

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHESE

Les adénovirus recombinants comme vecteurs vaccinaux

GOGEV S., THIRY E.

Virologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège
B 4000 Liège, Belgique

RESUME. Selon de nombreuses études, les vaccins recombinants fondés sur les adénovirus capables ou non de se multiplier sont des candidats potentiels pour la vaccination contre les maladies animales et humaines. Ils ont démontré leur capacité à exprimer des gènes exogènes à un niveau élevé et à induire une immunité humorale et cellulaire indépendamment de l'antigène, du modèle animal ou de la voie d'administration. En outre, ces vecteurs induisent une excellente immunité après application sur les muqueuses, ce qui justifie leur développement en tant que vaccins contre différents agents infectieux responsables d'affections des voies respiratoires et du tractus génital.

INTRODUCTION

Les vaccins classiques sont préparés à partir d'agents pathogènes inactivés ou atténués par différentes techniques dont le résultat est difficilement prévisible. Cette approche requiert peu de connaissances de la réponse immune induite et de la structure moléculaire des antigènes. Les progrès rapides en virologie moléculaire ont permis d'explorer de nouvelles stratégies et de nouvelles voies d'obtention de vaccins.

Les nouveaux types de vaccins (Eloit, 1998) peuvent se définir selon le mode de présentation des immunogènes au système immunitaire: 1) **vaccins inertes** constitués d'antigènes purifiés, produits *in vitro* par des techniques de génie génétique, ou de sous-fractions synthétisées chimiquement; 2) **vaccins vivants** dits vecteurs quand le gène codant pour un antigène d'intérêt est inséré dans le génome d'un micro-organisme capable de se multiplier; 3) **vaccins de nature intermédiaire** pour lesquels des gènes de ces protéines sont délivrés à l'individu, soit par l'intermédiaire de vecteurs viraux incapables de se multiplier, soit sous forme d'ADN nu.

Les adénovirus sont actuellement utilisés comme moyen de délivrer des gènes en thérapie génique. Le succès de leur utilisation comme vecteurs viraux recombinants est largement dû à l'immunisation de millions de recrues militaires américaines, par voie orale, avec des gélules entériques contenant les adénovirus (Ad) humains de types 4 et 7 non atténués, pour prévenir l'ARD (acute respiratory disease) (Imler, 1995). Les sérotypes 2 et 5 ont été utilisés préférentiellement aux sérotypes 4 et 7 pour le développement de vecteurs recombinants, en raison de leur moindre pathogénicité. En outre, les adénovirus humains sont caractérisés par un certain nombre de propriétés biologiques qui en font des candidats très attrayants pour le développement de vecteurs de transfert de gènes *in vivo*. Ils peuvent être directement administrés et infecter un grand nombre de types de cellules quiescentes ou en division. De plus, leur spectre d'hôte semble être relativement large. Un certain nombre d'espèces animales sont permissives à l'infection par l'adénovirus humain ce qui permet de tester les vaccins recombinants sur les modèles animaux avant l'applica-

tion chez l'homme. Les adénovirus humains de types 2 et 5 peuvent infecter non seulement les rongeurs tels que le hamster, le rat du cottonnier et la souris (faiblement permissive) (Eloit *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1993; Gallichan *et al.*, 1993; Mittal *et al.*, 1996; Papp *et al.*, 1998), mais aussi le porc, le chien, le chat, le renard et la moutonnette (Callebaut *et al.*, 1996; Yaroeh *et al.*, 1996; Gonin *et al.*, 1995; Charlton *et al.*, 1992). Les adénovirus humains de types 4 et 7 ont un spectre plus restreint, mais ils peuvent infecter le chien et le chimpanzé (Chengalvala *et al.*, 1994 et 1997; Ye *et al.*, 1991; Lubeck *et al.*, 1989 et 1994). La taille du génome de l'adénovirus (36 kilopaires de bases; kpb) permet aujourd'hui l'établissement de vecteurs dépourvus de la majorité de leurs séquences, et capables, en conséquence, de porter et transduire un ADN d'une taille pouvant atteindre 30 kpb (Parks et Graham, 1997). De plus, l'ADN transduit persiste en position extrachromosomique. Récemment, les adénovirus bovin de type 3 (BAV-3) (Mittal *et al.*, 1995; Zakhartchouck *et al.*, 1998 et Zakhartchouck *et al.*, 1999), ovin (Rothel *et al.*, 1997), canin de type 2 (CAV-2)

(Klonjowski *et al.*, 1997) et porcin de type 3 (PAV-3) (Reddy *et al.*, 1999) ont fait l'objet de développement de vecteurs recombinants

CARACTERISTIQUES
PRINCIPALES
DES ADENOVIRUS

Les premiers adénovirus ont été isolés aux Etats-Unis chez des jeunes gens souffrant de pneumopathies, et à partir d'amygdales sur de jeunes enfants (Huebner *et al.*, 1954). Les virus isolés dans ces deux cas furent initialement appelés AD ou agents de dégénérescence adénoïde. Mis en évidence lors de mise en culture de tissu amygdalien humain où leur présence a été révélée par l'apparition d'un effet cytopathogène, ils tirent leur nom de la racine grecque *adēvos* (glande).

Chez les enfants, ces virus sont responsables de pneumonie, de pharyngite aiguë fébrile, de fièvre pharyngo-conjonctivale et d'un syndrome «coquelucheux» (Leleu *et al.*, 1995).

Ils sont également, responsables d'affections respiratoires aiguës s'accompagnant de fièvre, de myalgies, d'asthénie et de céphalées (sérotypes 4 et 7), d'affections oculaires (sérotipe 8), d'affections du tractus gastro-intestinal (sérotypes 1, 2, 5, 40, et 41,) de méningoencéphalites (sérotypes 3 et 7) et de cystites hémorragiques aiguës (sérotypes 11 et 12) chez les adultes (Horwitz, 1990^a et ^b).

Chez les animaux, les adénovirus sont responsables d'infections des tractus respiratoire et digestif (Aldasy *et al.*, 1965). Les infections sont modérées, sauf dans le cas de l'adénovirus canin 1 responsable de l'hépatite infectieuse canine (Rubarth *et al.*, 1947).

Chez l'homme, au moins 47 sérotypes différents ont été isolés et divisés en 6 groupes, A, B, C, D, E et F. Ces groupes sont caractérisés par des homologies de séquence entre les différents génomes de virus appartenant à un même groupe, par la capacité du virus d'agglutiner les globules rouges ainsi que par le pouvoir onco-

gène du virus chez les rongeurs (Shenk, 1996).

STRUCTURE
DES ADENOVIRUS

Les adénovirus (figure 1) sont des virus non enveloppés de symétrie icosaédrique de 60 à 90 nm de diamètre comportant une capside constituée de 252 capsomères (240 hexons et 12 pentons) et un cœur contenant l'ADN viral associé à des protéines internes (IIIa, VI, VIII, IX) (Shenk, 1996).

L'hexon (II) est une protéine majeure de la capside, constituée de trois sous-unités polypeptidiques.

Le penton (III, IV) est une protéine majeure de la capside, portant à sa base un appendice formé d'une fibre (IV) terminée par une sphère; quand il est dépourvu de cette fibre, le penton se limite à sa base.

La protéine IIIa lie les facettes adjacentes de la capside et fait le pontage entre les hexons et la protéine VII de la nucléocapside.

Les protéines VI, VIII et IX stabilisent probablement le treillis formé par les hexons, tandis que les protéines VI et VIII feraient le pontage entre la capside et la nucléocapside.

Les protéines V, VII et la protéine mu sont associées à l'ADN viral. Les deux protéines basiques (V et VII) associées à l'ADN forment une structure de type chromatine, tandis que le rôle de la protéine mu est inconnu. La protéine V peut se lier au penton et ainsi faire un pontage entre la capside et le cœur. La protéine VII sert probablement comme un centre de type histone autour duquel l'ADN viral s'enroule.

La protéine terminale de 55 kDa est liée de façon covalente aux extrémités 5' de chacun des deux brins d'ADN; elle est utilisée comme amorce et permet l'initiation de la réplication du génome viral.

