UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UFR de PHARMACIE

ANNEE 2005

N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

DE REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE

Par

Jérôme LEMOINE

Né le 16 Janvier 1974 à Villers-Semeuse (Ardennes)

Mention : Pharmacie

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

TRANSFECTION DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE NASAL NORMAL DE SOURIS

Soutenue publiquement le 02/12/2005

<u>JURY</u>

Président : Moncef GUENOUNOU, Professeur des Universités, REIMS

Rapporteurs : Michel Francis BUREAU, Docteur, Université de PARIS V

Joël PESTEL, Directeur de recherche CNRS, Université de LILLE 1

Directeur de thèse : Bernard DESOIZE, Professeur des Universités, REIMS

Les opinions exprimées dans cette thèse n'engagent que son auteur

et en aucun cas la Faculté de Pharmacie de REIMS.

A mes parents, Janine et Daniel

Que je remercie pour leur soutien et leur confiance tout au long de ces années.

A ma sœur Valérie et ma grand-mère Lucie

Qui nous ont quitté pendant la réalisation de cette thèse.

A mes nièces Solène et Célia

Qui ont vu le jour au cours de ce travail.

A toute ma famille

Qu'elle trouve dans cette thèse le témoignage de mon affection.

A vous tous, je dédie cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Leaf Huang, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au Center for Pharmacogenetics de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Pittsburgh (PA, USA) et de m'avoir permis d'y mener à bien ce travail.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur Bernard Desoize, qui en acceptant d'être mon directeur de thèse, m'a permis d'effectuer à Pittsburgh la recherche, qui me tenait à cœur depuis si longtemps.

Qu'il soit assuré de ma respectueuse et profonde gratitude.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur Moncef Guenounou, que je remercie vivement de me faire l'honneur de juger cette thèse et d'avoir accepté d'être le Président du jury.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Michel Francis Bureau et Monsieur le Docteur Joël Pestel pour l'intérêt qu'ils ont accordé à ce travail de thèse et pour avoir accepté d'être ses rapporteurs.

Qu'ils trouvent ici l'assurance de ma respectueuse considération.

A tous les membres du Center for Pharmacogenetics de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Pittsburgh.

Table des

matières

| | pages |
|--|-------|
| Introduction | 1-25 |
| But du travail | 26-28 |
| Chapitre 1: Transfection de l'épithélium respiratoire nasal par choc hypotonique | 29-57 |
| 1.1. Introduction | 29-32 |
| 1.2. Matériels et méthodes | 33-37 |
| 1.2.1. Matériels | 33 |
| 1.2.2. Plasmides | 33 |
| 1.2.3. Transfert de gènes dans l'épithélium nasal de souris | 33-34 |
| 1.2.4. Mesure de l'activité luciférase | 34-35 |
| 1.2.5. Immunodétection de la β -galactosidase | 35-37 |
| 1.3. Résultats | 38-53 |
| 1.3.1. Effet de la tonicité de la solution d'ADN sur la transfection du tissu nasal | 38-39 |
| 1.3.2. Localisation de l'expression du transgène dans le tissu nasal par détection de la β-galactosidase par immuno-marquage | 40-42 |
| 1.3.3. Effet de la pré-perfusion d'eau sur la transfection de l'épithélium respiratoire | 43-46 |
| 1.3.4. Effet de l'ATP sur la transfection de l'épithélium nasal | 47-49 |
| 1.3.5. Effet de la suramine sur la transfection du tissu respiratoire nasal | 50-51 |
| 1.3.6. Altération de la transfection du tissu nasal par divers agonistes P2 | 52-53 |
| 1.4. Discussion | 54-57 |
| Chapitre 2: Vecteur de gènes Sec-LPD-II | 58-78 |
| 2.1. Introduction | 58-60 |
| 2.2. Matériels et méthodes | 61-64 |
| 2.2.1. Matériels | 61 |

| 2.2.2. Plasmide | 61 |
|---|--------|
| 2.2.3. Formation du liposome NGPE/DOPE | 61 |
| 2.2.4. Formation du complexe ADN/protamine | 61-62 |
| 2.2.5. Formation du pré-LPD-II | 62 |
| 2.2.6. Synthèse du conjugué Sec-PEG-PE | 62 |
| 2.2.7. Formation de Sec-LPD-II | 63 |
| 2.2.8. Mesure de la taille de complexes par Dynamic Light Scattering | 63 |
| 2.2.9. Mesure du potentiel zêta de complexes | 63-64 |
| 2.2.10. Perfusion nasale du vecteur de gènes | 64 |
| 2.3. Résultats | 65-76 |
| 2.3.1. Taille des complexes ADN/protamine | 65-66 |
| 2.3.2. Potentiel zêta des complexes ADN/protamine | 67-68 |
| 2.3.3. Taille du pré-LPD-II | 69-70 |
| 2.3.4. Potentiel zêta du pré-LPD-II | 71-72 |
| 2.3.5. Formation du vecteur Sec-LPD-II | 73-74 |
| 2.3.6. Transfection de l'épithélium respiratoire nasal avec Sec-LPD-II | 75-76 |
| 2.4. Discussion | 77-78 |
| Chapitre 3: Amélioration de la transfection et de l'expression du transgène | 79-104 |
| 3.1. Introduction | 79-80 |
| 3.2. Matériels et méthodes | 81-86 |
| 3.2.1. Matériels | 81 |
| 3.2.2. Préparation de la solution d'acide aurintricarboxylique | 81 |
| 3.2.3. Mutagenèse dirigée du site YY1 | 82-85 |
| 3.2.3.1. Dénaturation du plasmide | 82 |

pages

| | pages |
|--|-------------|
| 3.2.3.2. Hybridation de l'oligonucléotide amorce | 82 |
| 3.2.3.3. Extension de l'oligonucléotide amorce | 82 |
| 3.2.3.4. Digestion par Dpn I | 83 |
| 3.2.3.5. Transformation des bactéries compétentes BMH 71-18 mutS | 83-84 |
| 3.2.3.6. Transformation des bactéries compétentes DH5α | 84-85 |
| 3.2.3.7. Identification des colonies contenant un plasmide mutant | 85 |
| 3.2.4. Préparation des fragments de restriction | 86 |
| 3.3. Résultats | 87-100 |
| 3.3.1. Effet de l'inhibition des nucléases sur la transfection de l'épithélium nasal | 87-89 |
| 3.3.2. Mutation du site de fixation du facteur de transcription YY1 | 90-94 |
| 3.3.3. Clivage de la portion bactérienne du plasmide | 95-100 |
| 3.4. Discussion | 101-104 |
| Chapitre 4: Fixation non covalente de peptides sur un plasmide via un bis-l | PNA 105-133 |
| 4.1. Introduction | 105-112 |
| 4.2. Matériels et méthodes | 113-119 |
| 4.2.1. Peptides | 113 |
| 4.2.2. Synthèse du bis-PNA | 113 |
| 4.2.3. Conjugaison du bis-PNA au FITC | 113-114 |
| 4.2.4. Clivage, déprotection et extraction du FITC-bis-PNA-peptide | 114 |
| 4.2.5. Purification du FITC-bis-PNA-peptide par Reverse Phase-HPL | .C 114-115 |
| 4.2.6. Préparation de la solution de bis-PNA-peptide | 115 |
| 4.2.7. Détermination de la concentration de bis-PNA-peptide | 115-116 |
| 4.2.8. Fixation du bis-PNA-peptide sur le plasmide pGeneGrip-luc | 116 |
| 4.2.9. Filtration en gel du mélange bis-PNA-peptide/pGeneGrip-luc | 116 |

| 4.2.10. Mesure de la fluorescence (512 nm) et de l'absorbance (260 nm) du complexe FITC-bis-PNA-peptide/plasmide | 117 |
|---|---------|
| 4.2.11. Culture et ensemencement des lignées cellulaires | 117 |
| 4.2.12. Formation des complexes bis-PNA-peptide/ADN/ Lipofectamine 2000 | 117-118 |
| 4.2.13. Transfection des lignées cellulaires | 118 |
| 4.2.14. Production d'un fragment de PCR contenant le gène luciférase | 118-119 |
| 4.3. Résultats | 120-131 |
| 4.3.1. Fixation du bis-PNA dépourvu de résidus « J » sur le plasmide pGeneGrip-luc | 120-125 |
| 4.3.2. Transfection de lignées cellulaires avec des complexes ADN/bis-PNA-peptide | 126-131 |
| 4.4. Discussion | 132-133 |
| <u>Chapitre 5</u> : Modifications de l'amplificateur transcriptionnel IE1 du cytomégalovirus | 134-153 |
| 5.1. Introduction | 134-137 |
| 5.2. Matériels et méthodes | 138-141 |
| 5.2.1. Matériels | 138 |
| 5.2.2. Elimination de l'amplificateur transcriptionnel du plasmide pNGVL ₃ -luc | 138-139 |
| 5.2.3. Formation de duplexes d'oligonucléotides reconstituant l'amplificateur transcriptionnel | 139 |
| 5.2.4. Assemblage des plasmides contenant un amplificateur transcriptionnel mutant | 139 |
| 5.2.5. Transformation de la souche DH5 α d'Escherichia coli | 140 |
| 5.2.6. Identification des colonies contenant un plasmide mutant | 140-141 |
| 5.3. Résultats | 142-149 |
| 5.3.1. Transfection de l'épithélium nasal avec le plasmide pNGVL ₃ -luc | 142-143 |

pages

| | pages |
|---|---------|
| 5.3.2. Transfection de l'épithélium respiratoire nasal avec le plasmide pNGVL ₄ -luc | 144-145 |
| 5.3.3. Transfection de l'épithélium nasal avec le plasmide pNGVL ₅ -luc | 146-149 |
| 5.4. Discussion | 150-153 |
| Discussion et perspectives | 154-160 |
| Références bibliographiques | 161-195 |

Table des illustrations

| | pages |
|---|--------------------------------|
| Figure 1 Représentation schématique du choc hypotonique. | 32 |
| Figure 2 Effet de la tonicité de la solution de plasmide sur la transf du tissu nasal. | Section 39 |
| Figure 3 Immunodétection de la β-galactosidase dans l'épithélium respiratoire nasal. | 41-42 |
| Figure 4 Perfusion séquentielle d'eau déminéralisée et de plasmide l'eau. | e dans de 44 |
| Figure 5 Représentation schématique des changements de volume au cours d'un choc hypotonique. | cellulaire 46 |
| Figure 6 Structures de l'agoniste P2, l'adénosine triphosphate (a) e l'antagoniste P2, la suramine (b). | t de 48 |
| Figure 7 Effet de l'adénosine triphosphate (ATP) sur la transfection l'épithélium nasal. | n de 49 |
| Figure 8 Effet de la suramine sur la transfection du tissu respiratoir | re nasal. 51 |
| Figure 9 Effets de divers agonistes P2 sur la transfection de l'épithe | élium nasal. 53 |
| Figure 10 Représentation schématique de l'assemblage du vecteur Sec-LPD-II. | de gènes 60 |
| Figure 11 Taille des complexes ADN/protamine à différents ratios | de masse. 66 |
| Figure 12 Potentiel zêta des complexes ADN/protamine à différent de masse. | s ratios 68 |
| Figure 13 Taille du pré-LPD-II à divers ratios de masse liposome: | ADN. 70 |
| Figure 14 Potentiel zêta du pré-LPD-II à divers ratios de masse lipe | osome:ADN. 72 |
| Figure 15 Potentiel zêta du complexe pré-LPD-II incubé avec 0,5 r de Sec-PEG-PE. | nol % 74 |
| Figure 16 Transfection de l'épithélium respiratoire nasal de souris avec Sec-LPD-II. | 76 |
| Figure 17 Transfection de l'épithélium nasal avec 100 µg de plasm luc et de l'ADN non codant. | ide pNGVL ₃ - 88 |

