la protéine huGFP (S65T-GFP) (Ropp *et al.* 1995). La huGFP est une GFP dont une Ser en position 65 a été remplacée par une Thr . Cette modification a pour effet d'accroître d'un facteur 2 sa fluorescence lorsqu'elle est excitée. Les résultats obtenus sur la lignée Hela n'ont pas été satisfaisants, la fluorescence étant difficilement détectable en microscopie à fluorescence et en cytométrie en flux, d'autre part cette protéine s'est avérée très toxique puisque la totalité des cellules sont mortes 48h après électroporation.

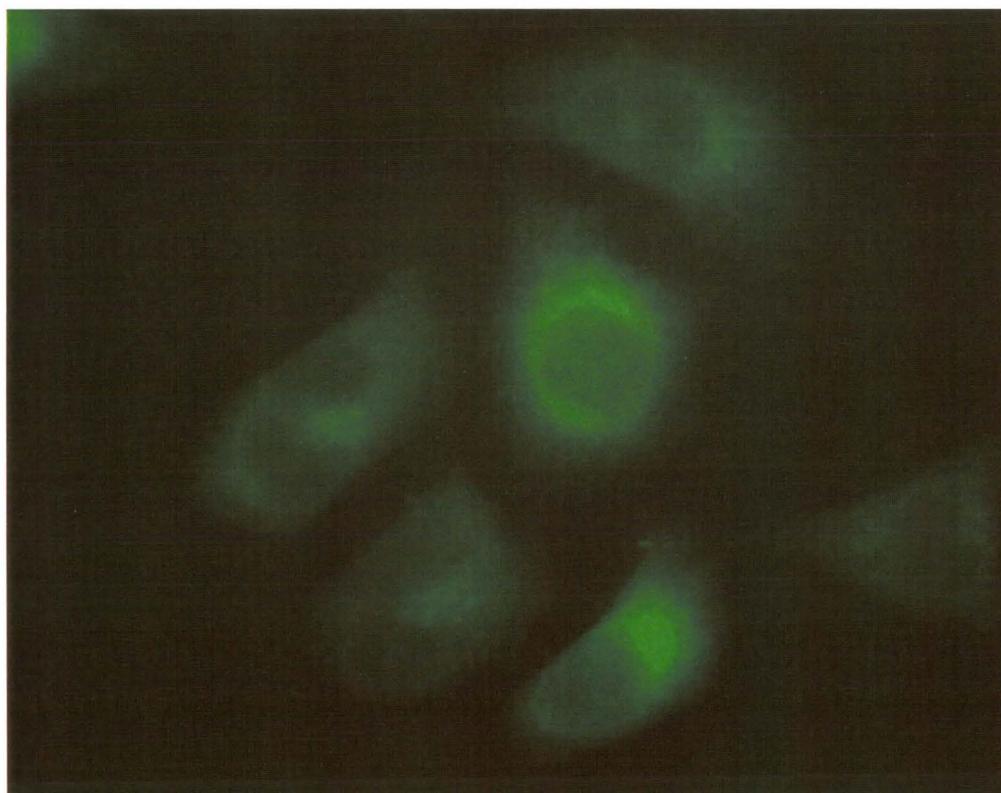
Certains auteurs rapportant des résultats similaires (Hanazono *et al.* 1997) nous avons construit un nouveau vecteur (pcDNA3-EGFP1) porteur d'une nouvelle protéine GFP, l'EGFP pour *Enhanced Green Fluorescent Protein* qui est basée sur la huGFP mais porte une nouvelle mutation, le remplacement d'une Phe par une Leu en position 64. Dans ces conditions sa fluorescence est accrue par un facteur 30 et sa toxicité est réduite (Zhang *et al.* 1996; Alexander *et al.* 1997; Ramiro *et al.* 1998). Les résultats après électroporation ont été analysés par cytométrie en flux et microscopie à fluorescence.

II . 2 . 1 . Test fonctionnel du vecteur pcDNA3-EGFP

Afin de vérifier si le plasmide porteur de l'EGFP était fonctionnel et non toxique, nous avons électroporé des cellules Hela avec cette nouvelle construction. Les résultats obtenus ont été observés en microscopie à fluorescence 24h après transfert. La mortalité a été évaluée par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan. Les résultats obtenus en microscopie à fluorescence sont représentés sur le cliché 1.

Contrairement à la construction portant la huGFP nous n'avons pas constaté de mort cellulaire accrue par rapport aux cellules témoins transfectées avec le vecteur vide, dans les deux cas la mortalité est proche de 50%. D'autre part la fluorescence s'est avérée facilement détectable en microscopie, le taux de cellules fluorescentes étant de 70%.

Ces résultats nous ont permis de poursuivre nos travaux en utilisant ce vecteur sur les cellules leucémiques.



Cliché-1 : Transfection par électroporation de cellules Hela avec le plasmide pcDNA3-EGFP. Acquisition par microscope à fluorescence Leitz et système Visys. Grossissement X 100.

II . 2 . 2 . Optimisation des conditions d'électroporation dans la lignée K562.

Afin d'optimiser les conditions de transfert de gène dans les cellules issues de leucémies aiguës myéloblastiques en culture primaire nous avons électroporé la lignée érythroïde K562 en faisant varier deux paramètres : la différence de potentiel de 190 à 250 Volts (V) et la capacitance de 1050 ou 1500 microFarads (μF). Pour chaque électroporation les facteurs déterminants sont le taux de transfection (% de cellules transfectées), le taux de mortalité et l'intensité de la fluorescence qui reflète le taux d'expression (moyenne de fluorescence). L'analyse a été effectuée par cytométrie 24h après transfert. Les résultats sont représentés sur la figure 3.

L'observation de ces résultats nous permet de constater que les taux de transfection et l'intensité de la fluorescence augmentent à partir de 220V à 1050 et 1500 μF . Les valeurs maximums sont obtenues à 240V et 250V respectivement pour les capacitances de 1050 et 1500 μF . Nous observons un net avantage à 250V et 1500 μF , l'intensité de fluorescence et le taux de transfection étant deux fois plus élevés qu'à 240 V et 1050 μF . Cependant la mortalité à 250V/1500 μF est importante (80%) et ne permet pas d'envisager de telles conditions d'électroporation pour les cellules en culture primaire, plus fragiles que les lignées. Par contre l'électroporation à 240V et 1500 μF permet une survie de 40% des cellules. De plus l'intensité de fluorescence est deux fois plus élevée que la fluorescence de base et le taux de transfection à 24h est proche de 20%.

Ces résultats ont été confirmés par les observations effectuées en microscopie à fluorescence représentés sur le cliché 2. Le taux de mortalité élevé à 250V/1500 μF n'a pas permis de les photographier.

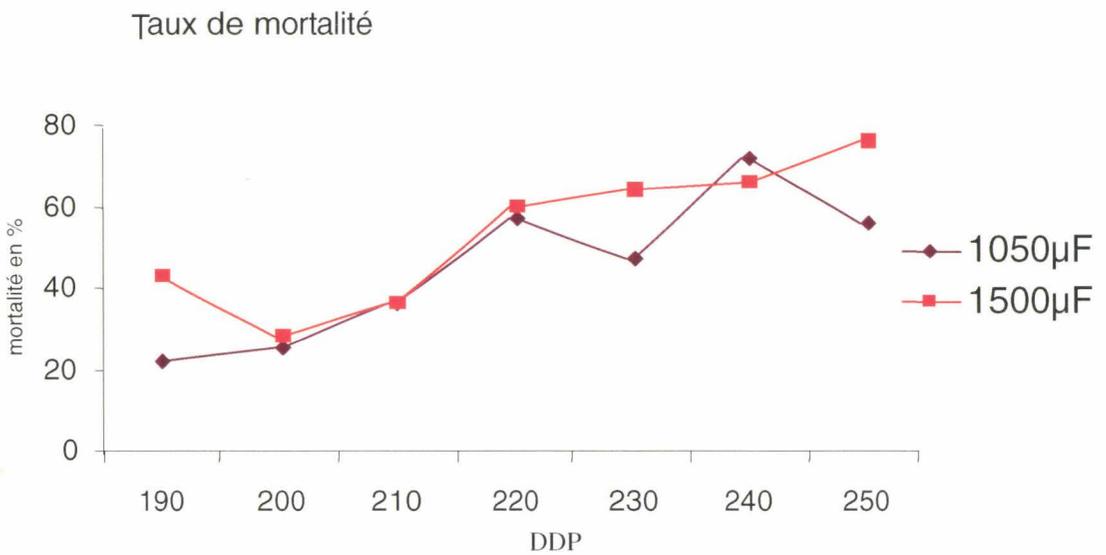
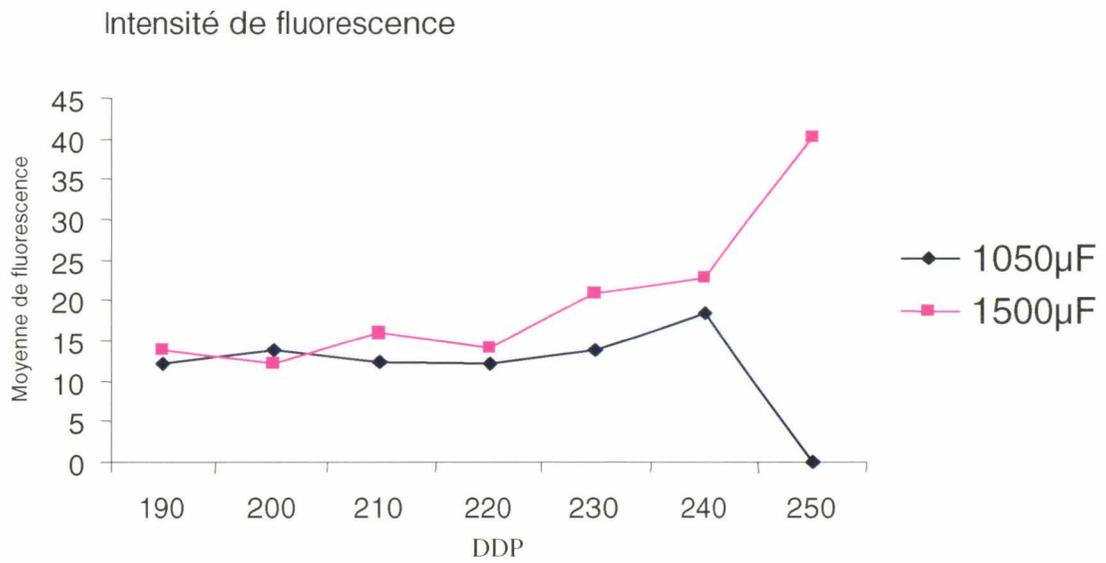
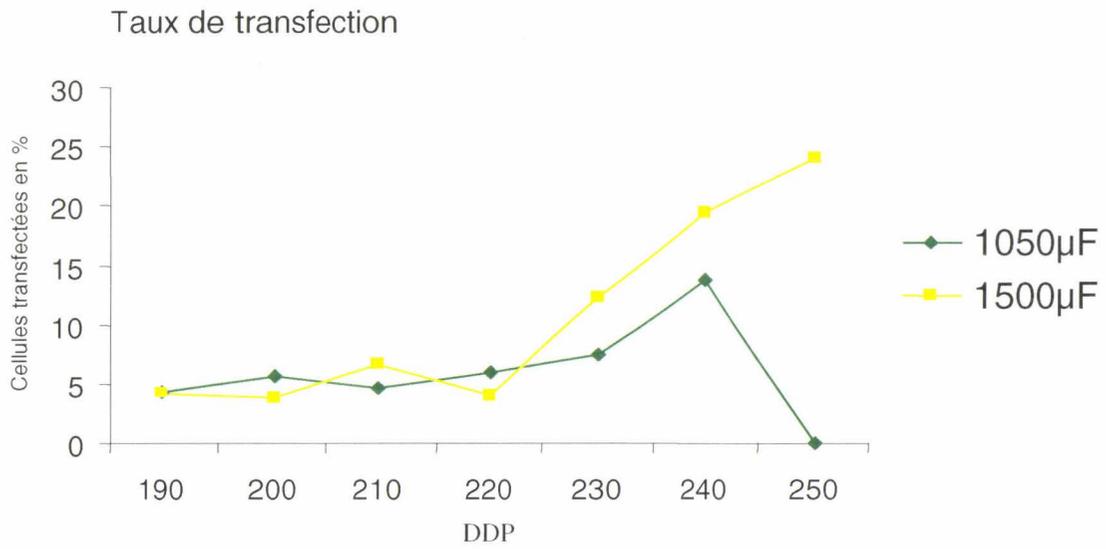
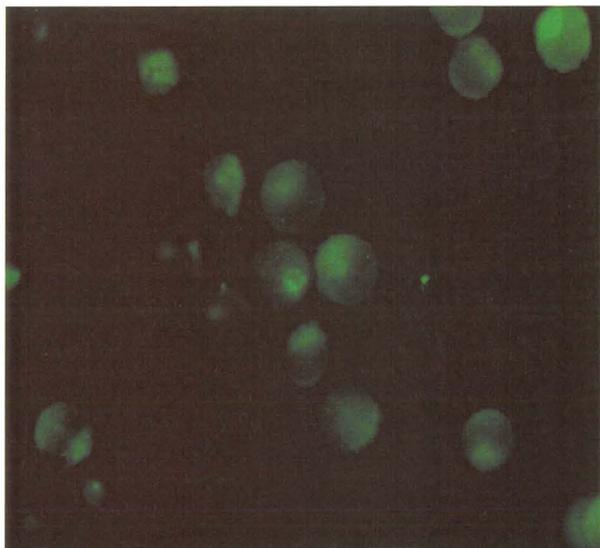
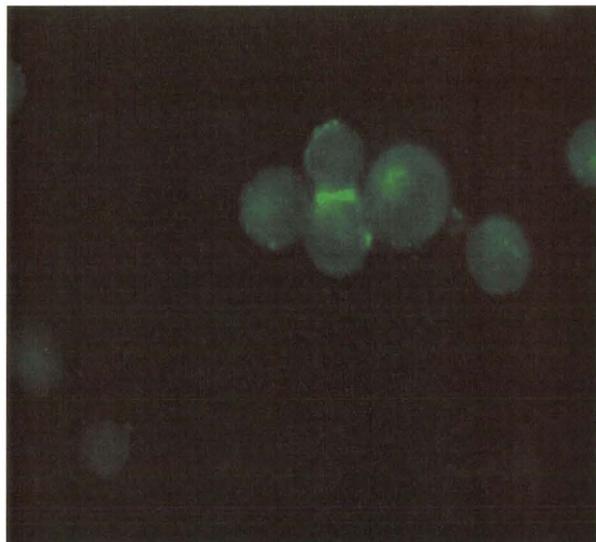


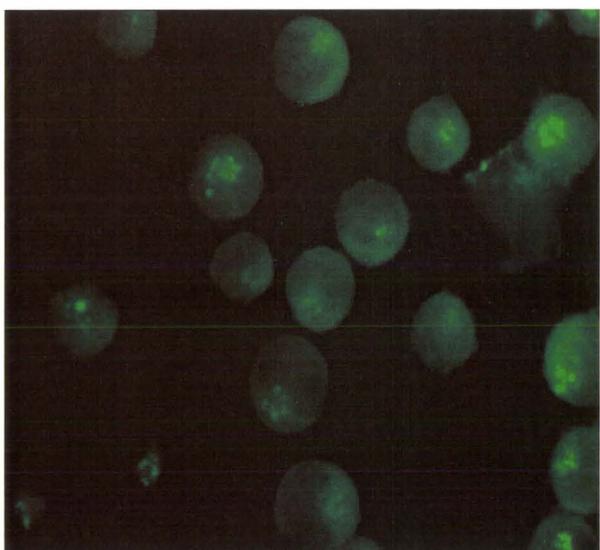
Figure 3 : Optimisation des conditions d'électroporation.
DDP=Différence de potentiel.



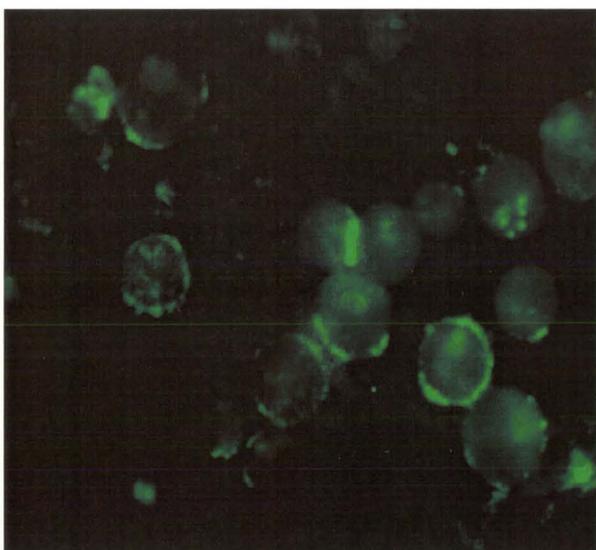
Témoin



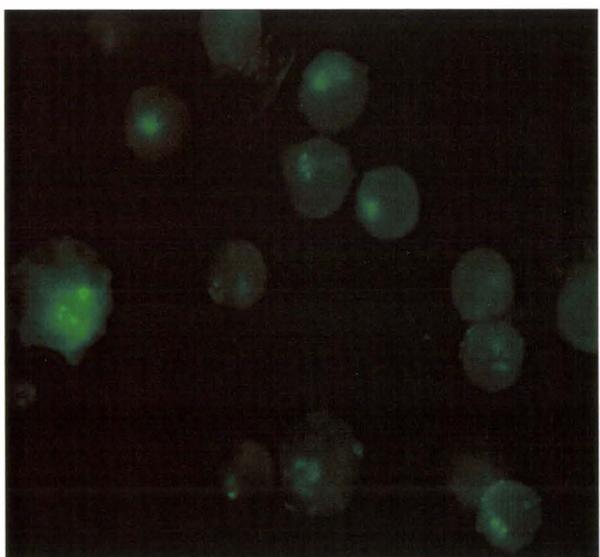
200 v



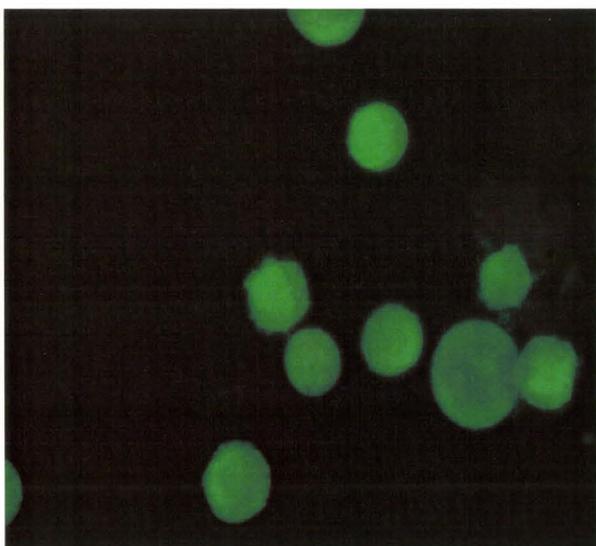
210 v



220 v



230 v



240 v

Cliché 2 : Gamme d'électroporation du pCDNA3-EGFP1 dans les cellules K562 à 1500 μ F. Grossissement X100. 5 millions de cellules ont été électroporées avec 10 μ g de plasmide pCDNA3-EGFP.

II . 2 . 3 . Electroporation des lignées leucémiques K562 et HL60.

Les cellules ont été électroporées dans les conditions optimisées précédemment puis analysées à 48h, 72h et 5 jours après transfection en cytométrie en flux. Les résultats sont représentés sur la figure-4.

A partir de 72h, nous observons une expression stable du transgène jusqu'au cinquième jour avec des taux de transfection moyens de 58% pour la lignée K562 et de 45% pour la lignée HL60. Les résultats obtenus sur la lignée K562 se rapprochent de ceux obtenus par transfert rétroviral et par des adénovirus classiques, ceux obtenus sur la lignée HL60 montrent un taux élevé de transfert pour une lignée difficilement transfectable. Suite à ces résultats, nous avons expérimenté cette technique sur de cellules leucémiques en culture primaire issues de leucémies aiguës myéloblastiques.

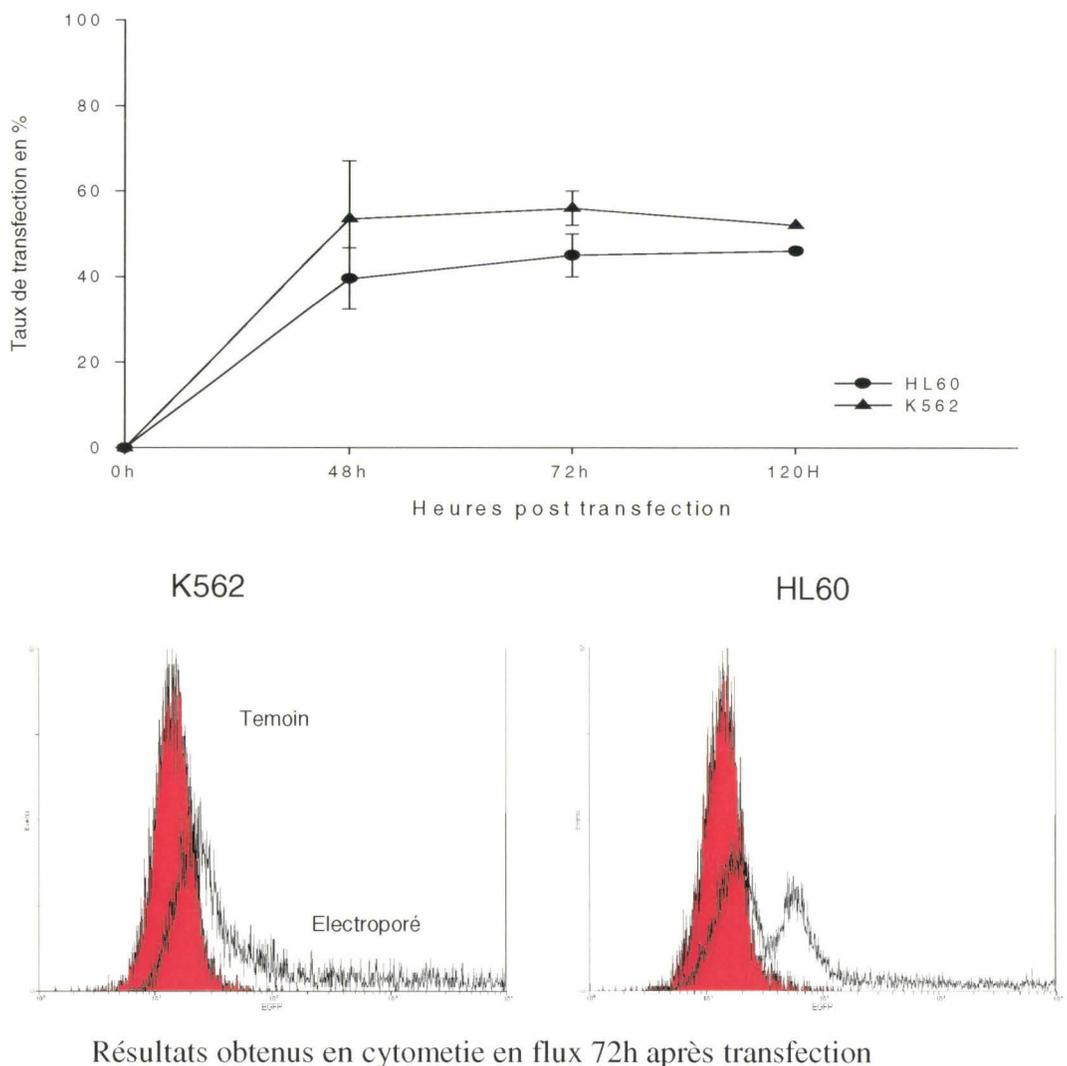


Figure 4 : Electroporation de lignées K562 et HL60

II . 2 . 4 . Transfert de gène par électroporation dans les cellules de LAM en culture primaire.

Nous avons électroporé les cellules de 18 patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique dans les conditions optimisées sur la lignée K562 avec le plasmide pcDNA3-EGFP. L'analyse a été faite sur les cellules $CD33^+$, $CD3^-$, $CD19^-$ sélectionnées par cytométrie en flux et immunodépletion (DYNAL). Les résultats optimums ont été obtenus entre 72h et 120h et sont représentés sur la figure 5. Deux exemples d'acquisition par cytométrie en flux sont également représentés sur la figure 5bis.

Sur un total de 18 échantillons de patients nous observons un taux de transfection moyen de 48% et une médiane de 43% avec des valeurs comprises entre 7 et 95 %. Seuls trois échantillons présentent un taux de transfection inférieur ou égal à 20%. Sur un total de 18 échantillons 15 ont une expression supérieure à 30% et 8 supérieure à 50%.

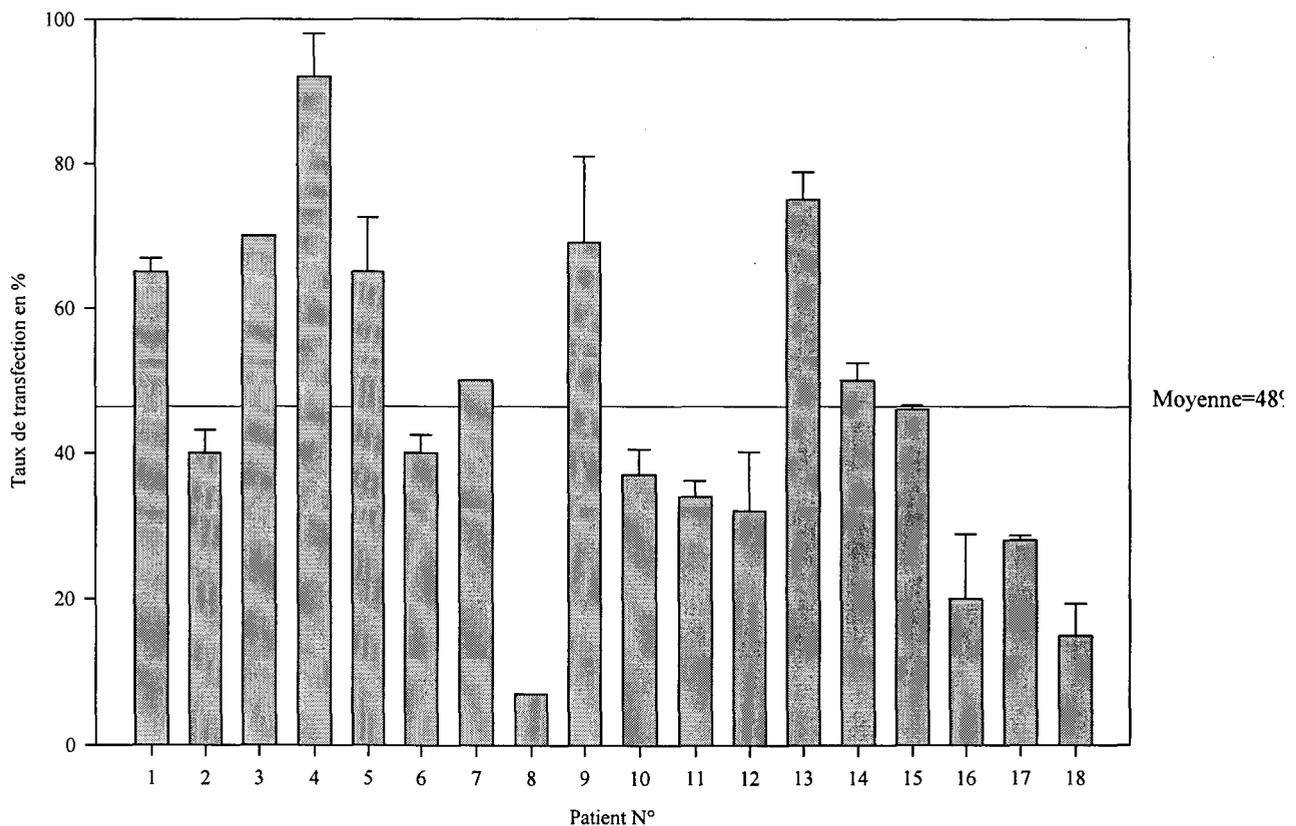
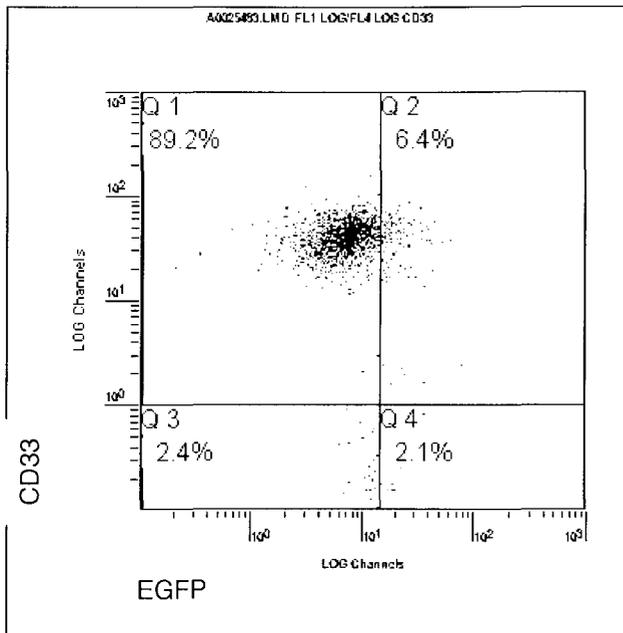
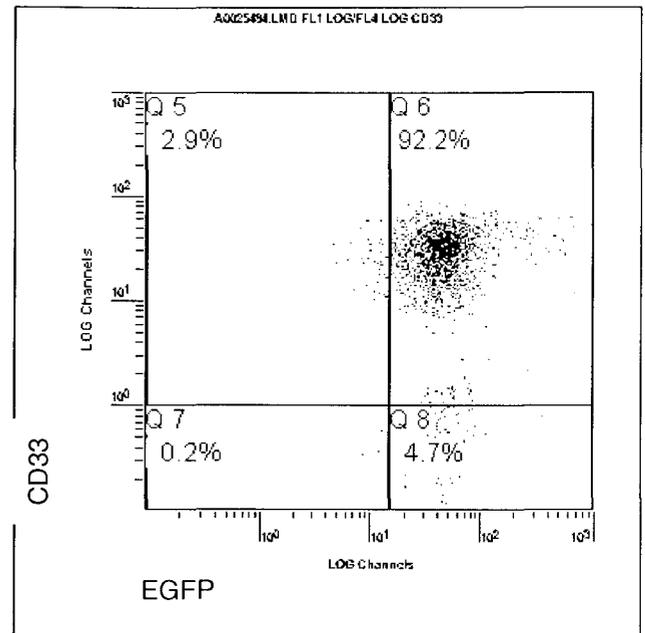


Figure 5 : Electroporation de blastes de LAM en culture primaire.