ORGANISATION GENOMIQUE
DE L'ADENOVIRUS

Le génome viral consiste en une molécule d'ADN bicaténaire linéaire de 36000 pb (Tooze, 1981) codant pour

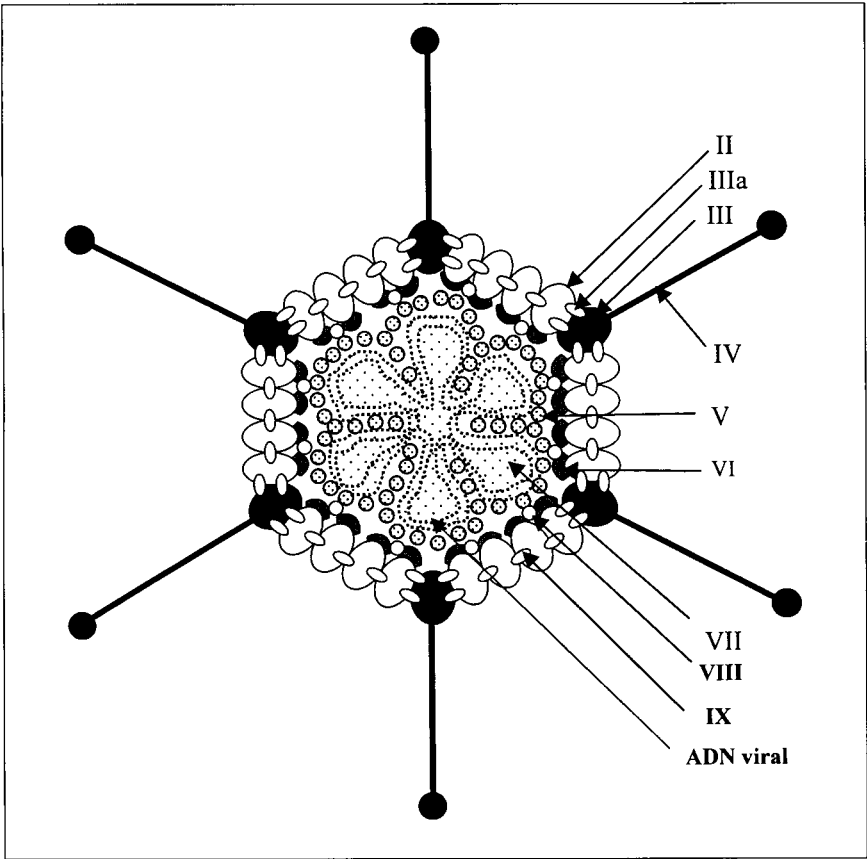


Figure 1

Structure du virion d'adénovirus. Les protéines de la capside: l'hexon (II), le penton (III), la fibre (IV), la protéine IIIa qui lie les facettes adjacentes de la capside et les protéines VI, VIII et IX qui stabilisent le treillis des hexons. Les protéines du cœur: les protéines V, VII sont associées à l'ADN viral. Les deux protéines basiques (V et VII) associées à l'ADN forment une structure de type chromatine.

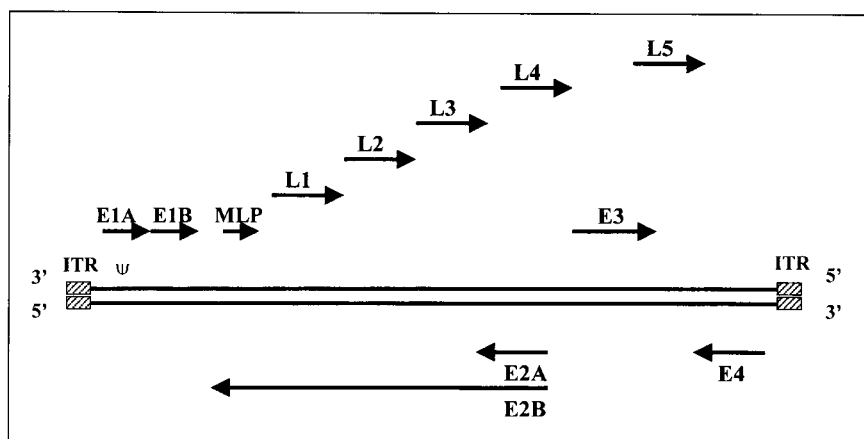


Figure 2

Structure du génome de l'adénovirus de type 5. Les flèches L1, L2, L3, L4 et L5 désignent les unités de transcriptions tardives sous le contrôle du promoteur MLP codant principalement pour des protéines de structure du virion. Les flèches E1A, E1B, E2A, E2B, E3, et E4 désignent les unités de transcriptions précoces codant pour des protéines non structurales, dotées d'activités de régulation ou enzymatiques. Les séquences terminales inversées indispensables pour l'initiation de la réplication de l'ADN viral sont représentées par l'abréviation ITR. Le symbole ψ désigne le domaine d'encapsidation.

au moins 30 protéines et comportant à ses extrémités des séquences répétées inversées appelées: ITR (inverted terminal repeat) de 100 à 200 pb (figure 2).

Les quatre régions E1, E2, E3 et E4 correspondent aux gènes précoces transcrits durant la première partie du cycle viral (figure 3). Les gènes E1A et E1B les plus précocement exprimés sont situés à l'extrémité gauche du génome. La région correspondant aux gènes tardifs (L) recouvre plus de 50% du génome. Elle

est transcrite à partir d'un même promoteur (MLP: major late promoter). Les gènes précoces codent pour des protéines non structurales, dotées d'activités de régulation ou enzymatiques tandis que les gènes tardifs transcrits dans la phase tardive codent principalement pour des protéines de structure du virion (Shenk, 1996).

La région E1 est localisée à l'extrémité gauche du génome et s'étend sur environ 4000 pb, soit 11,2 mu (map units, unités génomiques). Elle renferme deux unités de transcription

adjacentes E1A et E1B. La région E1 comprend également une unité de transcription tardive incluse dans la région E1B, codant pour le polypeptide IX indispensable à l'encapsidation de l'ADN (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987). La transcription du génome viral est initiée dans la région E1A, dont le promoteur contient les deux éléments activateurs I et II qui régulent cette transcription (Hearing et Shenk, 1983 et 1986). La délétion de la région E1A affecte l'expression des autres unités précoces E1B, E2, E3 et E4 (Berk *et al.*, 1979). Les protéines E1A ont une fonction activatrice (*trans*-activateurs) de la transcription des gènes viraux (Akusjärvi, 1993). La transcription de la région E1B est activée par les produits d'expression de la région E1A (Berk *et al.*, 1979).

La région E2 se divise en deux parties, appelées E2A et E2B. La région E2A code pour une protéine de 72 kDa nommée DNA binding-protein (Klessig *et al.*, 1979). Elle recouvre les chaînes d'ADN monocaténaire au cours de la réplication (Van der Vliet *et al.*, 1975). La région E2B code pour une protéine de 80 kDa nommée la protéine préterminale (pTP), précurseur de la protéine terminale (TP) de 55 kDa, ainsi que pour une ADN polymérase virale de 140 kd (Shenk, 1996). La pTP, indispensable pour l'initiation de la réplication de l'ADN viral, est attachée de manière covalente à l'extrémité 5' de celui-ci. Elle forme un complexe avec l'ADN polymérase virale. La protéine terminale (PT) de 55 kd obtenue par la protéolyse de pTP de 80 kd pendant l'assemblage des virions, reste attachée à l'extrémité 5' de l'ADN viral. L'ADN polymérase virale possède l'activité polymérasique 5' → 3', ainsi que l'activité exonucléasique 3' → 5'. L'élongation de la chaîne de l'ADN viral requiert la présence de l'ADN polymérase, de la protéine de 72kd nommée DNA-binding protein, ainsi que de la protéine nucléaire II (NFII) d'origine cellulaire (Shenk, 1996).