| p | a | g | e | S |
|---|---|--------|---|---|
| | | \sim | | |

| Figure 18 Transfection de l'épithélium respiratoire nasal avec le plasmide pNGVL ₃ -luc et l'acide aurintricarboxylique. | 89 |
|--|-----|
| Figure 19 Structure de l'oligonucléotide d'ADN YY1. | 91 |
| Figure 20 Transfection de l'épithélium nasal avec pNGVL ₃ -luc et l'oligonucléotide YY1. | 92 |
| Figure 21 Transfection de l'épithélium nasal avec pNGVL ₃ -luc et un plasmide mutant. | 94 |
| Figure 22 Carte du plasmide pNGVL ₃ -luc. | 96 |
| Figure 23 Transfection de l'épithélium nasal avec divers fragments de restriction. | 98 |
| Figure 24 Cinétique de l'expression luciférase dans l'épithélium nasal transfecté par choc hypotonique avec de l'ADN nu. | 100 |
| Figure 25 Structure chimique du PNA. | 106 |
| Figure 26 Carte du plasmide pGeneGrip-luc. | 107 |
| Figure 27 Représentation schématique de quatre molécules de bis-PNA-peptide fixées au plasmide pGeneGrip-luc. | 110 |
| Figure 28 Séquence du bis-PNA conjugué à du FITC et à un peptide NLS. | 120 |
| Figure 29 Cinétique de fixation du bis-PNA-NLS sur le plasmide pGeneGrip-luc. | 122 |
| Figure 30 Filtration en gel du mélange pGeneGrip-luc/FITC-bis-PNA-NLS. | 124 |
| Figure 31 Séquence du bis-PNA conjugué à du FITC et à un peptide DBP (Dynein Binding Peptide). | 125 |
| Figure 32 Transfection de cellules NIH3T3 et Hela avec les bis-PNA-NLS et bis-PNA-DBP. | 127 |
| Figure 33 Transfection de cellules NIH3T3 avec pGeneGrip-luc complexé à un bis-PNA-peptide et de l'ADN de thymus de veau. | 129 |
| Figure 34 Transfection de cellules Hela avec un fragment de PCR contenant le gène luciférase complexé à un bis-PNA-peptide. | 131 |

| | pages |
|---|-------|
| Figure 35 Séquence sauvage de l'amplificateur transcriptionnel IE1 du CMV, contrôlant l'expression du gène luciférase, dans le plasmide pNGVL ₃ -luc. | 142 |
| Figure 36 Séquence modifiée de l'amplificateur transcriptionnel contrôlant l'expression du gène luciférase dans le plasmide pNGVL ₄ -luc. | 144 |
| Figure 37 Séquence modifiée de l'amplificateur transcriptionnel contrôlant l'expression du gène luciférase dans le plasmide pNGVL ₅ -luc. | 147 |
| Figure 38 Cinétique de l'expression luciférase dans l'épithélium respiratoire nasal transfecté par choc hypotonique. | 149 |
| Figure 39 Séquence d'un amplificateur et d'un promoteur transcriptionnels artificiels | 152 |

Liste des abréviations

- AAV : Virus adéno-associé
- ABC : ATP binding cassette
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AEC : 3-amino-9 éthylcarbazole
- AMP : Adénosine monophosphate
- AMPK : AMP-activated kinase
- ADP : Adénosine diphosphate
- AP-1 : Activating protein 1
- ARNm : Acide ribonucléique messager
- ATA : Acide aurintricarboxylique
- ATF : Activating transcription factor
- ATP : Adénosine triphosphate
- BSA : Sérum albumine bovine
- CAR : Coxsackie Adenovirus Receptor
- cDNA : ADN complémentaire
- CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CMV : Cytomégalovirus
- CRE : CREB responsive element
- CREB : cAMP-responsive element-binding protein
- dATP : Désoxyadénosine triphosphate
- DBP : Dynein binding peptide
- DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine
- DMF : Diméthylformamide
- DOPE : Dioléylphosphatidyléthanolamine
- DSPE : Distéarylphosphatidyléthanolamine

DTNB : Acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) DTT: Dithiothréitol EBNA-1: Epstein-Barr nuclear antigen-1 EBV : Virus Epstein-Barr EDT : 1,2-éthanedithiol EDTA : Acide éthylenediamine tétraacétique EnaC : Canal épithélial sodique FITC : Isothiocyanate de fluorescéine FR: Famille de répétitions Virus de l'immunodéficience humaine 1 HIV-1: HPLC : Chromatographie liquide à haute performance IE1: Immediate early 1 IL-8/10: Interleukine 8/10 LF2000: Lipofectamine 2000 LPD: Liposome/polycation/DNA MAP2 : Microtubule associated protein 2 MeCP2 : Methyl-CpG binding protein 2 MS : Spectrométrie de masse NaCl: Chlorure de sodium NF1: Nuclear factor 1 Nuclear factor-*k*B $NF-\kappa B$: NGPE : N-glutarylphosphatidyléthanolamine NLS: Signal de localisation nucléaire nNOS : NO synthase neuronale Oct-1 : Octamer-1

| PAGE : | Gel de polyacrylamide |
|---------|--------------------------------------|
| PBS : | Tampon phosphate salin |
| PCR : | Réaction de polymérisation en chaîne |
| PE: | Phosphatidyléthanolamine |
| PEG : | Polyéthylène glycol |
| PKA : | Protéine kinase A |
| PKC : | Protéine kinase C |
| PNA : | Peptide nucleic acid |
| RITC : | Rhodamine B isothiocyanate |
| rpm : | Rotation par minute |
| Sec : | Serpin-enzyme complex |
| SecR : | Serpin-enzyme complex receptor |
| SIDA : | Syndrome d'immunodéficience acquise |
| siRNA : | ARN interférent |
| Sp1 : | Stimulating protein 1 |
| STE : | Tris-HCl EDTA salin |

- TAE : Tris-acétate EDTA
- TFA : Acide trifluoroacétique
- TNF α : Tumor necrosis factor α
- TRITC : Tétraméthylrhodamine isothiocyanate
- URL : Unité relative de lumière
- UTP : Uridine triphosphate
- YY1: Yin Yang 1

Introduction

De nombreuses pathologies héréditaires et acquises affectent les voies respiratoires, incluant le cancer des bronches, la grippe, l'asthme, la broncho-pneumopathie obstructive chronique (BPOC) et la mucoviscidose.

I. La mucoviscidose.

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente parmi les Caucasiens (1 pour 2.500) [9]. Cette maladie mortelle affecte actuellement plus de 30.000 enfants et adultes aux États-unis. Désormais, l'espérance de vie est en moyenne de plus de 30 ans, avec environ 37 % des patients ayant plus de 18 ans [37] et elle ne dépasse pas 45 ans [61]. La mucoviscidose est due à la mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), qui est porté par le bras long du chromosome 7 (7q31) [94].

I.1. La protéine CFTR.

Le produit du gène CFTR est une protéine membranaire intégrale composée de 1480 acides aminés [176], principalement localisée dans les membranes apicales des cellules épithéliales des voies aériennes, de l'intestin, des gonades et des glandes exocrines (sudoripares, salivaires et pancréas exocrine). La protéine CFTR forme un canal chlorique, régulé par l'AMP cyclique, responsable du transport transépithélial de sel et d'eau [5].





En plus de cette fonction, le CFTR module l'activité de protéines de transport, tel que le canal épithélial sodique (EnaC) [149] et l'aquaporine [143]. Le CFTR appartient à la superfamille des transporteurs à cassette à ATP (ABC), qui fixent l'ATP et utilisent son énergie pour transporter une grande variété de substrats à travers des membranes cellulaires [43]. Le CFTR est composé de deux motifs répétés, étant chacun constitué d'un domaine hydrophobe de 6 hélices transmembranaires et d'une région hydrophile cytosolique fixant l'ATP (nucleotide binding domain, NBD) [137]. Ces deux motifs sont reliés par un domaine régulateur cytoplasmique (R), qui contient de nombreux sites de phosphorylation pour la PKA, la PKC et d'autres protéine kinases. L'AMPK (AMP-activated kinase) phosphoryle le CFTR entre les résidus 1420 et 1457 et inhibe le canal chlorique [76].

La protéine CFTR cristallisée présente deux conformations différentes (ouverte et fermée) [140] et possède une grande homologie structurale avec la glycoprotéine P. Le CFTR existe et fonctionne plus efficacement sous la forme d'un homodimère [56]. Ses trois derniers acides aminés (1478-TRL-1480) interagissent avec le domaine PDZ (Postsynaptic density-95, Disc large, Zona occludens-1) de 5 protéines : CAL, NHERF1, NHERF2, IKEPP et CAP70 [75]. Ces deux dernières protéines stabilisent le dimère CFTR en se fixant à chacun des deux monomères. NHERF1 et 2 relient CFTR au cytosquelette cortical apical en se fixant à l'ézrine, via leurs domaines ERM [136]. Or, l'ézrine séquestre également sous la membrane apicale, la PKA qui régule l'activité de CFTR [51].



D'après Li C, Naren AP. Pharmacol Ther 2005.

La localisation apicale du récepteur A2b de l'adénosine, couplé à une protéine G, à l'adénylate cyclase et à la PKA, lui permet d'activer la protéine CFTR [82].



Ainsi, le CFTR forme un complexe multiprotéique dans des microdomaines de la membrane apicale.



L'extrémité N-terminale de CFTR interagit avec la syntaxine 1A et SNAP-23, qui sont des protéines t-SNAREs impliquées dans le transport intracellulaire en direction de la membrane apicale de la cellule épithéliale. La fixation de ces protéines à CFTR diminue son activité [33]. CFTR interagit également via son extrémité C-terminale, avec AP-2 (adaptor protein complexes 2) [174], la principale protéine intervenant dans la formation de la clathrine [93]. L'internalisation de CFTR survient par endocytose impliquant la clathrine et cela détermine le nombre de canaux CFTR fonctionnels à la surface apicale [14].

I.2. Les mutations du gène CFTR.

La mucoviscidose est une maladie génétique récessive, ce qui implique que les deux allèles du gène CFTR doivent être mutés pour que la maladie se manifeste. Plusieurs centaines de mutations différentes ont été répertoriées depuis la découverte de ce long gène (>200 kb) en 1989 [137], mais la délétion du codon 508 (Δ F 508) [41] dans l'exon 10 est la mutation la plus fréquente dans la population mondiale (~ 70 % des allèles mutants) [160]. La mutation Δ F 508 est associée à une forme sévère de la maladie et plus de 90 % des patients possèdent au moins un allèle Δ F 508. De plus, environ la moitié des patients sont homozygotes pour l'allèle Δ F 508 du gène CFTR. Cet allèle code pour une protéine CFTR instable, qui n'est pas correctement repliée et s'agrège, ce qui abouti à un transport défectueux de la protéine vers la membrane plasmique [158]. La protéine mutante est retenue dans le réticulum endoplasmique et est rapidement dégradée [173]. Par conséquent, elle ne peut pas transporter le chlorure au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales.

I.3. Les conséquences cliniques de la maladie.

La mucoviscidose est une maladie mortelle causée par le disfonctionnement de la protéine CFTR ou par une diminution de sa biosynthèse [26,175]. L'absence ou la perte de fonction du canal chlorique CFTR abouti à une perturbation de l'homéostasie des fluides à la surface des épithéliums de divers organes, incluant le poumon, le pancréas, le tractus gastro-intestinal, le foie et les glandes sudoripares [187]. Les conséquences cliniques incluent une atteinte du foie, pouvant progresser vers la cirrhose, des problèmes de motilité intestinale et un dysfonctionnement du pancréas, qui peut dégénérer en pancréatite. Un épais mucus obstrue le pancréas exocrine empêchant ainsi les enzymes digestives d'atteindre les intestins. Cependant, l'apport par voie orale d'enzymes pancréatiques, au cours de chaque repas, pallie ce problème. L'incidence du diabète dans la mucoviscidose augmente fortement avec l'âge et survient exclusivement chez les patients ayant un dysfonctionnement pancréatique exocrine [97]. La plupart des patients souffrent de sinusites et ont des polypes nasaux [83]. Avec la perte de fonction pulmonaire et les infections chroniques, la fertilité féminine est réduite. De plus, presque tous les hommes souffrant de la mucoviscidose sont stériles (absence de la *vas deferens*). Les enfants atteints de la maladie peuvent souffrir d'une réduction de densité minérale osseuse [79].

Les facteurs de prédisposition incluent les déficits en vitamines D et K et les faibles apports en calcium. Dans le poumon, le déficit de transport de chlorure est couplé à une forte absorption de sodium et abouti à la production d'un mucus épais, ainsi qu'à la destruction progressive des voies respiratoires. Les poumons des patients, incluant les glandes à mucus, sont normaux à la naissance [28]. Peu après la naissance, les poumons sont le siège d'une inflammation importante. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire contient de nombreux neutrophiles et des concentrations élevées d'IL-8 et d'élastase [4,91]. Cette inflammation persistante est la principale cause d'altération du poumon et de réduction progressive de la fonction pulmonaire. Elle est due aux infections bactériennes, qui sont plus fréquentes que chez le sujet sain.

Deux hypothèses permettent d'expliquer la survenue accrue d'infections pulmonaires. La première hypothèse stipule que les cellules épithéliales respiratoires régulent la concentration

en sel du liquide de surface de l'épithélium. Le disfonctionnement de CFTR résulte en l'augmentation de la concentration en sel du liquide de surface de l'épithélium. Les peptides antimicrobiens, les défensines, sont notablement inactivées par des concentrations en NaCl supérieures à 50 mmol/L. La mutation de CFTR facilite ainsi les infections et la croissance bactérienne [146].