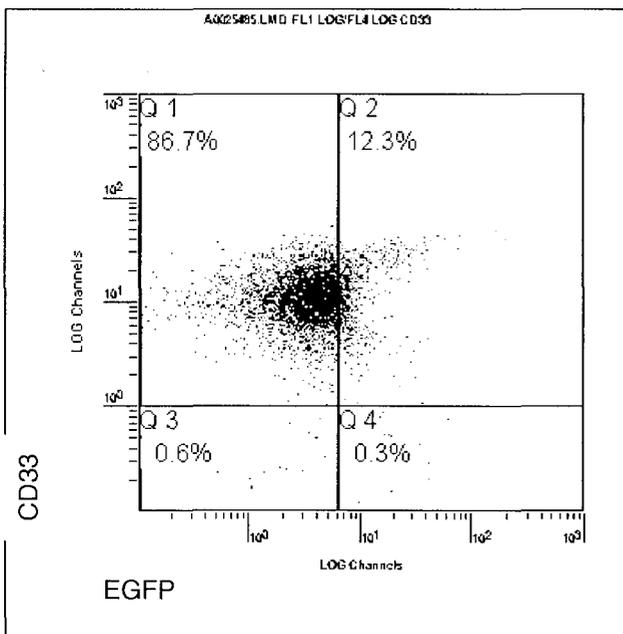


Témoïn

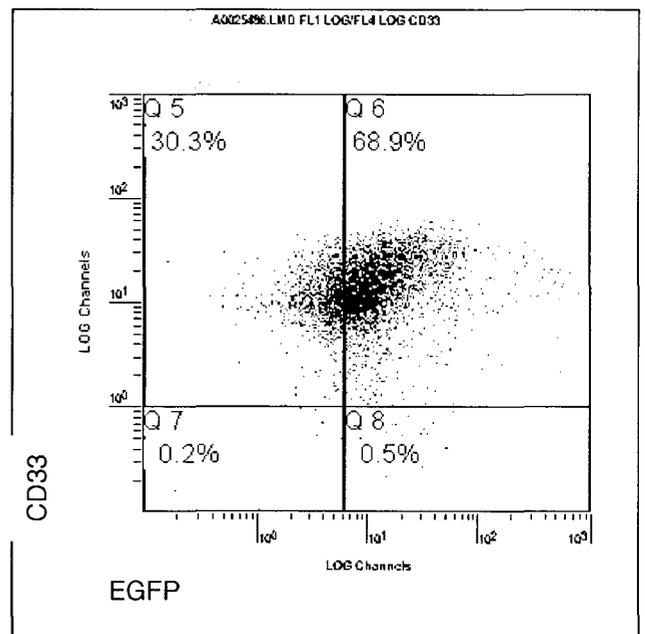


Electroporé

Patient n°4



Témoïn



Electroporé

Patient n°5

Figure 5 bis : Cellules de LAM (CD33⁺) électroporées par le pcDNA3-EGFP.

II . 2 . 5 . Survie et expression à long terme des blastes électroporés

La survie des cellules après électroporation a été évaluée par comptage et exclusion des cellules mortes par coloration au Bleu Trypan. Les résultats sont représentés sur la figure 6.

Nous observons un taux de mortalité lié à l'électroporation de 50% à 24h avec un maximum de 70% à 72h.

Si nous comparons la survie des cellules électroporées avec le taux de transfection représentés sur la figure 6 nous observons que ces deux paramètres suivent la même évolution, en effet le taux de transfection entre le troisième et le quinzième jour augmente jusqu'à J7 puis décroît de la même façon que la survie des cellules. Ce même cas de figure est retrouvé avec les cellules non électroporées (figure 7) ce qui tend à montrer que l'expression du transgène est intimement liée à la survie des cellules. Cinq échantillons ont proliféré jusqu'au quinzième jour avec des taux respectifs de 15, 20, 40, 50 et 65 % de cellules exprimant l'EGFP, 70% des cellules ne survivant pas au delà du dixième jour après électroporation.

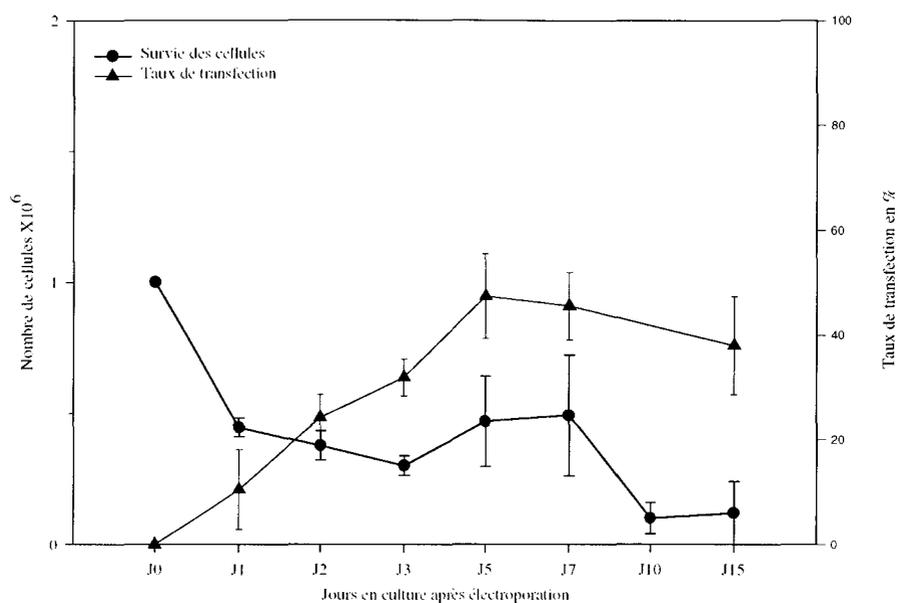


Figure 6 : Prolifération et expression des blastes électroporés

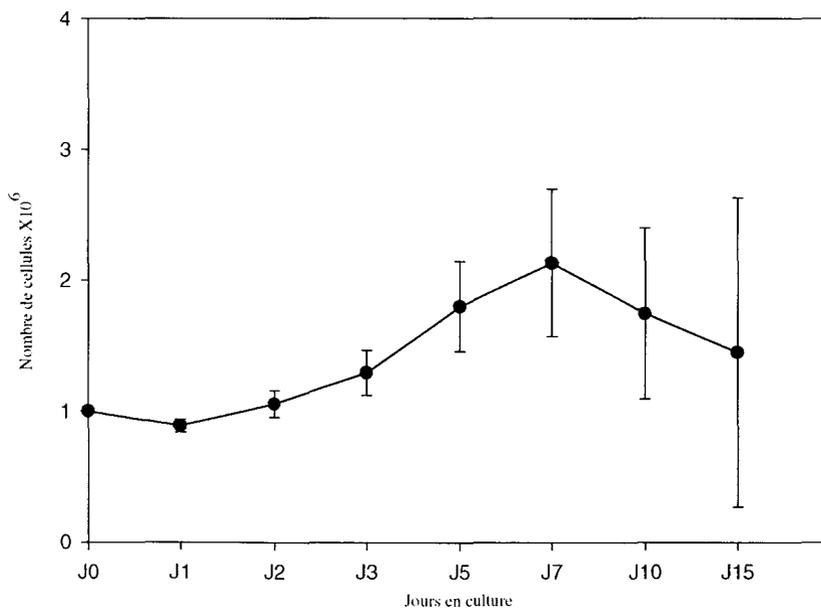


Figure 7 : Prolifération des cellules non électroporées

III . TRANSFERT DE GENE DANS LES CELLULES DE LEUCEMIES AIGUËS MYELOBLASTIQUES PAR UN ADENOVIRUS PORTEUR D'UNE FIBRE MODIFIEE.

Le transfert par des vecteurs d'origine virale est certainement la voie la plus explorée pour la thérapie génique des hémopathies malignes. Cependant peu de vecteurs s'avèrent efficaces sur les cellules leucémiques. Les vecteurs rétroviraux sont capables de transfecter beaucoup de cellules hématopoïétiques mais, pour s'intégrer, ce qui est une de leurs qualités essentielles, ils requièrent des cellules en division. L'utilisation de vecteurs adénoviraux est également très étudiée, mais leur efficacité est très réduite sur les cellules hématopoïétiques les récepteurs au virus et les molécules permettant son internalisation étant faiblement exprimées sur ces cellules. Nous avons expérimenté un vecteur adénoviral modifié qui permet de s'affranchir des mécanismes classiques de pénétration des adénovirus dans la cellule, le vecteur AdZ.F(pK7) construit par Tom Wickham de la société GenVec (Rockville, USA). La fibre modifiée de ce vecteur lui permet de se fixer sur les molécules de type Héparane-Sulfate présentes à la surface de la plupart des cellules et notamment des cellules hématopoïétiques. Ce vecteur est porteur du gène LacZ. Nous avons comparé ce vecteur à un vecteur adénoviral témoin non modifié AdZ.F porteur du même gène rapporteur.

Les taux de transfert ont été analysés par cytométrie en flux après révélation de l'activité β -galactosidase par le système CellProbe Gal.Galactosidase de Coulter (USA).

III . 1 . Transfection de lignées cellulaires.

Les lignées Hela, K562 et HL60 ont été transfectées par l'AdZ.F(pK7) et l'AdZ.F avec le même nombre de particules. Les résultats sont représentés sur la figure 8.

Pour les trois lignées nous observons des taux de transfection très élevés avec les deux vecteurs qui varient entre 90 et 100% avec l'AdZ.F(pK7) et 60 à 100% avec l'AdZ.F selon les lignées. Nous observons également que les cellules Hela sont transfectées avec la même efficacité par les deux vecteurs, cela s'explique par des résultats préalables qui indiquent l'importante présence de récepteurs à l'Adénovirus sur cette lignée (Bergelson *et al.* 1997). La lignée K562 est par contre plus permissive au vecteur modifié qu'au vecteur témoin avec une moyenne de fluorescence très élevée. Le calcul statistique (Test de Student, $p=0,01$) montre que cette différence est significative, par contre il n'existe aucune différence significative entre les deux vecteurs sur la lignée HL60 ($p=0,19$). Les résultats sont représentés sur la figure 9 et le cliché 3.

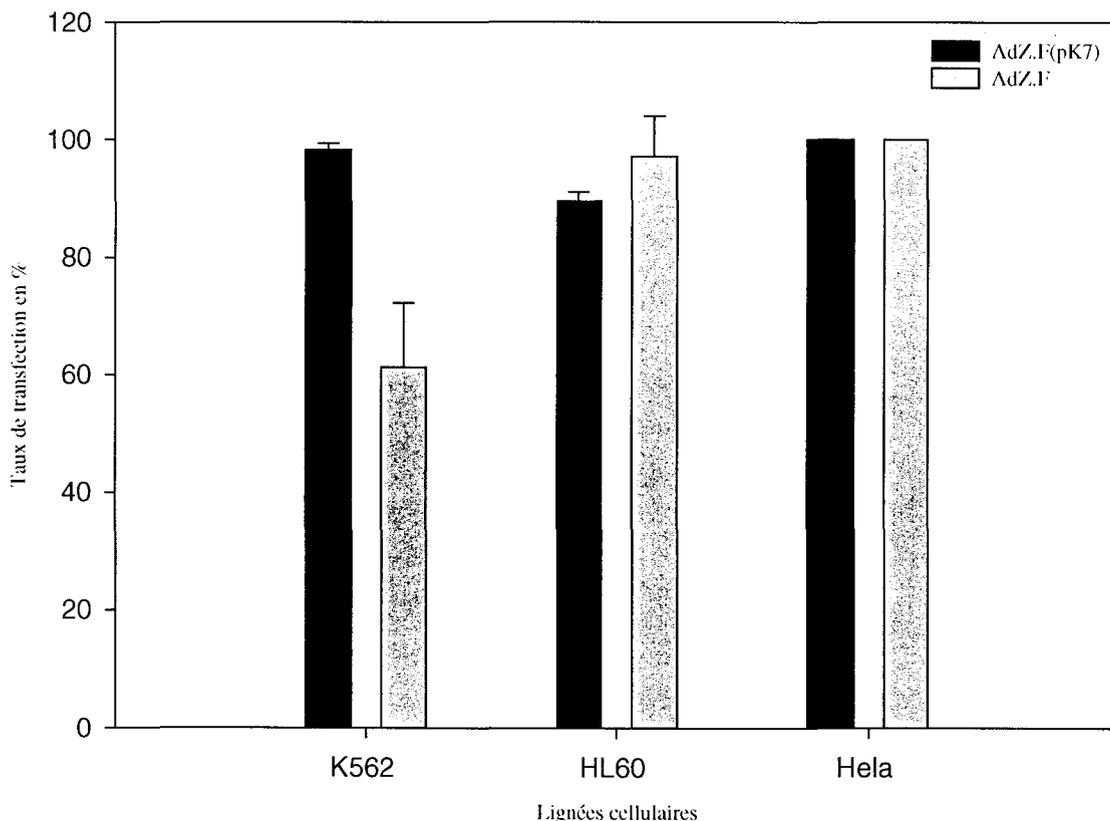
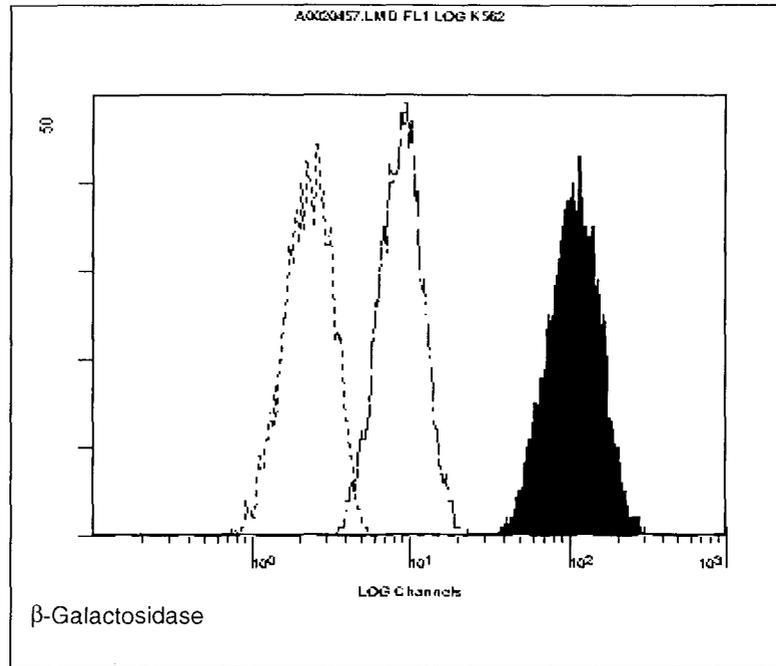


Figure 8 : Transfection de lignées cellulaires par le vecteur AdZ.F(pK7)

K562



..... Témoin
- - - - AdZ.F
■ AdZ.F(pK7)

HL60

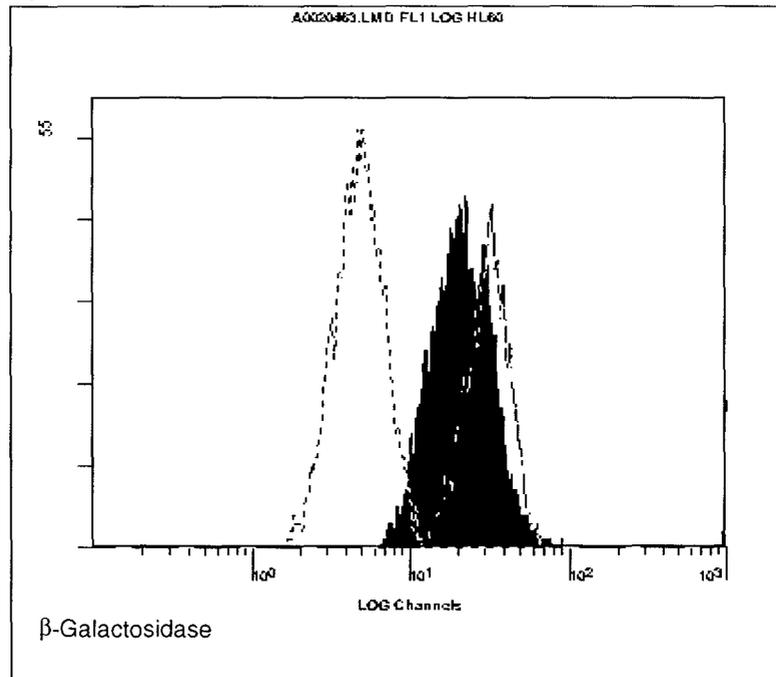
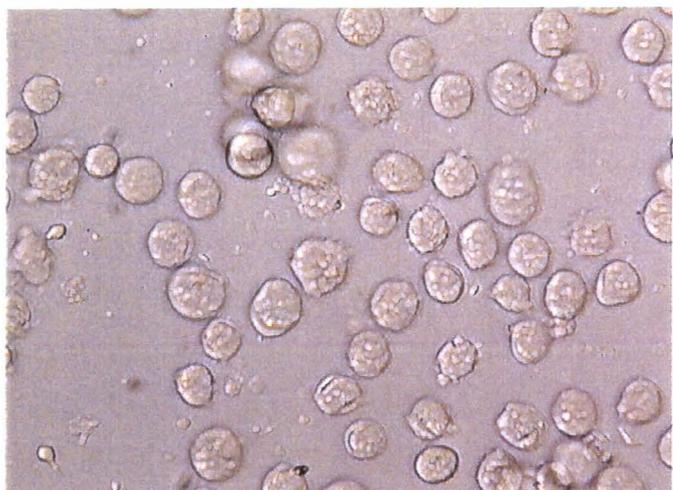
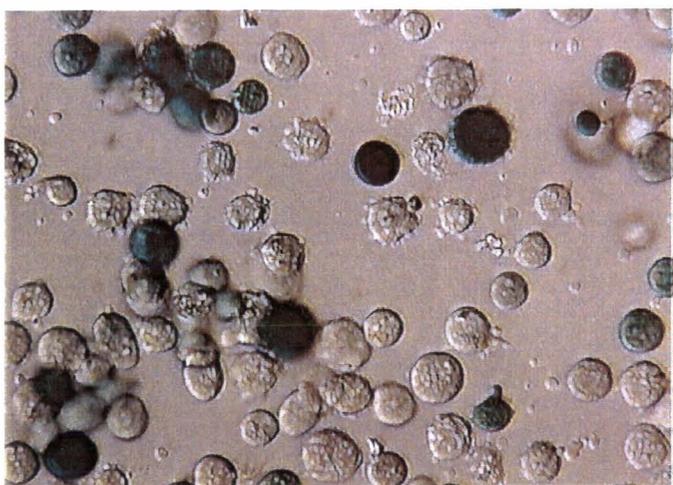


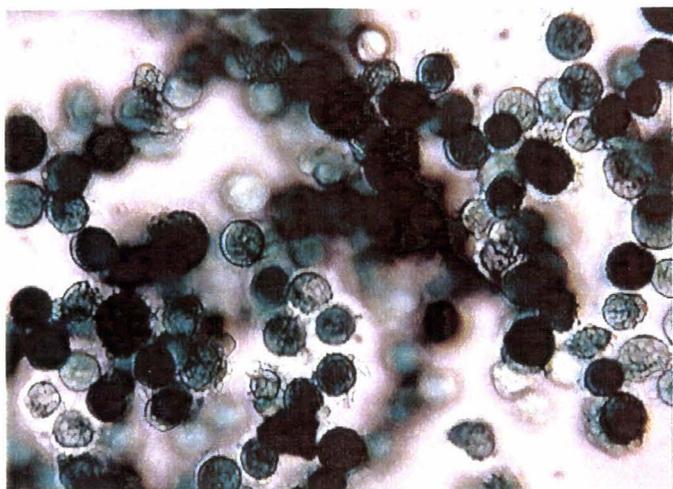
Figure 9 : Expression de l'activité β -galactosidase par les lignées transfectées mesurée en cytométrie en flux



Cellules K562 témoins



Cellules K562 transfectées
avec le vecteur AdZ.F



Cellules K562 transfectées
avec le vecteur AdZ.F(pK7)

Cliché 3: Transfection de la lignée K562 par les vecteurs adénoviraux AdZ.F et AdZ.F(pK7).
Mesure de l'activité β -galactosidase par coloration au X-Gal

III . 2 . Transfection de cellules de Leucémie Aiguë Myéloblastique en culture primaire.

Les résultats obtenus après transfection ont été analysés par cytométrie en flux sur la population CD33⁺, CD19⁻, CD3⁻.

III . 2 . 1 . Etablissement d'une gamme de transfection en nombre de particules physiques par cellule.

La gamme a été effectuée avec un nombre de particules virales équivalentes entre le vecteur AdZ.F et le vecteur AdZ.F(pK7). Les résultats ont été analysés 48h après transfection et sont représentés sur les Figures 10a et 10b.

Les taux de transfection sont supérieurs dans tous les cas avec l'AdZ.F(pK7) par rapport à l'AdZ.F qui ne dépasse pas les 15%. Avec le vecteur modifié à partir de 4200 particules (équivalentes à 50 pfu) 95% des cellules expriment le transgène, le maximum de 100% est obtenu pour 8400 particules (100 pfu). Au-delà, nous n'observons aucune variation du taux de transfert et de la moyenne de fluorescence (figure 10b). Si l'on compare les résultats en nombre de particules actives (multiplicité d'infection en pfu) la différence est encore plus marquée en faveur de l'AdZ.F(pK7), le nombre de pfu par cellule étant nettement inférieur à celui du virus témoin. L'équivalence entre le nombre de particules physiques et le nombre de particules actives (infectieuses) pour les deux vecteurs est représentée sur le tableau n° 4.

Suite aux résultats obtenus nous poursuivrons nos expériences en utilisant la dose optimale de 8400 particules/cellule équivalente à une MOI de 100 pfu/cellule.

Gamme en particules physiques	1600	4200	8400	16800
Gamme en pfu pour l'AdZ.F	75	150	300	600
Gamme en pfu pour l'AdZ.F(pK7)	20	50	100	200

Tableau n°4 : Equivalence entre le nombre de particules virales physiques et actives

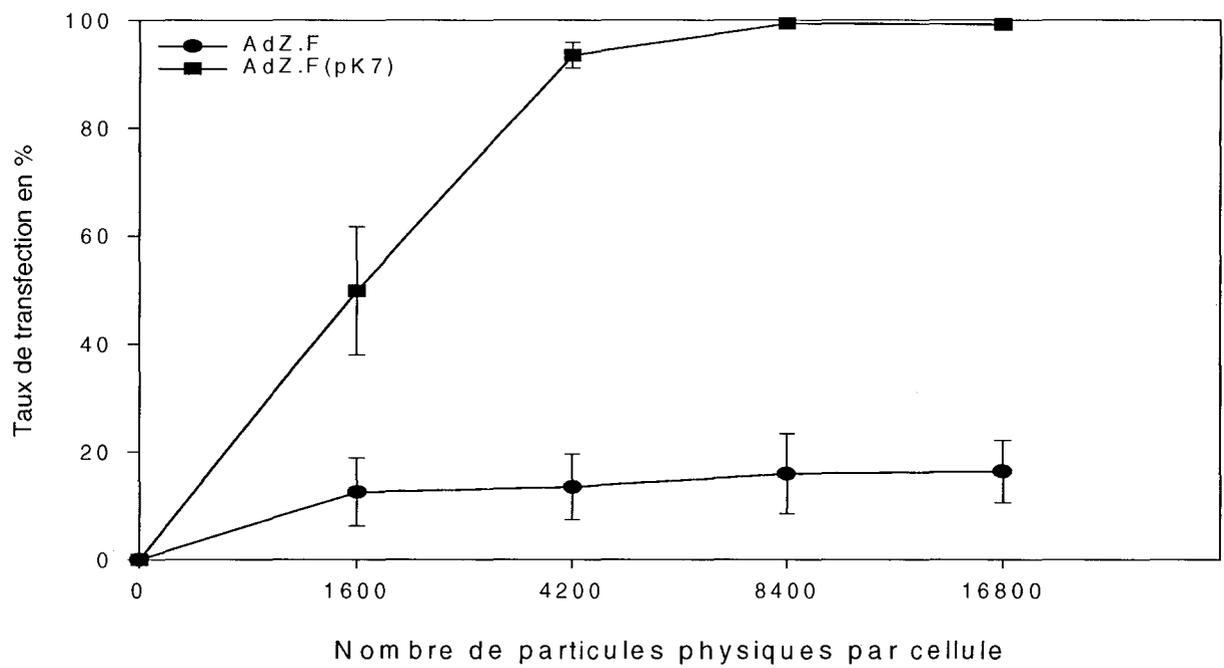


Figure 10a : Gamme de transfection des cellules de LAM en culture primaire.

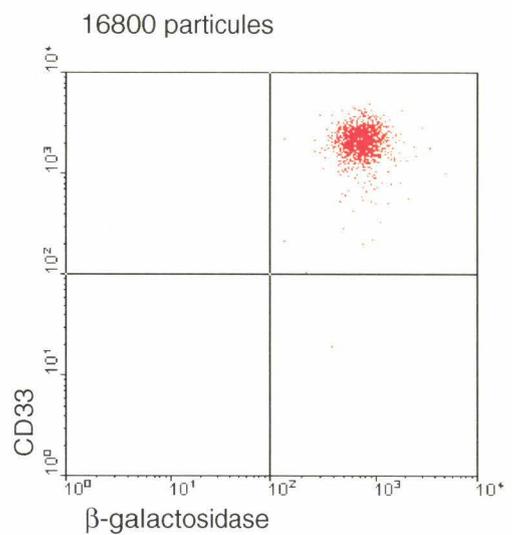
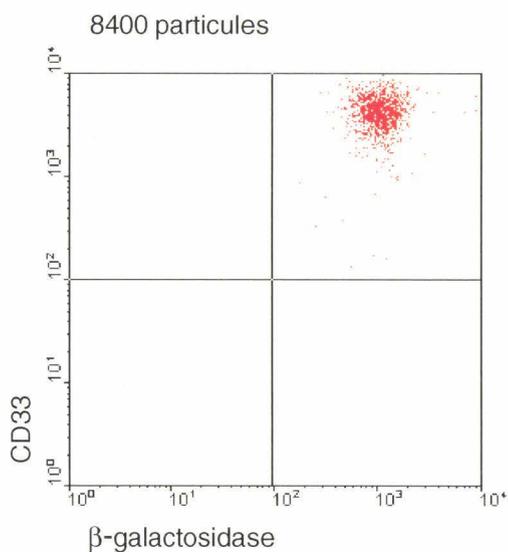
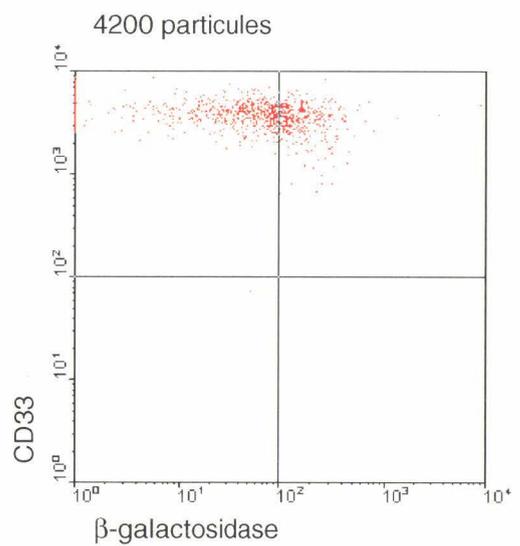
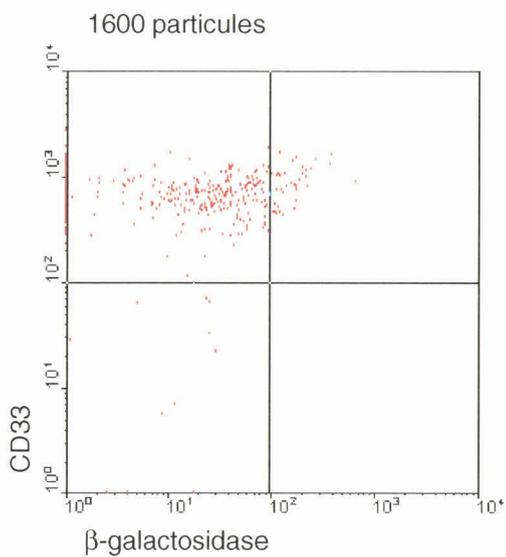
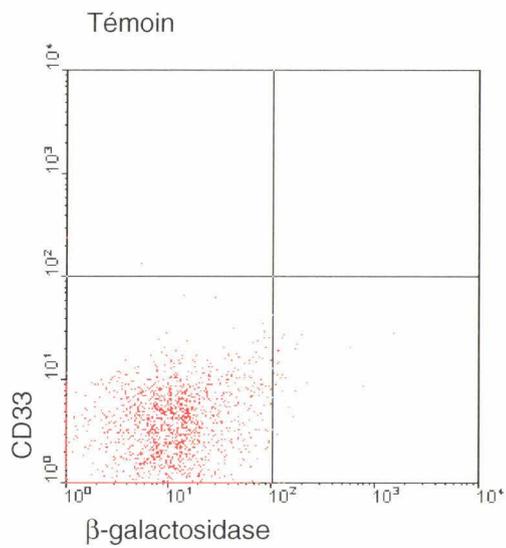


Figure 10b : Gamme de transfection des cellules de LAM par l'AdZ.F(pK7). Représentation bi-paramétrique des résultats obtenus par cytométrie en flux.

III . 2 . 2 . Transfection de 25 échantillons de patients atteints de LAM

Les résultats de l'analyse de l'activité β -galactosidase réalisée 72h après transfection sur 25 échantillons de LAM avec 8400 particules/cellule, représentés sur la figure 11 et le cliché 4 montrent une plus grande efficacité du vecteur adénoviral AdZ.F(pK7) par rapport à son homologue non modifié. En effet le taux de transfert moyen est de 94,5% avec des valeurs comprises entre 70 et 100% pour l'AdZ.F(pK7) alors qu'il n'est que de 10,26% pour l'AdZ.F avec des valeurs comprises entre 0 et 75%. Seuls 5 échantillons sur 25 pour l'AdZ.F(pK7) se situent entre 70 et 80%, les 20 autres patients se situent entre 90 et 100%. Pour l'AdZ.F seuls 3 échantillons présentent des taux de transfection compris entre 45 et 75%.

La cytotoxicité a été évaluée après transfert à moins de 5% pour chaque échantillon, de plus nous avons observé une prolifération cellulaire pour 15 échantillons, les 10 autres demeurant stables.