La région E3 est non essentielle pour la multiplication du virus et code pour une glycoprotéine de masse moléculaire apparente de 19 kDa qui est exprimée à la surface des cellules infectées (Persson *et al.*, 1979). Cette glycoprotéine inhibe la présentation

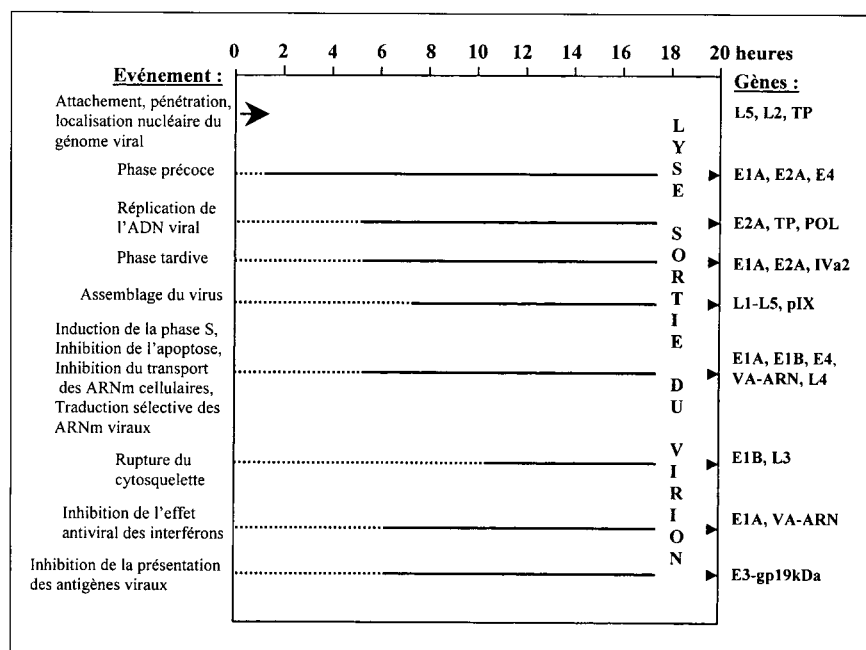


Figure 3

Description temporelle des événements, ainsi que de l'expression des gènes viraux intervenant après l'infection des cellules HeLa par l'adénovirus. La multiplication virale dans les cellules d'origine animale est plus lente que celle dans les cellules HeLa.

des antigènes à la surface des cellules en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) (Shenk, 1996). Cette situation peut entraîner l'absence de reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques et contribuerait ainsi au maintien du virus dans l'organisme infecté (Wold et Gooding, 1991; Müllbacher, 1992). Cette région code également pour trois protéines de poids moléculaires de 14,7; 14,5 et 10,4 kDa. L'action cytolytique du «tumor necrosis factor» (TNF) est inhibée par la protéine E3-14,7 kDa, ainsi que par le complexe des protéines E3-14,5 kDa et E3-10,4 kDa via l'inhibition de libération de l'acide arachidonique (Shenk, 1996). La protéine E1B-19 kDa inhibe également l'apoptose induite par le TNF (Gooding *et al.*, 1988).

La région E4 code pour au moins 7 protéines. Une de ces protéines peut se lier au facteur de transcription cellulaire E2F et activer la transcription de E2 (Shenk, 1996). Le complexe formé de la protéine de 55 kDa codée par la région E1B, et de la protéine de 25 kDa codée par la région E4 bloque l'accumulation des ARNm cellulaires et facilite l'accumulation des ARNm viraux dans la cytoplasm ce qui favorise la traduction sélective des ARNm tardifs. La délétion de la région E4 entraîne la perte de la viabilité du virus (Mason *et al.*, 1990).

Les gènes tardifs commencent à s'exprimer au début de la réplication de l'ADN viral.

L'expression est contrôlée par un seul promoteur (MLP). Le transcrit primaire commence au MLP et continue jusqu'à la fin de l'ADN. Il subit un épissage alternatif au cours de sa maturation ce qui produit une variété d'au moins 18 ARNm qui sont répartis en cinq familles dénommées L1, L2, L3, L4 et L5, en fonction du site commun de polyadénylation utilisé lors de la maturation. Les ARNm de chaque famille possèdent le même site de polyadénylation, mais ont des sites d'épissage différents et des extrémités 5' reliées à trois segments 1, 2 et 3. Il s'agit de segments courts qui proviennent de l'épissage de trois petits exons appartenant à des régions distinctes du génome d'adénovirus (16,6; 19,6 et 26,6 mu). Les trois

segments forment la séquence «leader» de 200 pb (Chow *et al.*, 1977). Les ARNm liés en 5' à la séquence «leader» sont préférentiellement traduits pendant la phase tardive parce que leur traduction ne requiert pas la présence du facteur de l'initiation de traduction eIF-4F (Chow *et al.*, 1977; Shenk, 1996).

Le MLP est un promoteur très fort pendant la phase tardive, bien qu'il soit actif pendant les deux phases de l'infection. Après réplication de l'ADN, l'efficacité de transcription augmente à des niveaux au moins 20 fois plus élevés que ceux qui sont atteints par les promoteurs viraux précoces (Leong *et al.*, 1990).

Le domaine d'encapsidation de l'ADN (ψ), qui va des nucléotides 194 à 358 à l'extrémité gauche du génome viral de l'Ad5, est composé d'au moins cinq éléments distincts agissant en cis durant la phase tardive (Hearing et Shenk, 1983). L'ADN viral est alors encapsidé après être entré dans des capsides préformées.

La région de l'activateur de E1A est localisée dans la même région que le domaine d'encapsidation. Deux éléments activateurs distincts régulant l'expression des gènes viraux ont été définis dans cette région (Hearing et Shenk, 1983 et 1986): 1) l'élément activateur I est une séquence répétée deux fois (nucléotides 199-209, 297-307) qui régule la transcription de E1A; 2) l'élément activateur II recouvre une région d'environ 30 pb (nucléotides 250-280) et augmente la transcription de chacune des unités de transcription précoces.

Les séquences actives en cis sont localisées à l'intérieur des dernières 51 pb des ITR (domaines A, B et C).

Le domaine A comprend les premières 18 pb. Il est indispensable pour l'initiation de la réplication. Un complexe de deux protéines (la protéine préterminale de 80 kDa codée par la région E2B et l'ADN polymérase) s'y lie. La protéine préterminale (pTP), indispensable pour l'initiation (rôle d'amorce) de la réplication de l'ADN viral, est attachée de manière covalente à l'extrémité 5' de celui-ci. La protéine terminale (TP) de 55 kDa obtenue par la protéolyse de pTP de 80 kDa pendant l'assemblage des

virions, reste attachée à l'extrémité 5' de l'ADN viral (Shenk, 1996).

Le domaine B qui s'étend de 19 à 39 pb, et le domaine C qui s'étend de 40 à 51 pb, ne sont pas absolument indispensables pour la réplication, mais ils augmentent l'efficacité de l'initiation de la réplication (Shenk, 1996).

Les cellules infectées par l'adénovirus contiennent une grande quantité de deux ARN de faible masse moléculaire, appelés *ARN associés à l'adénovirus*, en abrégé VAI-ARN et VAIL-ARN (Ad2 et Ad5) (Reich *et al.*, 1966). Ces ARN d'une longueur d'environ 160 nucléotides et non codants, transcrits par l'ARN polymérase III, interviennent dans la traduction des ARNm viraux (Thimmappaya *et al.*, 1982). L'absence de ces VA-ARN entraîne un déficit dans la capacité de synthétiser les protéines virales.

LES ADENOVIRUS COMME VECTEURS D'EXPRESSION

La transcription des gènes a lieu uniquement dans le noyau cellulaire. Différents systèmes vecteurs ont été utilisés pour assurer le transfert de gènes qui codent pour les immunogènes viraux majeurs et de gènes thérapeutiques dans le noyau de la cellule cible. Selon la nature du vecteur utilisé, la structure fonctionnelle de l'ADN transféré dans le noyau est variable: soit intégrée dans le génome, soit extrachromosomique. Les systèmes couramment utilisés actuellement sont les vecteurs chimiques, les rétrovirus recombinants et les adénovirus recombinants.

L'utilisation des adénovirus comme vecteurs d'expression est intéressante pour les raisons suivantes:

- Leur organisation génétique est suffisamment connue pour permettre d'insérer dans leur génome des gènes étrangers sous contrôle de promoteurs forts d'adénovirus ou d'autres promoteurs;
- ils peuvent être multiplier à hautes titres en culture cellulaire;
- ils possèdent l'avantage considérable de transférer du matériel génétique à une grande variété de cellules

quel que soit leur état de prolifération, et ce même si celles-ci sont totalement en repos. Ces vecteurs paraissent donc adaptés aux applications directes *in vivo*, car dans la plupart des organes les cellules se divisent rarement;

- leur spectre d'hôte est relativement large. Un certain nombre d'espèces animales sont permissives à l'infection par l'adénovirus humain ce qui permet de tester les vaccins recombinants sur les modèles animaux avant l'application chez l'homme;

- la taille du génome de l'adénovirus de 36 kpb permet aujourd'hui la construction de vecteurs dépourvus de la majorité de leurs séquences, et capables, en conséquence, de porter et transduire un ADN d'une taille pouvant atteindre 30 kpb (Parks et Graham, 1997). De plus, l'ADN transduit persiste en position extra-chromosomique.