Selon la seconde hypothèse, le déficit d'activité de CFTR abouti à une réduction du volume du liquide de surface de l'épithélium et du fluide périciliaire, ainsi qu'à une diminution de leur teneur en eau. Ces deux compartiments deviennent plus visqueux, ce qui ralenti notablement le transport mucociliaire. Les bactéries sont piégées dans la couche de mucus et ne sont pas efficacement évacuées des poumons [12]. Cependant, ces deux hypothèses n'expliquent pas pourquoi les patients sont infectés par certaines espèces bactériennes, et plus précisément par Pseudomonas aeruginosa. CFTR semble agir comme un récepteur pour l'internalisation de P. aeruginosa par les cellules épithéliales respiratoires. Ainsi, la mutation de CFTR réduit l'élimination de la bactérie des voies aériennes [132]. Certaines souches de P. aeruginosa adhèrent plus fortement aux cellules épithéliales de patients atteints de mucoviscidose. Cela pourrait être dû à une expression apicale accrue d'asialo-GM1, qui est un récepteur de ces souches [44].

Presque tous les patients sont infectés de manière chronique par une ou plusieurs espèces bactériennes (~ 80 %). La réponse inflammatoire à l'infection semble être plus intense chez les patients atteints de mucoviscidose que chez ceux qui ne le sont pas. Les infections précoces des poumons sont le fait de Staphylococcus aureus et Haemophilus influenzae [38]. La survenue d'infections chroniques dues à P. aeruginosa augmente avec l'âge et est accompagnée de la diminution de celles dues à S. aureus et H. influenzae. Au cours de l'infection chronique par des souches de P. aeruginosa productrices d'alginate, l'élimination de la bactérie est pratiquement impossible, même en utilisant des antibiotiques [126].

Les infections polymicrobiennes sont fréquentes dans la mucoviscidose et les bactéries régulièrement isolées des patients sont, outre P. aeruginosa et S. aureus, Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans, Pandorea apista et les mycobactéries autres que M. tuberculosis. Les poumons peuvent également être chroniquement colonisés par des Enterobacteriaceae. Les pathogènes respiratoires communs, Streptococcus pneumoniae et Moraxella catarrhalis, sont moins fréquemment rencontrés [50], mais ils peuvent jouer un rôle pathogénique important. Enfin, Candida albicans et Aspergillus fumigatus sont parfois isolés du sputum et certains patients développent une aspergillose bronchopulmonaire allergique.

Les cytokines pro-inflammatoires sont abondantes dans le liquide de surface de l'épithélium [10], tandis que les cytokines anti-inflammatoires (IL-10), qui inhibent la production de ces premières, y sont trouvés à de faibles concentrations. Ce déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires résulte en une inflammation excessive et durable. Par conséquent, la fonction pulmonaire se détériore plus rapidement chez les patients infectés par P. aeruginosa que chez ceux qui ne le sont pas [54]. Les manifestations pulmonaires de la mucoviscidose sont responsables d'une morbidité importante et de plus de 90 % de la mortalité liée à la maladie.

II. Les traitements de l'atteinte pulmonaire de la mucoviscidose.

II.1. L'antibiothérapie.

L'antibiothérapie occupe une place fondamentale dans la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. Le choix des antibiotiques se fonde sur l'analyse de la flore d'expectoration, la gravité de l'infection bactérienne et les phénotypes de résistance des micro-organismes. Les infections à Haemophilus influenzae sont traités *per os* en associant l'amoxicilline et l'acide clavulanique ou par une céphalosporine orale. Les infections à Staphylococcus aureus sont le plus souvent traitées par les antibiotiques usuels et dans le cas

d'une souche résistante à la méthicilline, une bithérapie orale ou un traitement parentéral est d'usage. Dans le cas de la primo-infection par Pseudomonas aeruginosa, l'administration parentérale d'une β -lactamine et d'un aminoglycoside suivie d'une antibiothérapie par voie inhalée, évite le passage à l'infection chronique. Cette dernière se traite par injection parentérale d'une β -lactamine ou d'une quinolone et un aminoglycoside pendant deux à trois semaines. Les aminoglycosides sont parmi les antibiotiques les plus fréquemment nébulisés, car ils sont chimiquement stables et ont un goût acceptable. La Tobramycine est l'une des aminoglycosides ayant la plus faible toxicité systémique et sa nébulisation dans les voies aériennes est bien tolérée. L'antibiothérapie améliore l'état respiratoire des patients et, à long terme, augmente leur espérance de vie. L'utilisation au long cours d'antibiotiques favorise l'apparition d'une résistance des pathogènes vis-à-vis de ces médicaments, qui peut requérir des tests de laboratoire de susceptibilité des bactéries isolées du sputum, à une gamme d'antibiotiques. De plus, les aminoglycosides sont ototoxiques et néphrotoxiques et les patients peuvent devenir allergiques aux β -lactamines.

II.2. Les anti-inflammatoires.

L'inflammation est le composant majeur du cercle vicieux caractérisant la mucoviscidose. Si elle n'est pas traitée, l'inflammation endommage l'épithélium respiratoire et cela abouti à la réduction de la fonction pulmonaire. L'inflammation serait la conséquence de l'infection des voies aériennes [39]. La persistance de bactéries pathogènes et de leurs produits induirait une réaction d'hypersensibilité de type III. Cette dernière est caractérisée par la production d'anticorps spécifiques aux antigènes bactériens, la formation de complexes immuns et l'afflux de neutrophiles. Les neutrophiles morts formeraient de grands volumes de mucosités, qui obstrueraient les voies aériennes. La libération de protéases à sérine lysosomales détruirait progressivement le tissu bronchique. Certains médicaments anti-inflammatoires, tels que les glucocorticoïdes [7], l'ibuprofène [101] et l'azithromycine ont un effet bénéfique sur l'évolution de la maladie. L'azithromycine, outre ses propriétés antimicrobiennes, semble être sûr et efficace, et représente l'anti-inflammatoire le plus prometteur, disponible aux patients. L'aspergillose bronchopulmonaire allergique requiert également l'usage d'anti-inflammatoires inhalés.

II.3. Les broncho-dilatateurs.

La majorité des patients atteints de mucoviscidose présente une hyperréactivité bronchique de temps à autre. Ainsi, les broncho-dilatateurs font désormais partie de la chimiothérapie de la maladie. Les agonistes β -adrénergiques nébulisés, tel que l'albuterol et le salmeterol, améliorent la fonction pulmonaire en augmentant le flux d'air circulant dans les poumons. Les broncho-dilatateurs anticholinergiques, tel que le bromure d'ipratropium, peuvent aussi être utilisés chez les patients, en complément ou en substitution aux agonistes β -adrénergiques.

II.4. Les mucolytiques.

Les infections bactériennes respiratoires entraînent une inflammation importante, qui résulte en une accumulation de neutrophiles. Lorsque ces derniers meurent, ils libèrent leur ADN dans le mucus, ce qui augmente sa viscosité. La dornase α est la DNase I humaine recombinante (rhDNase). Son administration dans les poumons diminue la viscosité du sputum en digérant l'ADN nucléaire des neutrophiles et favorise l'élimination des pathogènes par le transport mucociliaire. La fonction respiratoire est alors nettement améliorée chez les patients, quel que soit le degré de sévérité de la maladie et ce traitement pourrait ralentir la destruction pulmonaire. Le nombre de jours passés à l'hôpital, la fréquence des infections et la quantité d'antibiotiques administrés par voie parentérale ont diminué chez les patients dont la maladie est peu sévère à modérément sévère. Les essais cliniques ont indiqué une faible mais significative amélioration du volume expiratoire forcé. L'amélioration de la qualité de

vie des patients a varié d'un essai clinique à l'autre, mais les effets secondaires ont été minimes. Cependant, les administrations répétées du médicament constitueront un coût élevé pour la société.

Il y a un regain d'intérêt pour la nébulisation de solutions salines hypertoniques. En effet, celles-ci améliorent le transport mucociliaire chez les patients, en modifiant la viscoélasticité du sputum [138]. Par contre, aucun bénéfice clinique n'a été observé au cours d'un essai clinique de longue durée [155].

De nombreux composants du mucus comportent des liaisons disulfures. La Nacétylcystéine est un agent réducteur, qui fluidifie les mucosités en rompant les ponts disulfures. Cependant, aucun effet significatif sur la fonction pulmonaire ou les autres paramètres cliniques n'a été observé [148].

II.5. La kinésithérapie respiratoire.

Afin de compenser le mauvais fonctionnement du transport mucociliaire, la kinésithérapie a pour but l'élimination des sécrétions visqueuses par des exercices respiratoires. Il existe plusieurs techniques de kinésithérapie respiratoire, tels que le drainage postural et la pression expiratoire positive, qui visent à faire expectorer les mucosités par le patient. Une étude a démontré que la fonction pulmonaire s'est détériorée après une période de trois semaines sans kinésithérapie [46]. De plus, la combinaison d'une antibiothérapie parentérale et de kinésithérapie respiratoire a davantage amélioré la fonction pulmonaire que le traitement antibiotique seul [11].

II.6. La greffe de poumons.

La greffe d'un poumon sain $(CFTR^{+/+})$ est le traitement de la phase finale de la mucoviscidose. Elle est décidée lorsque le pronostique vital semble engagé dans les deux ans

à venir. Le choix entre la transplantation de poumons et de cœur + poumons dépend de l'expérience de l'équipe médicale et de considérations logistiques. Après la greffe, le taux de survie des patients augmente de près de 90 % à un an et 78 % à cinq ans. Une étude rétrospective a démontré que la survie des patients ayant bénéficié d'une greffe de poumons, par rapport à ceux qui n'en ont pas bénéficié, a été significativement prolongée [112]. Néanmoins, la transplantation de poumons, comme celle de tout organe étranger, est systématiquement accompagnée de la prise à vie de médicaments anti-rejet. Peu après la greffe, les patients reçoivent une combinaison de méthylprednisolone et d'anticorps anti-lymphocytaires. Puis, la chimiothérapie immunosuppressive à long cours consiste à combiner trois médicaments : la ciclosporine ou le tacrolimus, l'azathioprine et la prednisolone. Le rejet des poumons transplantés peut malgré cela survenir et est parfois lié à une infection pulmonaire par des pathogènes. De plus, le nombre de greffons étant limité, une partie de la masse, croissante, de patients nécessitant une greffe de poumons, n'en bénéficiera pas.

II.7. La thérapie génique : l'avenir du traitement de la mucoviscidose.

La thérapie génique de la mucoviscidose consisterait à transférer le gène CFTR sauvage dans l'épithélium bronchique, afin de normaliser le transport du chlorure. Ainsi, une amélioration voire une disparition complète des conséquences cliniques respiratoires de la maladie serait attendue de cette approche thérapeutique. Si les cellules souches ne sont pas transfectées, le renouvellement continu de l'épithélium respiratoire obligera les cliniciens à répéter l'administration du système de transfection. L'efficacité du transfert du gène CFTR dans l'épithélium bronchique peut être modeste. En effet, 5 à 10 % de l'expression de la protéine CFTR sauvage des sujets sains suffiraient pour corriger le déficit de transport de chlorure des patients souffrant de la maladie [49]. Ainsi, la thérapie génique suscite l'espoir d'une nouvelle approche pour soigner la mucoviscidose.

III. Le transfert du gène CFTR.

III.1. La cible : l'épithélium respiratoire.

L'épithélium respiratoire est la principale cible de la thérapie génique de la mucoviscidose. Il recouvre la structure tubulaire des voies aériennes, de la cavité nasale à l'arbre bronchique en passant par la trachée. Il comporte plusieurs types de cellules épithéliales, incluant les cellules sécrétrices de mucus (Goblet) et les cellules ciliées impliquées dans l'élimination des bactéries pathogènes et autres particules microscopiques. Dans les bronches et les bronchioles, les cellules Clara sécrètent des peptides et des protéines régulant les réponses inflammatoires. Les glandes sous-muqueuses produisent un mélange de sécrétions muqueuses et séreuses, qui est extrêmement important pour le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Enfin, l'épithélium comporte aussi des cellules basales et neuroendocrines, ainsi que des cellules non-épithéliales : des macrophages et des cellules dendritiques. L'épithélium respiratoire repose sur une matrice, la membrane basale, qui est produite par les cellules mésenchymateuses. Les interactions entre l'épithélium respiratoire et le tissu mésenchymateux peuvent aboutir à une altération de l'épithélium, la fibrose, qui joue un rôle clé dans la mucoviscidose. Les différents types cellulaires expriment la protéine CFTR à différents niveaux [89].

III.2. Les barrières au transfert de gène.

Les mammifères ont mis en place des barrières intra- et extracellulaires, afin de limiter l'entrée de matériel génétique étranger. Par conséquent, les vecteurs de gènes doivent être capables de franchir ces barrières : ils doivent traverser le mucus, échapper au transport mucociliaire et atteindre la membrane apicale. Ensuite, le vecteur doit soit fusionner avec la membrane plasmique, soit pénétrer dans la cellule épithéliale par endocytose. Il doit s'échapper des endosomes et des lysosomes, traverser le cytoplasme jusqu'au noyau et l'ADN doit finalement franchir un pore nucléaire.