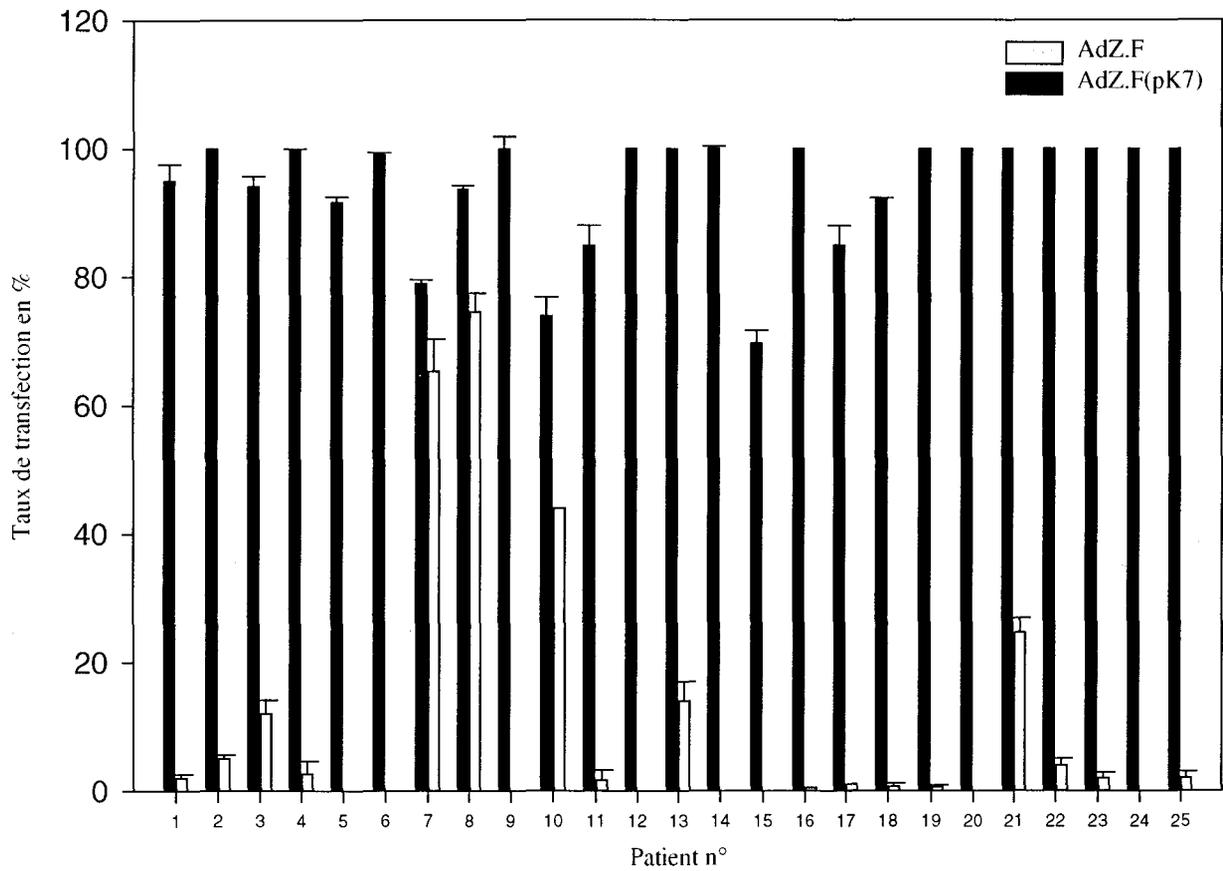
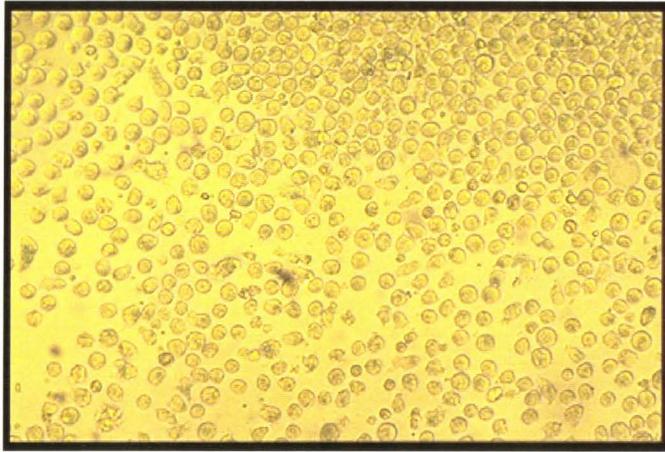
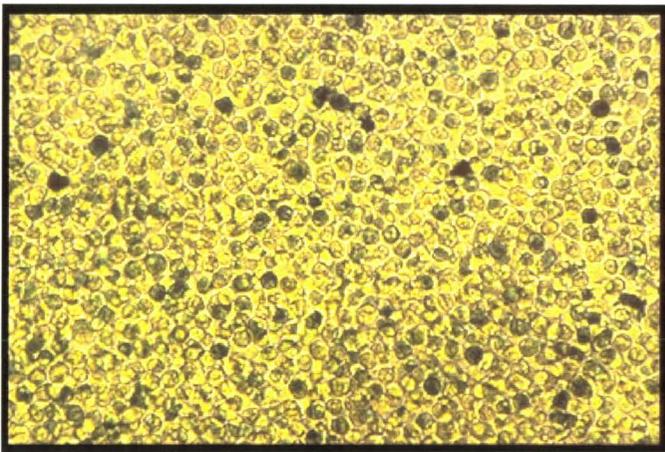


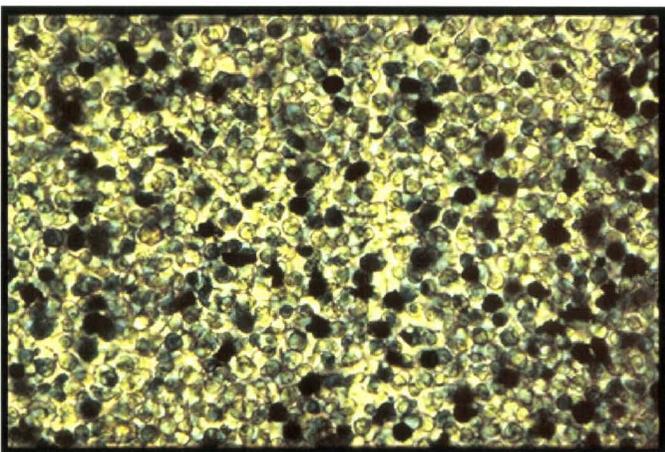
Figure 11 : Résultats de la transfection de 25 échantillons de LAM en culture primaire par les vecteurs AdZ.F et AdZ.F(pK7).



Témoin non transfecté



AdZ.F



AdZ.F(pK7)

Cliché 4 : Transfert de gène par un vecteur adénoviral modifié dans les cellules de LAM en culture primaire. Résultats obtenus par coloration au X-Gal sur le patient n° 2. Grossissement X 100.

III . 2 . 3 . Taux de transfection des échantillons de LAM en fonction du type FAB

Les résultats obtenus précédemment sur 25 échantillons ont été classés en fonction du type FAB des LAM et présentés sur la figure 12.

Nous observons très peu de différence entre les types FAB, mis à part pour les LAM de type M5 dont le taux de transfection moyen de 77,7 est inférieur à la moyenne générale de 94,5%. Cependant il n'existe pas de différence significative entre ces échantillons.

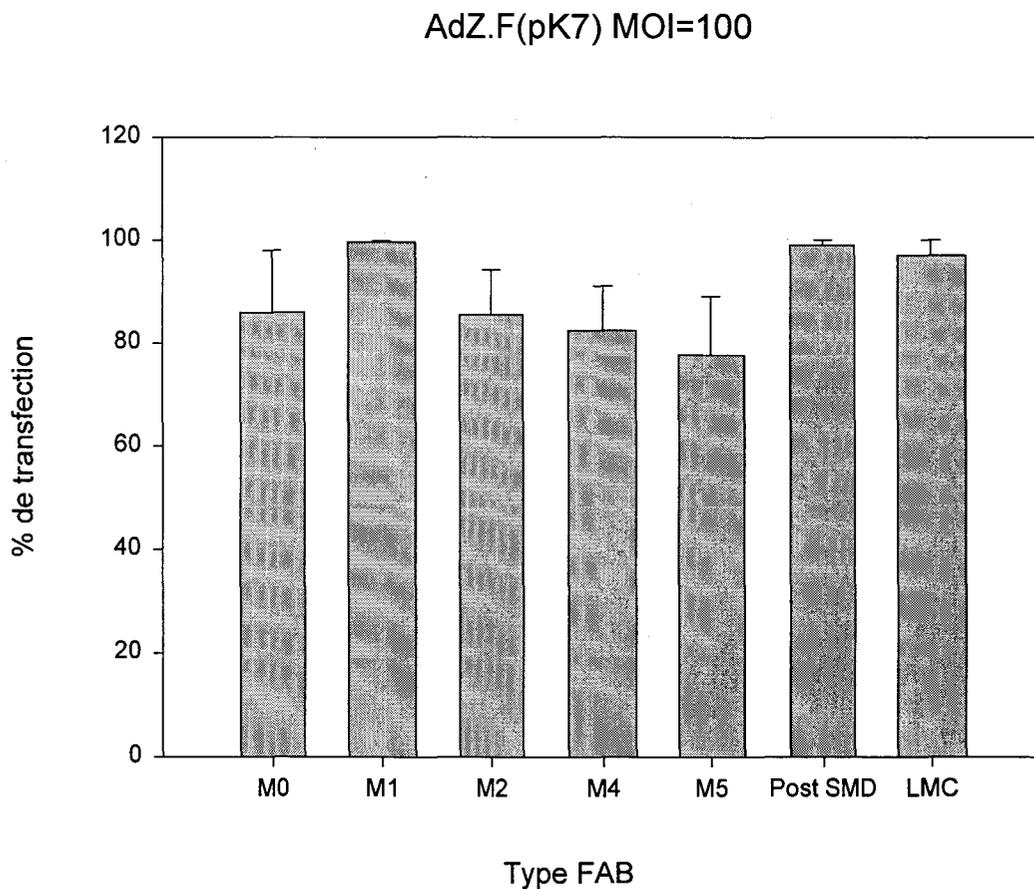


Figure 12 : Taux de transfection des échantillons de LAM en fonction du type FAB

III . 2 . 4 . Evaluation de l'expression à long terme des cellules transfectées par l'AdZ.F(pK7).

L'expression de la β -Galactosidase a été mesurée sur une période de 20 jours pour 10 échantillons. Les résultats sont représentés sur la Figure 13. Nous observons que l'expression est détectable 24h après transfert pour l'AdZ.F(pK7) et 48h pour le vecteur non modifié, cependant seules les cellules transfectées par l'AdZ.F(pK7) expriment encore à J15 à un taux de 90% contre 1 à 5% des cellules transfectées par l'AdZ.F. Au bout 20 jours l'expression moyenne est encore de 80% pour les cellules transfectées par le vecteur modifié, cependant cette baisse est accompagnée d'une chute de la viabilité cellulaire.

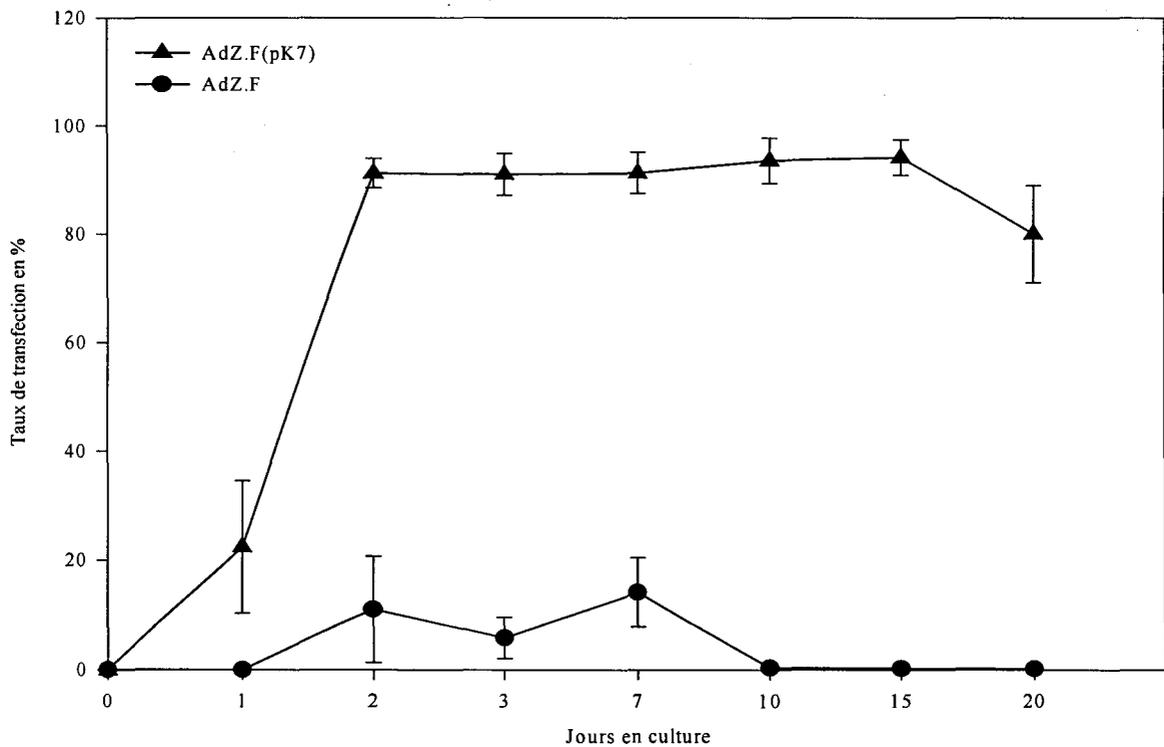


Figure 13 : moyenne d'expression de la β -galactosidase à long terme par les blastes de LAM transfectés. n=10

III . 2 . 5 . Effet des facteurs de croissance sur l'efficacité de transfert de l'AdZ.F(pK7).

Nous avons étudié l'effet de facteurs de croissance sur l'efficacité de transfert des vecteurs AdZ.F et AdZ.F(pK7).

Sur la figure 14a nous pouvons observer que les facteurs de croissance (SCF, IL3 et GM-CSF) semblent être requis pour un transfert efficace par les deux vecteurs.

En effet la transfection sur des cellules cultivées en absence de facteurs de croissance se solde par une très faible expression de β -Galactosidase qui est également accompagnée d'une décroissance rapide de la viabilité cellulaire, ce que nous observons sur la figure 14b.

III . 3 . Inhibition du transfert par l'AdZ.F(pK7).

Afin de vérifier si l'AdZ.F(pK7) pénétrait dans les cellules de LAM via les Héparanes-Sulfate, nous avons étudié l'effet de diverses substances pouvant inhiber l'interaction entre ces molécules et la fibre modifiée.

III . 3 . 1 . Inhibition compétitive par l'héparine

Les vecteurs AdZ.F(pK7) et AdZ.F ont été incubés avec de l'héparine avant la transfection de 10 échantillons de blastes de LAM et de la lignée HL60.

Les résultats représentés sur les figures 15a et 15b montrent une très forte inhibition du transfert de l'AdZ.F(pK7) dans les cellules de LAM. Cet effet n'est pas observé sur la lignée HL60 ni sur les cellules transfectées par l'AdZ.F.

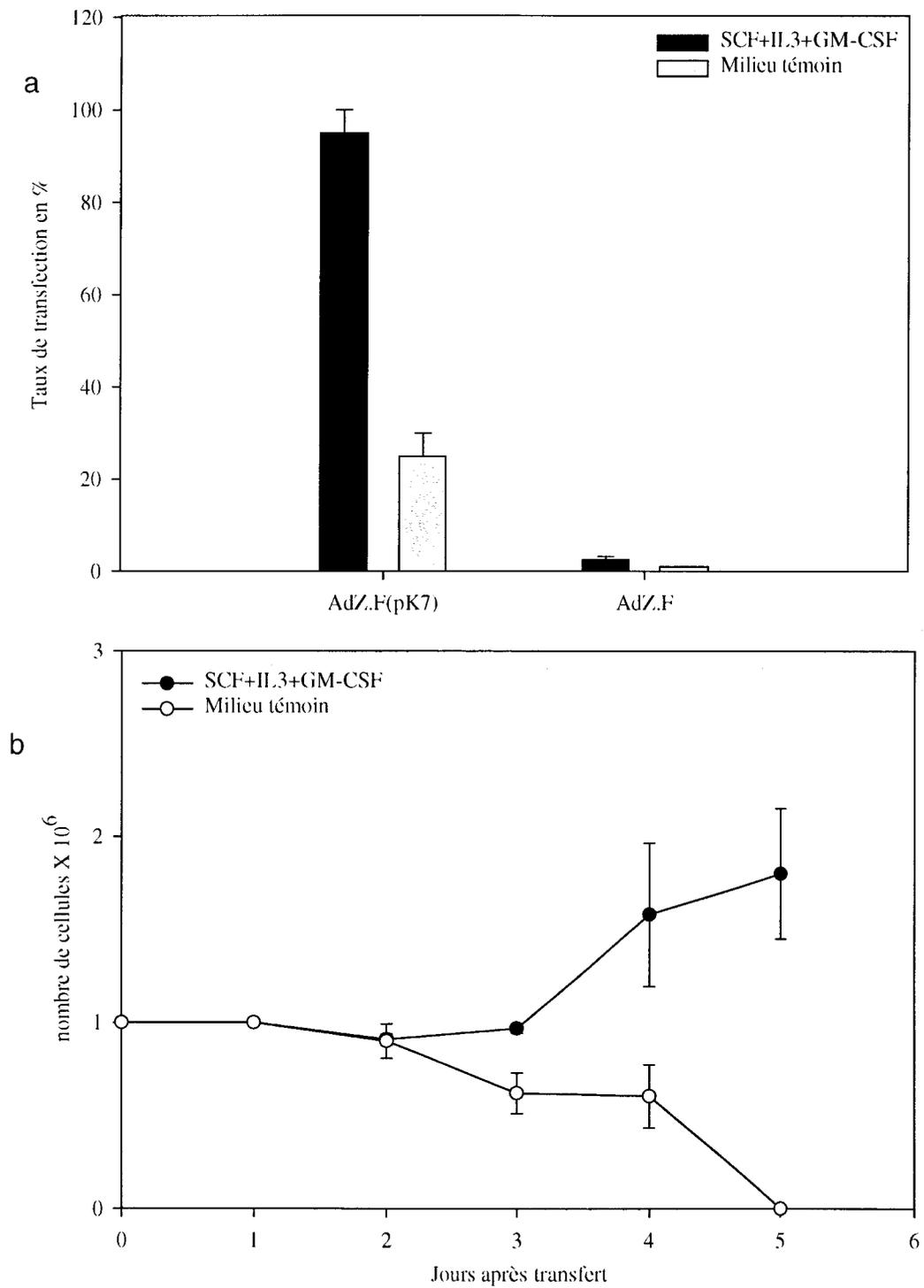
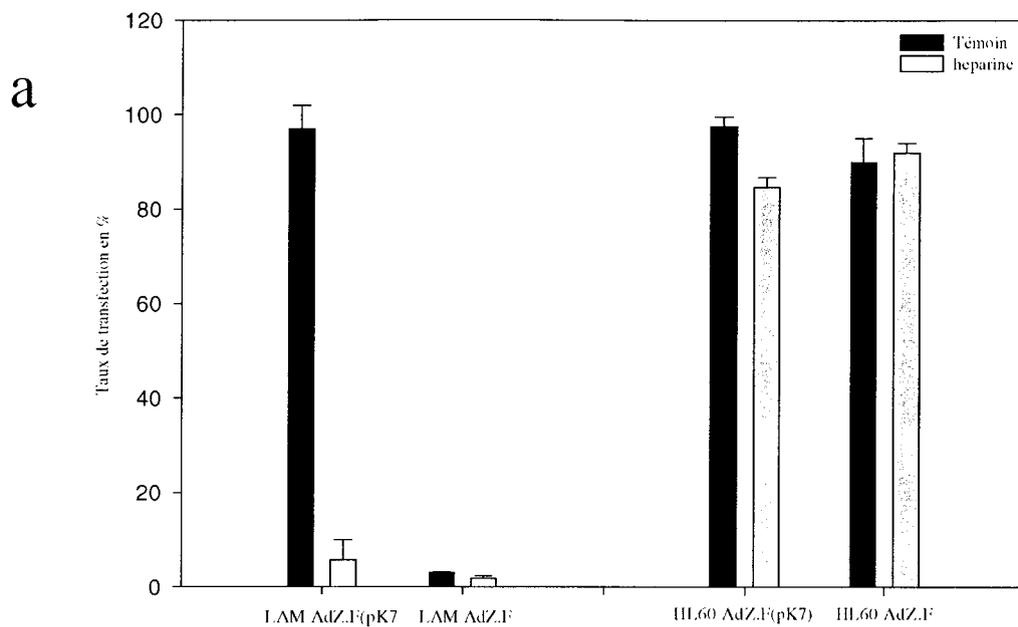


Figure 14 : Influence des facteurs de croissance sur l'efficacité de transfection.



LAM n°6

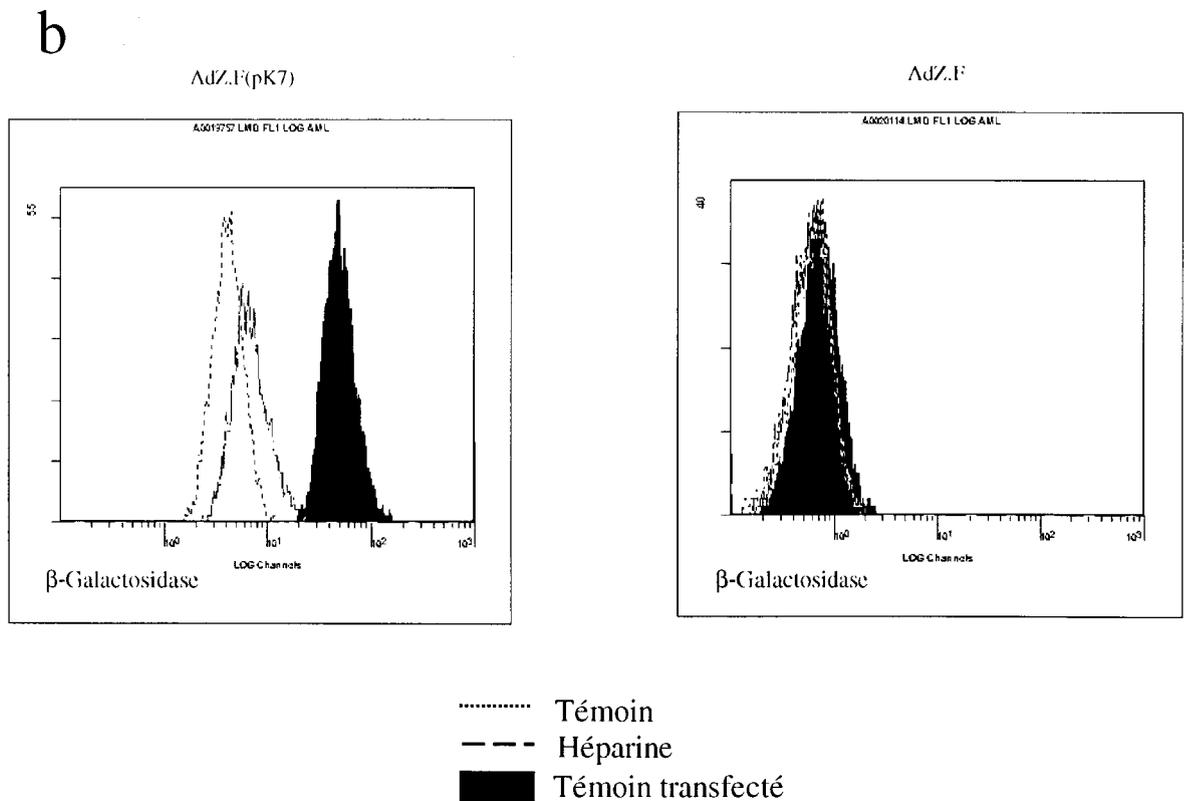


Figure 15 : Effets de l'héparine sur la transfection par l'AdZ.F(pK7).

III . 3 . 2 . Inhibition enzymatique par clivage des glycosaminoglycanes.

Les cellules de 5 échantillons de LAM ont été traitées pendant 1h avec de l'Héparinase-I ou de la Neuraminidase avant d'être incubées avec les particules virales. Nous observons sur la figure 15c une très forte diminution du taux de transduction de l'AdZ.F(pK7) après traitement des cellules avec l'héparinase I. Par contre aucun effet significatif n'est observé sur le taux de transduction du vecteur AdZ.F (test de Student, $p=0,01$). La neuraminidase ne semble pas affecter le taux de transduction des deux vecteurs (test de Student, $p=0,6$). Les résultats obtenus avec les échantillons 7 et 8, transduits par les deux vecteurs montrent une forte diminution du taux de transduction du vecteur AdZ.F(pK7) par l'héparinase-I et plus légèrement par la neuraminidase. Ces deux enzymes n'ont par contre aucun effet sur la transduction par le vecteur non modifié AdZ.F. Ces résultats suggèrent que la transfection par l'AdZ.F(pK7) est médiée principalement par les héparanes-sulfates dans les blastes de LAM. Cependant dans certains cas d'autres molécules anioniques peuvent être requises comme les neuramidiques.

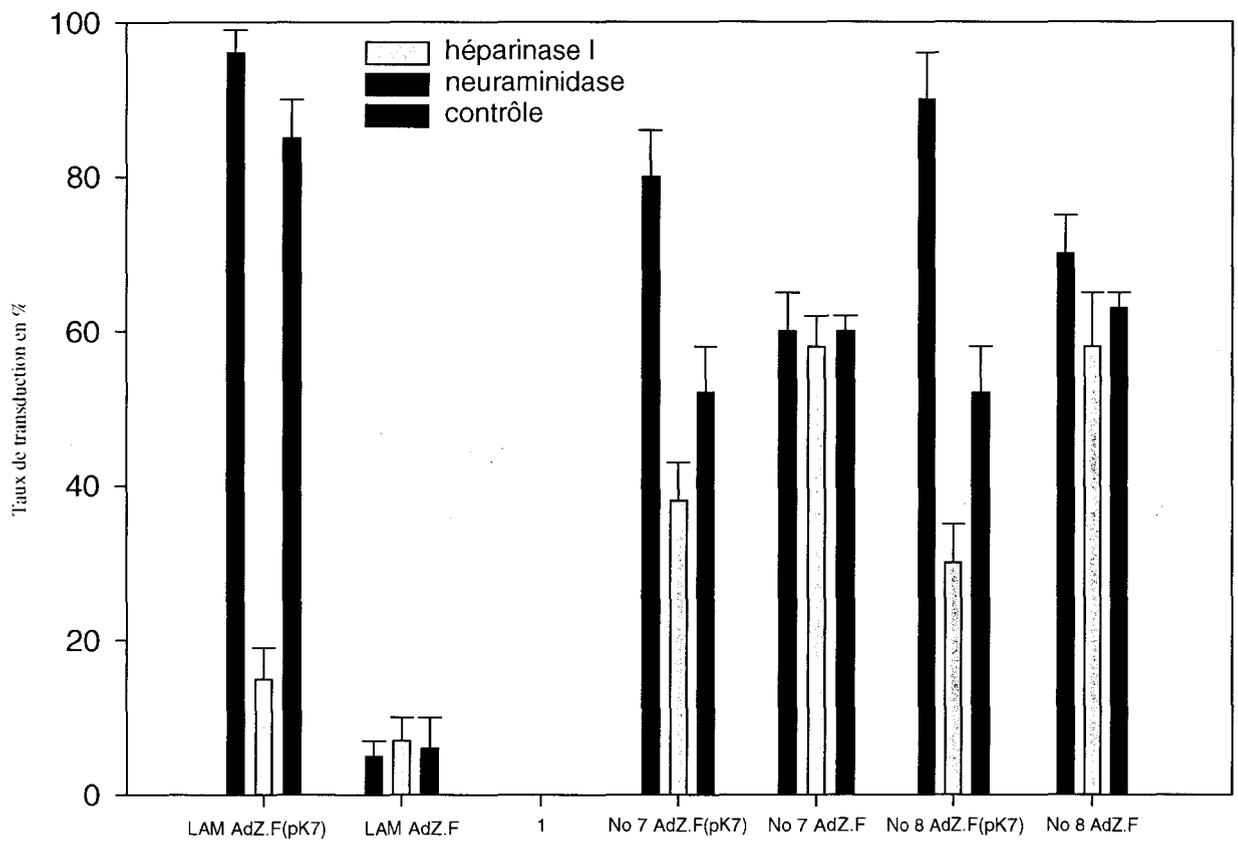


Figure 15c : Inhibition enzymatique de la transfection par les vecteurs AdZ.F et AdZ.F(pK7).

IV . TRANSFERT DU GENE DE LA β -GALACTOSIDASE DANS LES MYELOMES PAR LE VECTEUR ADENOVIRAL MODIFIE ADZ.F(PK7)

Suite aux résultats obtenus sur les LAM par le vecteur adénoviral modifié AdZ.F(pK7) nous nous sommes intéressés aux modalités de transfert de gène dans les myélomes. En effet plusieurs travaux attestent de la grande richesse en héparanes-sulfates à la surface de ces cellules (Wijdenes *et al.* 1996; Sun *et al.* 1997) notamment de la présence de molécules de type syndécan-I et VI. Ces molécules étant une cible potentielle du vecteur AdZ.F(pK7).

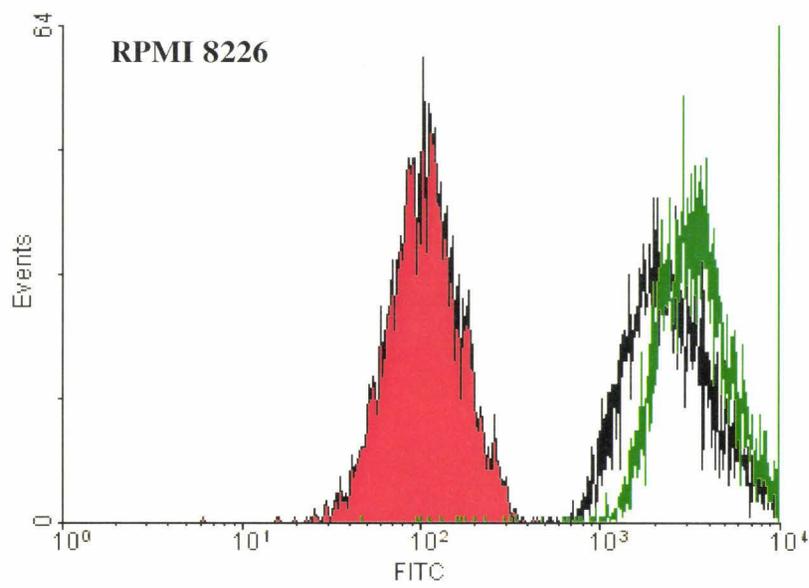
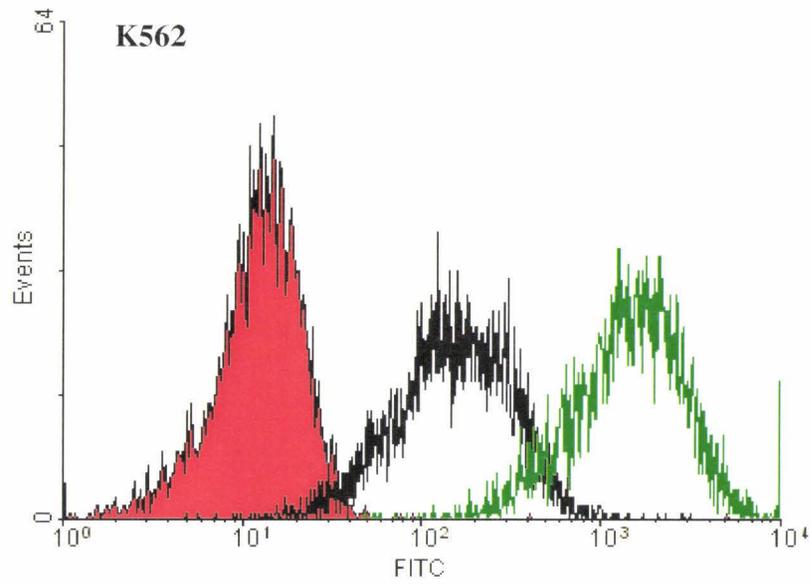
IV . 1 . Transfection de la lignée plasmocytaire RPMI 8226.

Les cellules ont été transfectées par le vecteur AdZ.F(pK7) et le vecteur témoin AdZ.F dans les mêmes conditions que la lignée K562 (8400 particules physiques), utilisé comme témoin de transfection. Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont représentés sur la Figure 16.

Nous observons une grande efficacité de transfert par les deux vecteurs. En effet 100% des cellules RPMI 8226 expriment la β -galactosidase, ces résultats étant confirmés par la coloration au X-Gal sur quatre expériences. Cependant sur les résultats obtenus par cytométrie en flux (figure 16) nous observons une moyenne de fluorescence plus élevée pour les cellules transfectées par l'AdZ.F(pK7), qui nous indique un taux d'expression plus élevé du transgène.

IV . 2 . Culture de cellules plasmocytaires tumorales

Afin de transfecter efficacement des cellules de myélomes issues de patients nous avons dû optimiser les conditions de culture. Les cellules issues des prélèvements médullaires de patients et préalablement déplétées en cellules CD3+ ont été cultivées dans du milieu ISCOVE+10%SVF supplémenté de 20ng de GM-CSF, 8ng d'IL3, 20ng de SCF et 20ng d'IL6. Tous les échantillons ont été préalablement déplétés en cellules CD3+ (Lymphocytes T) par le système immunomagnétique DYNAL et analysés en cytométrie en flux sur la population CD38+ représentative des plasmocytes.