Le principe de construction des adénovirus recombinants est basé sur (Gerard et Meidell, 1995; Rrianarison-Jewtoulkoff et Perricaudet, 1995): 1) une recombinaison homologue *in vivo* entre le génome viral et un plasmide dans des cellules transcomplémentant les fonctions virales déficientes; 2) une insertion *in vitro* du transgène par l'intermédiaire d'un plasmide, dans un virus dont le phénotype a été modifié par élimination de sites de restriction spécifiques pour permettre une reconstitution complète de l'ADN recombinant avant la transfection. Récemment, des différentes stratégies de construction de vecteurs recombinants par recombinaison homologue dans *E.coli* ont été développées (Chartier *et al.*, 1996; Crouzet *et al.*, 1997).

Les vecteurs adénoviraux réplcatifs

Construction

La construction de ces vecteurs implique l'insertion de transgènes dans la partie droite du génome viral sans délétion d'aucun gène viral essentiel à la multiplication (figure 4).

Le plus souvent, les transgènes sont insérés dans la région E3 impliquée dans un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire. Elle n'est pas

indispensable pour la multiplication du virus. La délétion de cette région (Schneider *et al.*, 1989; Prevec *et al.*, 1989) permet l'insertion d'une cassette d'expression d'une taille pouvant atteindre 3 kpb (Chengalvala *et al.*, 1994). Le transgène est inséré dans la région E3 du génome de l'adénovirus via un plasmide par insertion *in vitro* ou par recombinaison homologue *in vivo*. La recombinaison homologue a lieu dans des cellules humaines, entre un plasmide contenant la partie droite du génome de l'adénovirus avec le transgène et un large fragment du génome de l'adénovirus. Dans la stratégie utilisant l'insertion *in vitro*, le fragment du plasmide qui contient la partie droite du génome de l'adénovirus avec le transgène, est ligaturé à un large fragment du génome d'adénovirus dont la partie droite manque. Cette partie est manquante en raison de la digestion spécifique requise par la construction (Imler, 1995).

Il est également possible d'insérer une cassette d'expression dans le dernier cadre de lecture ouverte de la région E3 (Chengalvala *et al.*, 1994), mais aussi entre la région E4 et la l'ITR 3'. La région E4 doit être intacte car sa délétion est létale pour le virus (Mason *et al.*, 1990).

Une autre stratégie, qui a été utilisée dans le cadre d'une expérience avec l'Ad5 humain, repose sur l'insertion de l'ADN exogène dans la partie gauche du génome viral, entre l'ITR 5' et la région E1, à condition de conserver les gènes E1 fonctionnels (Eloit et Adam., 1995). Cette méthode de clonage

conduit à l'obtention des vecteurs qui sont capables de se multiplier.

Le développement d'adénovirus bovin recombinant réplcatif (BAV-3) est basé sur l'insertion du transgène dans la région E3 du génome viral. La construction de BAV-3 délété en E3 et qui exprime le gène de la glycoprotéine gD du BHV-1 (herpèsvirus bovin de type 1), a été réalisée par deux recombinaisons homologues successives en *E.coli*. (Zakhartchouk *et al.*, 1998). Le plasmide qui contient le génome de BAV-3 délété en E3 est obtenu lors de la première recombinaison homologue. L'obtention des vecteurs recombinants BAV-3 qui contiennent le transgène est réalisée par une deuxième recombinaison homologue en *E.coli* entre le plasmide qui contient le génome de BAV-3 délété en E3 et un plasmide qui contient le transgène.

La composition et l'orientation de la cassette d'expression peuvent influencer et modifier la cinétique, ainsi que le niveau d'expression des transgènes. La cassette d'expression contient un promoteur exogène ou endogène, le transgène qui sera exprimé et un signal de polyadénylation. L'insertion de la cassette d'expression, contenant un promoteur exogène, en sens inverse de la transcription de la région E3, s'est révélée moins favorable pour l'expression du transgène (Johnson *et al.*, 1987, Schneider *et al.*, 1989 et Yaroeh *et al.*, 1996).

Utilisation en vaccination

Plusieurs applications d'adénovirus humains réplcatifs ont été dévelop-

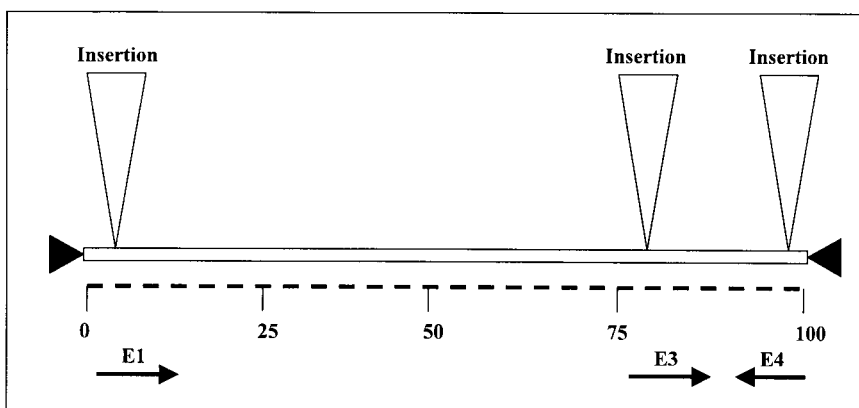


Figure 4

Carte du génome de l'adénovirus. La position des séquences dans le génome est décrite par la carte linéaire de 100 unités (mu ou map units), chaque unité représentant 360 nucléotides. La position 0 correspond à l'extrémité gauche de la carte et la position 100 correspond à l'extrémité droite. Les endroits d'insertion de l'ADN exogène sont indiqués par les triangles.

pées. Les Ad5 ont démontré une grande efficacité lors de la transduction, ainsi que lors de l'expression de glycoprotéines virales non seulement en culture de cellules permissives, mais aussi en culture de cellules peu ou pas permissives à leur multiplication et lors de l'induction de la réponse immune humorale et cellulaire chez différentes espèces animales (Prevec *et al.*, 1989; Schneider *et al.*, 1989). De nombreux essais ont été réalisés sur des espèces permissives à la multiplication de l'Ad5 tels que le hamster (Morin *et al.*, 1987) et le rat des cotonniers (Mittal *et al.*, 1996; Papp *et al.*, 1998), mais aussi sur des espèces non permissives tels que le bovin, le chien, le porc, la souris (Prevec *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1993), le renard et la mouffette (Charlton *et al.*, 1992). Après l'administration d'Ad5 recombinant réplcatif par voie intradermale, sous-cutanée, intramusculaire, intranasale, intratrachéale, orale ou intrapéritonéale, ces animaux développent de hauts taux d'anticorps envers les protéines virales exprimées par le vecteur et sont protégés envers des épreuves virulentes. De plus, ces vecteurs réplcatifs sont capables d'induire une réponse immune locale en anticorps IgA après leur administration par voie intranasale (Mittal *et al.*, 1996; Papp *et al.*, 1998).

D'autres espèces d'adénovirus ont été utilisées pour le développement de vecteurs recombinants suivant des principes comparables: ainsi, des virus Ad4 et Ad7 réplcatifs induisent une réponse en anticorps envers l'antigène de surface du virus de l'hépatite B chez le chien (Chegalvala *et al.*, 1994) et chez les chimpanzés. Ces animaux ont été protégés partiellement envers une épreuve virulente (Lubeck *et al.*, 1989).

Vu l'utilisation limitée d'adénovirus humains chez les animaux, ainsi que la spécificité d'hôte assez restreinte des adénovirus animaux, le développement de vecteurs recombinants d'origine animale devient un choix logique. Récemment, le développement des vecteurs BAV-3 (adénovirus bovin de type 3) (Zakhartchouk *et al.*, 1998) et PAV-3 (adénovirus porcin de type 3) (Reddy *et al.*, 1999) réplcatifs a été décrit. L'administration du BAV-3 recombinant exprimant la glycoprotéine gD du BHV-1 chez les rats des

cotonniers s'est traduite par une réponse en anticorps IgG et IgA sérique et locale (écouvillons nasaux et lavage pulmonaire) (Zakhartchouk *et al.*, 1998). Les porcs immunisés avec du PAV-3 exprimant la glycoprotéine gD du virus de la maladie d'Aujeszky ont développé une réponse immune en anticorps neutralisants (Reddy *et al.*, 1999).

L'utilisation des vecteurs réplcatifs engendre divers inconvénients, tels que, notamment, l'apparition d'une inflammation *in vivo* ou d'une lyse cellulaire *in vitro* chez les cellules permissives à leur multiplication et par conséquent une expression courte et modérée du transgène. Par ailleurs, les produits de la région E1A sont des déterminants antigéniques majeurs, reconnus par les cellules tueuses naturelles et des lymphocytes T cytotoxiques après l'infection par l'Ad5 (Routes *et al.*, 1991). Cette réponse peut compromettre la durée d'expression du transgène *in vivo*.