Les systèmes de transfert de gènes consistent en un acide nucléique portant le gène thérapeutique et un vecteur. Ce dernier doit condenser l'acide nucléique et le protéger du stress mécanique et des attaques enzymatiques. Le vecteur doit favoriser le transport du transgène du milieu extracellulaire au noyau, où sa transcription a lieu. Le transport de chlorure par l'épithélium bronchique pourrait être normalisé, soit par transfert du gène CFTR sauvage, soit par réparation du gène CFTR mutant endogène. La première solution est la plus fréquemment choisie et le transfert du gène CFTR pourrait s'effectuer à l'aide de vecteurs viraux ou non-viraux.

III.3. Les vecteurs de gènes viraux.

Les virus ont acquis au cours de l'évolution la capacité de transférer efficacement leur matériel génétique dans leurs cellules-cibles. Ils comportent un acide nucléique empaqueté dans une coque de protéines, la capside, et certains sont aussi enveloppés d'une membrane de lipides et de glycoprotéines, l'enveloppe. Les protéines virales sont parfaitement bien adaptées à la fixation du virus à la surface de la cellule, le franchissement de la membrane plasmique et parfois de la membrane endosomale, au transport intracellulaire du virus et à l'introduction du génome viral dans le noyau. Un virus recombinant est créé en remplaçant une partie du génome viral par le gène thérapeutique et sert de système de transfert de gène. Celui-ci a été dérivé de divers virus : l'adénovirus [147], le virus adéno-associé [17], les lentivirus [1,64], le virus de Sendaï [8], les virus herpétiques [145] et le poxvirus [116].

III.3.1. L'adénovirus.

Le premier vecteur de gènes viral, utilisé pour le traitement de la mucoviscidose dans un essai clinique, qui a débuté en avril 1993 à New York, a été un adénovirus recombinant [36]. Ce choix s'explique par la propension du virus sauvage, qui est un pathogène bénin, à infecter les voies aériennes. Le génome de l'adénovirus (30-40 kb) et la fonction de ses gènes ont été abondamment étudiés, ce qui a permis d'insérer le gène CFTR et d'éliminer les gènes viraux indésirables. La production du vecteur adénoviral s'effectue dans une lignée cellulaire, qui contient les gènes viraux manquants. Dans le cas extrême, seules les répétitions terminales du génome viral subsistent (minimal high-capacity gutless adenoviral vectors) [98]. Cela aboli totalement l'expression des protéines virales par les cellules transduites, ce qui a pour conséquence de réduire la réponse lymphocytaire T cytotoxique et augmente notablement la durée d'expression du transgène [30]. La fixation de l'adénovirus à la cellule-cible débute par l'interaction de la fibre de la capside avec une glycoprotéine cellulaire de la famille des immunoglobulines, le Coxsackie Adenovirus Receptor (CAR), et se poursuit par la fixation de la base du penton de la capside avec l'intégrine $\alpha_V\beta_5$. Ces deux récepteurs sont localisés sur la face basolatérale des cellules épithéliales respiratoires.



Un vecteur adénoviral efficace devra être re-ciblé vers des récepteurs exposés sur la face apicale en modifiant la capside virale [48]. Enfin, jusqu'à présent, les réponses immunotoxiques à l'administration d'un vecteur adénoviral n'ont pas pu être supprimées. Le décès de Jesse Gelsinger en septembre 1999, au cours d'un essai clinique impliquant un vecteur adénoviral, suite à une réponse immunitaire exacerbée [134], a sévèrement compromis l'avenir de ce vecteur viral pour toute utilisation humaine.

III.3.2. Le virus adéno-associé (AAV).

Le AAV est un petit virus à ADN (parvovirus) requérant un virus helper (habituellement un adénovirus) et capable d'infecter des cellules quiescentes. L'AAV n'est pas responsable de la moindre maladie connue chez l'homme [53]. Les vecteurs AAV peuvent s'intégrer au
hasard dans le génome de la cellule-cible, avec néanmoins une plus faible efficacité que le virus parental, ce qui permet d'obtenir une expression stable du transgène. Son génome ne peut accepter qu'environ 4,8 kb, ce qui rend la mise au point d'un vecteur du gène CFTR difficile, car le seul cadre de lecture du gène CFTR (cDNA) s'étend sur 4.443 paires de bases. Le récepteur du AAV-2, le sulfate d'héparane, est situé sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales respiratoires [152]. Cependant, la membrane apicale possède un récepteur de haute affinité contenant des acides sialiques. Les vecteurs AAV de type 6 semblent être les plus efficaces pour transduire l'épithélium respiratoire [74]. Des essais cliniques de phase I et II ont été réalisés avec différents sérotypes de vecteur AAV [62,169]. L'efficacité de la transduction a été trop faible pour donner lieu à un bénéfice clinique.

III.3.3. Les lentivirus.

Les vecteurs lentiviraux sont dérivés du rétrovirus HIV-1, l'agent étiologique du SIDA, ou de virus apparentés. Ces vecteurs peuvent intégrer le transgène dans le génome de la cellulecible et accommoder jusqu'à 8-9 kb. Une expression stable et spécifique du type cellulaire peut être obtenue, en utilisant les séquences régulatrices appropriées [86]. La troisième génération de vecteurs lentiviraux contient moins de 5 % du génome viral et ne peut pas être complémenté par le virus sauvage. Cependant, la production de grandes quantités de virus recombinant de qualité pharmaceutique est difficile. L'enveloppe des lentivirus ne leur permet pas d'entrer dans les cellules épithéliales respiratoires par la face apicale. Les vecteurs lentiviraux doivent être pseudotypés avec l'enveloppe d'un virus, dont le récepteur est présent sur la membrane apicale. Ainsi, un vecteur lentiviral doté de l'enveloppe d'un filovirus a efficacement transduit l'épithélium respiratoire *in vivo* [96]. Le risque majeur encouru avec ce type de vecteur de gènes à intégration aléatoire est la mutagenèse insertionnelle.

III.3.4. Le virus de Sendaï.

Le virus de Sendaï est un virus à ARN simple brin, qui transduit très efficacement les cellules épithéliales respiratoires *in situ* chez la souris et le furet. Néanmoins, Sendaï induit une forte réponse immunitaire après sa première administration, qui atténue notablement la seconde transduction de l'épithélium respiratoire. Jusqu'à présent, toutes les tentatives pour rendre les modèles animaux tolérants vis-à-vis des antigènes du virus recombinant ont échoué. Un virus similaire, le virus parainfluenza de type 3 transduit les cellules épithéliales respiratoires ciliées par leur face apicale et semble être efficace *in vitro* [182]. Ce vecteur est également immunogène.

III.3.5. Les inconvénients des vecteurs de gènes viraux.

Bien que certains vecteurs viraux transduisent efficacement les cellules épithéliales respiratoires, ils induisent tous une solide réponse immunitaire après leur première utilisation, compromettant toute ré-administration. L'activation du complément et les anticorps préexistant à leur administration induisent une réponse aiguë de défense de la part de l'hôte. Cette réponse peut aller de la réaction inflammatoire modérée à une réaction fatale, comme cela a été le cas pour un patient après l'injection intraveineuse d'un vecteur adénoviral [107]. De plus, une réponse lymphocytaire T cytotoxique peut survenir contre les antigènes viraux exprimés par les cellules transduites [147]. Les récepteurs viraux à la surface des cellules épithéliales respiratoires se situent principalement sur la face basolatérale. Or, les jonctions étanches préviennent l'accès des vecteurs viraux à la membrane basolatérale, à partir du mucus, ce qui diminue considérablement leur capacité à transduire les cellules épithéliales [70].

Leur génome est généralement de petit taille, afin de leur permettre de s'introduire dans le virion, ce qui limite la longueur du transgène qu'ils peuvent délivrer dans les cellules à

transduire. Certains vecteurs viraux intègrent le transgène dans un des chromosomes, ce qui peut aboutir à la transformation tumorale de la cellule, si cette intégration a lieu dans un gène de suppresseur de tumeur ou à proximité d'un proto-oncogène. En effet, deux patients traités avec des cellules de moelle osseuse transduites par un vecteur rétroviral ont été diagnostiqués avec une leucémie causée par une mutation insertionnelle dans un proto-oncogène [90,99]. Les recombinaisons et les réarrangements du génome viral et les complémentations avec des virus sauvages sont possibles avec certains vecteurs viraux, ce qui rend leur utilisation chez l'homme relativement risquée. Enfin, les vecteurs viraux sont produits par des lignées cellulaires en culture, à partir desquelles ils doivent être intensivement purifiés et chaque lot de virus doit être soigneusement contrôlé. Toutes ces étapes rendent la production de ces vecteurs très onéreuse.

III.4. Les vecteurs de gènes non-viraux.

L'alternative à l'utilisation des vecteurs de gènes viraux est la mise au point d'un système de transfection non-viral. Celui-ci est constitué du seul transgène, généralement porté par un plasmide, et d'une ou de plusieurs molécules susceptibles de faciliter le transfert de ce gène, comme un lipide cationique. Contrairement aux vecteurs viraux, les vecteurs de gènes non-viraux peuvent transporter des molécules d'ADN de n'importe quelle taille et ne sont pas ou peu immunogènes. L'épithélium respiratoire est préférentiellement transfecté par administration d'un vecteur de gène ou d'ADN nu dans les voies respiratoires, car les cellules épithéliales respiratoires sont difficilement accessibles par administration systémique.

III.4.1. Les lipides cationiques.

Un lipoplexe est un complexe issu du mélange d'ADN et de lipides cationiques. Ces derniers protègent partiellement l'ADN vis-à-vis des nucléases, le condensent et favorisent l'échappement de l'ADN des endosomes et des lysosomes. Puisque la membrane plasmique est aussi chargée négativement grâce à la présence de nombreux acides sialiques, l'excès de charges positives du lipoplexe lui permet de se fixer à la surface de la cellule et d'être plus efficacement endocyté [55]. De plus, les lipoplexes peuvent encapsuler des acides nucléiques de grande taille, ils sont peu toxiques, peu immunogènes et peuvent être aisément produits en grandes quantités [183]. Depuis 1987, de nombreux lipides cationiques ont été synthétisés et testés [85,128].

Tous les lipides cationiques possèdent une tête hydrophile ayant une ou plusieurs charges positives. Cette tête hydrophile est connectée à un groupe hydrophobe par une charnière. En général, la tête polaire comporte un ou plusieurs groupements d'azote tertiaire ou quaternaire. Le groupe hydrophobe peut être une chaîne hydrocarbonée, du cholestérol ou un de ses dérivés [113]. Les groupements constituant une charnière (linker), formés d'une ou de plusieurs liaisons esters, seraient moins toxiques du fait de l'hydrolyse spontanée que subit ce type de liaisons dans un environnement aqueux.



Le DOTMA (chlorure de [1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) et le DOSPA (trifluoroacétate de 2,3-dioléyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium) sont principalement utilisés pour transfecter des cellules *in vitro*. Un

liposome constitué de DOSPA et de DOPE (3 :1) est disponible commercialement sous le nom de LipofectamineTM. Le DOTAP ([1,2-bis(oléoyloxy)-3-(triméthylammonio)propane]) a été synthétisé pour la première fois par Leventis et Silvius [109] et il est fréquemment utilisé pour transfecter les animaux de laboratoire. Le GL-67 (Genzyme Lipid 67) et le DC-Chol (3[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol), mélangés au DOPE, ont été largement employés pour la transfection de l'épithélium respiratoire *in vivo* [105].

Le principal mode d'entrée des lipoplexes est l'endocytose [179]. L'échappement des endosomes est une étape critique de la transfection, puisque les lysosomes contiennent la DNase II, une enzyme susceptible de digérer complètement l'ADN encapsulé dans les liposomes cationiques. Le lipide « helper », DOPE (dioléylphosphatidyléthanolamine), semble jouer un rôle clé dans ce processus. En effet, contrairement au lipide DOPC (dioléylphosphatidylcholine) de structure similaire, DOPE apparaît être capable de déstabiliser la membrane endosomale et favoriser la libération de l'ADN dans le cytosol [58].

Le transfert du gène CFTR a été obtenu dans un modèle animal de la mucoviscidose à l'aide d'un lipoplexe cationique nébulisé [2]. Cependant, un faible effet thérapeutique a été obtenu, car la nébulisation endommage les lipoplexes.

III.4.2. Les polymères cationiques.

L'ADN peut aussi être condensé et protégé par des polymères cationiques, tels que la polylysine, la polyéthylèneimine (PEI linéaire ou branchée) et le chitosan. Le complexe ainsi formé a été baptisé polyplexe. Ces molécules ont une haute masse moléculaire et présentent une grande disparité, ce qui rend leur caractérisation difficile. Ainsi, des peptides cationiques de plus faible masse moléculaire ont été développés pour contrôler la structure du polymère [119].