- AdZ.F
- AdZ.F(pK7)
- Témoïn non transfecté

Figure 16 : Mesure de l'activité β -galactosidase des lignées transfectées. Représentations monoparamétriques obtenues par cytométrie en flux sur les lignées cellulaires K562 et RPMI 8226 avec 8400 particules virales par cellule.

IV . 3 . Etablissement d'une gamme de transfection des plasmocytes tumoraux en culture primaire.

Afin de déterminer le nombre minimum de particules nécessaires pour infecter 100% des cellules nous avons établi une gamme de transfection sur une série de 5 patients avec 500, 1000, 5000 et 8000 particules physiques par cellule pour chaque vecteur. Les résultats obtenus 72h après transfection sont représentés sur la figure 17a.

Nous observons que les deux vecteurs sont capables de transférer 100% des cellules. Cependant le vecteur AdZ.F(pK7) se montre très vite efficace puisque 100% des cellules expriment la β -Galactosidase dans la majorité des cas c'est à dire 4 cas sur 5 dès 500 particules, alors que le vecteur témoin n'atteint cette valeur qu'à partir de 8000 particules.

D'autre part si l'on compare ces résultats par rapport au nombre de particules virales actives, la différence est encore plus grande puisque le vecteur AdZ.F(pK7) transfère la totalité des cellules à une MOI de 5,95 pfu contre 18,2 pour le vecteur témoin. L'équivalence entre le nombre de particules physiques et le nombre de particules actives (infectieuses) pour les deux vecteurs est représentée sur le tableau n°5.

Gamme en particules physiques	500	1000	5000	8000
Gamme en pfu pour l'AdZ.F	18,2	36,25	182	290
Gamme en pfu pour l'AdZ.F(pK7)	5,95	11,9	59,5	95,2

Tableau n°5 : Equivalence entre le nombre de particules physiques et actives pour les vecteurs AdZ.F et AdZ.F(pK7)

Par ailleurs nous observons sur la figure 17b que la moyenne de fluorescence est plus élevée avec l'AdZ.F(pK7) qu'avec le vecteur témoin même à 8000 particules physiques par cellule.

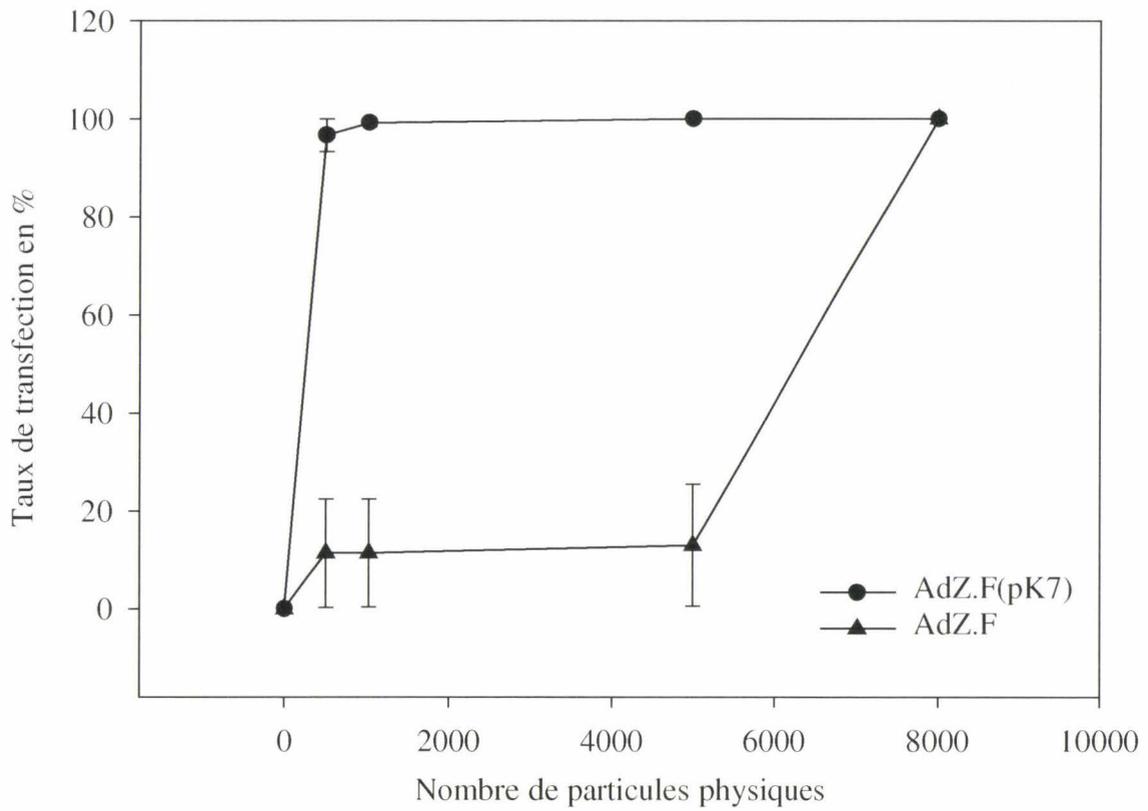


Figure 17a : gamme de transfection des myélomes

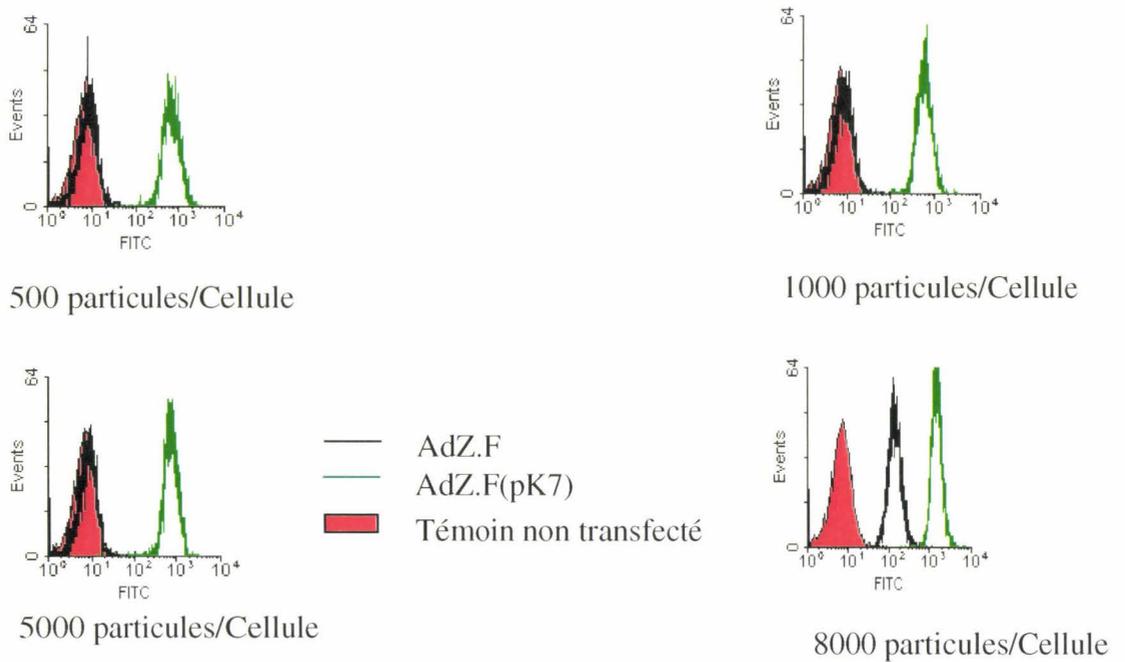


Figure 17b : Représentation monoparamétrique obtenue en cytométrie en flux de la gamme de transfection par les vecteurs AdZ.F et AdZ.F(pK7) sur un échantillon de patients atteints d'un myélome.

IV . 4 . Transfection de myélomes en culture primaire.

Suite aux résultats précédents nous avons poursuivi nos expériences en transfectant les échantillons avec 500 particules physiques par cellule.

IV . 4 . 1 . Transfection de 10 échantillons de myélomes en culture primaire

Les échantillons issus de 10 patients atteints de myélomes ont été transfectés par les deux vecteurs avec 500 particules physiques. Les taux de transfert ont été analysés 72h après transfection et sont représentés sur la figure 18.

Nous observons une très nette supériorité de l'AdZ.F(pK7) par rapport à l'AdZ.F pour 8 échantillons sur 10. Un seul échantillon demeure intransfecté et un autre l'est par les deux vecteurs. Le taux de transfection moyen pour l'AdZ.F(pK7) est de 88,36% contre 14% pour l'AdZ.F avec une médiane de 100% contre 1,2% respectivement. Pour les deux vecteurs le taux de survie est de 95%.

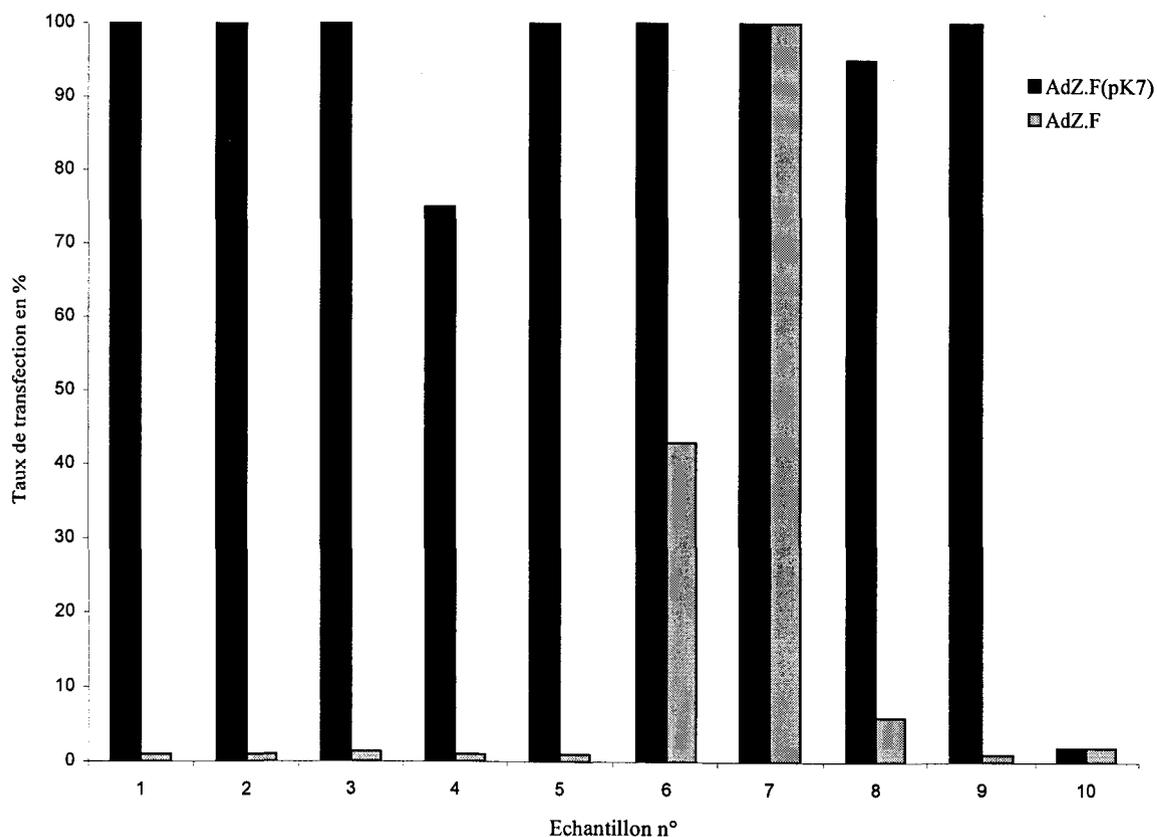


Figure 18 : Transfection de 10 échantillons de myélomes par le vecteur AdZ.F(pK7)

IV . 4 . 1 . Analyse de l'expression à long terme.

L'expression à long terme de la β -Galactosidase a été étudiée sur cinq échantillons. Les résultats sont représentés sur la figure 19. Les résultats montrent une expression importante du transgène avec le vecteur modifié jusqu'au dixième jour, au-delà l'expression n'a pas été évaluée suite à une baisse importante de la viabilité cellulaire.

Pour le vecteur témoin nous observons une augmentation de l'expression à partir du cinquième jour suivie d'une chute rapide jusqu'au dixième jour accompagnée d'une baisse de la viabilité cellulaire.

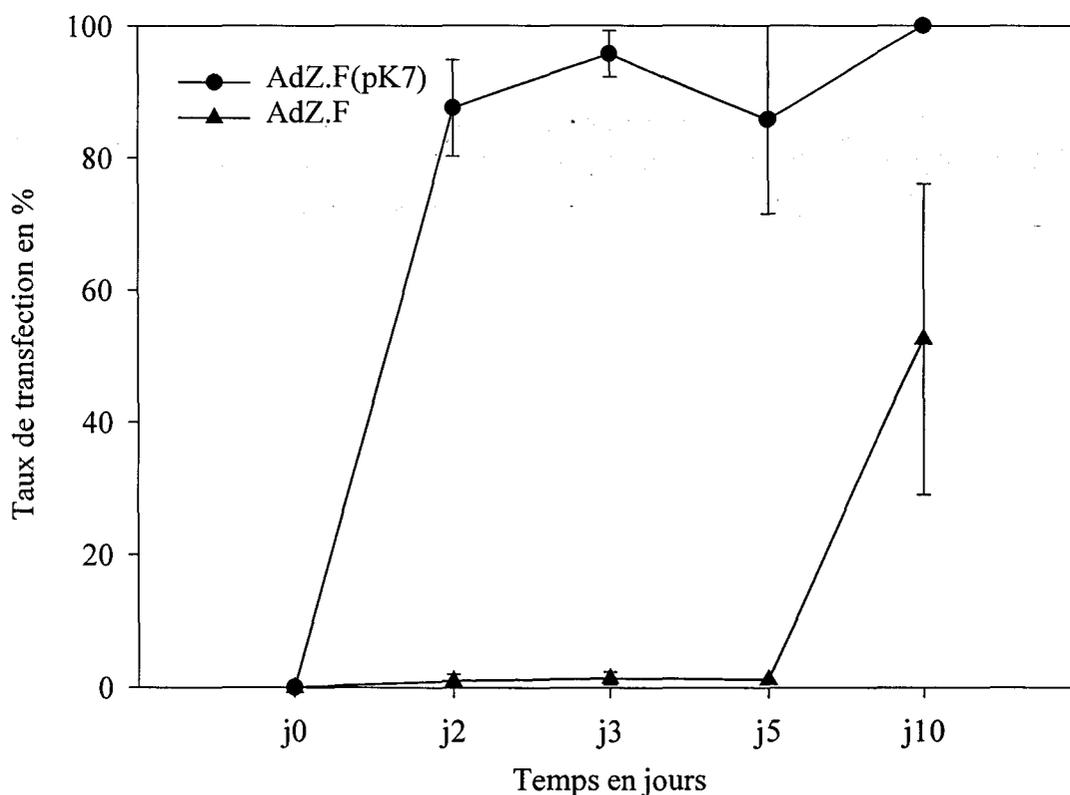


Figure 19 : Expression moyenne à long terme des cellules de myélomes de 5 patients transfectées par les vecteurs adénoviraux AdZ.F(pK7) et AdZ.F

IV . 5 . Inhibition compétitive

Comme pour les LAM nous avons réalisé des expériences d'inhibition compétitive afin de vérifier la voie d'accès du vecteur modifié par l'utilisation d'héparine (1mg/ml) et de fibre recombinée.

Figure 20 nous observons une inhibition totale du vecteur AdZ.F(pk7) par l'héparine et par la fibre plus héparine. Aucune modification significative du taux de transfection n'est observée avec la fibre seule. Ces résultats n'ont pu être observés avec le vecteur témoin étant donné le très faible taux de transfert obtenu avec celui-ci avec 500 particules physiques.

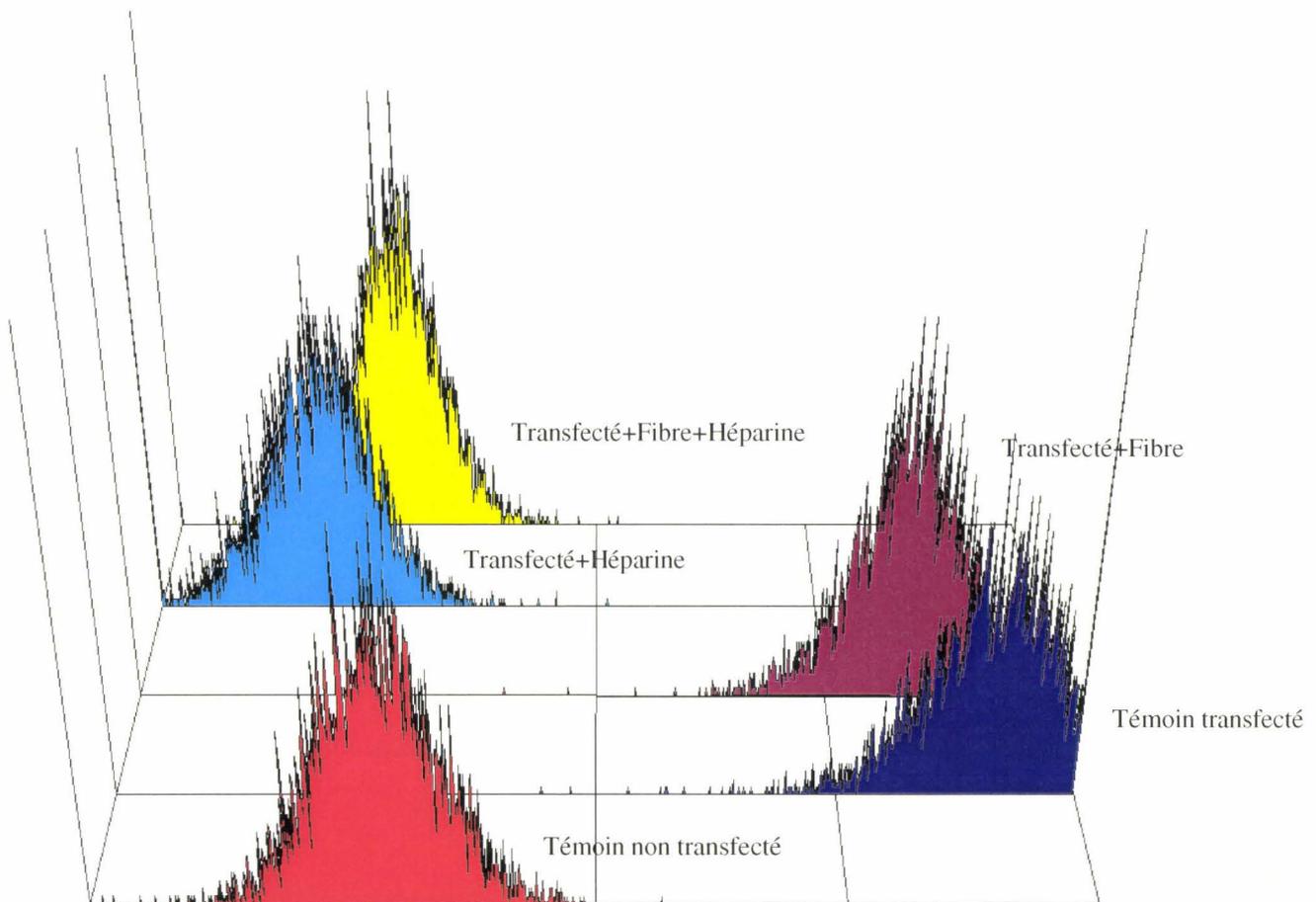


Figure 20: Inhibition de la transfection du vecteur AdZ.F(pk7) par la fibre et l'Héparine

DISCUSSION

La culture des cellules leucémiques est un facteur limitant du transfert de gènes *ex vivo*. En effet beaucoup de vecteurs sont tributaires de la division cellulaire. Les vecteurs rétroviraux qui sont les plus utilisés ne peuvent s'intégrer dans le génome qu'après disparition de l'enveloppe nucléaire (Roe *et al.* 1993). Pour d'autres vecteurs la prolifération cellulaire n'est pas nécessaire, c'est le cas des vecteurs plasmidiques et adénoviraux, ces derniers utilisant d'autres mécanismes d'entrée dans le noyau cellulaire (Greber *et al.* 1997). Cependant, bien qu'ils ne soient pas soumis à cette contrainte, ils sont malgré tout tributaires de la machinerie cellulaire et par conséquent de la survie de la cellule hôte. D'autre part dans l'optique d'une réinjection des cellules modifiées au patient celles-ci devront être irradiées afin d'empêcher leur prolifération, ce qui a pour effet d'augmenter la mortalité cellulaire et par conséquent de causer une perte de matériel biologique. La cryoconservation des cellules est également un des éléments limitants pour certains protocoles de thérapie génique comme l'immunothérapie qui nécessite des injections répétées de cellules modifiées afin d'aboutir à un effet thérapeutique. Le transfert de gènes dans les cellules tumorales comme les cellules de LAM permet de collecter d'importantes quantités de cellules, ce qui permet de compenser les pertes dues au transfert. Cependant quel que soit le type de vecteur utilisé, la culture primaire de ces cellules s'avère nécessaire dans le but de les maintenir en vie le temps nécessaire aux multiples manipulations auxquelles elles seront soumises avant leur réinjection au patient.

Dans le cadre de notre travail visant à étudier les modalités de transfert de gènes *ex vivo* dans les cellules de LAM et afin de nous permettre de mener à bien nos expériences, nous avons dans premier temps cherché à optimiser les conditions de culture primaire de ces cellules tumorales. Peu de travaux concernant la culture des cellules leucémiques ont été décrits et la plupart des travaux de vectorisation sur ce type de cellules utilisent des milieux classiques, ce qui limite l'évaluation à long terme et pourrait être la cause de la baisse rapide de l'expression du transgène (Dilloo *et al.* 1997). Par ailleurs les données concernant la culture des cellules souches hématopoïétiques ne sont que très partiellement transposables aux cellules de LAM, la réponse aux facteurs de croissance pouvant être différente pour ce type de cellules. Cependant les connaissances acquises dans ce domaine nous ont permis d'étudier l'effet de certains facteurs de croissance induisant la prolifération des progéniteurs myéloïdes sur les cellules de LAM en culture primaire (Weber-Nordt *et al.* 1995; von Kalle *et al.* 1998).

Trois facteurs de croissance ont été étudiés sur les cellules de LAM après congélation, le GM-CSF, l'IL-3 et le SCF en présence de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). La présence de SVF s'est avérée essentielle, les cellules ne survivant pas au-delà de 48h en absence de ce composé. Les résultats nous ont permis d'observer une forte prolifération avec le milieu contenant ces trois facteurs de croissance par rapport aux autres milieux testés et par conséquent de déterminer un milieu adéquat pour la prolifération et la survie de ces cellules. L'absence de facteurs de croissance n'induit pas d'augmentation de la population cellulaire, nous ne pouvons cependant pas affirmer s'il s'agit d'une baisse de la prolifération ou bien d'un arrêt de celle-ci. Dans le cadre de notre travail de vectorisation ces résultats nous ont permis de déterminer également la période pendant laquelle les cellules seront les plus aptes à être manipulées, celle-ci se situant entre le deuxième et le cinquième jour après décongélation. De plus les résultats obtenus avec des cellules fraîches suivent la même cinétique en présence de facteurs de croissance, ce qui confirme l'intérêt de ce milieu pour les cellules congelées. Un milieu de composition similaire au notre a également été utilisé avec succès dans des travaux concernant le transfert de gènes dans les cellules leucémiques par un vecteur rétroviral (Hirst *et al.* 1997).

La vectorisation non-virale dans les cellules leucémiques en culture primaire a été rarement abordée, la plupart des travaux concernant principalement les cellules souches et des lignées de cellules leucémiques. Les travaux réalisés sur des cellules de LAM montrent une efficacité équivalente entre les liposomes cationiques et les vecteurs viraux (Tableau n°1), cependant les taux de transduction demeurent relativement faibles. Les polyéthylémines ont montré des résultats prometteurs sur de nombreuses lignées cellulaires cependant les taux de transduction sur la lignée leucémique K562 sont très inférieurs à ceux obtenus sur d'autres cellules tumorales comme les cellules murines 3T3 et à ceux obtenus avec des liposomes cationiques (Boussif *et al.* 1995).

Dans le but d'évaluer ces techniques sur les cellules de LAM nous avons étudié dans un premier temps le transfert de gènes à l'aide de vecteurs cationiques comme la polyéthylémine et les lipopolyamines (lipofectamine, Gibco BRL) sur des lignées de cellules leucémiques et de carcinome ovarien. Les résultats obtenus avec ces vecteurs n'ont pas abouti à des taux de transfert satisfaisants, ceux-ci se situant nettement en-dessous de ceux obtenus par des vecteurs viraux dans ces cellules (Wattel *et al.* 1996). Suite à ces résultats nous n'avons pas poursuivi ces travaux sur les cellules leucémiques en culture primaire.

Nous avons orienté nos travaux sur une autre méthode de transfert, l'électroporation. Plusieurs travaux ont montré l'intérêt et la faisabilité du transfert de gènes ou d'oligonucléotides antisens dans les cellules hématopoïétiques par électroporation (Matthews *et al.* 1995; Spiller *et al.* 1998). Cependant seuls des vecteurs viraux comme l'adénovirus, l'AAV et le virus de l'herpès ont été testés avec succès sur les cellules de LAM en culture primaire (Anderson *et al.* 1997; Dilloo *et al.* 1997). Nos travaux nous ont permis de montrer pour la première fois l'efficacité du transfert de gènes par électroporation sur les cellules de LAM en culture primaire. Nous avons observé que le transfert par électroporation de l'ADNc de l'EGFP aboutissait à l'expression de cette protéine dans tous les échantillons testés et que plus de 30% des cellules survivantes de 15 échantillons sur les 18 testés exprimaient celle-ci, la moyenne sur l'ensemble des échantillons étant de 43% et la médiane de 48%. De plus, l'expression de l'EGFP s'accroît jusqu'au cinquième jour après transfert et demeure détectable à un niveau élevé après quinze jours. Cependant, la mortalité cellulaire induite par cette technique est très élevée, ce qui peut être un problème pour son usage sur les cellules issues de tumeurs solides en culture primaire où le nombre de cellules disponibles est généralement faible. Dans le cas des cellules leucémiques qui peuvent généralement être collectées en grandes quantités à partir du sang ou de la moelle osseuse au diagnostic cette technique demeure néanmoins applicable. De plus malgré la faible viabilité des cellules, l'électroporation permet d'obtenir un nombre important de cellules de LAM transduites capables de survivre de 7 à 15 jours pouvant être utilisées dans un but thérapeutique. Les avantages de cette technique sont multiples, contrairement aux vecteurs cationiques ; en effet, elle permet d'obtenir des taux de transduction importants tout en étant de mise en œuvre facile et d'une grande sécurité d'emploi clinique par rapport aux vecteurs viraux.

Parallèlement à l'électroporation nous avons étudié les modalités de transfert de gène par un vecteur adénoviral modifié dans les cellules de LAM en culture primaire. Différents groupes ont rapporté récemment la construction de vecteurs adénoviraux modifiés avec un tropisme étendu. Les stratégies abordées sont le remplacement du domaine KNOB de l'Ad5 par celui de l'Ad3, l'utilisation d'anticorps bispécifiques dirigés contre le penton et les intégrines, l'utilisation d'anticorps porteurs d'un ligand dirigés contre la fibre et l'ajout de polylysines ou d'une séquence RGD à l'extrémité de la fibre (Wickham *et al.* 1995; Krasnykh *et al.* 1996; Wickham *et al.* 1996b; Stevenson *et al.* 1997; Wickham *et al.* 1997a; Wickham *et al.* 1997b). Les résultats obtenus à l'aide d'autres vecteurs viraux et cationiques sont généralement faibles dans ce type de cellules, concernent d'autres hémopathies ou les cellules souches hématopoïétiques (Ozawa 1995; Tani *et al.* 1995a).

Nos travaux nous ont permis de montrer que le vecteur adénoviral classique AdZ.F était capable de transduire efficacement des lignées de cellules de leucémies myéloïdes mais se montrait inefficace sur les cellules de LAM en culture primaire. Par contre le vecteur adénoviral AdZ.F(pK7) porteur d'une fibre modifiée était capable de transfecter très efficacement et avec très peu de particules virales toutes les cellules de LAM en culture primaire avec des taux de transduction variant entre 90 et 100% pour 20 échantillons sur 25, la moyenne étant de 94,5%. Nous avons également observé une expression à long terme pour la plupart des échantillons sur une période de 15 jours suivie d'une baisse rapide de la viabilité cellulaire. L'expression à long terme peut s'expliquer par l'efficacité de transduction du vecteur mais aussi par la faible prolifération de ces cellules ex-vivo.

Les résultats obtenus avec le vecteur témoin AdZ.F sont malgré tout meilleurs à ceux obtenus avec un vecteur du même type dont le transgène était sous la dépendance d'un promoteur RSV, ce qui confirme les résultats d'autres travaux établissant la supériorité des promoteurs CMV par rapport aux promoteurs RSV qui ont une activité modérée dans les cellules hématopoïétiques (Wattel *et al.* 1996). La seule différence entre les vecteurs AdZ.F et AdZ.F(pK7) est l'ajout de sept lysines à l'extrémité C-terminale de la fibre de ce dernier (Matériels et Methodes). Par incubation des particules virales avec de l'héparine ou des cellules avec de l'héparinase I nous avons réussi à bloquer la transduction des cellules de LAM avec l'AdZ.F(pK7), le traitement de ces cellules par la neuraminidase s'est avéré sans effet sur la transduction. Par contre la transduction de la lignée HL60 s'est avérée légèrement plus efficace avec l'AdZ.F et le traitement avec l'héparine n'empêche pas la transfection par l'AdZ.F(pK7); cela nous permet de suggérer que les héparanes sulfates ne sont pas nécessaires pour le transfert de gènes dans cette lignée. Sur deux échantillons dont le taux de transduction est similaire pour les deux vecteurs, le traitement à la neuraminidase affecte la transduction par l'AdZ.F(pK7) mais pas par l'AdZ.F, ceci suggérant que dans certains cas la transfection par le vecteur porteur d'une fibre modifiée pourrait être liée à l'interaction entre les polylysines et des charges négatives portées par d'autres molécules que les héparanes sulfates. Cependant, l'importante efficacité de transfert de l'AdZ.F(pK7) dans les cellules de LAM en culture primaire semble principalement liée à l'attachement des particules virales à la membrane cellulaire via les héparanes sulfates comme cela a été décrit dans d'autres travaux portant sur les cellules musculaires, endothéliales, les macrophages et les lymphocytes T. Il a été montré que ce vecteur modifié était capable de transfecter les cellules dépourvues de récepteurs de la fibre et que la fixation des particules virales pouvait être inhibée par traitement des cellules avec l'héparinase mais pas par la neuraminidase ou la chondroitinase (Wickham *et al.* 1996a; Wickham *et al.* 1997c).

De plus, certains récepteurs portant des héparanes sulfates comme le récepteur au FGF sont abondamment exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques (Witzig *et al.* 1998). Des travaux récents ont par ailleurs montré que les héparanes sulfates sont également les récepteurs des AAV de type 2 et des virus Pox comme la vaccine (Chung *et al.* 1998). Le virus de l'herpès qui peut également se fixer aux cellules par cette voie et un vecteur issu de ce virus a montré une très grande efficacité dans les cellules de LAM en culture primaire. La modification de la protéine de la fibre afin de cibler les héparanes sulfates permet donc d'augmenter de façon importante le taux de transduction en élargissant le tropisme de ce type de vecteur.