D'autres inconvénients liés à l'utilisation de vecteurs réplcatifs, sont l'induction d'une réponse immune contre ces vecteurs, ce qui peut compromettre l'effet rappel de l'inoculation ultérieure, la dissémination dans d'autres tissus que l'organe ou le tissu cible, ainsi que la transmission à d'autres individus et leur utilisation chez les animaux déjà immunisés envers ces vecteurs suite à une infection naturelle par un adénovirus sauvage.

Les vecteurs adénoviraux non réplcatifs

Ces vecteurs adénoviraux sont délétés au moins pour la région E1. Le recours à ces vecteurs incapables de se multiplier permet de pallier certains inconvénients liés à l'utilisation de vecteurs réplcatifs, tels que la durée courte d'expression du transgène *in vivo*, la dissémination dans l'organisme et la transmission à d'autres individus. La biosécurité de ces vecteurs repose justement sur la délétion des gènes essentiels à la multiplication virale.

Construction

Leur construction est basée sur l'insertion de l'ADN exogène dans la partie gauche du génome viral (figure 4).

Les vecteurs recombinants qui en résultent sont délétés pour E1A et, éventuellement, pour E1B et sont, par conséquent, incapables de se multiplier dans des cellules non complémentantes.

La construction de ces vecteurs implique l'utilisation d'un plasmide qui contient un transgène flanqué de deux fragments du génome de l'Ad5 (Gerard et Meidell, 1993; Rianarison-Jewtougoff et Perricaudet, 1994) (figure 5). Le fragment en amont du transgène porte la partie gauche du génome viral contenant l'ITR 5', les signaux d'encapsidation et les séquences activatrices du promoteur E1A. L'autre fragment qui se trouve en aval du transgène porte les séquences qui permettent la recombinaison homologue et qui codent pour la protéine pIX. Cette région est toujours conservée et est indispensable pour la multiplication virale. Le transgène est inséré dans la partie gauche du virus par l'intermédiaire du plasmide soit par insertion *in vitro* soit par recombinaison homologue *in vivo*.

Dans la stratégie utilisant l'insertion, le plasmide contenant le gène d'intérêt est digéré par des enzymes de restriction. Le fragment linéarisé qui contient la partie gauche de l'Ad5 et le transgène sous contrôle du promoteur, est ligaturé à la partie droite de l'Ad5. La partie gauche de l'Ad5 est manquante car elle a été digérée par des endonucléases spécifiques (Eloit *et al.*, 1990). La méthode de clonage employée conduit à l'obtention de mutants défectifs pour E1 qui ne se multiplient pas en cellules normales et qui nécessitent les cellules 293 (Aiello *et al.*, 1979 et Graham *et al.*, 1977) capables de fournir en trans les produits du gène E1. Il s'agit de cellules rénales embryonnaires humaines transformées par des fragments d'ADN d'Ad5 comprenant 4 à 5 copies des 12% de l'extrémité gauche du génome viral, ainsi qu'une copie des 9% de la partie droite. L'analyse de l'ADN viral des cellules 293 a montré que l'ADN viral a été intégré en deux sites du génome cellulaire. Les sites d'intégration ont été déterminés par hybridation de l'ADN viral marqué avec l'ADN cellulaire transformé (Aiello *et al.*, 1979).

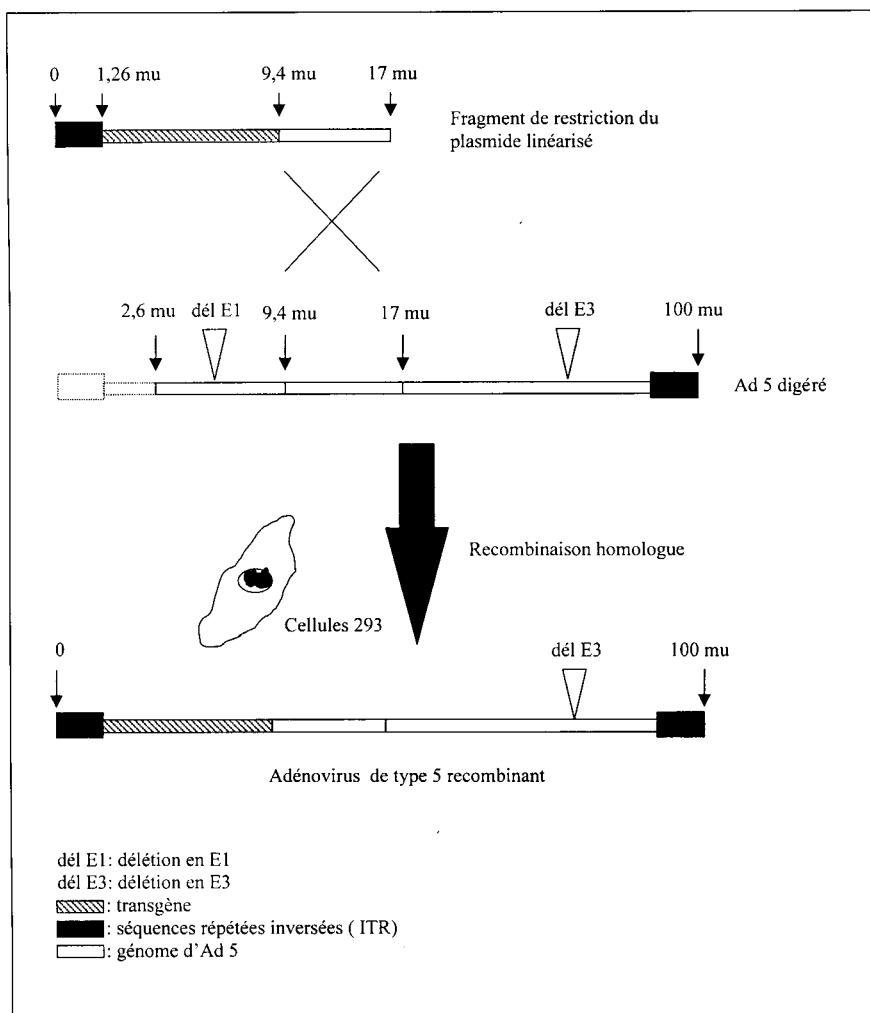


Figure 5

Stratégie utilisée pour la construction des adénovirus recombinants délétés en E1. Le plasmide linéarisé contenant du transgène (1,26-9,4 mu) flanqué de deux fragments (0-1,26 mu et 9,4-17 mu) du génome d'Ad5 est cotransfecté dans les cellules 293 avec le génome de l'Ad5 dont la partie gauche est manquante du fait de la digestion spécifique par des endonucléases de restriction requise par la construction. La recombinaison homologue entre les deux ADN génère des génomes recombinants qui peuvent être encapsidés et qui sont délétés dans les régions E1 et E3.

La recombinaison homologue après la cotransfection des cellules 293 avec le plasmide linéarisé et le génome de l'Ad5 (dIE1) dont la partie gauche manque, génère des génomes recombinants qui peuvent être encapsidés et qui sont délétés en E1. L'utilisation d'un génome d'Ad5 délétés dans les régions E1 et E3 lors de la cotransfection, permet d'obtenir des vecteurs recombinants délétés dans ces deux régions E1 et E3 (Eloit et Adam, 1995). Ce type de construction permet le clonage de transgènes d'une taille pouvant atteindre 7-8 kpb.

Un autre vecteur délété pour les régions E1, E3 et pour le gène E2B codant pour une ADN polymérase virale de 140kDa et pour une protéine de 80 kDa, a été récemment construit (Amalfitano *et al.*, 1998).

Des vecteurs recombinants non répliatifs de deuxième génération sont obtenus par le clonage de transgènes dans la région E4 dont la délétion est létale pour le virus (Mason *et al.*, 1990). Le clonage de transgènes est également possible dans la région E3. La stratégie de construction de ces vecteurs par recombinaison ou insertion est similaire à celle décrite pour les vecteurs délétés en E1 à l'exception de l'utilisation des plasmides qui contiennent la partie droite du génome de l'Ad5 et le transgène (Imler, 1995).

Aujourd'hui, il est possible de construire des vecteurs dits «minimaux» dépourvus de tous les gènes viraux à l'exception des ITR de chaque côté et le domaine d'encapsidation à l'extrémité gauche du génome viral (Parks *et al.*, 1997).