Certains polymères, tels que la polyéthylèneimine [13] et le pDMAEMA [163], ont la capacité de tamponner les endosomes et lysosomes. Les pompes à protons sont obligées d'injecter davantage de protons dans les vésicules pour maintenir le faible pH. Cela est suivi de l'entrée de chlorure pour des raisons électrostatiques et d'eau pour des raisons osmotiques. Le résultat est un gonflement des endosomes, qui facilite la rupture de ces compartiments membranaires et la libération du vecteur non-viral dans le cytosol. Ce processus a été appelé « l'effet éponge à protons ». Néanmoins, la majorité de l'ADN endocyté est détruit dans les lysosomes par la DNase II. Ceci représente une des principales barrières à la transfection non-virale.

Le pKa de la chaîne latérale de l'histidine est d'environ 6. Or, le pH de l'endosome précoce est sensiblement le même. Ce résidu d'acide aminé est donc capable d'exercer un « effet éponge à protons ». De nombreux peptides riches en histidine ont été synthétisés, testés et se sont révélés être des réactifs de transfection efficaces [22,92,130].

L'échappement des endosomes peut aussi être favorisé par l'utilisation de peptides lytiques, qui s'incorporent dans la membrane endosomale, suite à un changement conformationnel induit par le faible pH endosomal, et la déstabilisent. Ces peptides peuvent être chimiquement conjugués au polymère cationique et les plus fréquemment utilisés ont été le peptide issu de l'extrémité N-terminale de l'hémagglutinine du virus influenza [168] et le peptide GALA (répétitions du tétrapeptide Glu-Ala-Leu-Ala) [127].

Après la libération dans le cytosol des vecteurs non-viraux, l'ADN doit se dissocier des polymères cationiques. Le fait que le cytosol soit un milieu réducteur a été exploité à cet effet. Des polymères réductibles comme le peptide Cys-Lys₁₀-Cys [135] et le poly[Lys-(AEDTP)] [117], qui possèdent des liaisons disulfures, se fragmentent sous l'action des agents réducteurs du cytosol, incluant le glutathion. L'ADN n'interagit plus suffisamment avec le

polymère cationique ; le polyplexe se dissocie et l'ADN devient alors accessible à la machinerie transcriptionnelle.

Jusqu'à présent, il n'y a eu qu'un seul essai clinique de thérapie génique utilisant un polyplexe. L'administration intranasale d'un plasmide, contenant le gène CFTR et complexé à de la polylysine conjuguée à du polyéthylène glycol, a modérément amélioré la différence de potentiel nasal chez des patients atteints de mucoviscidose [42].

III.4.3. Le ciblage des cellules épithéliales respiratoires.

In vivo, l'entrée des vecteurs non-viraux dans les cellules épithéliales respiratoires peut être nettement améliorée par le ciblage de récepteurs membranaires. Ces derniers doivent se situer sur la membrane apicale des cellules épithéliales, afin que les vecteurs puissent interagir avec eux, à partir du mucus. Suite à la fixation des vecteurs de gènes au récepteur membranaire, celui-ci doit entraîner les vecteurs à l'intérieur de la cellule par endocytose.

Quatre récepteurs différents ont été ciblés à la surface des cellules épithéliales respiratoires. Le récepteur purinergique P2Y2 avec le ligand UTP [103], le récepteur de l'urokinase-activateur du plasminogène via un peptide contenant le motif CLNGGTC [52], le récepteur du complexe serpine-enzyme (SecR) à l'aide d'un peptide possédant la séquence CSIPPEVKFNKPFVYLI [186] et des lectines membranaires par l'intermédiaire du lactose [57].

III.4.4. Les limites des vecteurs de gènes non-viraux actuels.

Dans les années 1990, des essais pré-cliniques sur la souris et des essais cliniques sur des patients atteints de mucoviscidose, avec de l'ADN encapsulé dans un liposome cationique, se sont soldés par un échec [3]. Jusqu'à présent, l'efficacité de la transfection au cours des essais

cliniques sur la mucoviscidose a été trop faible pour corriger suffisamment le transport de chlorure à travers l'épithélium respiratoire (au mieux de 25 %) [77].

La transfection est une succession d'étapes, incluant l'entrée de l'ADN dans la cellule, son échappement des endosomes, l'atteinte de l'enveloppe nucléaire et le franchissement d'un pore nucléaire. Les vecteurs de gènes non-viraux actuels ne parviennent pas à franchir efficacement toutes ces barrières à la transfection. Puisqu'il est difficile d'améliorer les deux dernières étapes du transfert de gène, les travaux doivent se focaliser sur l'entrée de l'ADN dans les cellules épithéliales respiratoires et sur son transfert dans le cytosol. Plus la quantité d'ADN transféré dans le cytosol sera importante, plus le nombre de copies intactes du transgène transféré dans le noyau sera élevé.

But du travail

Il était donc devenu évident qu'une nouvelle stratégie de transfection de l'épithélium respiratoire devait être trouvée. Notre travail est le fruit de cette volonté de parvenir à transférer efficacement des gènes dans les cellules épithéliales des voies aériennes. Il a été proposé par le Dr Eric Alton (London, UK) et il a été financé par le Cystic Fibrosis Research Trust (UK). Il se divise en trois étapes : transfection par choc hypotonique, amélioration de l'éfficacité de la transfection et maintien de l'expression du transgène à un haut niveau, pendant plusieurs semaines.

La thérapie génique de la mucoviscidose nécessite le transfert du gène CFTR dans l'épithélium respiratoire bronchique. Or, chez la souris, l'administration d'un médicament dans les poumons requiert une intervention chirurgicale délicate. Il a été démontré que l'épithélium respiratoire nasal possède la même composition cellulaire que l'épithélium respiratoire bronchique. En effet, les mêmes cellules épithéliales sont présentes dans le nez et dans les poumons (cellules ciliées, caliciformes, ...) et dans les mêmes proportions. L'épithélium nasal normal de souris a donc été choisit comme modèle de l'épithélium bronchique et l'ADN exogène a été administré dans les fosses nasales par perfusion, qui est une méthode non-invasive.

L'efficacité de la transfection non-virale de l'épithélium respiratoire nasal doit être estimée de la manière la plus rigoureuse possible. Pour cela, il est indispensable que le produit du transgène soit aisément détecté par un test de laboratoire. Le gène de la luciférase est le gène marqueur le plus fréquemment utilisé, car la quantité de protéine luciférase est facilement mesurée en ajoutant, à un lysat tissulaire, le substrat de cette enzyme, la luciférine, ainsi que de l'ATP. La réaction libère des photons, qui sont détectés par un luminomètre.

La plupart des médicaments administrés aux patients sont dissous dans une solution saline physiologique (par exemple une solution de NaCl à 150 mmol/L), afin de ne pas entraîner de

choc hypertonique ou hypotonique. Or, les cellules épithéliales respiratoires ne sont pas significativement transfectées par de l'ADN nu dans une solution saline, tandis que la transfection devient notable si la solution saline est remplacée par de l'eau déminéralisée. Ce mode original de transfert de gènes non-viral a été appelé : transfection par choc hypotonique et a constitué la méthode de transfection de base utilisée tout au long de ce travail.

Bien que l'expression du gène de la luciférase ait été significative, elle n'a pas été suffisamment robuste pour envisager l'utilisation de cette méthode pour traiter certaines pathologies bronchiques. Il a donc été nécessaire, par la suite, d'améliorer cette expression de plus de dix fois.

La première tentative a consisté à mettre au point un vecteur de gènes, Sec-LPD-II, afin de protéger l'ADN vis-à-vis des nucléases, et de l'administrer dans les fosses nasales dans de l'eau pure, pour générer un choc hypotonique.

La seconde approche a eu pour but d'inhiber les nucléases susceptibles de digérer l'ADN exogène, à l'aide d'ADN simple brin, d'ADN double brin et d'un inhibiteur de nucléases, l'acide aurintricarboxylique.

Nous avons également émis l'hypothèse selon laquelle l'expression luciférase est non seulement le résultat du transfert de gène mais aussi de la fréquence d'initiation de sa transcription. Nous avons repéré dans notre plasmide un site consensuel de fixation d'un facteur de transcription, YY1, qui se comporte comme un répresseur transcriptionnel dans de nombreux promoteurs. En théorie, la mutation du site de fixation d'un répresseur transcriptionnel devrait augmenter la fréquence d'initiation de la transcription du transgène.

Lors du choc hypotonique, l'ADN exogène est internalisé par les cellules épithéliales à partir de leur face apicale. Cependant, les plasmides sont des molécules d'ADN relativement

longues (5 à 10 kb). Une minorité d'entre-elles parviendraient à atteindre le noyau des cellules épithéliales respiratoires, à partir du mucus. Le clivage de la portion bactérienne du plasmide à l'aide d'enzymes de restriction a permis de raccourcir la molécule d'ADN portant le gène de la luciférase.

Enfin, la dernière approche a consisté à fixer des peptides sur le plasmide, par l'intermédiaire d'un bis-PNA, afin d'améliorer les étapes de la translocation nucléaire de l'ADN exogène, à partir du cytoplasme.

L'amélioration de la transfection a permis d'obtenir un niveau élevé d'expression du transgène, 24 heures après l'administration de l'ADN. Malheureusement, l'expression du gène de la luciférase ne se maintient pas à ce haut niveau dans l'épithélium nasal suffisamment longtemps. Une des raisons de cette diminution de l'expression du transgène est l'atténuation de ses séquences régulatrices. Celle-ci est en partie due à la dépendance du transgène vis-à-vis de facteurs de transcription inductibles, qui ne le stimulent que pendant quelques dizaines d'heures. La séquence de l'amplificateur transcriptionnel contrôlant le gène de la luciférase a donc été modifiée, afin de limiter la perte de l'expression luciférase au cours des deux semaines qui suivent la transfection.

<u>CHAPITRE 1</u> :

Transfection de l'épithélium respiratoire nasal par choc hypotonique

1.1. INTRODUCTION

Pour pénétrer dans les cellules de l'épithélium respiratoire, l'ADN exogène doit faire face à deux barrières principales. La première est la couche de mucus, impliquée dans le transport muco-ciliaire, qui limite l'atteinte de la surface apicale des cellules épithéliales par les vecteurs de gène non-viraux en agissant comme un filtre. La seconde barrière est le faible taux d'internalisation cellulaire par endocytose au niveau de la membrane apicale, qui limite l'entrée des vecteurs de gène non-viraux dans les cellules [131]. De plus, la membrane basolatérale des cellules épithéliales respiratoires, qui bénéficie d'un taux d'internalisation par endocytose plus élevé que celui de la membrane apicale, est inaccessible du fait de la présence des jonctions étanches. Celles-ci ne laissent passer ni les vecteurs de gène ni l'ADN nu.

L'épithélium respiratoire a probablement mis en place ces mécanismes de défense pour limiter les infections virales et bactériennes. Nous avons émis les hypothèses suivantes : de l'ADN nu serait mieux à même de traverser la couche de mucus recouvrant l'épithélium respiratoire qu'un vecteur de gène non-viral de plusieurs dizaines ou centaines de nanomètres de diamètre. Nous pensons aussi qu'un choc hypotonique augmenterait le taux d'internalisation de l'ADN par endocytose au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales respiratoires.

En effet, il est désormais bien connu qu'un choc hypotonique comprend deux étapes : le gonflement cellulaire suivi de la diminution régulée du volume cellulaire (Figure 1). Au cours de la première étape, les molécules d'eau pénètrent dans les cellules par osmose (1). Ce gonflement cellulaire initial étire la membrane plasmique (2) et ainsi stimule des canaux à cations sensibles à la tension de la membrane (3). Du calcium rentre dans les cellules par ces canaux et stimule l'exocytose de nombreuses vésicules intracellulaires (4) [125,150]. En

fusionnant avec la membrane plasmique, elles permettent à celle-ci de s'étendre, et même dans certaines cellules comme les fibroblastes et les cellules tumorales des ascites d'Ehrlich, la membrane plasmique forme des protubérances [18,178]. Ainsi, le gonflement osmotique des cellules n'aboutit pas à la lyse cellulaire. En effet, des cellules en culture ont pu être maintenues dans un milieu hypotonique pendant une heure sans perte de viabilité [95].