Une des limitations importantes à l'utilisation de vecteurs rétroviraux est qu'ils requièrent des cellules en division et l'incubation prolongée des cellules avec des facteurs de croissance peut induire des différenciations de celles-ci et modifier leur immunogénicité.

Nous avons observé dans ce travail que malgré la propriété des vecteurs adénoviraux de transfecter des cellules quiescentes, l'absence des facteurs de croissance GM-CSF, IL3 et SCF dans le milieu de culture aboutissait à un faible taux de transduction. Bien que ces facteurs de croissance soient d'importants inducteurs de l'expression des intégrines α_v nécessaires à l'infection par l'adénovirus, leur intérêt pour le transfert avec le vecteur AdZ.F(pK7) résiderait principalement dans le maintien de la viabilité cellulaire qui est très réduite en absence de ceux-ci (Wickham *et al.* 1993). Par ailleurs l'activation du promoteur CMV par les facteurs de croissance n'est pas à exclure. De plus la grande efficacité de l'AdZ.F(pK7) permet des temps de culture très courts des cellules, limitant ainsi l'exposition prolongée de celles-ci aux facteurs de croissance.

Il a été montré récemment que les vecteurs adénoviraux classiques sont capables de transduire des plasmocytes tumoraux en culture primaire, cependant les taux de transfert demeurent relativement faibles (Prince *et al.* 1998). D'autre part les cellules de myélomes expriment abondamment à leur surface des molécules contenant des héparanes sulfates comme les récepteurs au bFGF, le syndécan I (Sun *et al.* 1997), cette propriété en fait de bons candidats pour l'utilisation du vecteur AdZ.F(pK7). Suite à ces observations et à nos résultats qui ont montré l'intérêt du vecteur AdZ.F(pK7) comme outil de transfert de gènes dans les LAM en culture primaire, nous avons orienté notre travail sur les myélomes. Il a été montré dans un modèle murin qu'il était possible d'induire une réponse immune efficace par transfert de gènes contre ces cellules tumorales (Kopantzev *et al.* 1998). Différents travaux concernant le transfert de gènes dans les myélomes ont montré qu'il était possible de transfecter efficacement ces cellules par différents vecteurs viraux comme l'AAV, les rétrovirus et les adénovirus, cependant toutes ces études ont été effectuées sur des lignées.

Nous avons montré qu'il était possible de transduire très efficacement et avec des quantités très faibles de particules virales (5,9 pfu par cellule) les cellules de myélomes en culture primaire par le vecteur modifié AdZ.F(pK7). La totalité des échantillons transfectés ont exprimé le transgène, les taux de transduction variant entre 70 et 100%, la médiane étant de 100%. Avec le vecteur témoin AdZ.F seuls 3 échantillons sur 10 exprimaient le transgène avec le même nombre de particules virales que l'AdZ.F(pK7). Les taux de transduction respectifs avec le vecteur témoin sont de 5, 40 et 100%, la médiane est de 1,2%. En utilisant une MOI plus élevée (100pfu/cellule) nous observons une augmentation du taux de transduction par le vecteur témoin mais aucune amélioration de celui-ci n'est observée avec l'AdZ.F(pK7) qui atteint son maximum d'efficacité à une MOI de 20 pfu/cellule.

L'observation de l'expression à long terme nous a permis de constater que l'expression maximum est atteinte au troisième jour et que celle-ci est toujours détectable au dixième jour après lequel une augmentation importante de la mortalité cellulaire est observée.

L'incubation des particules virales avec de l'héparine bloque complètement la transfection par le vecteur modifié, elle n'a par contre aucun effet sur la transfection par le vecteur témoin AdZ.F. L'incubation des cellules avec de la fibre recombinée bloque par contre complètement la transfection par le vecteur témoin et n'a aucun effet sur le transfert par le vecteur modifié AdZ.F(pK7). Ces résultats confirment le rôle des héparanes sulfates dans le transfert par l'AdZ.F(pK7). Nos résultats montrent l'intérêt de ce vecteur modifié pour la thérapie génique des myélomes.

Une des limitations majeures du transfert de gènes dans les hémopathies malignes était jusque maintenant la faible efficacité des vecteurs couramment utilisés à cet effet. Dans ce travail nous avons montré que l'utilisation du vecteur modifié AdZ.F(pK7) peut aboutir à des taux de transduction très importants dans les blastes de LAM et les myélomes en culture primaire sans toxicité apparente. Ce vecteur modifié est capable de combler la faible efficacité des vecteurs adénoviraux classiques tout en conservant les avantages de ce type de vecteur par rapport aux autres vecteurs viraux qui sont la facilité de production à grande échelle, le stockage et la propriété de transfecter des cellules quiescentes ou qui prolifèrent peu. Les seuls résultats probants sur les LAM en culture primaire ont été obtenus par des vecteurs issus de virus de l'Herpès (Dilloo *et al.* 1997), cependant les taux de transduction demeurent inférieurs à ceux obtenus par l'AdZ.F(pK7) et l'expression chute rapidement à partir du quatrième jour. Par ailleurs la production de ce type de vecteur nécessite de nombreuses étapes ce qui la rend difficile. Contrairement à ce vecteur issu du virus de l'herpès et d'autres vecteurs rétroviraux (Cantwell *et al.* 1996; Huang *et al.* 1997), des essais préliminaires semblent indiquer que le vecteur AdZ.F(pK7) n'est pas efficace sur les leucémies lymphocytaires et les cellules CD34+. Ces résultats peuvent être liés à la culture primaire de ces cellules et à l'expression des protéoglycane et intégrines à leur surface, ils demeurent cependant d'un grand intérêt puisqu'ils permettent d'envisager des applications *in-vivo* dirigées contre les cellules tumorales d'origine myéloïde et *ex-vivo* dans les purges médullaires.

Un des problèmes suscités par les vecteurs d'origine adénovirale est leur immunogénicité importante, des études ont montré qu'il était possible de diminuer celle-ci de façon significative (Lee *et al.* 1995). Cependant pour certaines application comme l'immunothérapie celle-ci permettrait d'amplifier l'effet vaccin des cellules tumorales modifiées en jouant le rôle d'adjuvant. Toutes fois il est possible que cette immunogénicité puisse au contraire inhiber la réponse cytotoxique aux antigènes tumoraux en déviant la réponse immune.

Le vecteur adénoviral modifié constitue donc un excellent vecteur de transfert de gènes pour les LAM et les Myélomes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons montré qu'il était possible de transférer efficacement des gènes par électroporation et un vecteur adénoviral portant une fibre modifiée dans les cellules de Leucémie Aiguë Myéloblastique et les Myélomes en culture primaire. L'électroporation constitue un moyen rapide et d'une grande sécurité pour le transfert de gènes dans les cellules de LAM. L'emploi de cette technique engendre une mortalité cellulaire importante, cependant l'optimisation de la culture primaire des cellules leucémiques permet d'envisager son usage pour des applications de thérapie génique ne nécessitant pas de très grandes quantités de cellules transduites et une forte expression du transgène. Son utilisation en immunothérapie peut être envisagée pour l'injection de cellules vaccinales après une première stimulation.

L'utilisation d'un nouveau vecteur adénoviral portant une fibre modifiée constitue également un puissant outil de transfert de gènes dans les cellules de LAM et de Myélomes. L'expression forte du transgène par ce type de vecteur et son efficacité de transfection en font un outil de transfert de gènes capable de servir pour de nombreuses applications *ex-vivo* comme l'immunothérapie et les purges médullaires. Il a été montré sur des modèles animaux que le transfert de gènes codant des molécules de costimulation du système immunitaire pouvait induire un puissant effet anti-leucémique (Matulonis *et al.* 1996; Dunussi-Joannopoulos *et al.* 1998). L'usage de ce vecteur paraît approprié pour des applications *ex-vivo* d'immunothérapie. Les cellules transduites avec des gènes codant des cytokines ou des facteurs de co-stimulation du système immunitaire peuvent être réinjectées au patient en rémission complète après irradiation dans le but d'induire une réponse immune contre la maladie résiduelle.

Une seconde modification de la fibre par l'ajout d'un ligand ciblant une population tumorale permettrait à terme son utilisation *in-vivo* pour le transfert de gènes suicides et suppresseurs de tumeur.

Les perspectives de ce travail sont d'insérer un ou plusieurs gènes thérapeutiques dans ce nouveau vecteur adénoviral afin de développer un modèle d'immunothérapie sur des souris leucémiques humanisées. Un modèle murin syngénique d'immunothérapie par transfert de gènes est en cours d'élaboration au sein de notre laboratoire et permettra à court terme de définir les gènes les plus efficaces pour une application clinique.

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS.

I . 1 . Les cellules.

I . 1 . 1 . Les lignées cellulaires.

a. La RPMI 8226 est une lignée de morphologie lymphoblastique issue d'un prélèvement de sang périphérique effectué sur un patient atteint d'un myélome (ATCC:CCL 155) .

b. La HL60 est une lignée de morphologie lymphoblastique issue d'un prélèvement de sang périphérique effectué sur un patient atteint d'une leucémie promyélocytaire (ATCC:CLL 240).

c. La K562 est une lignée de morphologie érythromyéloïde et a été obtenue suite à une effusion pleurale sur un patient atteint d'une leucémie myéloïde chronique (ATCC: CLL 243).

d. La Hela est une lignée épithéliale issue d'une patiente atteinte d'un carcinome cervical (ATCC : CCL 002) .

I . 1 . 2 . Les cellules Tumorales « fraîches »

Les cellules tumorales fraîches sont issues de patients atteints de Leucémies Aiguës Myéloblastiques de différents types FAB avec un minimum de 85% de blastes circulants et de Myélomes avec au moins 50% de plasmocytes. Les résultats d'analyses nous sont communiqués par le laboratoire d'hématologie du CHU de Lille. Les prélèvements sanguins et médullaires sont effectués au diagnostique dans le service des maladies du sang du CHU de Lille avec le consentement du patient.

I . 2 . Les Bactéries

La souche bactérienne SURE II (Epicurian Coli SURE-II supercompetent cells, Stratagene, USA) , de phénotype : e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan^r) uvrC[F' proAB lacμZΔM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r] a été utilisée pour les transformations et l'amplification de vecteurs plasmidiques.

I . 3 . Les Vecteurs

I . 3 . 1 . Les vecteurs plasmidiques

Le pcDNA3-Zeo est un vecteur d'expression dans les cellules Eucaryotes commercialisé par la société InVitrogen Corporation (USA). Il porte un promoteur de type CMV situé en amont d'un site de clonage multiple qui permet l'insertion facilitée d'un ou de plusieurs transgènes sous la dépendance de celui-ci. Ce vecteur porte également un gène de résistance à la zéomycine, ce qui permet de sélectionner les cellules transduites. La carte de ce plasmide est représentée sur la figure 1M.

Le pEGFP1 est un vecteur d'expression dans les cellules Eucaryotes, commercialisé par la société Clontech (USA) porteur de l'ADN complémentaire (ADNc) de la protéine EGFP (Zhang *et al.* 1996), qui est un mutant humanisé et optimisé de la protéine GFP issue de la méduse *Aequoria victoria* (Prendergast and Mann 1978). Dans ce vecteur le transgène est dépourvu de promoteur et porte en aval de multiples sites de clonage afin de pouvoir y insérer un promoteur adéquat. Ce plasmide nous a servi à amplifier l'ADNc de l'EGFP afin de l'insérer dans d'autres vecteurs. La carte de ce plasmide est représentée sur la figure 2M.

Le *pSV-β-Galactosidase* est un vecteur d'expression contrôle servant à mesurer l'efficacité de transfection dans les cellules de mammifères. Il nous a permis d'amplifier le gène de la β-Galactosidase afin de l'intégrer dans nos vecteurs. Ce vecteur est produit par Promega (USA). La carte de ce plasmide est représentée sur la figure 3M

Figure 1M :

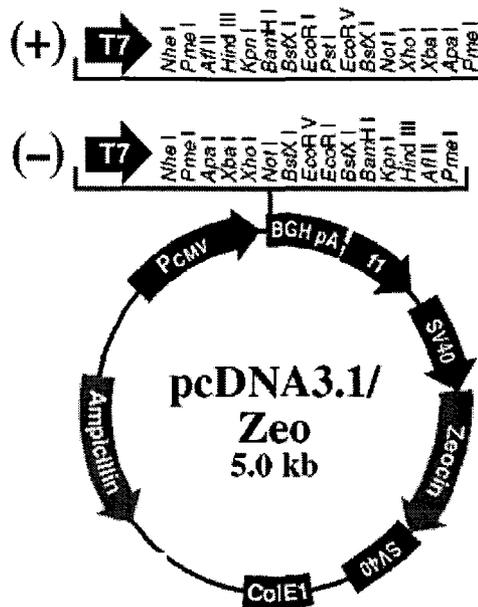


Figure 2M :

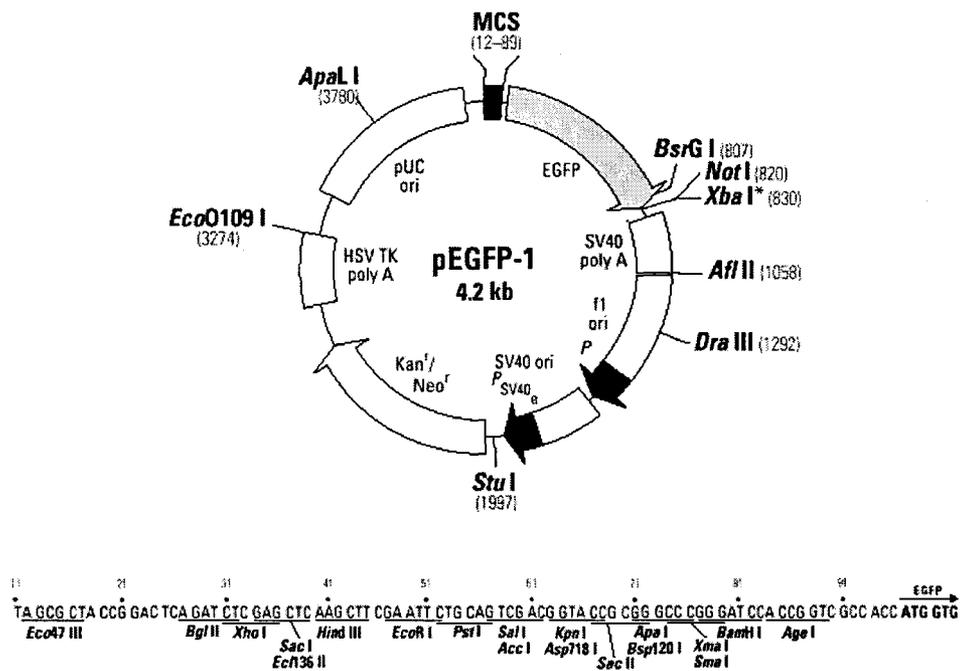
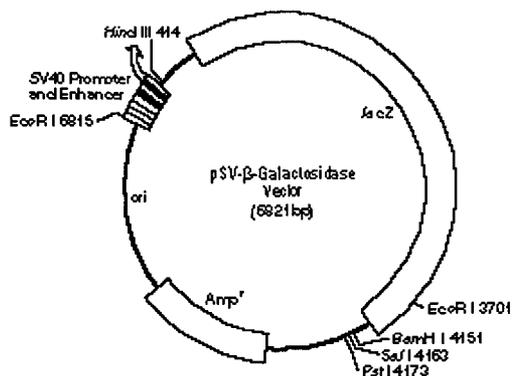


Figure 3M :



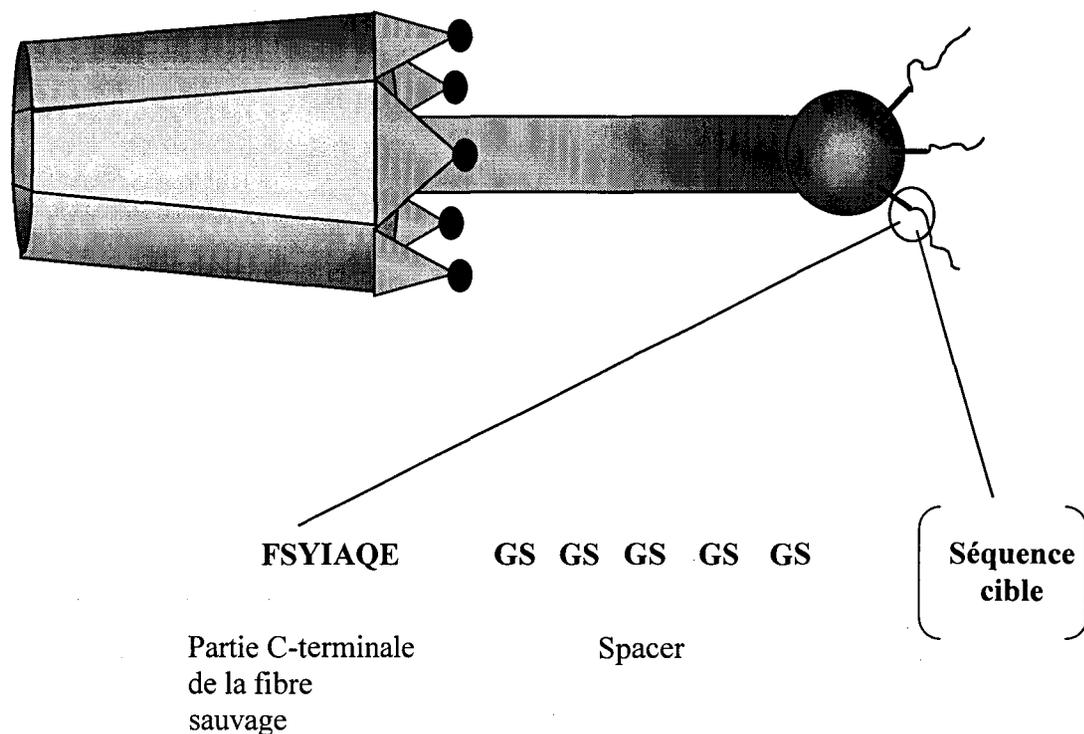
I . 3 . 2 . Les vecteurs adénoviraux.

Les vecteurs adénoviraux AdZ.F et AdZ.F(pK7) nous ont été fournis et mis au point par Tom Wickham de la société Gen Vec (USA).

-Le vecteur adénoviral AdZ.F est issu d'un adénovirus de type V porteur de l'ADN complémentaire de la β -Galactosidase sous la dépendance d'un promoteur de type CMV. Ce vecteur est déléteé des régions E1 et E3 de l'adénovirus sauvage, ce qui le rend défectif pour la réplication. Les particules virales sont produites par complémentation de la région E1 dans la lignée 293 (Wickham *et al.* 1997c).

-Le vecteur adénoviral AdZ.F(pK7) est issu d'un adénovirus de type V dont la fibre, modifiée dans sa partie C-terminale porte sept Lysines qui lui permettent de se fixer sur les molécules de type Héparane-Sulfate présentes à la surface de la plupart des cellules. Ce vecteur a été construit par transfert dans la lignée 293 du vecteur adénoviral AdZ.11A (GenVec) déléteé des régions E1, E3 et E4 de l'adénovirus, porteur de l'ITR gauche de celui-ci et du gène de la β -galactosidase sous la dépendance d'un promoteur CMV. Ces mêmes cellules ont été co-transfectées par le plasmide (pNS(FS)pK7), porteur du gène de la fibre modifiée ainsi que de la région E4 et une séquence qui permettra la recombinaison homologue avec le vecteur adénoviral. Le résultat de la recombinaison de ces deux constructions dans la lignée 293 aboutit à la production de particules adénovirales recombinées, défectives pour la réplication, déléteées de gènes E1 et E3, porteuses de la fibre modifiée, du gène de la β -galactosidase sous la dépendance d'un promoteur CMV et de la région E4.

Le schéma de la fibre modifiée est représenté sur la figure 3M.



VECTEUR	Récepteur cible	Séquence cible
AdZ.F (pK7)	Héparanes-Sulfates	KKKKKKK

Figure 3M : Schéma de la fibre modifiée du vecteur adénoviral AdZ.F(pK7)

I . 4 . Les anticorps

Les anticorps utilisés proviennent de la société COULTER-IMMUNOTECH (USA), ils sont tous d'origine murine et dirigés contre des antigènes humains.

ANTICORPS	ISOTYPE CONTROLE	CARACTERISTIQUES
CD38-PE	IgG1, clone T16	Marqueur plasmocytaire
CD33-PC5	IgG1, clone D3HL60-251	Marqueur myéloïde
CD19-FITC	IgG1, clone J4.119	Marqueur lymphocytaire B
CD3-PE	IgG1, clone UCHT1	Marqueur lymphocytaire T

II . METHODES.

II . 1 . Culture cellulaire.

Toutes les cellules sont comptées à l'aide de cellules de Malassez et la viabilité cellulaire est estimée par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan.

II . 1 . 1 . Culture des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont cultivées dans un milieu RPMI (Gibco-BRL, USA) enrichi à 10% en Sérum de Veau Fœtal (Gibco-BRL, USA) décomplémenté (30mn à 56°C), additionné de 100U/ml de pénicilline, 0,1mg/ml de streptomycine, 1mM de pyruvate de sodium, 2mM de L-glutamine et de 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco BRL, USA). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO₂ et à un degré d'hygrométrie de 95%.

Les cellules adhérentes Hela sont maintenues à subconfluence par repiquages successifs. Le milieu de culture est changé tous les trois jours. A 90% de confluence, les cellules sont rincées avec une solution de PBS (Gibco-BRL,USA), puis décollées par une solution de trypsine/EDTA (Gibco-BRL, USA). La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 300g pendant 10mn puis les cellules sont remises en culture dans 20 ml de milieu à raison de 10⁵ cellules par boîte de 10cm².

Pour les lignées en suspension HL60 et K562 le milieu est changé par centrifugation 10mn à 300g, et les cellules sont remises en suspension dans du milieu de culture à raison de 2.10⁵ cellules par ml de milieu. Les cellules sont maintenues en culture à une concentration inférieure à 1.10⁶ par ml.

II . 1 . 2 . Culture primaire des cellules tumorales.

II . 1 . 2 . 1 . Récupération des cellules tumorales

Les cellules mononuclées sont récupérées après sédimentation par centrifugation 30mn à 400g dans du milieu de séparation des lymphocytes. Les cellules mononuclées se trouvant à l'interphase sont récupérées à l'aide d'une pipette, rincées dans du milieu RPMI à 37°C, puis cryogénisées dans un milieu composé de 90% de SVF et 10% de DMSO (Sigma, USA) ou bien elles sont mises en culture afin d'être manipulées.

II . 1 . 2 . 2 . Culture primaire des cellules de Leucémies Aïgues Myéloblastiques (LAM).

Les cellules issues de leucémies myéloblastiques aiguës sont cultivées dans un milieu ISCOVE (Gibco-BRL, USA) enrichi à 10% en Sérum Foetal de Veau (Gibco-BRL, USA) décomplémenté (30mn à 56°C), additionné de 100U/ml de pénicilline, 0.1mg/ml de streptomycine, 1mM de pyruvate de sodium, 2mM de L-glutamine et de 1% d'acides aminés non essentiels. Ce milieu est de plus complémenté en facteurs de croissance avec 8ng/ml d'IL3, 20ng/ml de SCF et 20ng/ml de GM-CSF. Dans ces condition les cellules sont maintenues en culture à une concentration minimum de 1 million de cellules par ml. Les boîtes de culture sont renouvelées tous les trois jours afin d'éliminer des expériences les monocytes.

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, dans une atmosphère à 5% de CO₂ et à un degré d'hygrométrie de 95%.

II . 1 . 2 . 3 . Culture primaire des cellules de Myélomes

Les cellules issues de myélomes sont cultivées dans les mêmes conditions de culture et de milieu que les cellules de LAM, dans un milieu comportant en plus 20ng/ml d'IL-6.

II . 1 . 3 . Déplétion et sélection des cellules.

II . 1 . 3 . 1 . Déplétion de lymphocytes T et B.

Les lymphocytes T CD3⁺ et B CD19⁺ sont éliminés des prélèvements de cellules tumorales par sélection positive à l'aide du système DYNAL (USA) d'immunosélection magnétique, selon le protocole du constructeur. Dans ce système les cellules marquées par les anticorps couplés à des billes magnétiques sont récupérées à l'aide d'un aimant, dans notre cas cela permet d'éliminer les cellules CD3 des prélèvements de LAM et de Myélomes et CD19 des prélèvements de LAM avec un niveau de pureté supérieur à 90%.

II . 1 . 3 . 2 . Sélection des cellules de LAM et des plasmocytes tumoraux par cytométrie en flux.

Afin de pouvoir travailler sur les populations cellulaires désirées les cellules sont marquées avec des anticorps dirigés contre des molécules représentatives celles-ci.

La population cellulaire représentant les Blastes de LAM issus des prélèvements est visualisée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps anti CD-33. Les plasmocytes tumoraux issus des prélèvements de Myélomes sont sélectionnés par la même technique après marquage avec un anticorps anti CD-38.

II . 2 . Techniques d'analyse et de purification de l'ADN.

II . 2 . 1 . Electrophorèse en gel d'agarose

Afin de visualiser et séparer les fragments d'ADN compris entre 700 et 7000pb, les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose de 0,8% ou 1% (0,8% à 1% agarose, 0,5 µg/ml BET, TBE 1X) qui offrent une bonne résolution pour les fragment variant de 200pb à 10kb. Avant d'être déposés ceux-ci sont mélangés avec 1/6^{ème} de volume d'une solution de Bleu de bromophénol (0,05% bleu de bromophénol, 40% saccharose, 20mM EDTA). La migration se fait sous une tension de 100V pendant 20mn dans un tampon TBE (135mM Tris, 45mM Borate, 2,5mM EDTA , pH 8,3). Afin de mesurer précisément la taille des bandes, deux marqueurs de taille couvrant de 100pb à 11kb sont déposés avec les échantillons, un 100bp (Pharmacia) et un 1kb (Pharmacia).

II . 2 . 2 . Purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse en gel d'agarose ou linéarisés sont purifiés par l'utilisation du kit *GeneClean-II* (Bio 101 Inc, USA) selon le protocole stipulé par le fabricant. Ce kit permet la purification de fragments d'ADN supérieurs à 500pb après dissolution du gel d'agarose dans une solution d'iodure de sodium et une solution saturée en sels, puis par capture des molécules d'ADN avec des billes de silice affines. L'ADN peut ensuite être élué à la concentration désirée.

II . 2 . 3 . Ligature des fragments d'ADN

Les ligatures des fragments d'ADN ayant des extrémités cohésives sont réalisées par l'utilisation du kit *Ready-to-Go* (Pharmacia, USA) qui contient dans un seul tube la *T4 DNA Ligase*, ligase du Bactériophage T4 (Pharmacia) et le tampon lyophilisés. Dans ce cas la réaction s'effectue après ajout des fragments d'ADN dans un rapport molaire de 1/1, dans un volume réactionnel de 20 µl à 16°C pendant 30mn. Les ligatures de fragments d'ADN à extrémités franches sont effectuées dans un volume réactionnel de 15µl avec un rapport entre le vecteur et l'insert de 1/10 par 2 unités de *T4 DNA Ligase* (Pharmacia) dans le tampon fourni par le fabricant. Les échantillons sont incubés une nuit à 16°C.

II . 2 . 4 . Transformation bactérienne

Les bactéries compétentes de la souche issue d'*E.coli SURE-II supercompetent cells* (Stratagene, USA) sont transformées par incubation 10mn dans la glace avec 25mM de β -Mercaptoéthanol suivie d'une incubation de 30mn avec 100ng de produit de ligation dans les mêmes conditions. Les bactéries subissent ensuite un choc thermique par un passage de 30 sec. à 42°C puis 2mn dans la glace et sont mises 1h30mn en culture dans 1ml de milieu SOC (Gibco BRL, USA), 100 μ L de bactéries sont pour finir étalées sur boîte de Pétri dans du milieu LB gélosé contenant 200 μ g/ml d'Ampicilline et incubées une nuit à 37°C.

II . 2 . 5 . Identification des clones recombinés

Les clones bactériens résistants à l'ampicilline, porteurs du plasmide, sont ensemencés dans 2ml de milieu LB+Ampicilline et mis en culture une nuit à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique est ensuite extrait à l'aide du kit *Wizard Plasmid extraction kit* (Promega, USA) selon le protocole du fabricant. Ce kit opère par lyse alcaline, puis capture de l'ADN par un gel de Guanidium. Les clones porteurs du plasmide recombiné sont identifiés par hydrolyse enzymatique et électrophorèse en gel d'agarose.

II . 2 . 6 . Purification d'ADN plasmidique.

Les extractions d'ADN plasmidique sont effectuées à l'aide de kits par lyse alcaline et capture de l'ADN par une résine composée de billes ayant une forte affinité pour celui-ci. Selon la quantité de plasmide à préparer on utilise les kits *Quiagen* (USA) qui permettent de purifier de grandes quantités de plasmide ou le kit *Wizard* (Promega, USA) pour les minipréparations, selon le protocole décrit dans le kit . Ces systèmes permettent de récupérer rapidement un ADN très pur.

II . 3 . Construction des vecteurs plasmidiques pcDNA3-EGFP et PCDNA3- β -Galactosidase

II . 3 . 1 . Le pcDNA3-EGFP

Le fragment de 769 pb correspondant à l'ADNc de l'EGFP a été récupéré après digestion par les enzymes EcoR1 et Not1 du plasmide *pEGFP1* (Clontech, USA) et a été ligaturé avec le vecteur pcDNA3-Zéo préalablement digéré par les mêmes enzymes. La ligature s'est effectuée dans un rapport molaire 1/1 avec le kit de ligature Ready-to Go (Pharmacia, USA)

Après transformation les clones bactériens porteurs des vecteurs recombinés ont été identifiés par extraction d'ADN (kit *Wizard*), digestion par les enzymes EcoR1 et Not1 et électrophorèse sur gel d'agarose, le résultat attendu étant les deux bandes ligaturées de 769pb et 5000pb. Le vecteur pcDNA3-EGFP est représenté sur la figure 4M.

II . 3 . 2 . Le pcDNA3- β -Galactosidase

Ce vecteur, construit par M. Rodolphe Vereecque de l'INSERM U124, contient le gène de la β -Galactosidase sous la dépendance d'un promoteur CMV.

II . 4 . Transfection des cellules tumorales ex-vivo.

II . 4 . 1 . Transfection par Electroporation.

L'électroporation est une méthode de transfection qui a pour but de perméabiliser les cellules en créant des pores suite à une décharge électrique (Potter *et al.* 1984). L'amplitude de la décharge est dépendante de la tension et de la capacitance d'un condensateur. L'appareillage utilisé: *Easy Ject+* de la société Eurogentec (USA).

La transfection s'effectue sur 5.10^5 cellules rincées et remises en suspension dans du milieu de culture sans sérum. Celles-ci sont introduites avec $10\mu\text{g}$ de plasmide dans les cuves d'électroporation et sont soumises, dans les conditions optimums, à la décharge électrique de 270V d'une capacité de $1500\mu\text{F}$. Les cellules sont ensuite remises en culture dans 5 ml de milieu.

II . 4 . 2 . Transfection chimique.

La transfection par la *Lipofectamine* s'effectue par mélange de 6 à $12,5\ \mu\text{l}$ de cette solution avec $2\mu\text{g}$ d'ADN plasmidique suivi d'une incubation de 5h à 37°C avec 600 000 cellules dans $200\mu\text{l}$ de milieu de culture sans sérum selon le protocole du fabricant (Gibco BRL, USA).