Récemment une nouvelle méthode de construction de génomes recombinants appelés EDRA (E. coli – derived Recombinant Ad genomes), qui comprend deux recombinaisons homologues successives en *E.coli* (two – step recombinational cloning), a été développée (Crouzet *et al.*, 1997). Elle permet de construire des recombinants délétés en E1 et E3 qui seront propagés sur les cellules 293, et des recombinants délétés en E1, E3 et E4 propagés par la suite sur les cellules IGRP dérivées des cellules 293 qui transcomplémentent les fonctions déficientes (Yeh *et al.*, 1996).

Utilisation en vaccination

Les vecteurs adénoviraux dits de première génération sont délétés au moins de la région E1A (*trans*-activateurs des gènes viraux) et le plus souvent en E1B dans un fond génétique où la gène E3 est supprimé.

La délétion de la région E3 augmente l'activité cellulaire T cytotoxique et, par conséquent, la durée d'expression des transgènes est diminuée (Ginsberg *et al.*, 1989; Wold et Gooding, 1991). De plus, les vecteurs délétés en E3 induisent une réponse en anticorps plus forte et plus durable que celle induite par les vecteurs non délétés en E3 (Rianarison-Jewtoukoff et Perri-caudet, 1995). En outre, la délétion en E3 peut également minimiser le risque de persistance du vecteur chez les personnes ou les animaux vaccinés.

Le premier vaccin à base d'adénovirus recombinant non répliatif a été utilisé avec succès pour exprimer l'antigène de surface (HBs) du virus de l'hépatite B *in vivo* chez le lapin (Ballay *et al.*, 1987).

La capacité de vecteurs déficients pour la multiplication, d'induire une réponse immune envers différents antigènes, a été démontrée pour plusieurs virus chez différents animaux: pour l'herpèsvirus de la maladie d'Aujeszky chez le lapin, la souris, le rat des cottonniers (Eloit *et al.*, 1990; Eloit et Adam, 1995), le porc (Potier *et al.*, 1997) et le poulet (Adam *et al.*, 1995), pour le BHV-1 chez le rat des cottonniers (Mittal *et al.*, 1996), pour l'herpès simplex virus (Gallichan *et al.*, 1993) et le virus de la rage chez la souris (Xiang *et al.*, 1996), pour le

coronavirus de la péritonite infectieuse féline chez le chat (Gonin *et al.*, 1996) et pour le virus Epstein-Barr chez le singe tamarin (Ragot *et al.*, 1993).

Ces vecteurs peuvent être administrés par diverses voies et malgré leur incapacité à se multiplier, expriment le transgène *in vitro* et *in vivo* (Eloit *et al.*, 1990).

L'induction d'une réponse immune mucoale et d'une activité cellulaire T cytotoxique, après l'administration locale des adénovirus recombinants exprimant le gène de la glycoprotéine gB de l'herpès simplex virus (Gallichan *et al.*, 1993) et la glycoprotéine G du virus rabique (Xiang *et al.*, 1996) a également été décrite dans la modèle murin. L'inoculation des adénovirus recombinants à des rats des cotonniers, par voie intradermique et rappel par voie intranasale, a permis d'obtenir une réponse en anticorps IgG et IgA sériques et locaux et une protection envers l'épreuve virulente avec le BHV-1 (Mittal *et al.*, 1996).

Malheureusement, il s'est vite avéré que ces vecteurs adénoviraux dits de première génération induisaient une réaction immunitaire contre les cellules transduites en raison de l'apparition de peptides viraux synthétisés au cours de la réplication à bas bruit qui a lieu dans les cellules. En effet, la délétion des gènes E1 n'empêche pas une transcription de faible niveau à partir de promoteurs des autres gènes précoces (E2, E3 et E4) ou à partir de promoteur MLP des gènes tardifs (L1-L5) exprimant les protéines structurales (Amalfitano *et al.*, 1998). Les cellules génétiquement modifiées exprimant des protéines virales, en plus du transgène, seront éliminées par les cellules T cytotoxiques. En outre, l'expression de ces protéines virales amplifie la réponse en anticorps contre le vecteur, ce qui représente un frein à l'efficacité des rappels. L'ensemble de ces effets secondaires est responsable de l'expression transitoire du transgène. Elle limite donc sérieusement l'utilisation de ces vecteurs en thérapie génique. Cet effet est moins grave en cas d'application vaccinale et de traitement de tumeurs où une réaction immunitaire contre les cellules transduites est bénéfique, puisqu'on cherche justement à les éliminer. L'expression de la protéine fortement immunogène codée par le transgène après la vaccination peut induire, soit une forte réponse en lymphocytes T cytotoxiques,

auquel cas les cellules transduites sont progressivement éliminées, soit une réponse cytotoxique faible ou nulle et une forte réponse humorale: les cellules transduites ne sont pas détruites, mais par contre le produit du transgène n'est pas détectable ou est rapidement éliminé s'il est sécrété (Michou *et al.*, 1997; Lusky *et al.*, 1998).

Les vecteurs adénoviraux délétés dans les régions E1, E3 et E2B sont capables de porter un transgène d'une taille pouvant atteindre 11 kpb. Le gène E2B est indispensable pour la multiplication virale. Sa délétion diminue considérablement l'expression des gènes tardifs par comparaison aux vecteurs adénoviraux de première génération délétés de E1, ce qui entraîne une prolongation de l'expression du transgène. La propagation de ces vecteurs délétés en E2B n'est possible qu'en culture de cellules C-7 dérivées des cellules 293, qui sont capables de fournir en trans l'ADN polymérase virale et la protéine préterminale codés par le gène délété (E2B), ainsi que les produits du gène E1. De plus, la délétion du gène E2B permet d'éviter les risques d'apparition de RCA (Replication Competent Adenovirus). En effet, le double événe-

Tableau 1

Inconvénients liés à l'utilisation du vecteur	Modifications proposées du vecteur
- dissémination dans d'autres tissus que l'organe ou le tissu cible. - transmission du receveur vers d'autres personnes ou d'autres animaux.	- utilisation de virus non réplcatifs. - Délétions possibles dans les régions E1, E2B et E4.
- apparition de RCA^a par recombinaison lors de la production	- délétion en E2B ou en E4. de vecteurs <i>in vitro</i>. - mise au point de nouvelles CCL^b réduisant les risques de génération de RCA^a.
- trans-complémentation du vecteur par un adénovirus sauvage <i>in vivo</i>. - récupération des gènes délétés à partir d'un adénovirus sauvage <i>in vivo</i>. - transfert du transgène vers un adénovirus sauvage.	- mutations au niveau du domaine d'encapsidation. - développement de vecteurs adénoviraux d'origine animale.
- faible niveau d'expression des protéines virales en absence de E1.	- délétion en E2B ou en E4. - utilisation de vecteurs dits «minimaux»
- taille d'insert limitée	- délétions en E1+E3 (6 kpb) ou E1+E2B+E3 (9kpb) ou E1+E3+E4 (9 kpb) ou E1+E3+E4+L5 (10,7 kpb) - utilisation de vecteurs dits «minimaux»
- immunogénicité insuffisante	- utilisation d'adjuvants huileux (eau/huile/eau) permettant l'induction d'IL-2 et surtout d'IL-6. Cela permet d'augmenter la réponse immune contre le produit du transgène et de diminuer la dose vaccinale (Ganne <i>et al.</i>, 1994). - co-expression de gènes de cytokines permettant d'amplifier ou de moduler la réponse immune.

^a Adénovirus compétents pour la multiplication (replication competent adenovirus).
^b Lignée cellulaire complémentante (complementation cell line).

ment de recombinaison au niveau de E1 et E2B requis pour les générer est hautement improbable. En outre, la production des ces vecteurs ne requiert pas l'utilisation de virus auxiliaires, ce qui évite la contamination des stocks d'adénovirus.

Les vecteurs adénoviraux de deuxième génération sont délétés simultanément des gènes E1 et E4. Les cellules transduites par ces vecteurs persistent plus longtemps que ceux transduites par des vecteurs délétés de E1 et portant le même transgène. La délétion de E4 qui est létale pour le virus, limite de façon importante la synthèse de protéines virales dans les cellules transduites et diminue le risque de réapparition de RCA dans les stocks d'adénovirus. Ces vecteurs peuvent se multiplier seulement dans des cellules transcomplémentant les fonctions virales défectives (E1 et E4) (Gao *et al.*, 1996).