La seconde étape du choc hypotonique est l'internalisation de l'excès de membrane plasmique à partir des membranes apicale et basolatérale des cellules épithéliales pour reformer les vésicules intracellulaires, qui ont fusionné avec la membrane plasmique à l'étape précédente. Il a été abondamment démontré que les récepteurs P2 sont impliqués dans ce processus. Ces récepteurs sont des protéines intégrales présentes sur les surfaces apicale et basolatérale des cellules épithéliales et sont divisés en trois sous-familles : X, Y et Z. Les récepteurs les plus importants, P2Y, sont associés aux protéines G hétérotrimériques. P2Y1, P2Y2 et P2Y4 ont été trouvés sur la membrane apicale des cellules épithéliales respiratoires et P2Y6 sur leur face basolatérale [32]. Leur agoniste naturel, l'adénosine triphosphate (ATP), est présent à fortes concentrations dans les granules de sécrétion qui fusionnent avec la membrane plasmique au cours de la phase de gonflement cellulaire [164]. Ainsi, l'ATP qui est libéré dans le milieu extracellulaire pendant le gonflement cellulaire, se fixe sur les récepteurs P2 à la surface des cellules et les active (**5**), ce qui initie la diminution régulée du volume cellulaire.

Une voie de transduction du signal initiée par des récepteurs P2Y couplés à une phospholipase aboutie à l'ouverture de canaux potassium par une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (6) [60]. Une autre voie de transduction initiée par des récepteurs P2Y couplés à l'adénylate cyclase résulte en l'ouverture de canaux chlorure [141], incluant le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) via l'activation de la protéine kinase A (6) [81]. La sécrétion de chlorure de potassium réduit la force ionique dans le cytoplasme des cellules et l'augmente dans le milieu extracellulaire, ce qui a pour effet de faire sortir les molécules d'eau de la cellule par osmose (7). L'éviction de l'excès d'eau permet à la cellule d'internaliser l'excès de membrane plasmique par endocytose (8).

Contrairement à un gros vecteur de gène non-viral, de l'ADN nu ne se ferait pas piéger dans le réseau fibreux qui constitue la couche de mucus recouvrant l'épithélium respiratoire. Dans l'étude suivante l'épithélium respiratoire nasal de souris a été transfecté avec un plasmide nu. De plus, si l'ADN est administré dans une solution hypotonique, il pourrait bénéficier du taux élevé d'endocytose au niveau de la membrane apicale, survenant au cours de l'étape de diminution régulée du volume cellulaire du choc hypotonique, pour être internalisé par les cellules épithéliales respiratoires. Cette internalisation de l'ADN est la première étape de la transfection de l'épithélium.



Figure 1 Représentation schématique du choc hypotonique. PLC, AC et pADN indiquent la phospholipase C, l'adénylate cyclase et le plasmide, respectivement.

1.2. MATERIELS ET METHODES

1.2.1. Matériels

Tous les nucléotides, l'adénosine et la suramine ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

1.2.2. Plasmides

pNGVL₃-luc comporte le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur/ amplificateur du cytomégalovirus. Il a été préparé sans endotoxine par Bayou Biolabs (Harahan, LA, USA).

pSVβ comporte le gène de la β-galactosidase sous le contrôle du promoteur/amplificateur de SV40 (Clontech). Il a été généreusement offert par Xinsheng Nan (University of Edinburgh, UK) et préparé avec l'Endo-free Plasmid Giga kit (Qiagen).

1.2.3. Transfert de gène dans l'épithélium nasal de souris

Toutes les expériences ont été effectuées avec des souris CD1 (Harlan) de 6-8 semaines. Elles ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale (seringue à insuline, Becton Dickinson) de 2,2,2-tribromoéthanol (Sigma-Aldrich), qui a été dissout dans du 2-méthyl-2-butanol (Sigma-Aldrich) et dilué dans du tampon phosphate salin au 81^{ième}.

Comme cela a été décrit par Griesenbach *et al.* [71], un cathéter connecté à une pompe péristaltique (pump P-1, Amersham Biosciences), a été inséré à une distance d'environ 2,5 mm dans la narine gauche des souris anesthésiées. 100 µg d'ADN dans 75 µl d'eau déminéralisée ont été administrés à un débit de 5 µl/min. Pendant la perfusion nasale, les souris ont été maintenues la tête en bas sur une plaque de polystyrène inclinée à environ 60°, grâce à des morceaux de papier adhésif collés sur chaque patte arrière, la queue et les oreilles. Elles ont été maintenues dans cette position inversée, afin d'optimiser le temps de contact entre l'ADN et le tissu nasal et obtenir l'absorption complète de la solution de plasmide ; la gravité compensant le reniflement de la solution d'ADN par la souris.

1.2.4. Mesure de l'activité luciférase

24 heures après la perfusion nasale, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Le tissu nasal a été récupéré en découpant la peau et les os du nez à l'aide d'une paire de ciseaux et d'un scalpel (Roboz). Puis, le tissu nasal a été découpé in situ et extrait du nez à l'aide d'une paire de fins ciseaux et d'une pince à épiler (Roboz). Le sang a été éliminé en agitant le tissu nasal dans de l'eau pure pendant quelques secondes. Ensuite, le tissu a été placé dans du tampon de lyse (0.1 M Tris-Hcl, 2 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100, pH 7,8), qui a été préalablement filtré avec une membrane de 0,22 micron (Millipore). Le tissu nasal a été homogénéisé en le découpant dans le tampon à l'aide d'une paire de ciseaux (Roboz). Trois cycles de congélation à -50°C / décongélation à 37°C ont été effectués, afin de faire éclater les cellules et libérer la protéine luciférase localisée dans leur cytoplasme. Les tubes contenant les lysats de tissu nasal ont été centrifugés à 14.000 rpm, à 20°C, pendant 10 minutes, afin d'éliminer les débris de tissu. La luciférase se situe dans le surnageant. Dix μ l de ce dernier ont été introduits au fond de tubes en borosilicate (VWR Scientific) et ces tubes ont été placés dans un luminomètre (AutoLumat LB953, EG&G berthold), qui a injecté une solution de luciférine et d'ATP (Luciferase Assay System, Promega) dans chaque tube. L'appareil a ensuite détecté la lumière émise par la réaction enzymatique pendant 10 secondes pour chaque échantillon. Les résultats s'expriment en unités relatives de lumière (URL). Le lysat tissulaire de souris non traitées donnant une valeur 150 URL, les valeurs nettes ont été obtenues en soustrayant les valeurs brutes, provenant des tissus nasaux transfectés par le gène luciférase, de 150. L'activité luciférase a été calculée à partir de ces valeurs nettes. La concentration en protéines tissulaires étant variable d'un échantillon à l'autre, elle a été mesurée en mélangeant 5 µl de lysat tissulaire (surnageant) et 1 mL de bleu de Coomassie (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce). L'absorbance à 595 nm a été mesurée par un spectrophotomètre (DU 640, Beckman Coulter). Au préalable, une courbe standard a été obtenue à l'aide de solutions

de sérum albumine bovine (Pierce) de concentrations croissantes. Les résultats s'expriment en milligrammes de protéines. L'activité luciférase s'exprime donc en URL/mg de protéines.

1.2.5. Immunodétection de la β-galactosidase

Des souris de la souche CD1 ont été perfusées avec le plasmide pSV β , qui code pour la β galactosidase, dans de l'eau ou du chlorure de sodium à 150 mmol/L, comme cela a été décrit ci-dessus.

Après 24 heures, les tissus nasaux ont été délicatement récupérés intacts et brièvement rincés dans du tampon phosphate salin (PBS). Ensuite, ils ont été fixés à l'intérieur de cassettes en plastique (Tissue-Tek, Miles) en les incubant dans de la formaline neutralisée (10 % v/v, J.T. Baker) pendant 6 heures, à température ambiante. Puis, ils ont été rincés à trois reprises dans du PBS (100 mL) pendant 15 minutes. Par la suite, les tissus ont été déshydratés en les incubant successivement dans de l'éthanol 70 % pendant 1 heure, de l'éthanol 85 % pendant 30 minutes, de l'éthanol 95 % pendant 30 minutes, de l'éthanol 100 % pendant 1 heure à deux reprises, et du xylène pendant 1 heures à deux reprises. Enfin, les tissus ont été incubés dans de la paraffine (Paraplast, Fisher Scientific) à 57°C pendant 1 heure à deux reprises et une dernière fois pendant 30 minutes. Les tissus nasaux ont ensuite été immobilisés dans de la paraffine à l'aide de l'Histo-center II (Fisher Scientific), en coulant la paraffine chaude dans une cassette en plastique contenant le tissu traité et en la laissant refroidir à température ambiante. Les blocs de paraffine piégeant les tissus ont été sectionnés à l'aide d'un microtome (Histostat, Reichert). Seules les sections effectuées dans l'épithélium respiratoire nasal ont été retenues, disposées sur des lames en verre (Fisher Scientific) et séchées. Les sections ont été réhydratées à trois reprises avec du xylène pendant 3 minutes, de l'éthanol 100 % pendant 10 minutes à deux reprises, de l'éthanol 95 % pendant 10 minutes à deux reprises et de l'eau pure pendant 2 minutes à deux reprises. La peroxydase endogène a été détruite en incubant les

sections avec du peroxyde d'hydrogène 3 % (dilué 10 fois dans du méthanol) pendant 10 minutes et les sections ont été rincées dans de l'eau pendant 2 minutes et du PBS pendant 2 minutes. Elles ont ensuite été incubées dans de l'acide chlorhydrique 2 mol/L pendant 20 minutes et rincées dans du PBS pendant 2 minutes. Les sections ont été recouvertes d'une solution d'avidine (Sigma-Aldrich) 1 mg/mL pendant 20 minutes, afin de bloquer la biotine endogène, avant d'être rincées dans du PBS pendant 2 minutes. Puis, des gouttes de biotine (Sigma-Aldrich) 100 µg/mL ont été ajoutées pendant 20 minutes, afin de bloquer l'avidine et suivi d'un rinçage avec du PBS pendant 2 minutes. Les sections ont été recouvertes d'une solution d'anticorps monoclonal anti-β-galactosidase (dilué au 500^{ième} dans du PBS, Sigma-Aldrich) biotinylé et incubées toute une nuit dans une atmosphère humide. Elles ont ensuite été rincées avec du PBS pendant 5 minutes et incubées avec un complexe avidine/peroxydase biotinylée pendant 30 minutes. Les sections ont été à nouveau rincées avec du PBS avant de les incuber avec le substrat de la peroxydase : le 3-amino-9 éthylcarbazole (Sigma-Aldrich) pendant 3 minutes, afin de colorer le cytoplasme des cellules transfectées en rouge. Les sections ont été rincées avec du PBS, puis de l'eau pure. Enfin, elles ont été incubées dans de l'hématoxyline pendant quelques secondes, afin de colorer les noyaux cellulaires en bleu, et rincées avec de l'eau tiède courante. Les sections marquées ont été déshydratées en les incubant à deux reprises dans de l'éthanol 100 % pendant 2 minutes et du xylène pendant 2 minutes à deux reprises. Après complète évaporation du xylène, les lamelles (Vashaw Scientific) ont été mises en place en les collant à l'aide de milieu de montage (Permount, Fisher Scientific). Après séchage, les sections ont été observées sous un microscope (TE 300, Nikon) relié à une caméra numérique (Nikon). Les champs représentatifs de chaque tissu ont été photographiés dans les mêmes conditions d'éclairage.

1.3. RESULTATS

1.3.1. Effet de la tonicité de la solution d'ADN sur la transfection du tissu nasal

Le transfert de gène a été évalué dans le tissu nasal de souris, qui est un modèle de l'épithélium respiratoire pulmonaire facile d'accès [186]. L'épithélium nasal a été perfusé avec le plasmide pNGVL₃-luc dissout dans de l'eau pure, du chlorure de sodium de 37.5 mmol/L à 300 mmol/L et du tampon phosphate salin (PBS). L'activité luciférase a été réduite proportionnellement à la concentration de chlorure de sodium et a été maximale avec l'eau déminéralisée. L'activité luciférase a été jusqu'à 102 fois plus faible lorsque l'ADN a été dissout dans du PBS que dans de l'eau (Figure 2).

Il a été récemment démontré que le PBS et le chlorure de sodium à 150 mmol/L sont de meilleurs solvants pour l'ADN nu que l'eau pure pour la transfection de la peau [21] et du muscle squelettique [114]. Soit la tonicité soit la force ionique de la solution d'ADN inhibent le transfert de gène dans l'épithélium nasal.

Pour déterminer si l'efficacité de la transfection dépend de la tonicité, des solutions d'ADN dans du saccharose à 5 % et 10 % ont été administrées aux souris. Le glucose n'a pas été utilisé à cause de la présence d'un transporteur du glucose dans la membrane apicale des cellules épithéliales respiratoires. Ce dernier aurait diminué la tonicité de la solution de glucose et d'ADN dans les fosses nasales en faisant entrer le glucose dans les cellules.

Plus la tonicité était élevée, plus la transfection de l'épithélium respiratoire a diminué. La solution d'ADN la plus hypotonique est par conséquent la plus efficace pour transfecter le tissu nasal.