La transfection par les PEI de 22 et de 800kDa a été effectuée sur 300 000 cellules dans $100\mu\text{l}$ de milieu de culture sans sérum de veau fœtal et 4h d'incubation à 37°C . Le polymère cationique est mélangé à l'ADN plasmidique dans les proportion optimums à partir d'une solution mère diluée dans l'eau à 10mM et équilibrée à pH7. Les proportions optimums ont été définies dans nos résultats.

Après transfection par ces deux vecteurs, les cellules sont rincées trois fois avec le milieu de culture des cellules et remises en culture.

L'expression du transgène est évaluée 48h après la transfection.

II . 4 . 3 . Transfection adénovirale.

Après comptage, 3.10^6 cellules sont rincées deux fois dans une solution de PBS 1X (Dulbecco's, USA) et remises en suspension dans 500 μ l de leur milieu de culture respectif en présence d'un nombre déterminé de particules adénovirales correspondant à des multiplicités d'infection (MOI) de 20, 50, 100 ou 200 particules physiques actives (pfu). Les cellules sont incubées pendant 1h à 37°C, puis le volume est ajusté à 3ml avec du milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 10^6 cellules par ml. Après 24h de culture les cellules sont rincées dans une solution de PBS et remises en culture dans du milieu frais à la même concentration. La correspondance entre la MOI en pfu et le nombre de particules physiques pour chaque vecteur est représenté sur le tableau 5M.

MOI	10	50	100	200
Nombre de particules physiques AdZ.F(pK7)	1600	4200	8400	16800
Nombre de particules physiques AdZ.F	427	1400	2800	5600

Tableau 5M : Correspondance entre la MOI et le nombre de particules physiques pour les vecteurs AdZ.F(pK7) et AdZ.F.

II . 5 . Inhibition de la transfection adénovirale.

II . 5 . 1 . Inhibition compétitive.

Inhibition par l'Héparine : Les particules adénovirales sont incubées pendant 1h dans 100µl de PBS 1X complémenté de 1mg/ml d'Héparine avant la transfection des cellules.

Inhibition par la Fibre adénovirale recombinée : Les cellules sont incubées pendant une heure dans 500µl de PBS 1X complémenté de 3µg/ml de fibre recombinée puis centrifugées avant d'être transfectées.

II . 5 . 2 . Inhibition enzymatique.

Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées pendant 1h à 37°C avec 0,1 UI/ml d'Héparinase-I (Sigma, USA) dans du PBS à pH 7,6 ou avec 0,1UI/ml de Neuraminidase (Sigma, USA) dans du milieu *DMEM* à pH 7. Après traitement les cellules sont rincées trois fois avec le milieu de culture des cellules, remises en culture ou transfectées.

II . 6 . Techniques d'analyse.

II . 6 . 1 . Cytométrie en flux

Les échantillons sont analysés sur un cytofluorometre *EPICS XL-3C* (Coulter, USA).

II . 6 . 1 . 1 . Analyse de l'activité β -Galactosidase

L'activité β -Galactosidase est analysée à l'aide du kit Cell Probe Gal.Galactosidase system (Coulter, USA) selon le protocole du fabricant. Ce système est basé sur l'hydrolyse du Digalactopyranoside-fluoroscéine (FDG) par la β -Galactosidase qui libère une molécule de Fluoroscéine détectable en cytométrie en flux et en microscopie à fluorescence à une longueur d'onde de 530nm après excitation à 488nm.

II . 6 . 1 . 2 . Marquage immunofluorescent.

Cette technique permet de détecter et de mesurer l'expression de certaines molécules, à la surface des cellules par un marquage avec des anticorps fluorescents.

Les cellules sont rincées 2 fois avec une solution de PBS 1X, incubées 30mn à 4°C dans 100 μ l de la même solution avec la dose d'anticorps conseillée par le fabricant, rincées 2 fois dans une solution de PBS, puis remises en suspension dans 1ml de ce tampon afin d'être analysées. Pour chaque échantillon à analyser 2 marquages sont effectués, le premier avec un anticorps contrôle négatif de même fluorochrome et isotype que l'anticorps spécifique, le deuxième avec l'anticorps spécifique dirigé contre l'antigène d'intérêt.

II . 6 . 1 . 3 . Analyse de la fluorescence de l'EGFP

La GFP étant naturellement fluorescente à 530nm, son activité est mesurée directement en cytométrie en flux et en microscopie à fluorescence, les cellules étant préalablement rincées et remises en suspension ou montées sur lame.

II . 6 . 2 . Microscopie à fluorescence

Cette technique permet de visualiser et de confirmer les résultats obtenus en cytométrie en flux et en outre de localiser en partie le marquage cellulaire.

Les cellules sont soumises au même protocole que pour la cytométrie en flux, puis à raison de 50 000 cellules dans un volume de 100µl elles sont centrifugées dans une centrifugeuse *CYTOSPIN* (Shandon, GB) à 700 tours pendant 5mn afin d'être déposées sur lame. Les cellules montées sur lame sont recouvertes d'une solution de montage *Vectashiel* (Vector, GB) qui homogénéise le milieu optique et élimine la fluorescence parasite. Les préparations sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence *LEITZ* (Allemagne) connecté à une caméra reliée à un ordinateur qui permet d'analyser les images à l'aide du système *VYSIS*.

II . 6 . 3 . Analyse de l'activité β -Galactosidase par Coloration des cellules au X-Gal

Les cellules transfectées par un vecteur porteur du gène LacZ sont visualisées en microscopie photonique, l'expression de la β -Galactosidase leur confère la propriété d'hydrolyser le X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-b-D-Galactopyranoside) qui les colore en bleu après incubation dans cette solution .

Les cellules sont rincées deux fois dans une solution de PBS 1X, fixées 10mn dans une solution de Glutaraldehyde à 2%, rincées deux fois dans la solution de PBS et incubées 1h à 37°C dans une solution de X-Gal (0,2% X-Gal, 1mM MgCl₂, 150mM NaCl, 3,3mM K₄Fe(CN)₆, 3,3 K₃Fe(CN)₆, 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄).

Bibliographie

- Abe, T., M. Ito, Y. Okamoto, H.J. Kim, Y. Takaue, K. Yasutomo, A. Makimoto, T. Yamaue, Y. Kawano, T. Watanabe, T. Shimada, and Y. Kuroda. 1997. Transduction of retrovirus-mediated NeoR gene into CD34+ cells purified from granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized infant and cord blood [see comments].
Exp Hematol **25**: 966-71.
- Aiello, L., R. Guilfoyle, K. Huebner, and R. Weinmann. 1979. Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293).
Virology **94**: 460-9.
- Alexander, L., H. Lee, M. Rosenzweig, J.U. Jung, and R.C. Desrosiers. 1997. EGFP-containing vector system that facilitates stable and transient expression assays.
Biotechniques **23**: 64-6.
- Anderson, R., I. Macdonald, T. Corbett, G. Hacking, M.W. Lowdell, and H.G. Prentice. 1997. Construction and biological characterization of an interleukin-12 fusion protein (Flexi-12): delivery to acute myeloid leukemic blasts using adeno-associated virus.
Hum Gene Ther **8**: 1125-35.
- Bartholomew, R.M., A.F. Esser, and H.J. Muller-Eberhard. 1978. Lysis of oncornaviruses by human serum. Isolation of the viral complement (C1) receptor and identification as p15E.
J Exp Med **147**: 844-53.
- Baum, C., H.G. Eckert, M. Stockschlader, U. Just, S. Hegewisch-Becker, M. Hildinger, A. Uhde, J. John, and W. Ostertag. 1996. Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection.
J Hematother **5**: 323-9.
- Bergelson, J.M., J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, and R.W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.
Science **275**: 1320-3.
- 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**: 415-9.

- Bodine, D.M., C.E. Dunbar, L.J. Girard, N.E. Seidel, A.P. Cline, R.E. Donahue, and D. Orlic. 1998. Improved amphotropic retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells.
Ann N Y Acad Sci **850**: 139-50.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.
Proc Natl Acad Sci USA **92**: 7297-301.
- Bramson, J., M. Hitt, W.S. Gallichan, K.L. Rosenthal, J. Gauldie, and F.L. Graham. 1996. Construction of a double recombinant adenovirus vector expressing a heterodimeric cytokine: in vitro and in vivo production of biologically active interleukin-12. *Hum Gene Ther* **7**: 333-42.
- Bramson, J.L., F.L. Graham, and J. Gauldie. 1995. The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo.
Curr Opin Biotechnol **6**: 590-5.
- Burns, J.C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, and J.K. Yee. 1993. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [see comments].
Proc Natl Acad Sci USA **90**: 8033-7.
- Byun, J., S.H. Kim, J.M. Kim, S.S. Yu, P.D. Robbins, J. Yim, and S. Kim. 1996. Analysis of the relative level of gene expression from different retroviral vectors used for gene therapy.
Gene Ther **3**: 780-8.
- Cantwell, M.J., S. Sharma, T. Friedmann, and T.J. Kipps. 1996. Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells.
Blood **88**: 4676-83.
- Challita, P.M. and D.B. Kohn. 1994. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo.
Proc Natl Acad Sci USA **91**: 2567-71.

- Challita, P.M., D. Skelton, A. el-Khoueiry, X.J. Yu, K. Weinberg, and D.B. Kohn. 1995. Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells.
J Virol **69**: 748-55.
- Cheng, L., C. Du, C. Lavau, S. Chen, J. Tong, B.P. Chen, R. Scollay, R.G. Hawley, and B. Hill. 1998. Sustained gene expression in retrovirally transduced, engrafting human hematopoietic stem cells and their lympho-myeloid progeny.
Blood **92**: 83-92.
- Cheng, L., C. Du, D. Murray, X. Tong, Y.A. Zhang, B.P. Chen, and R.G. Hawley. 1997. A GFP reporter system to assess gene transfer and expression in human hematopoietic progenitor cells.
Gene Ther **4**: 1013-22.
- Chiorini, J.A., C.M. Wendtner, E. Urcelay, B. Safer, M. Hallek, and R.M. Kotin. 1995. High-efficiency transfer of the T cell co-stimulatory molecule B7-2 to lymphoid cells using high-titer recombinant adeno-associated virus vectors.
Hum Gene Ther **6**: 1531-41.
- Chung, C.S., J.C. Hsiao, Y.S. Chang, and W. Chang. 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate.
J Virol **72**: 1577-85.
- Clesham, G.J., P.J. Adam, D. Proudfoot, P.D. Flynn, S. Efstathiou, and P.L. Weissberg. 1998. High adenoviral loads stimulate NF kappaB-dependent gene expression in human vascular smooth muscle cells.
Gene Ther **5**: 174-80.
- Cohen-Haguenaer, O., L.M. Restrepo, M. Masset, J. Bayer, L. Dal Cortivo, J.P. Marolleau, M. Benbunan, M. Boiron, and M. Marty. 1998. Efficient transduction of hemopoietic CD34+ progenitors of human origin using an original retroviral vector derived from Fr-MuLV-FB29: in vitro assessment.
Hum Gene Ther **9**: 207-16.
- Cohen-Haguenaer, O., L.M. Restrepo, M. Masset, J. Bayer, N. Pellerain, L. dal Cortivo, J.P. Marolleau, M. Benbunan, M. Boiron, and M. Marty. 1996. Transduction of human CD34+ haemopoietic progenitors of various origin using an original retrovirus vector derived from Fr-MuLV and clinically relevant procedures.
Hematol Cell Ther **38**: 205-6.

- Cosset, F.L., Y. Takeuchi, J.L. Battini, R.A. Weiss, and M.K. Collins. 1995. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* **69**: 7430-6.
- Davis, J.L., R.M. Witt, P.R. Gross, C.A. Hokanson, S. Jungles, L.K. Cohen, O. Danos, and S.K. Spratt. 1997. Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies. *Hum Gene Ther* **8**: 1459-67.
- Devereux, S., C. Corney, C. Macdonald, M. Watts, A. Sullivan, A.H. Goldstone, M. Ward, A. Bank, and D.C. Linch. 1998. Feasibility of multidrug resistance (MDR-1) gene transfer in patients undergoing high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma. *Gene Ther* **5**: 403-8.
- Dilloo, D., D. Rill, C. Entwistle, M. Boursnell, W. Zhong, W. Holden, M. Holladay, S. Inglis, and M. Brenner. 1997. A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* **89**: 119-27.
- Douglas, J.T., B.E. Rogers, M.E. Rosenfeld, S.I. Michael, M. Feng, and D.T. Curiel. 1996. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol* **14**: 1574-8.
- Dunussi-Joannopoulos, K., G. Dranoff, H.J. Weinstein, J.L. Ferrara, B.E. Bierer, and J.M. Croop. 1998. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood* **91**: 222-30.
- Dunussi-Joannopoulos, K., H.J. Weinstein, P.W. Nickerson, T.B. Strom, S.J. Burakoff, J.M. Croop, and R.J. Arceci. 1996. Irradiated B7-1 transduced primary acute myelogenous leukemia (AML) cells can be used as therapeutic vaccines in murine AML. *Blood* **87**: 2938-46.
- Floch, V., G. Le Bolc'h, M.P. Audrezet, J.J. Yaouanc, J.C. Clement, H. des Abbayes, B. Mercier, J.F. Abgrall, and C. Ferec. 1997. Cationic phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection in hematopoietic cell lines and CD34+ cells. *Blood Cells Mol Dis* **23**: 69-87.

- Friel, J., D. Hughes, I. Pragnell, C. Stocking, C. Laker, J. Nowock, W. Ostertag, and R.A. Padua. 1990. The malignant histiocytosis sarcoma virus, a recombinant of Harvey murine sarcoma virus and Friend mink cell focus-forming virus, has acquired myeloid transformation specificity by alterations in the long terminal repeat.
J Virol **64**: 369-78.
- Gao, X. and L. Huang. 1995. Cationic liposome-mediated gene transfer.
Gene Ther **2**: 710-22.
- Goldman, C.K., B.E. Rogers, J.T. Douglas, B.A. Sosnowski, W. Ying, G.P. Siegal, A. Baird, J.A. Campaign, and D.T. Curiel. 1997. Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor.
Cancer Res **57**: 1447-51.
- Goodman, S., X. Xiao, R.E. Donahue, A. Moulton, J. Miller, C. Walsh, N.S. Young, R.J. Samulski, and A.W. Nienhuis. 1994. Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into hematopoietic progenitor cells [published erratum appears in *Blood* 1995 Feb 1;85(3):862].
Blood **84**: 1492-500.
- Greber, U.F., M. Suomalainen, R.P. Stidwill, K. Boucke, M.W. Ebersold, and A. Helenius. 1997. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry.
Embo J **16**: 5998-6007.
- Grez, M., E. Akgun, F. Hilberg, and W. Ostertag. 1990. Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells.
Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 9202-6.
- Hall, S.J., M.A. Sanford, G. Atkinson, and S.H. Chen. 1998. Induction of potent antitumor natural killer cell activity by herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir therapy in an orthotopic mouse model of prostate cancer.
Cancer Res **58**: 3221-5.
- Hanazono, Y., J.M. Yu, C.E. Dunbar, and R.V. Emmons. 1997. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage.
Hum Gene Ther **8**: 1313-9.
- Hawley, R.G., A.Z. Fong, B.F. Burns, and T.S. Hawley. 1992. Transplantable myeloproliferative disease induced in mice by an interleukin 6 retrovirus.
J Exp Med **176**: 1149-63.

- Hirst, W.J., A. Buggins, D. Darling, J. Gaken, F. Farzaneh, and G.J. Mufti. 1997. Enhanced immune costimulatory activity of primary acute myeloid leukaemia blasts after retrovirus-mediated gene transfer of B7.1.
Gene Ther 4: 691-9.
- 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: 2294-306.
- Huang, M.R., M. Olsson, A. Kallin, U. Pettersson, and T.H. Totterman. 1997. Efficient adenovirus-mediated gene transduction of normal and leukemic hematopoietic cells.
Gene Ther 4: 1093-9.
- Huang, S., R.I. Endo, and G.R. Nemerow. 1995. Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery.
J Virol 69: 2257-63.
- Huang, S., T. Kamata, Y. Takada, Z.M. Ruggeri, and G.R. Nemerow. 1996. Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells.
J Virol 70: 4502-8.
- Jaffee, E.M., G. Dranoff, L.K. Cohen, K.M. Hauda, S. Clift, F.F. Marshall, R.C. Mulligan, and D.M. Pardoll. 1993. High efficiency gene transfer into primary human tumor explants without cell selection.
Cancer Res 53: 2221-6.
- Johnson, P.A., A. Miyanojara, F. Levine, T. Cahill, and T. Friedmann. 1992. Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1.
J Virol 66: 2952-65.
- Jolly, D. 1994. Viral vector systems for gene therapy.
Cancer Gene Ther 1: 51-64.
- Kavanaugh, M.P., D.G. Miller, W. Zhang, W. Law, S.L. Kozak, D. Kabat, and A.D. Miller. 1994. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters.
Proc Natl Acad Sci U S A 91: 7071-5.

- Keating, A. and F. Toneguzzo. 1990. Gene transfer by electroporation: a model for gene therapy.
Prog Clin Biol Res **333**: 491-8.
- Kempler, G., B. Freitag, B. Berwin, O. Nanassy, and E. Barklis. 1993. Characterization of the Moloney murine leukemia virus stem cell- specific repressor binding site.
Virology **193**: 690-9.
- Kopantzev, E., V. Roschke, and S. Rudikoff. 1998. Interleukin-2-mediated modulation of plasma cell tumor growth in a model of multiple myeloma [see comments].
Hum Gene Ther **9**: 13-9.
- Kovesdi, I., D.E. Brough, J.T. Bruder, and T.J. Wickham. 1997. Adenoviral vectors for gene transfer.
Curr Opin Biotechnol **8**: 583-9.
- 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**: 1844-52.
- Krasnykh, V.N., G.V. Mikheeva, J.T. Douglas, and D.T. Curiel. 1996. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism.
J Virol **70**: 6839-46.
- Lam, J.S., M.E. Reeves, R. Cowherd, S.A. Rosenberg, and P. Hwu. 1996. Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope.
Hum Gene Ther **7**: 1415-22.
- Lee, M.G., M.A. Abina, H. Haddada, and M. Perricaudet. 1995. The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1- , E3- adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector.
Gene Ther **2**: 256-62.
- Li, Y., E. Golemis, J.W. Hartley, and N. Hopkins. 1987. Disease specificity of nondefective Friend and Moloney murine leukemia viruses is controlled by a small number of nucleotides.
J Virol **61**: 693-700.

- Lu, M., N. Zhang, M. Maruyama, R.G. Hawley, and A.D. Ho. 1996. Retrovirus-mediated gene expression in hematopoietic cells correlates inversely with growth factor stimulation.
Hum Gene Ther 7: 2263-71.
- Lubovy, M., S. McCune, J.Y. Dong, J.F. Prchal, T.M. Townes, and J.T. Prchal. 1996. Stable transduction of recombinant adeno-associated virus into hematopoietic stem cells from normal and sickle cell patients.
Biol Blood Marrow Transplant 2: 24-30.
- Malik, P., W.J. Krall, X.J. Yu, C. Zhou, and D.B. Kohn. 1995. Retroviral-mediated gene expression in human myelomonocytic cells: a comparison of hematopoietic cell promoters to viral promoters.
Blood 86: 2993-3005.
- Malik, P., S.A. McQuiston, X.J. Yu, K.A. Pepper, W.J. Krall, G.M. Podsakoff, G.J. Kurtzman, and D.B. Kohn. 1997. Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line.
J Virol 71: 1776-83.
- Matthews, K.E., S.B. Dev, F. Toneguzzo, and A. Keating. 1995. Electroporation for gene therapy.
Methods Mol Biol 48: 273-80.
- Matulonis, U., C. Dosiou, G. Freeman, C. Lamont, P. Mauch, L.M. Nadler, and J.D. Griffin. 1996. B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct.
J Immunol 156: 1126-31.
- Matulonis, U.A., C. Dosiou, C. Lamont, G.J. Freeman, P. Mauch, L.M. Nadler, and J.D. Griffin. 1995. Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells.
Blood 85: 2507-15.
- Mazurier, F., F. Moreau-Gaudry, V. Maguer-Satta, S. Salesse, V. Pigeonnier-Lagarde, C. Ged, F. Belloc, F. Lacombe, F.X. Mahon, J. Reiffers, and H. de Verneuil. 1998. Rapid analysis and efficient selection of human transduced primitive hematopoietic cells using the humanized S65T green fluorescent protein.
Gene Ther 5: 556-62.

- Mentel, R., G. Dopping, U. Wegner, W. Seidel, H. Liebermann, and L. Dohner. 1997. Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes. *J Med Virol* **51**: 252-7.
- Miller, A.D. and G.J. Rosman. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **7**: 980-2, 984-6, 989-90.
- Miyake, H., I. Hara, K. Gohji, K. Yamanaka, S. Arakawa, and S. Kamidono. 1998. Enhancement of chemosensitivity in human bladder cancer cells by adenoviral-mediated p53 gene transfer. *Anticancer Res* **18**: 3087-92.
- Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, and D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]. *Science* **272**: 263-7.
- Obaru, K., S. Fujii, S. Matsushita, T. Shimada, and K. Takatsuki. 1996. Gene therapy for adult T cell leukemia using human immunodeficiency virus vector carrying the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Hum Gene Ther* **7**: 2203-8.
- Orlic, D., L.J. Girard, C.T. Jordan, S.M. Anderson, A.P. Cline, and D.M. Bodine. 1996. The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11097-102.
- Ozawa, K. 1995. [Gene transfer into hematopoietic stem cells]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **40**: 2732-8.
- Pahl, H.L., T.C. Burn, and D.G. Tenen. 1991. Optimization of transient transfection into human myeloid cell lines using a luciferase reporter gene. *Exp Hematol* **19**: 1038-41.
- Piacibello, W., L. Fubini, F. Sanavio, M.F. Brizzi, A. Severino, L. Garetto, A. Stacchini, L. Pegoraro, and M. Aglietta. 1995. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* **86**: 4105-14.

- Porter, C.D., M.K. Collins, C.S. Taylor, M.H. Parkar, F.L. Cosset, R.A. Weiss, and Y. Takeuchi. 1996. Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors.
Hum Gene Ther **7**: 913-9.
- Potter, H., L. Weir, and P. Leder. 1984. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation.
Proc Natl Acad Sci U S A **81**: 7161-5.
- Prendergast, F.G. and K.G. Mann. 1978. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*.
Biochemistry **17**: 3448-53.
- Prince, H.M., S. Dessureault, S. Gallinger, M. Krajden, D.R. Sutherland, C. Addison, Y. Zhang, F.L. Graham, and A.K. Stewart. 1998. Efficient adenovirus-mediated gene expression in malignant human plasma cells: relative lymphoid cell resistance.
Exp Hematol **26**: 27-36.
- Ramiro, A.R., V.G. De Yebenes, C. Trigueros, Y.R. Carrasco, and M.L. Toribio. 1998. Enhanced green fluorescent protein as an efficient reporter gene for retroviral transduction of human multipotent lymphoid precursors.
Hum Gene Ther **9**: 1103-9.
- Rawstron, A.C., R.G. Owen, F.E. Davies, R.J. Johnson, R.A. Jones, S.J. Richards, P.A. Evans, J.A. Child, G.M. Smith, A.S. Jack, and G.J. Morgan. 1997. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage.
Br J Haematol **97**: 46-55.
- Remy, J.S., A. Kichler, V. Mordvinov, F. Schuber, and J.P. Behr. 1995. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses.
Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 1744-8.
- Rizzo, M.G., A. Zepparoni, B. Cristofanelli, R. Scardigli, M. Crescenzi, G. Blandino, S. Giuliacci, S. Ferrari, S. Soddu, and A. Sacchi. 1998. Wt-p53 action in human leukaemia cell lines corresponding to different stages of differentiation.
Br J Cancer **77**: 1429-38.
- Roe, T., T.C. Reynolds, G. Yu, and P.O. Brown. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis.
Embo J **12**: 2099-108.

- Rogers, B.E., J.T. Douglas, C. Ahlem, D.J. Buchsbaum, J. Frincke, and D.T. Curiel. 1997. Use of a novel cross-linking method to modify adenovirus tropism. *Gene Ther* **4**: 1387-92.
- Ropp, J.D., C.J. Donahue, D. Wolfgang-Kimball, J.J. Hooley, J.Y. Chin, R.A. Hoffman, R.A. Cuthbertson, and K.D. Bauer. 1995. Aequorea green fluorescent protein analysis by flow cytometry. *Cytometry* **21**: 309-17.
- Rother, R.P., W.L. Fodor, J.P. Springhorn, C.W. Birks, E. Setter, M.S. Sandrin, S.P. Squinto, and S.A. Rollins. 1995. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med* **182**: 1345-55.
- Sabatino, D.E., B.Q. Do, L.C. Pyle, N.E. Seidel, L.J. Girard, S.K. Spratt, D. Orlic, and D.M. Bodine. 1997. Amphotropic or gibbon ape leukemia virus retrovirus binding and transduction correlates with the level of receptor mRNA in human hematopoietic cell lines. *Blood Cells Mol Dis* **23**: 422-33.
- Saggio, I., L. Ciapponi, R. Savino, G. Ciliberto, and M. Perricaudet. 1997. Adenovirus-mediated gene transfer of a human IL-6 antagonist. *Gene Ther* **4**: 839-45.
- Sanderson, R.D., P. Lalor, and M. Bernfield. 1989. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* **1**: 27-35.
- Schiedner, G., N. Morral, R.J. Parks, Y. Wu, S.C. Koopmans, C. Langston, F.L. Graham, A.L. Beaudet, and S. Kochanek. 1998. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity [published erratum appears in *Nat Genet* 1998 Mar;18(3):298]. *Nat Genet* **18**: 180-3.
- Schwarzenberger, P., S.E. Spence, J.M. Gooya, D. Michiel, D.T. Curiel, F.W. Ruscetti, and J.R. Keller. 1996. Targeted gene transfer to human hematopoietic progenitor cell lines through the c-kit receptor. *Blood* **87**: 472-8.
- Sommerfelt, M.A., C.R. Roberts, and E. Hunter. 1993. Expression of simian type D retroviral (Mason-Pfizer monkey virus) capsids in insect cells using recombinant baculovirus. *Virology* **192**: 298-306.

- Sommerfelt, M.A. and R.A. Weiss. 1990. Receptor interference groups of 20 retroviruses plating on human cells.
Virology **176**: 58-69.
- Sommerfelt, M.A., B.P. Williams, A. McKnight, P.N. Goodfellow, and R.A. Weiss. 1990. Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19.
J Virol **64**: 6214-20.
- Soussi, T. 1997. [Tumor suppressor p53 gene: a potential target for cancer therapy?].
Bull Cancer **84**: 753-6.
- Speck, N.A., B. Renjifo, E. Golemis, T.N. Fredrickson, J.W. Hartley, and N. Hopkins. 1990. Mutation of the core or adjacent LVb elements of the Moloney murine leukemia virus enhancer alters disease specificity.
Genes Dev **4**: 233-42.
- Sperling, C., S. Schwartz, T. Buchner, E. Thiel, and W.D. Ludwig. 1997. Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias.
Haematologica **82**: 617-21.
- Spiller, D.G., R.V. Giles, J. Grzybowski, D.M. Tidd, and R.E. Clark. 1998. Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cells: a comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation.
Blood **91**: 4738-46.
- 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**: 4782-90.
- Stopeck, A.T., E.M. Hersh, J.L. Brailey, P.R. Clark, J. Norman, and S.E. Parker. 1998. Transfection of primary tumor cells and tumor cell lines with plasmid DNA/lipid complexes.
Cancer Gene Ther **5**: 119-26.
- Sun, R.X., Z.Y. Lu, J. Wijdenes, J. Brochier, C. Hertog, J.F. Rossi, and B. Klein. 1997. Large scale and clinical grade purification of syndecan-1+ malignant plasma cells.
J Immunol Methods **205**: 73-9.
- Takahashi, M., T. Furukawa, K. Nikkuni, A. Aoki, N. Nomoto, T. Koike, Y. Moriyama, S. Shinada, and A. Shibata. 1991. Efficient introduction of a gene into hematopoietic cells in S-phase by electroporation.
Exp Hematol **19**: 343-6.

- Takeuchi, Y., F.L. Cosset, P.J. Lachmann, H. Okada, R.A. Weiss, and M.K. Collins. 1994. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* **68**: 8001-7.
- Takeuchi, Y., C.D. Porter, K.M. Strahan, A.F. Preece, K. Gustafsson, F.L. Cosset, R.A. Weiss, and M.K. Collins. 1996. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase. *Nature* **379**: 85-8.
- Tan, Y., M. Xu, W. Wang, F. Zhang, D. Li, X. Xu, J. Gu, and R.M. Hoffman. 1996. IL-2 gene therapy of advanced lung cancer patients. *Anticancer Res* **16**: 1993-8.
- Tani, K., H. Hibino, A. Nakazaki, T. Hayashi, K. Ikebuchi, and S. Asano. 1995a. [Development of gene therapy using hematolymphopoietic cells]. *Rinsho Ketsueki* **36**: 543-6.
- Tani, K., T. Lin, H. Hibino, K. Takahashi, Y. Nakazaki, S. Takahashi, H. Nagayama, K. Ozawa, I. Saitoh, R. Mulligan, and *et al.* 1995b. Transduction of LacZ gene into leukemia cells using viral vectors of retrovirus and adenovirus. *Leukemia* **9 Suppl 1**: S64-5.
- Toggas, S.M., E. Masliah, E.M. Rockenstein, G.F. Rall, C.R. Abraham, and L. Mucke. 1994. Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice [see comments]. *Nature* **367**: 188-93.
- 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**: 3352-6.
- Toneguzzo, F., A.C. Hayday, and A. Keating. 1986. Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol Cell Biol* **6**: 703-6.
- Veelken, H., H. Jesuiter, A. Mackensen, P. Kulmburg, J. Schultze, F. Rosenthal, R. Mertelsmann, and A. Lindemann. 1994. Primary fibroblasts from human adults as target cells for ex vivo transfection and gene therapy. *Hum Gene Ther* **5**: 1203-10.

- von Kalle, C., H. Glimm, G. Schulz, R. Mertelsmann, and R. Henschler. 1998. New developments in hematopoietic stem cell expansion.
Curr Opin Hematol **5**: 79-86.
- Walther, W. and U. Stein. 1996. Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting.
J Mol Med **74**: 379-92.
- Wattel, E., M. Vanrumbeke, M.A. Abina, N. Cambier, C. Preudhomme, H. Haddada, and P. Fenaux. 1996. Differential efficacy of adenoviral mediated gene transfer into cells from hematological cell lines and fresh hematological malignancies.
Leukemia **10**: 171-4.
- Weber-Nordt, R., R. Mertelsmann, and R. Henschler. 1995. Hematopoietic cell proliferation and hematopoietic growth factors.
Curr Opin Hematol **2**: 309-21.
- Wei, C.M., M. Gibson, P.G. Spear, and E.M. Scolnick. 1981. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1.
J Virol **39**: 935-44.
- Weinberg, J.B., T.J. Matthews, B.R. Cullen, and M.H. Malim. 1991. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes.
J Exp Med **174**: 1477-82.
- Wendtner, C.M., A. Nolte, E. Mangold, R. Buhmann, G. Maass, J.A. Chiorini, E.L. Winnacker, B. Emmerich, R.M. Kotin, and M. Hallek. 1997. Gene transfer of the costimulatory molecules B7-1 and B7-2 into human multiple myeloma cells by recombinant adeno-associated virus enhances the cytolytic T cell response.
Gene Ther **4**: 726-35.
- Wickham, T.J., M.E. Carrion, and I. Kovesdi. 1995. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs.
Gene Ther **2**: 750-6.
- Wickham, T.J., D. Haskard, D. Segal, and I. Kovesdi. 1997a. Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation.
Cancer Immunol Immunother **45**: 149-51.