L'utilisation des vecteurs adénoviraux dits «minimaux» de troisième génération permet d'augmenter la taille de l'insert jusqu'à 30 kpb et d'éviter les risques d'apparition de virus capables de se multiplier dans les stocks viraux appelés RCA (Replication Competent Adenovirus). La propagation des ces vecteurs n'est possible que dans une lignée cellulaire transcomplémentante en présence des vecteurs de première génération soit délétés en E1, soit

délétés simultanément en E1 et en E2B. Les virus auxiliaires, ainsi que la lignée cellulaire fournissent en trans les produits des gènes délétés chez les vecteurs dits «minimaux» ou «gutless», mais il reste très difficile à l'heure actuelle de séparer ces vecteurs dits «minimaux» des virus auxiliaires après leur production à haut titre (Fisher *et al.*, 1996).

CONCLUSION

Les vecteurs adénoviraux recombinants réplcatifs ou non réplcatifs ont clairement démontré leur efficacité dans le domaine de la vaccination, par l'induction de réponses immunes humorale, cellulaire, et muqueuse. Les modifications réalisées sur les vecteurs ont permis d'améliorer certaines caractéristiques lors de leur utilisation *in vitro* et *in vivo* (voir tableau 1). Des améliorations concernant le ciblage des vecteurs vers des types de cellules importantes pour l'induction d'une réponse immune devront être réalisées lorsque les cellules cibles seront mieux connues. L'optimisation des séquences régulatrices dans la cassette d'expression peut diminuer de manière très importante les doses virales nécessaires à une protection grâce à une expression optimale du transgène. Les vecteurs adénoviraux sont particulièrement indiqués pour l'immunisation par voie muqueuse.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une recherche subventionnée par la Direction Générale «Recherche et Développement» du Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture.

Les auteurs remercient le Professeur Marc Eloit (Maisons Alfort) pour les discussions stimulantes.

Summary

Recombinant adenoviruses as vectors in vaccination

According to numerous reported studies, recombinant vaccines based on replicative versus non replicative adenoviruses appear to be attractive candidates for vaccination against animal and human diseases. They have proven their ability to express high levels of heterologous genes and to induce humoral and cellular immunity independently of the antigen, the animal model or the route of administration. Furthermore, these vectors induce an excellent immunity upon application to mucosal membranes suggesting their usefulness as vaccines against different infectious agents responsible for respiratory and genital diseases.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAM M., OUALIKENE W., LE C.H., GUITTET M., ELOIT M. Replication-defective adenovirus type 5 as an *in vitro* and *in vivo* gene transfer vector in chickens. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 3153-3157.
- AIELLO L., GUILFOYLE R., HUEBNER K., WEINMANN R. Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology*, 1979, **94**, 460-469.
- AKUSJARVI G. Proteins with transcription regulatory properties encoded by human adenoviruses. *Trends in Microbiology*, 1993, **1**, 5, 163-170.
- ALDASY P., CSONTOS L., BARTHA A. Pneumo-enteritis in calves caused by adenovirus. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 1965, **15**, 167-175.
- AMALFITANO A., HAUSER M.A., HU H., SERRA D., BEGY C.R., CHAMBERLAIN J.S. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.*, 1998, **72**, 926-933.
- BALLAY A., LEVRERO M., TIOLLAIS P., PERRICAUDET M. In Hepadnaviruses. U.C.L.A. symposia on molecular and cellular biology. New series, 1987, **vol.70**: 481-493. W. Robinson, Koike K., Will H. Editors. New York: Alan R. Liss.
- BERK A.J., LEE F., HARRISON T., WILLIAMS J., SHARP P.A. Early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell*, 1979, **17**, 935-944.
- CALLEBAUT P., ENJUANES L., PENSAERT M. An adenovirus recombinant expressing the spike glycoprotein of porcine respiratory coronavirus is immunogenic in swine. *J. Gen. Virol.*, 1996, **77**, 309-313.
- CHARLTON K.M., ARTOIS M., PREVEC L., CAMPBELL J.B., CASEY G.A., WELER A.I., ARMSTRONG J. Oral rabies vaccination of skunks and foxes with a recombinant human adenovirus vaccine. *Arch. Virol.*, 1992, **123**, 169-179.
- CHARTIER C., DEGRYSE E., GANTZER M., DIETERLE A., PAVIRANI A., METHALI M. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.*, 1996, **70**, 4805-4810.
- CHENGALVALA M.V., BHAT B.M., BHAT R., LUBECK M.D., MIZUTANI S., DAVIS A.R., HUNG P.P. Immunogenicity of high expression adenovirus-hepatitis B virus recombinant vaccines in dogs. *J. Gen. Virol.*, 1994, **75**, 125-131.
- CHENGALVALA M.V., BHAT B.M., BHAT R.A., DHEER S.K., LUBECK M.D., PURCELL R.H., MURTHY K.K. Replication and immunogenicity of Ad7-, Ad4-, and Ad5-hepatitis B virus surface