Figure 2 Effet de la tonicité de la solution de plasmide sur la transfection du tissu nasal. Comparaison de l'activité luciférase après l'administration de 100 μ g d'ADN dans de l'eau pure, une solution de chlorure de sodium à différentes concentrations, du PBS et du saccharose (n = 3-4 souris par groupe). ** P<0,005 et *** P<0,0005 par rapport à l'eau pure.

1.3.2. Localisation de l'expression du transgène dans le tissu nasal par détection de la βgalactosidase par immuno-marquage

La thérapie génique de la mucoviscidose et d'autres pathologies des voies respiratoires implique que le transgène soit transféré dans l'épithélium respiratoire. Il a donc été nécessaire de déterminer quelles cellules sont transfectées au niveau histologique. Pour cela, 100 μ g du plasmide pSV β contenant le gène de la β -galactosidase ont été administrés à des souris dans de l'eau pure ou du chlorure de sodium à 150 mmol/L.

Aucun marquage spécifique n'a pu être détecté dans le tissu nasal de souris non traitées (Figure 3a), dans le tissu nasal de souris perfusées avec le plasmide pNGVL₃-luc dans de l'eau pure (Figure 3b) ou dans le tissu nasal ayant reçu le plasmide pSV β dans du chlorure de sodium à 150 mmol/L (Figure 3c). Par contre, un marquage positif et uniforme a été observé dans les cellules épithéliales respiratoires après leur perfusion avec pSV β dans de l'eau pure (Figure 3d). Sur toutes les sections observées, plus de 90 % des cellules épithéliales respiratoires ont été significativement transfectées (têtes de flèche). Aucune cellule mésenchymateuse n'a été transfectée. Par rapport au tissu nasal non traité (Figure 3a) et au tissu nasal perfusé avec pSV β dans du chlorure de sodium à 150 mmol/L (Figure 3c), les tissus ayant été perfusés avec pNGVL₃-luc dans de l'eau (Figure 3b) et pSV β dans de l'eau pure (Figure 3d) n'ont pas été significativement endommagés. Cela indique que le traitement hypotonique n'a pas altéré l'épithélium respiratoire nasal.







а



Figure 3 Immunodétection de la β-galactosidase dans l'épithélium respiratoire nasal. Les tissus nasaux de souris ayant reçu 100 µg de plasmide ont été fixés, sectionnés et marqués 24 heures après perfusion. Des sections représentatives de l'épithélium respiratoire de souris non traitées (a), de souris ayant reçu le plasmide pNGVL₃-luc dans de l'eau pure (b), de souris ayant reçu pSVβ dans du chlorure de sodium à 150 mmol/L (c) et de souris ayant reçu pSVβ dans de l'eau (d) sont montrées. L'hématoxyline (bleu) marque les noyaux cellulaires et l'AEC (rouge) marque les cellules exprimant la β-galactosidase. Les pointes de flèche montrent quelques cellules épithéliales respiratoires nasales exprimant la β-galactosidase. Le grossissement est de 40 x.

1.3.3. Effet de la pré-perfusion d'eau sur la transfection de l'épithélium respiratoire

Si l'ADN est internalisé par les cellules épithéliales au cours de la phase de diminution régulée du volume cellulaire, alors la pré-perfusion d'eau devrait déclencher un choc hypotonique et l'endocytose intensive devrait débuter en l'absence du plasmide. Celui-ci ne devrait donc pas pouvoir bénéficier autant du choc hypotonique que s'il est administré en même temps que l'eau.

L'épithélium nasal de souris a été perfusé avec de l'eau pure pendant différentes périodes de temps suivie de l'ADN dans de l'eau. Il y a eu une diminution de l'activité luciférase en fonction de la durée de la pré-perfusion. L'administration d'eau pendant 20 minutes suivie par la perfusion de l'épithélium nasal avec le plasmide a abouti à une réduction maximale de l'expression de la luciférase (7 fois).

L'efficacité de la transfection est retournée au niveau atteint par la simple perfusion des souris avec le plasmide dans de l'eau lorsque la pré-perfusion d'eau a duré 30 minutes. Ni la perfusion du tissu nasal avec de l'eau après celle du plasmide, ni l'administration de chlorure de sodium à 150 mmol/L avant celle de l'ADN n'a affecté le transfert de gène dans l'épithélium nasal (Figure 4).



Figure 4 Perfusion séquentielle d'eau déminéralisée et de plasmide dans de l'eau. L'eau déminéralisée a été administrée pendant 10 à 30 minutes rapidement suivie par 100 μ g d'ADN dans de l'eau pendant 15 minutes. Le plasmide a été administré pendant 15 minutes suivi par de l'eau pendant 20 minutes (ADN – 20 min eau). Cent cinquante mmol/L de chlorure de sodium ont été administrés pendant 20 minutes rapidement suivi par 100 μ g de plasmide dans de l'eau pendant 15 minutes (20 min NaCl – ADN). * P<0,05 ; ⁺⁺ P<0,01 et *** P<0,0005 par rapport à l'ADN seul (n = 3-4 souris par groupe).

Ces résultats suggèrent que la perfusion de l'ADN dans de l'eau, par rapport à celle de l'ADN dans une solution isotonique, améliore le transfert de gène dans une période de 30 minutes, après laquelle le système a récupéré et peut être re-stimulé. La perfusion nasale avec de l'eau pure, pendant une période inférieure à 30 minutes avant celle du plasmide, initierait un choc hypotonique avant que le tissu nasal ne voie l'ADN, qui ne pourrait pas pleinement bénéficier de l'endocytose ayant lieu au cours de la diminution régulée du volume cellulaire du choc hypotonique. Ceci est en accord avec le fait que des cellules incubées dans un milieu hypotonique se gonflent et atteignent leur taille maximale en 2 à 3 minutes, et retournent à leur volume initial en environ 30 minutes [139]. Ces données suggèrent donc que l'ADN est internalisé par le tissu nasal au cours de la seconde étape du choc hypotonique. Lorsqu'un cycle de gonflement cellulaire et de diminution régulée du volume cellulaire est achevé (en 30 min), un second cycle peut commencer et l'expression de la luciférase retourne au niveau atteint par la simple perfusion du plasmide dans de l'eau (Figure 5).





1.3.4. Effet de l'ATP sur la transfection de l'épithélium nasal

Le rôle crucial joué par les récepteurs P2 dans la diminution régulée du volume cellulaire au cours d'un choc hypotonique a été abondamment documenté [73,144]. Il a été démontré que leur stimulation par de l'ATP (Figure 6a) exogène accélère la diminution régulée du volume cellulaire [47], tandis que leur blocage par l'antagoniste, la suramine, la ralenti [59]. Si la transfection a lieu au cours de la diminution régulée du volume cellulaire, alors les récepteurs P2 doivent intervenir dans le processus.

Pour déterminer si les récepteurs P2 sont impliqués dans la transfection efficace obtenue avec l'eau pure, le plasmide pNGVL₃-luc a été administré avec de l'ATP dans de l'eau. L'expression de la luciférase dans le tissu nasal a diminué d'une manière proportionnelle à la dose d'ATP. L'activité luciférase a diminué de 10 fois à une dose d'ATP de 400 nmol par souris (Figure 7). Puisque la solution d'ADN a été administrée en 15 minutes, si l'ATP accélère la phase de diminution régulée du volume cellulaire au cours de laquelle le plasmide serait internalisé par les cellules épithéliales respiratoires, en présence d'ATP exogène la période d'endocytose intensive serait presque terminée alors que la plupart de l'ADN ne serait pas encore administré à la souris (Figure 5).

Cette hypothèse a été testée en raccourcissant la durée de perfusion de l'épithélium nasal avec la solution d'ADN et d'ATP. Plus la perfusion des souris avec la solution ADN/ATP a été rapide, plus l'activité luciférase a été élevée. La perfusion nasale ne durant que 7 minutes a abouti à une expression du transgène aussi élevée que le plasmide administré seul dans de l'eau pure pendant 7 minutes (Figure 7).



+



Figure 6 Structures de l'agoniste P2, l'adénosine triphosphate (a) et de l'antagoniste P2, la suramine (b).



Figure 7 Effet de l'adénosine triphosphate (ATP) sur la transfection de l'épithélium nasal. Activités luciférase obtenues après une perfusion nasale de 15 minutes avec 100 μ g de plasmide et jusqu'à 400 nmol d'ATP ; ⁺⁺ P<0,01 ; ⁺⁺⁺ P<0,001 et *** P<0,0005 par rapport à l'ADN seul perfusé en 15 minutes. Transfection de l'épithélium nasal avec 100 μ g de plasmide et 400 nmol d'ATP pendant une période aussi courte que 7 minutes ; * P<0,05 par rapport à 400 nmol d'ATP pendant 15 minutes (n = 3-4 souris par groupe).

1.3.5. Effet de la suramine sur la transfection du tissu respiratoire nasal

D'une manière similaire, l'épithélium nasal a été perfusé avec le plasmide et l'antagoniste P2, la suramine (Figure 6b). L'activité luciférase a diminué proportionnellement à la dose de suramine. Une diminution de l'expression luciférase de 15 fois a été obtenue à une dose de suramine de 50 nmol par souris. Il est intéressant de noter que l'administration du plasmide et de 400 nmol d'ATP et 50 nmol de suramine a abouti à une efficacité de la transfection similaire à celle obtenue avec l'ADN seul (Figure 8). Cela démontre que l'ATP exogène et la suramine n'ont pas diminué l'activité luciférase parce qu'ils sont toxiques vis-à-vis du tissu nasal. En présence de suramine, la diminution régulée du volume cellulaire durerait plus longtemps et après une perfusion nasale de 15 minutes, la plupart de l'ADN serait dégradé par des DNases extracellulaires avant d'être internalisé par les cellules épithéliales respiratoires (Figure 5) [100].

Pour déterminer si la suramine affecte la transfection en ralentissant la diminution régulée du volume cellulaire, la perfusion des souris avec la solution d'ADN et de suramine a été ralentie. Plus la perfusion nasale avec la solution ADN/suramine a été ralentie, plus l'expression du transgène a été élevée. La perfusion durant 45 minutes a complètement aboli l'effet délétère de la suramine sur le transfert de gène (Figure 8). Il est intéressant de remarquer que la diminution régulée du volume cellulaire est également ralentie au cours de la mucoviscidose à cause d'une libération limitée d'ATP endogène pendant le gonflement cellulaire [16,162]. Cette dernière expérience suggère que le plasmide dans de l'eau devrait préférentiellement être administré sur une longue période de temps dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose.



Figure 8 Effet de la suramine sur la transfection du tissu respiratoire nasal. Transfection du tissu nasal avec 100 μ g de plasmide et jusqu'à 50 nmol de suramine pendant 15 minutes. Expression luciférase après administration du plasmide et de 400 nmol d'ATP et de 50 nmol de suramine en 15 min (ATP + suramine 15 min); ⁺⁺ P<0,01 et *** P<0,0005 par rapport à l'ADN seul. Perfusions nasales avec 100 μ g de plasmide et 50 nmol de suramine pendant un maximum de 45 min ; * P<0,05 et ** P<0,005 par rapport à 50 nmol de suramine 15 min (n = 3-4 souris par groupe).
1.3.6. Altération de la transfection du tissu nasal par divers agonistes P2

L'adénosine triphosphate pourrait stimuler des protéines interagissant avec l'ATP autres que les récepteurs P2. Pour déterminer si les récepteurs P2 sont réellement la cible de l'ATP et de la suramine, le plasmide a été administré avec d'autres agonistes P2 connus. L'adénosine diphosphate (ADP), la désoxyadénosine triphosphate (dATP) et l'uridine triphosphate (UTP) sont des ligands efficaces des récepteurs P2, tandis que l'adénosine et l'adénosine monophosphate (AMP) ne le sont pas [108].

A la même dose que l'ATP (400 nmol), l'ADP, la dATP et l'UTP ont réduit l'activité luciférase autant que l'ATP et l'adénosine n'a pas eu d'effet (Figure 9). L'expression du transgène obtenue avec l'AMP a été intermédiaire entre celle de l'adénosine et celle des agonistes P2. Ceci peut s'expliquer par la présence de l'ecto-adénylate kinase sur la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires [129]. Cette enzyme convertit une molécule d'AMP et une molécule d'ATP en deux molécules d'ADP. L'ecto-adénylate kinase pourrait convertir une partie de l'AMP exogène et de l'ATP endogène en ADP, qui est un agoniste P2. Puisque l'agoniste P1, l'adénosine, n'a pas affecté le transfert de gène, ces résultats démontrent que les récepteurs P1 ne sont pas impliqués dans la transfection et il est bien connu qu'ils ne sont pas impliqués dans la diminution régulée du volume cellulaire du choc hypotonique [111].