- Wickham, T.J., G.M. Lee, J.A. Titus, G. Sconocchia, T. Bakacs, I. Kovesdi, and D.M. Segal. 1997b. Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3.
J Virol **71**: 7663-9.
- Wickham, T.J., P. Mathias, D.A. Cheresch, and G.R. Nemerow. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment.
Cell **73**: 309-19.
- Wickham, T.J., P.W. Roelvink, D.E. Brough, and I. Kovesdi. 1996a. Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types.
Nat Biotechnol **14**: 1570-3.
- Wickham, T.J., D.M. Segal, P.W. Roelvink, M.E. Carrion, A. Lizonova, G.M. Lee, and I. Kovesdi. 1996b. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies.
J Virol **70**: 6831-8.
- Wickham, T.J., E. Tzeng, L.L. Shears, 2nd, P.W. Roelvink, Y. Li, G.M. Lee, D.E. Brough, A. Lizonova, and I. Kovesdi. 1997c. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins.
J Virol **71**: 8221-9.
- Wijdenes, J., W.C. Vooijs, C. Clement, J. Post, F. Morard, N. Vita, P. Laurent, R.X. Sun, B. Klein, and J.M. Dore. 1996. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1 [see comments].
Br J Haematol **94**: 318-23.
- Wilson, K.M., P.J. Stambrook, W.L. Bi, Z.P. Pavelic, L. Pavelic, and J.L. Gluckman. 1996. HSV-tk gene therapy in head and neck squamous cell carcinoma. Enhancement by the local and distant bystander effect.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg **122**: 746-9.
- Witzig, T.E., T. Kimlinger, M. Stenson, and T. Therneau. 1998. Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia [In Process Citation].
Leuk Lymphoma **31**: 167-75.
- Wu, D.D., R. Nayar, and A. Keating. 1994. Synergistic effect of stem cell factor with interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the proliferation of murine primitive hematopoietic progenitors.
Exp Hematol **22**: 495-500.

- Yajima, T., T. Kanda, K. Yoshiike, and Y. Kitamura. 1998. Retroviral vector targeting human cells via c-Kit-stem cell factor interaction.
Hum Gene Ther **9**: 779-87.
- Yang, Y., K.U. Jooss, Q. Su, H.C. Ertl, and J.M. Wilson. 1996. Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo.
Gene Ther **3**: 137-44.
- Yang, Y., Q. Li, H.C. Ertl, and J.M. Wilson. 1995. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses.
J Virol **69**: 2004-15.
- Yang, Y., F.A. Nunes, K. Berencsi, E. Gonczol, J.F. Engelhardt, and J.M. Wilson. 1994. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis.
Nat Genet **7**: 362-9.
- Yang, Y. and J.M. Wilson. 1995. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4⁺ CTLs in vivo.
J Immunol **155**: 2564-70.
- Yu, H., A.B. Rabson, M. Kaul, Y. Ron, and J.P. Dougherty. 1996. Inducible human immunodeficiency virus type 1 packaging cell lines.
J Virol **70**: 4530-7.
- Zhang, G., V. Gurtu, and S.R. Kain. 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells.
Biochem Biophys Res Commun **227**: 707-11.

ANNEXES

ANNEXE I

Increased gene transfer in acute myeloid leukemic cells by an adenovirus vector containing a modified fiber protein

Ricardo GONZALEZ¹, Rodolphe VEREECQUE¹, Thomas J. WICKHAM², Michael VANRUMBEKE¹, Imre KOVESDI², Francis BAUTERS³, Pierre FENAUX^{1,3}, Bruno QUESNEL^{1,3}

1- INSERM U124, IRCL, Lille, France

2- GenVec, Inc, Rockville, Maryland

3- Service des Maladies du Sang, CHU, Lille, France

Running title : Increased gene transfer in AML cells

Key words : Adenovirus, AML, Gene Therapy, Heparan sulfates

Correspondence :

**Dr Bruno Quesnel, Service des maladies du sang, CHU Lille, 1 Place de Verdun,
59037 Lille France.**

Phone : (33) 3 20 44 42 84

Fax : (33) 3 20 44 40 94

E mail : quesnel@lille.inserm.fr

Abstract

Applications of gene transfer in acute myeloid leukemia (AML) blast cells have still not been developed, mostly due to the lack of an efficient vector. Adenoviruses have many advantages as vectors, but remain poorly efficient in cells lacking fiber receptors. A promising strategy is the retargeting of adenoviruses to other cellular receptors. We report the dramatic enhancement of gene transfer efficiency in AML blasts using AdZ.F(pK7), a modified adenovirus containing a heparin/heparan sulfate binding domain incorporated into the fiber protein of the adenovirus. We have transduced 25 AML blast samples with efficiency reaching 100% of the cells in most samples. Optimal results were obtained at 8400 physical particles/cell, corresponding to a multiplicity of infection of 100 plaque forming units/cell. Control AdZ.F adenovirus efficiently transduced leukemic cell lines but gave poor results in AML samples. Both addition of soluble heparin and cell treatment with heparinase inhibited AdZ.F(pK7) gene transfer, showing that heparan sulfates are the major receptors mediating AdZ.F(pK7) transduction of AML blasts. Although adenoviruses can infect non dividing cells, we observed that a combination of growth factors (GM-CSF, IL3, stem cell factor) was required for efficient transduction in order to maintain AML blast cell viability. This study demonstrates that retargeting the adenovirus fiber protein to heparan sulfates can overcome the low efficiency of adenovirus in AML blast cells and may provide a useful tool for gene therapy approaches in AML.

Introduction

Therapeutic approaches using ex vivo immunological modification of malignant cells or bone marrow purging systems have not yet been widely investigated in hematological malignancies. One of the prerequisites to these applications is a safe vector that can achieve high efficiency ex-vivo gene transfer in leukemic cells, without major cytotoxicity. As non viral systems remain poorly efficient, different viruses have been tested for their ability to transduce leukemic cells. Retroviral vectors are able to transduce a wide range of hematopoietic cells, but they require proliferating cells, and their large scale production is labor intensive. Adenoviruses can introduce foreign genes in non replicating cells, generally do not integrate into the genome, can be produced at high titer, and have been widely used as vectors in various cell types. However, their ability to transduce hematopoietic cells remains controversial. Recent reports have described successful gene transfer with adenoviral vectors in dendritic or CD34 positive cells but other groups have reported low transfer efficiency in bone marrow cells.¹⁻⁷ Adenoviruses could achieve significant gene transfer in myeloma, chronic myeloid leukemia (CML) and activated chronic lymphoid leukemia (CLL) cells, and we previously reported the poor ability of adenovirus vectors to transduce acute myeloid leukemia (AML) cells.⁸⁻¹⁰

Adenoviruses infect host cells after viral attachment mediated by the knob domain of the fiber protein and two distinct cellular receptors, the α_2 domain of the major histocompatibility complex (MHC) class I, and the recently described coxsackie virus-Ad receptor (CAR).¹¹⁻¹³ However, this receptor is weakly expressed on peripheral blood cells.¹³ Additionally, hematological cells, except CLL cells activated with CD154 or IL4 and monocytes activated with GM-CSF or M-CSF, express low levels of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins, which mediate adenovirus internalization via an RGD motif by binding to the adenoviral penton base.^{14, 15}

Different strategies to expand adenovirus tropism to many tissues have been recently developed. A recent report showed that adenovirus gene delivery to dendritic cells, which express α_v integrins, was greatly enhanced by combining liposomes with the adenoviruses, suggesting that the poor efficiency of adenovirus gene delivery in hematopoietic cells can be overcome by enhancement of virus internalization.¹⁶

Another strategy is the retargeting of viral attachment via other cellular receptors than class I MHC or CAR. Wickham et al described a new adenoviral vector AdZ.F(pK7) containing a modified fiber protein where polylysine had been added to the C-terminal end of the fiber.^{17, 18} This vector, through binding of polylysines to heparan sulfate containing receptors could increase virus adsorption and gene transfer efficiency in cell types expressing low level of adenovirus receptors. As hematopoietic stem cells express heparan sulfate containing receptors, we investigated the ability of AdZ.F(pK7) vector to achieve efficient gene transfer in primary cultured fresh AML blast cells.

Results

Gene delivery in cell lines

AdZ.F and AdZ.F(pK7) transduced HeLa cells with similar efficacy, confirming a previous report which showed that equal particle comparisons give equivalent transduction of cell lines which express high levels of CAR.¹⁷ The K562 cell line, known to be permissive for adenovirus infection was more efficiently transduced by AdZ.F(pK7) compared to AdZ.F ($p=0.01$, Student's t test) (Figure 1). However, AdZ.F transduced the HL 60 cell line slightly more efficiently than AdZ.F(pK7) but the difference was not significant ($p=0.19$, Student's t test).

Gene delivery in AML blast samples at growing virus doses

The incubation of 10 AML blast samples at different physical virus particle doses of AdZ.F or AdZ.F(pK7) showed that AdZ.F(pK7) transduced cells at considerably higher efficiency (Mann Whitney Rank test, $p<0.001$)(Figure 2A). At AdZ.F(pK7) virus doses greater than 8400 physical particles/cell (equivalent to 100 plaque forming units/cell (pfu)), transduction efficiency did not increase, and this dose was chosen for further experiments. Differences in active particle doses used with AdZ.F and AdZ.F(pK7) could not account for the greater efficiency of AdZ.F(pK7) because less pfu/cell of AdZ.F(pK7) than of the control AdZ.F were always used. Cytotoxicity measured 72 h after infection by blue dye exclusion assay was less than 5% at 8400 (100 pfu/cell) and 16800 (200 pfu/cell) AdZ.F (pK7) physical particles/cell.

Gene delivery in 25 AML samples.

Transduction of 25 AML samples with 8400 physical particles/cell (100 pfu/cell) showed that transduction was much more efficient with AdZ.F(pK7) than with AdZ.F. AdZ.F(pK7) gave a higher percentage of transduced cells (Student's t test, $p<0.001$)(Figure 3). 20/25 AML blast samples infected with AdZ.F(pK7) reached 90-100% FDG positive cells and 5/25 70-80% (mean 94.3 %, 70-100%). Only 3/25 AML blast samples infected with AdZ.F reached 45-75% FDG positive cells (mean 10.26 %, 0-74.7%).

The total number of cells increased between transduction and 3 days post-transduction in 15 cases, and remained stable in 10 cases, but these growth profiles had no influence on FDG test results. Cytotoxicity measured 72 h after transduction with both viruses was less than 5 % for each sample.

Long term transgene expression with AdZ.F(PK7)

Gene expression was also sequentially measured after transduction in 10 samples, during 20 days : transgene expression became detectable 24 hours after transduction with AdZ.F(pK7) or AdZ.F, and all AML samples transduced with AdZ.F(pK7) remained 90 % positive for FDG test in flow cytometry at day 15, but only 1 to 5 % of the cells remained positive when transduced with AdZ.F (Figure 4). After day 15, a rapid decrease of cell viability occurred and primary culture of AML cells could not be maintained longer than 3 weeks.

Growth factor requirement for transduction of AML cells with AdZ.F(pK7)

Primary culture of AML blasts samples with growth factors showed a rapid increase of cell count between day 3 and day 6, after which primary cultures could be maintained for two weeks with minor changes of cell proliferation (Figure 5B). As shown on Figure 5A, growth factors (SCF, IL3, GM-CSF) seemed to be required for transduction in AML samples tested with either AdZ.F(pK7) or AdZ.F ($p=0.02$, Student's t test). Transductions without growth factors resulted in low number of FDG positive cells, and a rapid decrease of cell viability.

Adenovirus competition experiments and enzymatic treatment

Incubation of 10 AML blast samples and HL60 leukemic cell line with heparin resulted in a strong inhibition of gene delivery by AdZ.F(pK7) ($p=0.001$, Student's t test), except in HL60 cell line, and had no effect on AdZ.F (Figure 6). As the polylysine tail of AdZ.F(pK7) could bind to many polyanions, we performed enzymatic digestion experiments. Preincubation of 5 AML samples with heparinase I and neuraminidase showed that enzymatic treatment with heparinase I dramatically reduced transduction efficiency with AdZ.F(pK7) but had no effect with AdZ.F ($p=0.01$, Student's t test) (Figure 7). Neuraminidase treatment did not affect transduction efficiency ($p=0.6$, Student's t test).

Heparinase I treatment of samples 7 and 8, which showed only minor difference of transduction by AdZ.F and AdZ.F(pK7), reduced AdZ.F(pK7) but not AdZ.F transduction efficiency. We also observed a moderate inhibition of AdZ.F(pK7) transduction efficiency with neuraminidase treatment (Figure 7). This suggested that AdZ.F(pK7) gene delivery in AML blasts was mediated mostly by heparan sulfates except in some samples where other negative charges could participate.

Discussion

Different groups have recently reported the construction of modified adenoviruses with extended tropism for a wide range of cell types. Strategies used have included replacement of the Ad5 knob domain by Ad3, binding of bispecific antibodies against penton and integrins, antibodies directed against the fiber covalently linked to a ligand, and addition to the knob domain of RGD sequences or polylysines.¹⁹⁻²⁴ We have shown in this work that the control AdZ.F adenovirus efficiently transduced myeloid leukemic cell lines but gave poor results in fresh AML samples. In contrast the AdZ.F(pK7) adenovirus containing a modified fiber protein transduced all AML samples in primary culture at relatively low virus particle concentration, with a gene transfer efficiency reaching 90-100% of the cells in 20 of the 25 samples tested. We also observed long term expression during 15 days in most samples transduced with AdZ.F(pK7), after which rapid loss of viability of AML cells in culture was observed. This long term expression obtained with AdZ.F(pK7) could be explained by the transduction efficiency of this vector but was also related to the low proliferation rate of AML cells in primary culture.

AdZ.F results were, however, somewhat better compared to our previous experience with a recombinant adenovirus where gene expression was driven by an RSV promoter, confirming reports which have established the lower activity of the RSV compared to the CMV promoter in hematopoietic cells.⁸

The only difference between AdZ.F(pK7) and AdZ.F was the addition of a string of seven lysines at the C-terminal end of the fiber protein.¹⁷ We were able to block AdZ.F(pK7) transduction of AML blasts with heparin and with heparinase I but not neuraminidase cell treatment. However, the HL60 promyelocytic cell line was transduced slightly better with AdZ.F, and heparin did not inhibit AdZ.F(pK7) gene delivery, suggesting that in this cell line, heparan sulfates are not required for adenovirus gene delivery.

Neuraminidase treatment affect AdZ.F(pK7) but not AdZ.F transduction of two samples which showed only moderate differences of efficiency between the two vectors, suggesting that in few samples other negative charges could participate. Thus the dramatic increase in gene transfer efficiency by AdZ.F(pK7) in AML blasts seems to be mostly related to an improvement of virus attachment by binding to heparan sulfate, as previously described in other cell types, including T cells, macrophages, endothelial and smooth muscle cells.¹⁷ It has been previously shown that AdZ.F(pK7) vector can infect cells lacking fiber receptors. In binding experiments, inhibition of AdZ.F(pK7) adsorption could be achieved only by addition of heparinase, but not chondroitinase or neuraminidase.¹⁸ Heparan sulfate associated receptors like FGF receptors are broadly expressed in hematopoietic cells.²⁵ Additionally, recent reports have found that heparan sulfates are also the receptors of adeno-associated virus type 2 and poxviruses.²⁶ Herpes viruses also bind to cell surface heparan during infection, and successful transduction of AML blasts has been reported with a herpes simplex vector.^{27, 28} Thus, modification of the fiber protein in order to target heparan sulfates extends the tropism of adenovirus vectors.

An important limitation of retrovirus vectors is that they require dividing cells, and therefore prolonged exposure of target cells with growth factors, which can induce cell differentiation, possibly modifying cell immunogenicity. In this study, we observed that, even though adenoviruses could transduce resting cells, the absence of GM-CSF, SCF, and IL3 resulted in poor gene transfer efficiency. Although these growth factors are strong inducers of α_v integrins, their improvement of gene transfer with AdZ.F(pK7) appeared to be mainly due to an improvement in cell viability which was very poor in absence in the absence of growth factors.²⁹ We also cannot rule out the possibility of an activation of the CMV promoter by growth factors. Furthermore, the high efficacy of AdZ.F(pK7) gene delivery allows very short culture times, limiting the duration of exposures to growth factors.

A major limitation of gene therapy in hematological malignancies was ,until now, the poor efficiency of currently available vectors able to transduce malignant cells. In this study, we have shown that the modified adenovirus AdZ.F(pK7) can mediate high level transduction in primary cultured AML blasts, without major cytotoxicity. This vector overcomes the low efficiency of adenoviruses in AML blasts, and retains the advantages of recombinant adenoviruses i.e. easy large scale production and storage and infection of resting cells. Therefore, AdZ.F(pK7) vector seems suitable for future gene therapy protocols in AML.

Material and Methods

AML blast cells and cell lines

Fresh cells were obtained from peripheral blood of 25 patients with AML classified according to French American British (FAB) criteria (1 M0, 5 M1, 4 M2, 5 M4, 5 M5, 3 AML post myelodysplastic syndromes, 2 AML post chronic myeloid leukemia), and with greater than 85% circulating blast cells. Blast cells were isolated by Ficoll Hypaque sedimentation, frozen in fetal calf serum (FCS) containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo) and stored in liquid nitrogen before use. After thawing, monocytes were removed by plastic adherence. T and B lymphocytes were depleted by magnetic Dynabeads CD3 and CD19 respectively (Dyna, Oslo, Norway), and AML cells were maintained in liquid culture in ISCOVE medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% FCS, 100 IU penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mmol/L L-Glutamine, 20 ng/ml human recombinant stem cell factor (SCF) (Amgen, Thousand Oaks, Ca), 8 ng/ml IL3 (Novartis, Basel, Switzerland), 20 ng/ml GM-CSF (Schering Plough, Levallois Perret, France), at 37°C with 5% CO₂. Culture medium was replaced every 3 days. K562 chronic myelogenous leukemia cell line, HL60 promyelocytic cell line, HeLa cell lines obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), were maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS (Life Technologies), 100 IU penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mmol/L L-Glutamine. Cells were tested for mycoplasma contamination using a mycoplasma PCR ELISA kit (Boehringer, Mannheim, Germany).

Construction of adenovirus vectors

Construction and production of chimeric AdZ.F(pK7) and control vector AdZ.F have been described previously.¹⁷ Briefly, AdZ.F containing the β-galactosidase gene under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter (GenVec, Inc, Rockville, Md) was grown in human embryonic kidney (293) cells. AdZ.F(pK7) was constructed by transfection into 293 cells of a transfer plasmid comprising an E4 sequence and a modified fiber gene encoding the fiber and a string of seven lysines at the C-terminal end of the fiber that allow high-affinity binding to heparin and heparan sulfate. 293 cells had been preincubated with the E1-, E3-, and E4- deleted AdZ.11A (GenVec), containing the β-galactosidase gene under the control of a CMV promoter.

Recombination of the E4+ transfer plasmid with the E4 deleted vector resulted in the rescue of an E1-, E3-, E4+ vector capable of replication in 293 cells. Both AdZ.F and AdZ.F(pK7) vectors were purified by plaque purification on 293 cells. The vectors were grown in 293 cells and purified by three successive bandings on a CsCl gradient followed by dialysis into 10 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ 3% sucrose.

Gene expression assay

Beta-galactosidase activity was measured with the CellProbe Gal.Galactosidase system (Coulter, Miami, FL), according to the manufacturer's recommendations. This system uses the property of fluorescein Di-galactopyranoside (FDG) to be hydrolysed by galactosidase to form a non fluorescent leaving group and fluorescein. Cells were analysed on a EPICS XL3C flow cytometry system (Coulter). Dead cells were excluded from analysis by forward and side scatter pattern. AML cells were gated using a FITC conjugated rat anti-human CD33 monoclonal antibody (Immunotech, Marseille, France).

Adenovirus mediated gene transfer

Due to the difference of infectivity between the two vectors, AdZ.F or AdZ.F(pK7) transduction efficiencies were not compared using equal plaque forming units per cell (pfu/cell), but equal numbers of physical particles/cell, so that lower pfu/cell concentration of AdZ.F(pK7) than of control AdZ.F were used in all experiments. The HeLa cell line, which has been shown to express high levels of CAR was used as control because equal physical particles comparisons between AdZ.F and AdZ.F(pK7) have been reported to give equivalent transduction of cells which express high levels of CAR.¹¹

AML blast cells and cell lines were washed and centrifuged. AdZ.F or AdZ.F(pK7) vectors at equal physical particle doses were added to 10⁶ cells of the resuspended pellet at growing doses of 1600, 4200, 8400, 16800 virus particles/cell, corresponding to 20, 50, 100, 200 pfu/cell for AdZ.F(pK7), and 75, 150, 300, 600 pfu/cell for AdZ.F respectively (after analysis of the 10 first samples, only one dose was used), and incubated at 37°C during 1 hour in 500 µl volume. Culture medium was then added in order to obtain a cell concentration of 10⁶/ml and incubation continued for 24 hours.

Cells were then washed twice in media to remove free viral particles, resuspended in complete medium as described above, and cultured for at least 72 hours after infection. In 5 leukemic blast samples, infection was also performed with and without growth factors (SCF, IL3 and GM-CSF). Each transductions were performed in triplicate.

Adenovirus competition experiments and enzymatic treatment

In order to determine the mechanism leading to virus attachment, 10 AML blast samples and HL60 cell line were preincubated with 1 mg/ml heparin before infection in triplicate with AdZ.F or AdZ.F (pK7). Additionally, 5 AML samples and samples 7 and 8 were preincubated with heparinase I and neuraminidase : cells were washed 3 times in phosphate-buffered saline (PBS), and incubated with 0.1 IU/ml heparinase I (Sigma Chemical Co) reconstituted in PBS pH 7.6 or with 0.1 IU/ml neuraminidase (Sigma Chemical Co) in DMEM for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ chamber. Cells were then washed three times in PBS, and subjected to infection with AdZ.F and AdZ.F(pK7) as described above except that incubation with vectors was stopped by washing the cells three times in PBS after one hour.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using Sigma Stat 2.0 software (SPSS, Chicago, USA).

Acknowledgments

Supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité du Nord and Comité du Pas de Calais), the Association de Recherche sur le Cancer, the Association Recherche Transfusion, the Fondation contre la Leucémie, and The Centre Hospitalier Universitaire of Lille, France. R.G. and R.V are recipient of a grant from the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL) and Région Nord Pas de Calais

The first two authors contributed equally to this work.

References

1. Watanabe T et al. Gene transfer into human bone marrow hematopoietic cells mediated by adenovirus vectors. *Blood* 1996;87:5032-5039.
2. Neering SJ et al. Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors. *Blood* 1996;88:1147-1155.
3. Seth P et al. Adenovirus-mediated gene transfer to human breast tumor cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging. *Cancer Res* 1996;56:1346-1351.
4. Kim M et al. A novel gene therapy strategy for elimination of prostate carcinoma cells from human bone marrow. *Hum Gene Ther* 1997;8:157-170.
5. Clarke MF et al. A recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11024-11028.
6. Wroblewski JM et al. Selective elimination (purging) of contaminating malignant cells from hematopoietic stem cell autografts using recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 1996;3:257-264.
7. Wroblewski JM, Lay LT, Meeker TC. Adenoviral vectors in hematology: purging, stem cell gene transfer, or both [letter]. *Blood* 1997;89:4664-4665.
8. Wattel E et al. Differential efficacy of adenoviral mediated gene transfer into cells from hematological cell lines and fresh hematological malignancies. *Leukemia* 1996;10:171-174.
9. Cantwell MJ, Sharma S, Friedmann T, Kipps TJ. Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 1996;88:4676-4683.
10. Huang MR et al. TH. Efficient adenovirus-mediated gene transduction of normal and leukemic hematopoietic cells. *Gene Therapy* 1997;4:1093-1099.
11. Bergelson JM et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-1323.
12. Hong SS et al. Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J* 1997;16:2294-2306.
13. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3352-3356.

14. Huang S, Endo RI, Nemerow GR. Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J Virol* 1995;69:2257-2263.
15. Huang S et al. Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol* 1996;70:4502-4508.
16. Dietz AB, Pavlovic SV. High efficiency adenovirus mediated gene transfer to human dendritic cells. *Blood* 1998;91:392-398.
17. Wickham TJ et al. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* 1997;71:8221-8229.
18. Wickham TJ, Roelvink PW, Brough DE, Kovesdi I. Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nature Biotechnology* 1996;14:1570-1573.
19. Wickham TJ et al. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J Virol* 1996;70:6831-6838.
20. Wickham TJ et al. Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *J Virol* 1997;71:7663-7669.
21. Wickham TJ, Haskard D, Segal D, Kovesdi I. Targeting endothelium for gene therapy via receptors up-regulated during angiogenesis and inflammation. *Cancer Immunology Immunotherapy* 1997;45:149-151.
22. Wickham TJ, Carrion ME, Kovesdi I. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther* 1995;2:750-756.
23. Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT, Curiel DT. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol* 1996;70:6839-6846.
24. Stevenson SC, Rollence M, Marshall-Neff J, McClelland A. Selective targeting of human cells by a chimeric adenovirus vector containing a modified fiber protein. *J Virol* 1997;71:4782-4790.
25. Watt SM et al. The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 1993;82:2649-2663.
26. Chung CS, Hsiao JC, Chang YS, Chang W. A27L protein mediates Vaccinia virus interaction with cell surface heparan surface. *J Virol* 1998;8:157-170.

27. Dilloo D et al. A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 1997;89:119-127.
28. Shieh MT, Spear PG. Herpesvirus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heparan sulfate or soluble heparin. *J Virol* 1994;68:1224-1228.
29. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993;73:309-319.

Legends to figures

Figure 1 : % FDG positive cells 72 hours after transduction with AdZ.F(pK7) or AdZ.F of K562, HL60, and Hela cell line as control. Comparisons between both vectors were performed using 8400 physical particles/cell (corresponding to 100 and 300 pfu/cell for AdZ.F(pK7) or AdZ.F respectively). Experiments were performed in triplicate and in eight separate experiments with results reported as mean and SEM

Figure 2 : (A) % FDG positive cells at different physical particles/cell of AdZ.F(pK7) or AdZ.F in AML blast samples cultured in presence of GM-CSF, IL3, and SCF. Data represent mean and SEM of three separate experiments performed with 10 AML blast samples using equal physical particles/cell. (B) FDG and CD33 flow cytometry profiles of one AML blast sample transduced with AdZ.F(pK7).

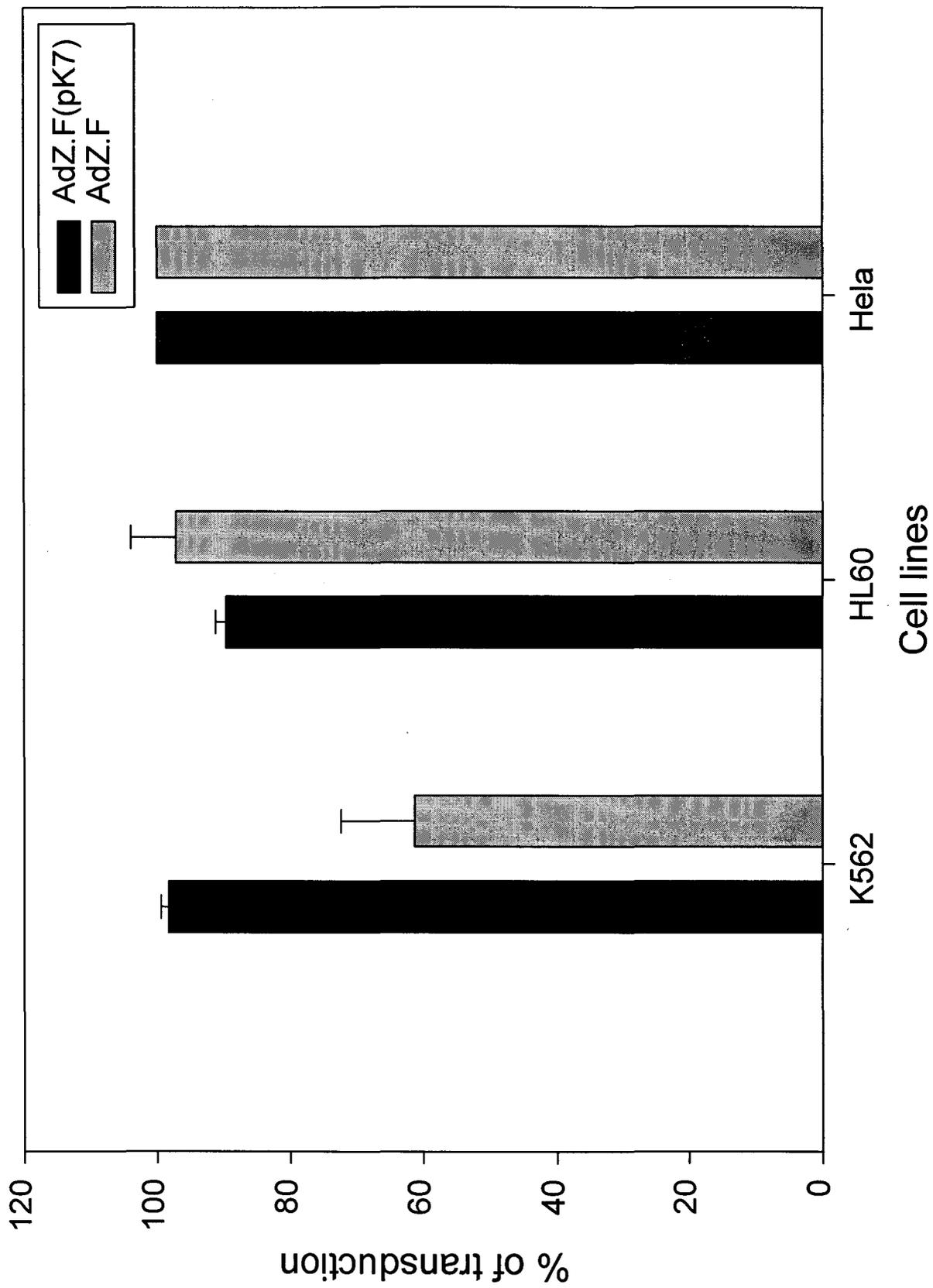
Figure 3 : % FDG positive cells 72 hours after transduction of 25 AML samples with AdZ.F(pK7) or AdZ.F using 8400 physical particles/cell in presence of GM-CSF, IL3, and SCF. Data represent mean and SEM of three separate experiments.