- antigen recombinants, with or without a portion of E3 region, in chimpanzees. *Vaccine*, 1997, **15**, 335-339.
- CHOW L.T., GELIANAS R.E., BROKER T.R., ROBERTS R.J. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, **12**, 1-8.
- CROUZET J., NAUDIN L., ORSINI C., VIGNE E., FERRERO L., LE ROUX A., BENOIT P., LATTA M., TORRENT C., BRANELLEC D., DENEFE P., MAYAUX J.F., PERRICAUDET M., YEH P. Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 1414-1419.
- ELOIT M., GILARDI-HEBENSTREIT P., TOMA B., PERRICAUDET M. Construction of a defective adenovirus vector expressing the pseudorabies virus glycoprotein gp50 and its use as a live vaccine. *J. Gen. Virol.*, 1990, **71**, 2425-2431.
- ELOIT M., ADAM M. Isogenic adenoviruses type 5 expressing or not expressing the E1A gene: efficiency as virus vectors in the vaccination of permissive and non-permissive species. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 1583-1589.
- ELOIT M. Vaccination par des vecteurs adénoviraux. *Virologie*, 1998, **2**, 109-120.
- GALLICHAN W.S., JOHNSON D.C., GRAHAM F.L., ROSENTHAL K.L. Mucosal immunity protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B. *J. Infect. Dis.*, 1993, **168**, 622-629.
- GANNE V., ELOIT M., LAVAL A., ADAM M., TROUVE G. Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants. *Vaccine*, 1994, **12**, 1190-1196.
- GAO G.P., YANG Y., WILSON J.M. Biology of adenovirus vectors with E1 E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J. Virol.*, 1996, **70**, 8934-8943.
- GERARD R.D., MEIDELL R.S. Adenovirus-Mediated Gene Transfer. *Trends Cardiovasc Med.*, 1993, **3**, 171-177.
- GINSBERG H.S., LUNDHOLM-BEAUCHAMP U., HORSWOOD R.L., PERNIS B., WOLD W.S., CHANOCK R.M., PRINCE G.A. Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 3823-3827.
- GONIN P., OUALIKENE W., FOURNIER A., SOULIER M., AUDONNET J-CH., RIVIÈRE M., ELOIT M. Evaluation of a Replication-Defective Adenovirus Expressing the Feline Infectious Peritonitis Membrane Protein as a Vaccine in Cats. *Vaccine Research*, 1996, **4**, 217-227.
- GOODING L.R., ELMORE L.E., TOLLEFSON A.E., BRODY H.A., WOLD W.S.M. A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell*, **53**, 341-346.
- GHOSH-CHOUDHURY G., HAJ-AHMED Y., GRAHAM F.L. Protein IX component of the human adenovirus capsid is essential for the packaging of full length genomes. *EMBO J.*, 1987, **6**, 1733-1739.
- FISHER K.J., CHOI H., BURDA J., CHEN S.J., WILSON J.M. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, 1996, **217**, 11-22.
- GRAHAM F.L., SMILEY J., RUSSELL W.C., NAIRN R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 1977, **36**, 59-74.
- HEARING P., SHENK T. The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. *Cell*, 1983, **33**, 695-703.
- HEARING P., SHENK T. The adenovirus type 5 E1A enhancer contains two functionally distinct domains: one is specific for E1A and other modulated all early units en cis. *Cell*, 1986, **45**, 229-236.
- HORWITZ M.S. Adenoviridae and their replication in: *Virology 2nd Fields B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., Hirsh M.S., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B. eds., Raven Press, New York*, 1990^b, 1679-1721.
- HORWITZ M.S. Adenoviruses in: *Virology 2nd Fields B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., Hirsh M.S., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B. eds., Raven Press, New York*, 1990^b, 1723-1740.
- HUEBNER R.J., ROWE W.P., WARD T.J., PARROT R.H., BELL J.A. Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *N. Engl. J. Med.*, 1954, **251**, 1077-1186.
- IMLER J.L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine*, 1995, **13**, 1143-1151.
- JOHNSON D.C., GHOSH-CHOUDHURY G., SMILEY J.R., FALLIS L., GRAHAM F.L. Abundant expression of herpes simplex virus glycoprotein gB using an adenovirus vector. *Virology*, 1988, **164**, 1-14.
- KLESSIG D.F., GRODZICKER T. Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells map in the viral gene encoding the 72K DNA binding protein. *Cell*, 1979, **17**, 957-966.
- KLONIKOWSKI B., GILARDI-HEBENSTREIT P., HADCHOUEL J., RRIANARISON V., BOUTIN S., YEH P., PERRICAUDET M., KREMER E.J. A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction expression of a transgene in human-derived cells and *in vivo* [see comments]. *Hum. Gene Ther.*, 1997, **8**, 2103-2115.
- LELEU G., LE JUNTER J., MORINET F. Les pneumonies à adénovirus. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1995, **6**, 18-22.
- LEONG K., LEE W., BERK A.J. High-level transcription from the adenovirus major late promoter requires downstream binding sites for late-phase-specific factors. *J. Virol.*, 1990, **64**, 1, 51-60.
- LUBECK M.D., DAVIS A.R., CHENGALVALA M., NATUK R.J., MORIN J.E., MOLNAR-KIMBER K., MASON B.B., BHAT B.M., MIZUTANI S., HUNG P.P. Immunogenicity and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on live recombinant adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 6763-6767.
- LUBECK M.D., NATUK R.J., CHENGALVALA M., CHA P.K., MURTHY K.K., MURTHY S., MIZUTANI S., LEE S.G., WADE M.S., BHAT B.M. Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1994, **10**, 1443-1449.
- LUSKY M., CHRIST M., RITTNER K., DIETERLE A., DREYER D., MOUROT B., SCHULTZ H., STOECKEL F., PAVIRANI A., MEHTALI M. *In vitro* and *in vivo* biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J. Virol.*, 1998, **72**, 2022-2032.
- MASON B.B., DAVIS A.R., BHAT B.M., CHENGALVALA M., LUBECK M.D., ZLE G., KOSTEK B., CHOLODOFSKY S., DHEER S., MOLNAR-KIMBER K. Adenovirus vaccine vectors expressing hepatitis B surface antigen: importance of regulatory elements in the adenovirus major late intron. *Virology*, 1990, **177**, 452-461.
- MICHOU A.I., SANTORO L., CHRIST M., JULLIARD V., PAVIRANI A., MEHTALI M. Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther.*, 1997, **4**, 473-482.
- MITTAL S.K., PREVEC L., GRAHAM F.L., BABIUK L.A. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 93-102.
- MITTAL S.K., PAPP Z., TIKOO S.K., BACA-ESTRADA M.E., YOO D., BENKO M., BABIUK L.A. Induction of systemic and mucosal immune responses in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncated forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology*, 1996, **222**, 299-309.
- MORIN J.E., LUBECK M.D., BARTON J.E., CONLEY A.J., DAVIS A.R., HUNG P.P. Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, **84**, 4626-4630.
- MÜLLBACHER A. Viral escape from immune recognition: Multiple strategies of adenoviruses. *Immunol. Cell Biol.*, 1992, **70**, 59-63.
- PAPP Z., BABIUK L.A., BACA-ESTRADA M.E. Induction of immunity in the respiratory tract and protection from bovine herpesvirus type 1 infection by different routes of immunization with recombinant adenovirus. *Viral. Immunol.*, 1998, **11**, 79-91.

- PARKS R.J., GRAHAM F.L. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J. Virol.*, 1997, **71**, 3293-3298.
- PERSSON H., SIGMAS C., PHILIPSON C. Purification and characterization of an early glycoprotein from Ad2 infected cells. *J. Virology*, 1979, **29**, 938-948.
- POTIER M.F., MONTEIL M., HOUDAYER C., ELOIT M. Study of the delivery of the gD gene of pseudorabies virus to one-day- old piglets by adenovirus or plasmid DNA as ways to by-pass the inhibition of immune response by colostral antibodies. *Vet. Microbiol.*, 1997, **55**, 75-80.
- PREVEC L., SCHNEIDER M., ROSENTHAL K.L., BELBECK L.W., DERBYSHIRE J.B., GRAHAM F.L. Use of human adenovirus-based vectors for antigen expression in animals. *J. Gen. Virol.*, 1989, **70**, 429-434.
- RAGOT T., FINERTY S., WATKINS P.E., PERRICAUDET M., MORGAN A.J. Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein- Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *J. Gen. Virol.*, 1993, **74**, 501-507.
- RANDRIANARISON-JEWTOUKOFF V., PERRICAUDET M. Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals*, 1995, **23**, 145-157.
- REDDY P.S., IDAMAKANTI N., HYUN B.H., TIKOO S.K., BABIUK L.A. Development of porcine adenovirus-3 as an expression vector. *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 563-570.
- REICH P.R., ROSE J., LEVINE A. RNA of low molecular weight in KB cells infected with Ad2. *J. Mol. Biol.*, 1966, **17**, 428-439.
- ROTHEL J.S., BOYLE D.B., BOTH G.W., PYE A.D., WATERKEYN J.G., WOOD P.R., LIGHTOWLERS M.W. Sequential nucleic acid and recombinant adenovirus vaccination induces host-protective immune responses against *Taenia ovis* infection in sheep. *Parasite Immunol.*, 1997, **19**, 221-227.
- ROUTES J.M., BELLGRAU D., MCGRORY W.J., BAUTISTA D.S., GRAHAM F.L., COOK J.L. Anti-adenovirus type 5 cytotoxic T lymphocytes: immunodominant epitopes are encoded by the E1A gene. *J. Virol.*, 1991, **65**, 1450-1457.
- RUBARTH S. An acute virus disease with liver lesion in dogs (hepatitis contagiosa canis). A pathologicoanatomical and etiological investigation. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*, 1947, **69**, 222.
- SCHNEIDER M., GRAHAM F.L., PREVEC L. Expression of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus by infectious adenovirus vectors. *J. Gen. Virol.*, 1989, **70**, 417-427.
- SHENK T. Adenoviridae: The viruses and their replication In Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (ed.), *Fields Virology*, third edition. Lippencott Raven Press, New York, 1996, 2111-2137.
- THIMMAPAYA B., WEINBERGER C., SCHEINDER R.J., SHENK T. Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell*, 1982, **31**, 543-551.
- TOOZE J. DNA tumor viruses: molecular biology of tumor viruses, 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, 937-1036.
- VAN DER VLIET P.C., SUSSENBACH J.S. An adenovirus type 5 gene function required for initiation of viral DNA replication. *Virology*, 1975, **67**, 415-426.
- WOLD W.S., GOODING L.R. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology*, 1991, **184**, 1-8.
- XIANG Z.Q., YANG Y., WILSON J.M., ERTL H.C. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology*, 1996, **219**, 220-227.
- YAROSH O.K., WELER A.I., GRAHAM F.L., CAMPBELL J.B., PREVEC L. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. *Vaccine*, 1996, **14**, 1257-1264.
- YE W.W., MASON B.B., CHENGALVALA M., CHENG S.M., ZLE G., LUBECK M.D., LEE S.G., MIZUTANI S., DAVIS A.R., HUNG P.P. Co-expression of hepatitis B virus antigens by a non-defective adenovirus vaccine vector. *Arch. Virol.*, 1991, **118**, 11-27.
- YEH P., DEDIEU J.F., ORSINI C., VIGNE E., DENEFLÉ P., PERRICAUDET M. Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J. Virol.*, 1996, **70**, 559-565.
- ZAKHARTCHOUK A.N., REDDY P.S., BAXI M., BACA-ESTRADA M.E., MEHTALI M., BABIUK L.A., TIKOO S.K. Construction and characterization of E3-deleted bovine adenovirus type 3 expressing full-length and truncated form of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology*, 1998, **250**, 220-229.
- ZHENG B., GRAHAM F.L., JOHNSON D.C., HANKE T., MCDERMOTT M.R., PREVEC L. Immunogenicity in mice of tandem repeats of an epitope from herpes simplex gD protein when expressed by recombinant adenovirus vectors. *Vaccine*, 1993, **11**, 1191-1198.