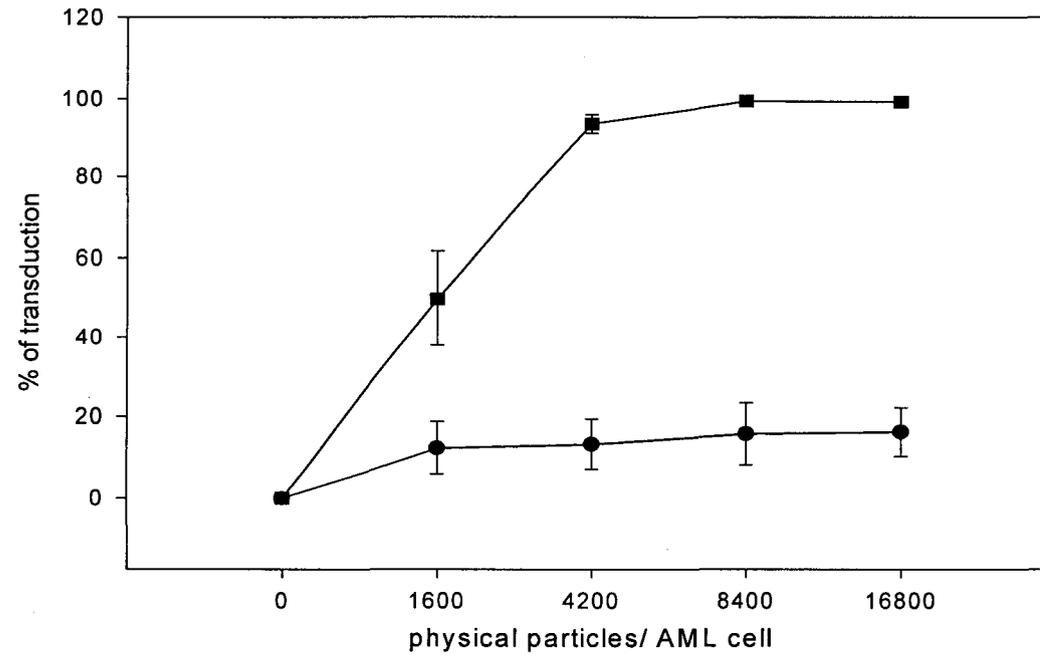
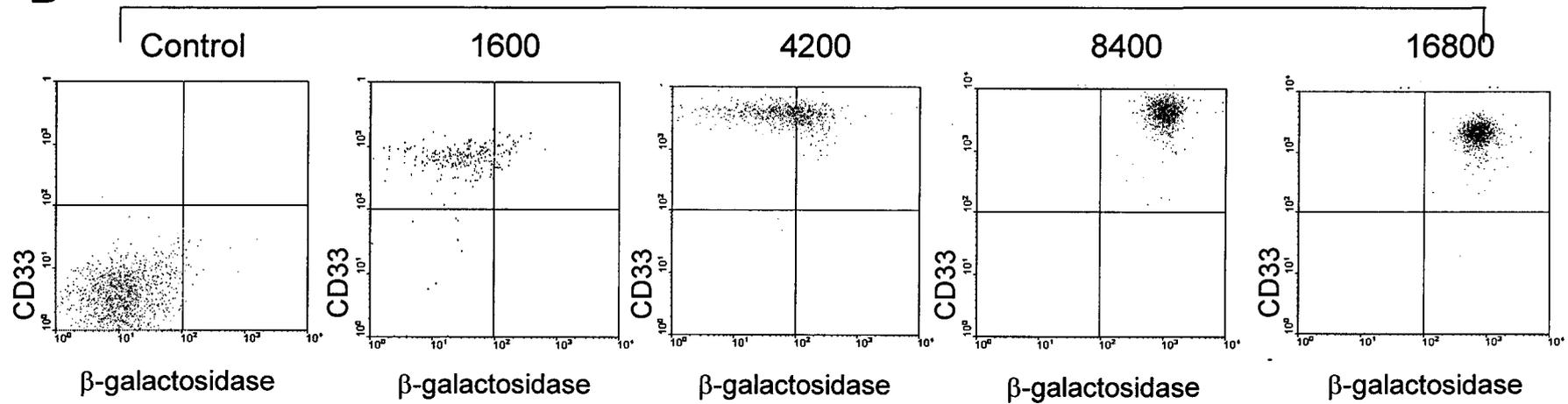
Figure 4 : Time course of AdZ.F(pK7) or AdZ.F transgene expression. Transduction were performed with using 8400 physical particles/cell in presence of GM-CSF, IL3, and SCF. Data represent mean and SEM of 10 AML samples tested in three separate experiments.

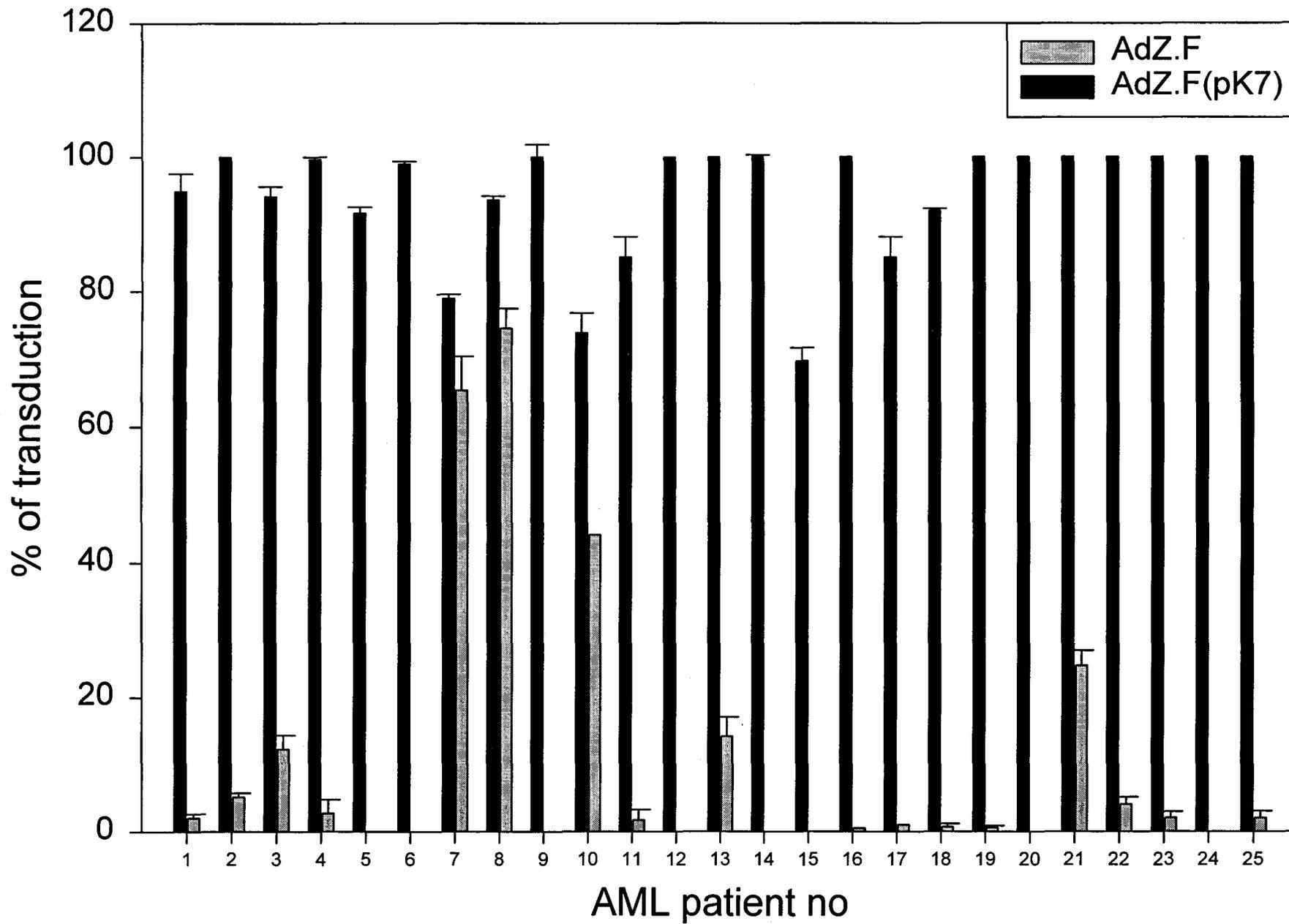
Figure 5 . (A) % of FDG positive cells after transduction by AdZ.F or AdZ.F(pK7) of five AML blast samples with or without SCF, GM-CSF and IL3. (B) Corresponding growth curves. Data represent mean and SEM of all samples tested in three separate experiments.

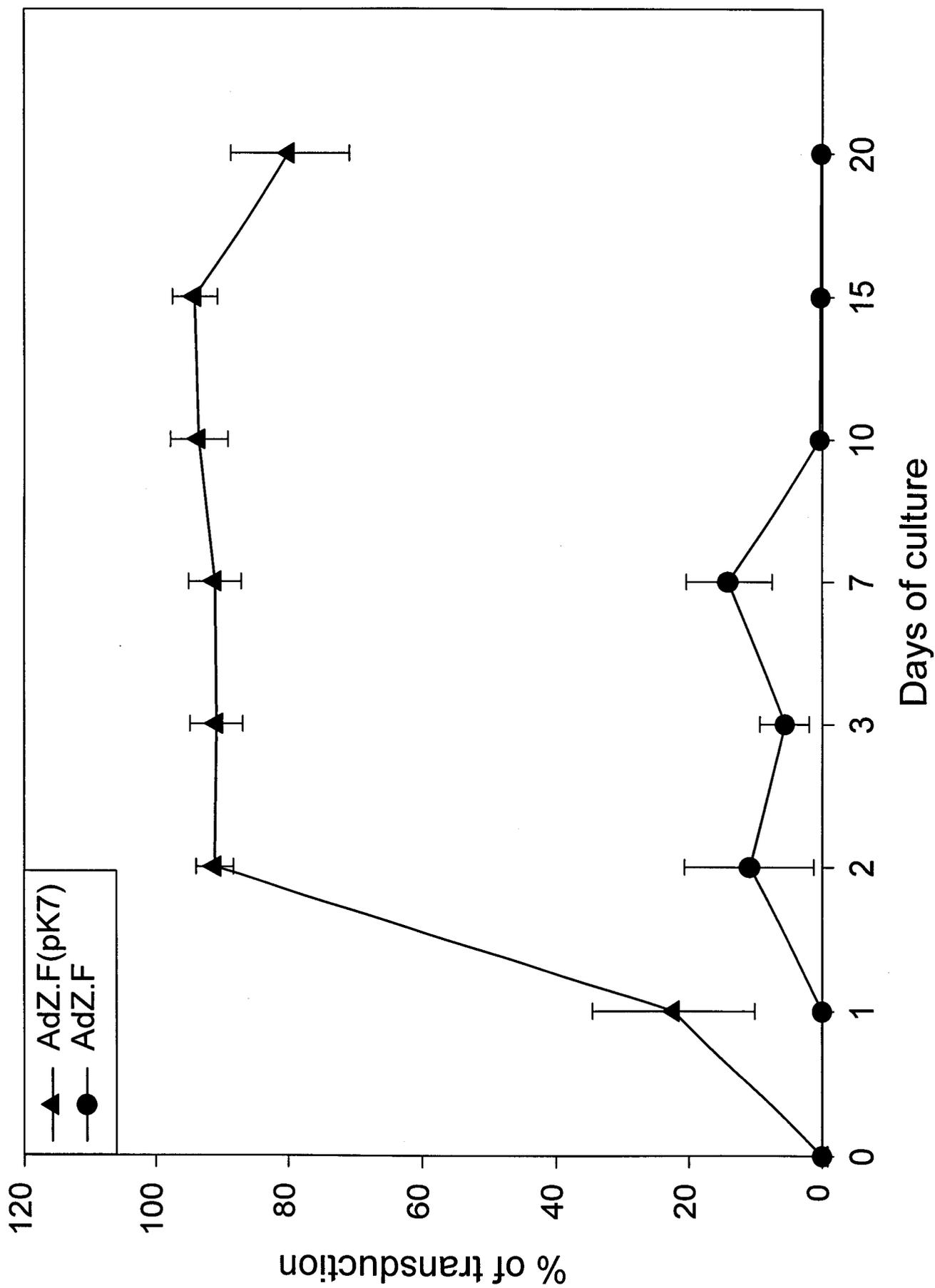
Figure 6 : (A) % of FDG positive cells of 10 AML blast samples or HL60 cell line incubated with or without 1 mg/ml heparin and infected with AdZ.F(pK7) or AdZ.F. Data represent mean and SEM of all samples tested in three separate experiments. (B) flow cytometry profile of one AML blast samples incubated with or without 1 mg/ml heparin and infected with AdZ.F(pK7) or AdZ.F.

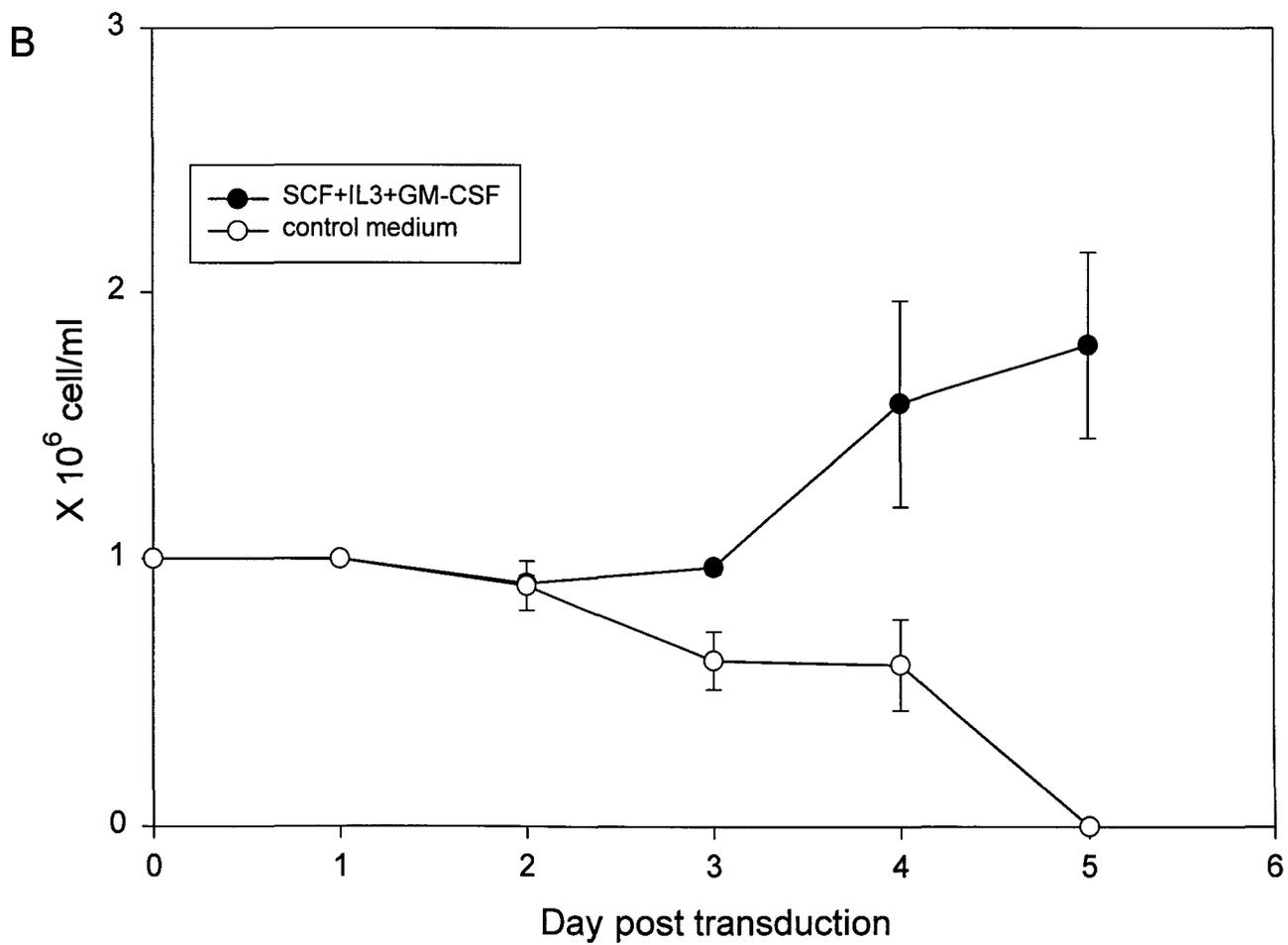
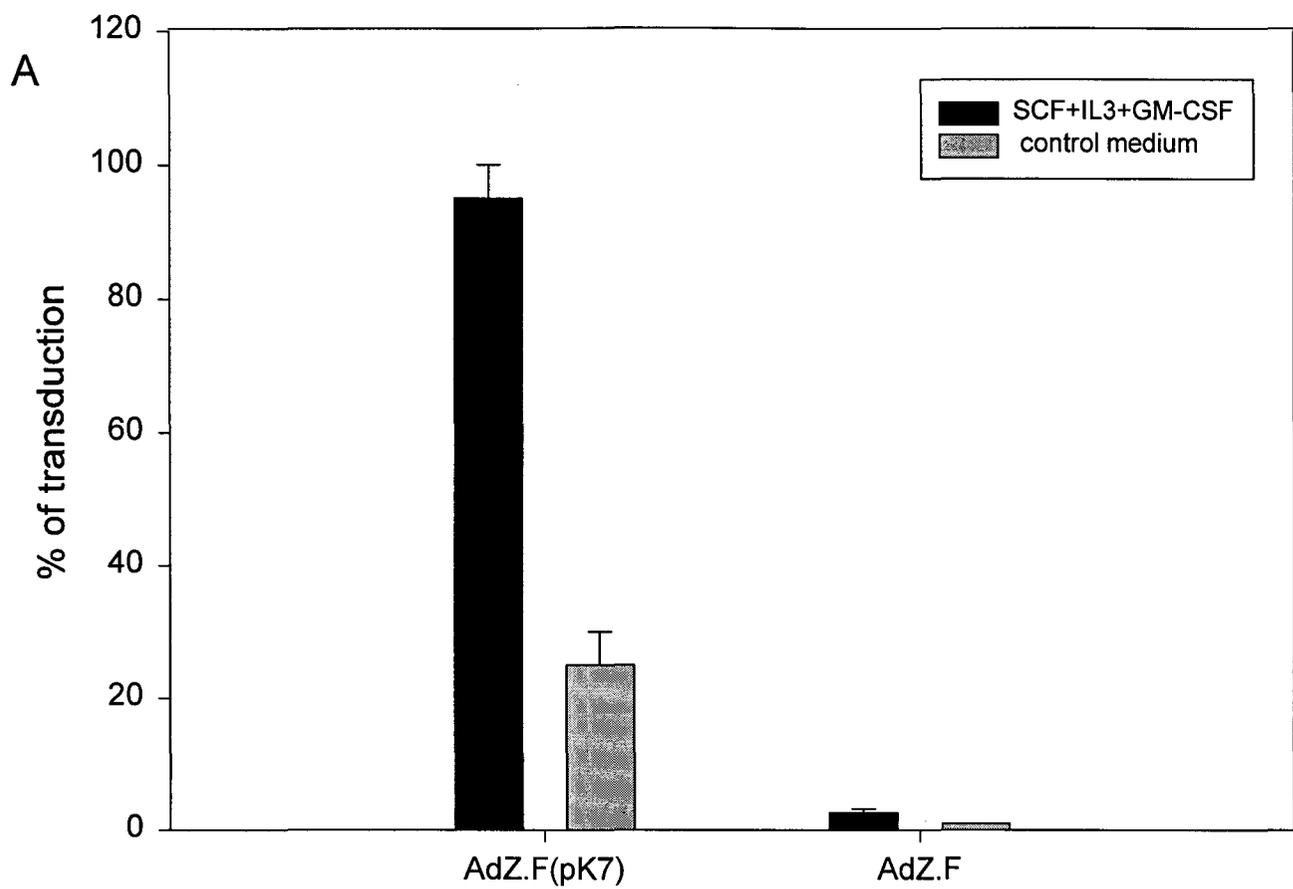
Figure 7 : % of FDG positive cells of AML blast samples No 2, 3, 4, 5 and 6 (A), and of samples No 7 and 8 (B) incubated with or without 0.1 IU/ml heparinase I or 0.1 IU/ml neuraminidase and with AdZ.F(pK7) or AdZ.F. Data represent mean and SEM of three separate experiments.



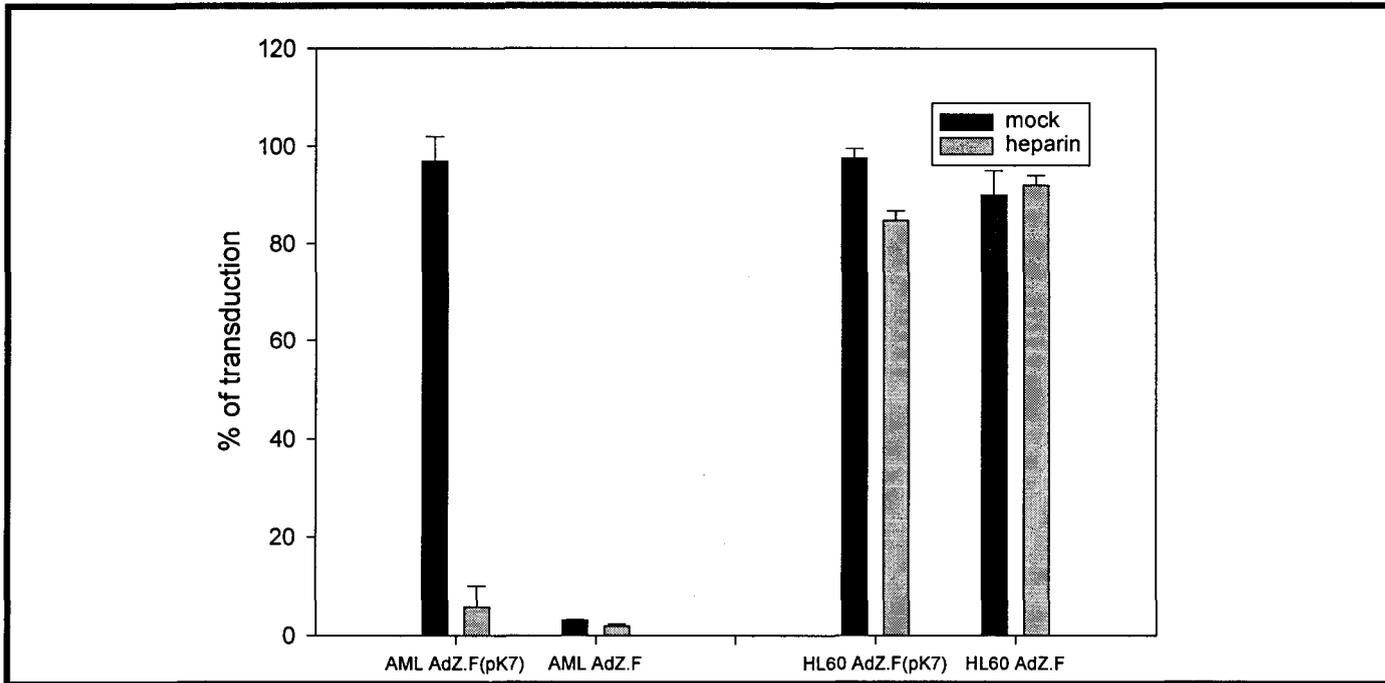
A**B**



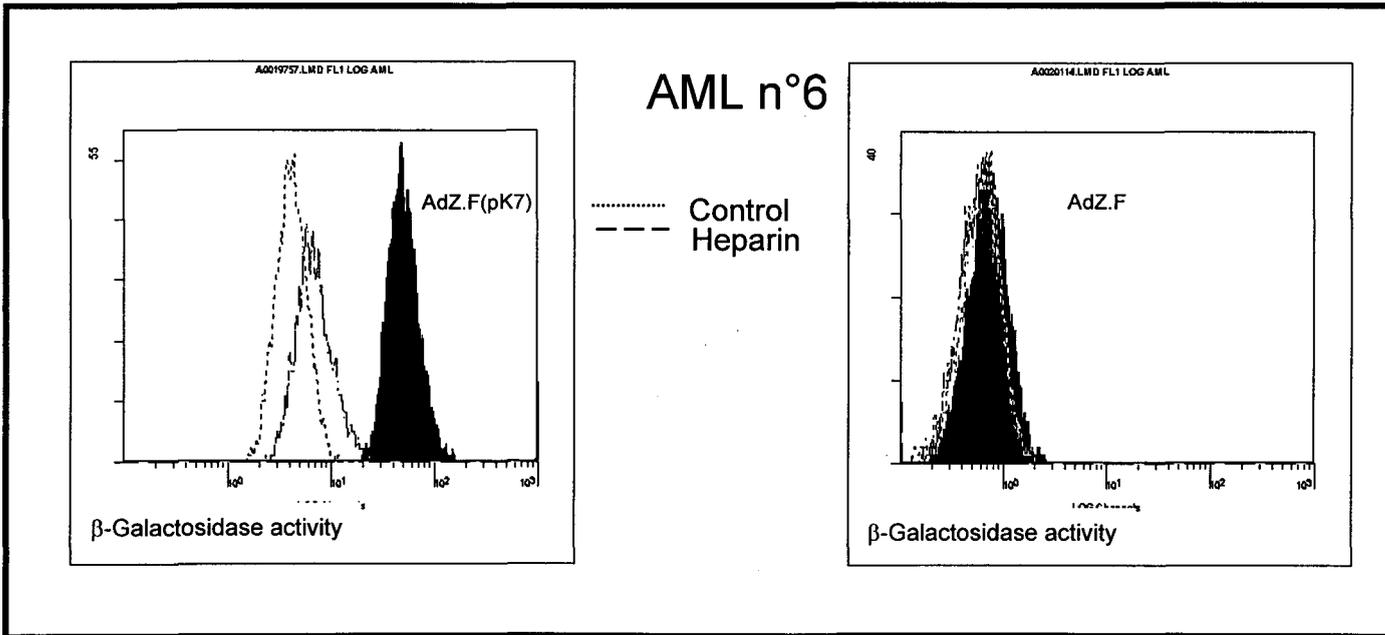


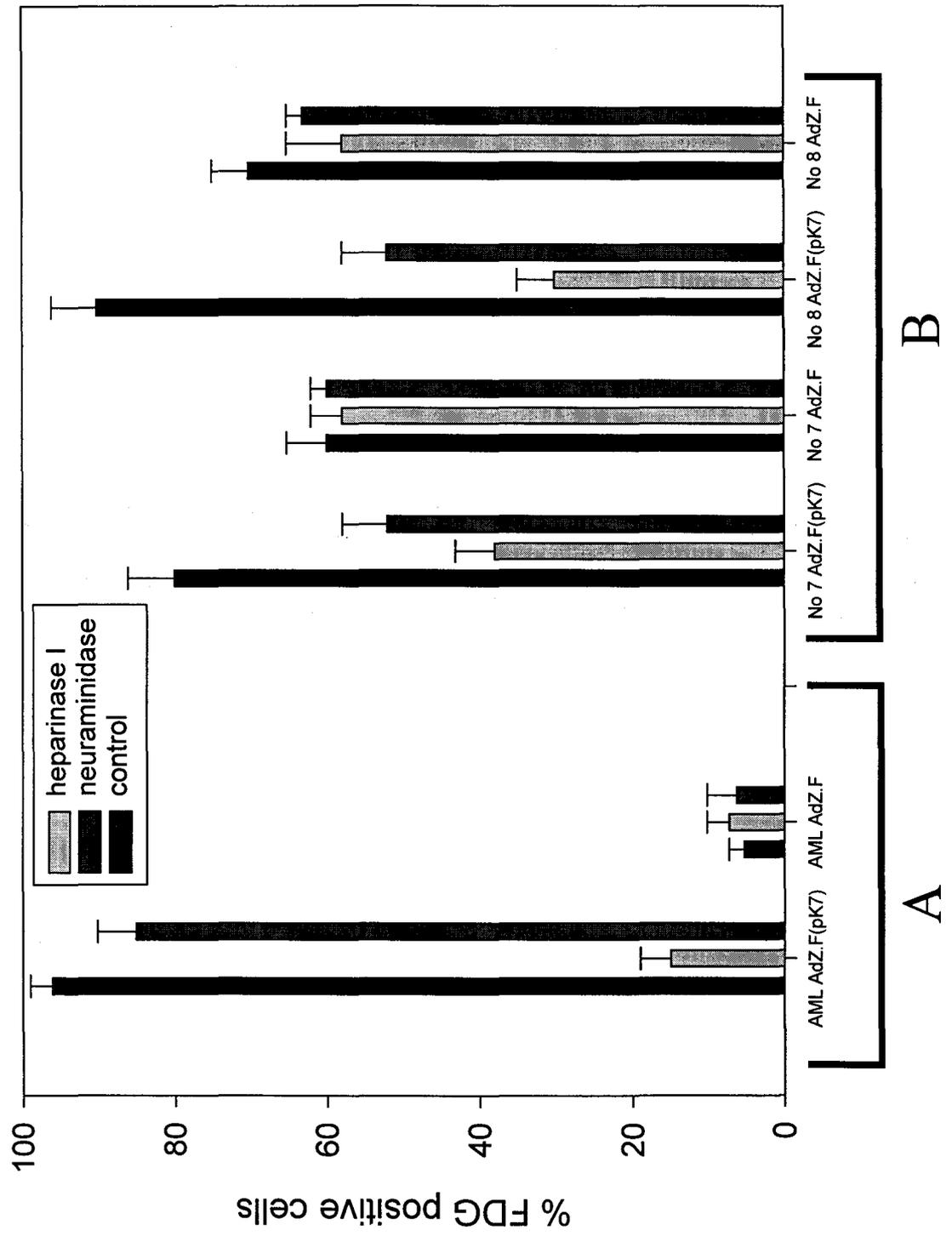


A



B





ANNEXE II

**EFFICIENT GENE TRANSFER IN ACUTE MYELOID LEUKEMIC CELLS
BY ELECTROPORATION**

**Ricardo GONZALEZ¹, Rodolphe VEREECQUE¹, Geraldine BUFFENOIR¹, Michael
VANRUMBEKE¹, Dominique HETUIN¹, Pierre FENAUX^{1,2}, Bruno QUESNEL^{1,2}**

**1- INSERM U124 Lille, France
2- Service des Maladies du Sang, CHU Lille, France**

Running title : Efficient gene transfer in AML cells

Key words : Electroporation, AML, Gene Therapy, EGFP

Correspondence :

**Dr Bruno Quesnel, Service des maladies du sang, CHU Lille, 1 Place de Verdun,
59037 Lille France. Phone : (33) 3 20 44 42 84**

Fax : (33) 3 20 44 40 94

E mail : quesnel@lille.inserm.fr

Supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité du Nord and Comité du Pas de Calais), the Association de Recherche contre le Cancer, the Association Recherche Transfusion, the Fondation contre la Leucémie, and The Centre Hospitalier Universitaire of Lille, France. R.G. and R.V are recipient of a grant from the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL) and Region Nord Pas de Calais

Abstract

Successful *ex vivo* gene transfer with non viral methods in fresh leukemic cells isolated from patients with acute myeloid leukemia (AML) had still not been reported. We transferred plasmids carrying the cDNA of the green fluorescent protein (GFP) by electroporation in 18 AML samples. Gene transfer was achieved in all samples tested. The median proportion of transduced cells was 43% (7-95), and GFP activity was detected for at least a week in 15/18 samples. Thus electroporation is a potent method for *ex vivo* gene transfer in fresh AML cells and might have potential interest for transfer of therapeutic genes.

ANNEXE III

A new murine aggressive myeloid leukemic model

**Rodolphe VEREECQUE¹, Geraldine BUFFENOIR¹, Ricardo GONZALEZ¹,
Malika HAMDANE¹, Claude PREUDHOMME³, Michael VANRUMBEKE¹, Dominique
HETUIN¹, Pierre FENAUX^{1,2}, Bruno QUESNEL^{1,2}.**

**1- Unité INSERM 124, IRCL, Lille
2-Service des maladies du sang, CHU Lille
3- Laboratoire d'hématologie, CHU Lille**

**Correspondence : Dr Bruno QUESNEL, Service des Maladies du Sang, CHU
Lille, 1 Place de Verdun, 59037 Lille France.**

Phone : (33) 3 20 44 42 84

Fax : (33) 3 20 44 40 94

Email : quesnel@lille.inserm.fr

Supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité du Nord and Comité du Pas de Calais), the Association de Recherche sur le Cancer, the Association Recherche Transfusion, the Fondation contre la Leucémie, and The Centre Hospitalier Universitaire of Lille, France. R.G. and R.V are recipients of a grant from the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL) and the Région Nord Pas de Calais, France. We thank the Laboratoire d'immunologie du CHU de Lille for precious help.

Keywords : AML, animal model, BCR/ABL.