D'une manière similaire à l'ATP, les perfusions nasales avec le plasmide et 400 nmol d'agonistes P2 et 50 nmol de suramine a abouti à des activités luciférase aussi élevées que celles obtenues avec l'ADN seul (Figure 9). Cela suggère fortement que la cible de tous les nucléotides utilisés et de la suramine est le récepteur P2 et non pas d'autres protéines de fixation à l'ATP.



Figure 9 Effets de divers agonistes P2 sur la transfection de l'épithélium nasal. Efficacités de la transfection obtenues avec 100 μ g de plasmide, 400 nmol de nucléotide(side)s et 50 nmol de suramine ; ⁺⁺⁺ P<0,001 et *** P<0,0005 par rapport à l'ADN seul (n = 3-4 souris par groupe).

1.4. DISCUSSION

Les résultats présentés sont tous en accord avec le modèle de transfection du tissu nasal par choc hypotonique. En effet, il a été démontré que plus la solution d'ADN est hypotonique, plus la transfection de l'épithélium respiratoire a été efficace. Le plasmide doit être administré en 30 minutes (Figure 4) pour bénéficier totalement du traitement hypotonique. Des agonistes P2, qui sont connus pour accélérer la phase de diminution régulée du volume cellulaire du choc hypotonique, ont également accéléré la transfection de l'épithélium nasal (Figures 7 et 9). L'antagoniste P2, suramine, qui est connu pour ralentir la diminution régulée du volume cellulaire, a aussi ralenti la transfection (Figure 8).

Bien que l'administration d'un plasmide dans de l'eau pure ait été d'abord rapportée par d'autres groupes [66,118,142], cette étude démontre que l'eau n'est pas seulement un solvant pour l'ADN, mais participe activement au processus de transfert de gène. Le plasmide nu dans de l'eau a spécifiquement transfecté les cellules épithéliales respiratoires, comme cela l'a été démontré avec l'immunodétection de la β -galactosidase, contrairement au plasmide dans du chlorure de sodium à 150 mmol/L. On pourrait se demander si la perfusion de l'épithélium nasal avec une solution hypotonique d'ADN endommage le tissu. D'après l'histologie, les tissus qui ont été perfusés avec de l'ADN dans de l'eau, n'ont pas été différents du tissu non traité (Figure 3). Cela indique que le traitement hypotonique a bien été toléré.

Un choc hypotonique pourrait augmenter la perméabilité paracellulaire de l'épithélium respiratoire au plasmide, lui permettant d'accéder à la membrane basolatérale des cellules épithéliales. Ces dernières pourraient internaliser l'ADN à partir d'une plus grande superficie de membrane plasmique. Cependant, il n'a pas été possible de trouver la moindre cellule mésenchymateuse exprimant la β-galactosidase sous l'épithélium respiratoire (Figure 3d). Si le plasmide pouvait franchir l'épithélium, des cellules mésenchymateuses seraient

significativement transfectées. De plus, d'après Wang et al. [171], au cours d'un choc hypotonique la résistance transépithéliale des cellules épithéliales respiratoires humaines chute rapidement, se stabilise pendant environ trois heures et retourne lentement à son niveau de départ en 24 heures. Une cinétique similaire a été obtenue par Widdicombe et al. [177]. Le modèle de transfection par choc hypotonique impliquant l'ouverture des jonctions étanches ne permet pas d'expliquer les données rapportées dans la Figure 4. En effet, la pré-perfusion d'eau pendant 10 à 25 minutes ne devrait pas significativement affecter la transfection de l'épithélium respiratoire. Par contre, le modèle de transfert de gène impliquant un taux exacerbé d'endocytose du plasmide est en accord avec les résultats de la Figure 4. Widdicombe et al. [177] ont démontré que des cellules trachéales humaines, incubées avec du dextran (2000 k) marqué avec du RITC, dans de l'eau déminéralisée, internalisent efficacement cette macromolécule fluorescente par endocytose. Koberna et al. [95] ont également démontré que divers composés fluorescents de faible masse moléculaire, tels que des nucléotides, des peptides et des colorants, sont rapidement endocytés par des lignées cellulaires, des cellules humaines en culture primaire, des cellules de drosophile et de xénope, ainsi que des sections de foie de rat par choc hypotonique. En revanche, ces mêmes molécules n'ont pas été significativement internalisées lorsque les cellules ont été exposées à un milieu isotonique. Finalement, van der Wijk et al. [164] ont récemment démontré que le gonflement hypotonique de cellules intestine 407 induit l'endocytose de dextran (10 k) marqué au TRITC. De nombreuses vésicules fluorescentes sont apparues dans les cellules stimulées par un choc hypotonique, mais pas dans les cellules exposées à une solution isotonique de dextran fluorescent. Le taux d'endocytose a augmenté après une période de latence de 2-3 minutes et a duré environ 15 minutes. Il est très probable que dans cette étude le plasmide aurait aussi été endocyté par les cellules épithéliales respiratoires nasales. Cependant, une démonstration directe devra être apportée au cours d'une étude ultérieure.

Jusqu'à présent, le défaut des vecteurs de gène non-viraux était leur faible aptitude à transférer des gènes dans les voies respiratoires normales [72]. L'activité luciférase obtenue avec ce système non-viral très simple (ADN nu dans de l'eau pure) approche celle du virus recombinant Sendai dans le nez [181] et est comparable à celles obtenues par un plasmide complexé à de la polyéthylèneimine et au polymère synthétique CK30PEG10K [185]. Contrairement aux vecteurs viraux, le plasmide nu n'est pas proinflammatoire, en particulier lorsque les dinucléotides CpG ont été préalablement éliminés [180]. Il pourrait ainsi être administré de manière répétitive dans les voies respiratoires. Du fait que quelques traitements antiasthmatiques couramment utilisés, tel que le cromoglycate et le salbutamol, sont des solutions hypotoniques [45,133], il est concevable d'administrer une solution hypotonique d'ADN dans les voies aériennes de patients souffrant de pathologies respiratoires héréditaires ou acquises.

La nébulisation d'une solution d'ADN nu aboutit à une fragmentation presque complète de la molécule d'ADN, qui devient alors inactive d'un point de vue thérapeutique [35]. Au cours de la nébulisation d'un médicament dans les voies respiratoires, le patient n'inhale qu'une partie de la solution nébulisée, qui retombe ainsi dans le réservoir du nébuliseur et est nébulisé à nouveau. Cette recirculation de la solution aboutit à la cassure mécanique de la molécule d'ADN. Cependant, Trudell Medical International (London, Ontario, Canada) a récemment développé l'AeroProbeTM, qui est un cathéter nébulisant intracorporel utilisable pour l'administration de médicaments sensibles à la nébulisation. La solution à nébuliser et un gaz circulent dans différents capillaires du cathéter, qui convergent à l'extrémité de celui-ci au niveau de petits orifices. Le gaz pressurisé éjecte alors la solution sous la forme de fines gouttelettes. La solution est directement nébulisée dans les poumons du patient et ne recircule pas dans le cathéter, qui peut d'ailleurs se connecter à un bronchoscope. On peut s'attendre à ce que l'unique passage d'une solution d'ADN dans ce type de cathéter nébulisant

n'endommagerait pas considérablement les molécules d'ADN. Cet équipement peut être connecté à une pompe pour administrer lentement une solution d'ADN dans les voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, afin de tenir compte de la lente diminution régulée du volume cellulaire de leurs cellules épithéliales au cours d'un choc hypotonique (libération limitée d'ATP endogène pendant le gonflement cellulaire).

Finalement, cette simple technique de transfection pourrait aussi être utilisée pour vacciner des patients en transférant dans leur muqueuse nasale des gènes codant pour des antigènes. Cela permettrait d'obtenir une immunité au niveau de toutes les muqueuses de l'organisme. Cette méthode pourrait aussi permettre l'administration efficace d'autres acides nucléiques, dans les voies aériennes supérieures comme inférieures, tel que des siRNAs ou oligonucléotides antisens pour lutter contre des infections virales (grippe, rhume, ...) et des fragments d'ADN de 0,4-0,5 kb pour réparer des gènes endogènes mutés, tel que CFTR [31]. Enfin, ce système de transfection pourrait s'appliquer au transfert de gènes dans d'autres muqueuses, tel que celles du tractus uro-génital et gastro-intestinal.

<u>CHAPITRE 2</u> :

Vecteur de gènes Sec-LPD-II

2.1. INTRODUCTION

Le niveau d'expression de la luciférase obtenu dans l'épithélium respiratoire nasal, avec le plasmide nu dans de l'eau, a été relativement élevé. Néanmoins, une activité luciférase au moins 10 fois supérieure serait nécessaire pour complètement corriger le transport de chlorure faisant défaut au cours de la mucoviscidose, après transfert du gène CFTR. Plusieurs arguments peuvent nous faire espérer que le vecteur de gènes LPD-II (Liposome Polycation DNA) pourrait transférer davantage de copies du transgène dans les cellules épithéliales respiratoires, en autres, en protégeant l'ADN vis-à-vis des nucléases extra- et intracellulaires.

Le vecteur LPD-II est assemblé en mélangeant un plasmide avec du sulfate de protamine, un peptide naturel chargé positivement, que l'on trouve dans les spermatozoïdes à la place des histones et qui condense l'ADN très efficacement. Le complexe globalement chargé positivement est ensuite mélangé à un liposome anionique, ce qui génère le pré-LPD-II. Finalement, un conjugué ligand-PEG₂₀₀₀-phosphatidyléthanolamine est incorporé dans la bicouche lipidique du pré-LPD-II pour former le vecteur fonctionnel (Figure 10).

Le vecteur LPD-II est chargé négativement ; il ne devrait donc pas s'adsorber sur les composants du mucus, tels que les mucines, qui sont eux aussi chargés négativement, contrairement à un vecteur de gènes chargé positivement. LPD-II est une nanoparticule, qui devrait parvenir à franchir la barrière physique que constitue le mucus recouvrant l'épithélium nasal. Enfin, en incorporant un ligand à la surface du vecteur LPD-II, celui-ci pourrait être internalisé par endocytose par récepteur.

Dans le mucus, de nombreuses protéases sont impliquées dans le catabolisme des protéines sériques et des mucines. Cependant, l'activité de ces protéases doit être étroitement contrôlée, afin qu'elles ne digèrent pas le tissu respiratoire. La serpine est un inhibiteur qui forme un complexe avec ces protéases (serpin-enzyme complex, Sec). Après interaction, ces dernières se protéolysent et l'extrémité C-terminale générée par cette coupure devient alors un ligand reconnu par le récepteur de Sec (SecR). Après fixation de Sec à SecR, le complexe est internalisé par endocytose et Sec est envoyé dans les lysosomes, où il y est dégradé. Ainsi, les protéases potentiellement dangereuses sont éliminées du mucus. Il a été démontré que SecR est présent sur la membrane apicale des cellules respiratoires, ce qui signifie que le vecteur de gènes LPD-II doté du ligand Sec (Sec-LPD-II), provenant des voies respiratoires, devrait aisément atteindre SecR et être endocyté par les cellules épithéliales [184]. Néanmoins, l'abondance relative de SecR à la surface apicale et la cinétique d'endocytose sont inconnues.

Aussi, le vecteur Sec-LPD-II doit s'échapper des endosomes et/ou des lysosomes avant qu'il ne se dissocie et que le plasmide ne soit dégradé par la DNase II présente dans les lysosomes. Le dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE) est un lipide synthétique fusiogène qui favorise, à faible pH, la fusion de deux bicouches lipidiques. Ainsi, au pH acide des endosomes et des lysosomes, le DOPE faciliterait la fusion de la membrane de Sec-LPD-II avec celle de ces vésicules [179]. Le vecteur serait ainsi libéré dans le cytosol et une partie du plasmide gagnerait alors le noyau cellulaire.

Les lipides et la protamine sont disponibles commercialement, seul le conjugué Sec-PEG-PE a dû être synthétisé en faisant réagir le peptide Sec, doté d'une cystéine, avec le lipide PE-PEG₂₀₀₀-maléimide. L'étude suivante a consisté à trouver les meilleures formulations du vecteur Sec-LPD-II et de les évaluer dans le modèle animal, en utilisant la technique de choc hypotonique.



Figure 10 Représentation schématique de l'assemblage du vecteur de gènes Sec-LPD-II.

2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. Matériels

Les deux lipides, le dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE) et le N-glutarylDOPE, ont été achetés chez Avanti Polar Lipids et le sulfate de protamine chez Sigma-Aldrich.

2.2.2. Plasmide

Le plasmide pNGVL₃-luc, contenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur et de l'amplificateur CMV, a été utilisé dans toutes les expériences.

2.2.3. Formation du liposome NGPE/DOPE

Des solutions de DOPE et de N-glutaryIDOPE dans du chloroforme ont été mélangées dans un tube en verre en quantités équimolaires. Le chloroforme a été évaporé sous un flux d'azote et le film lipidique a été séché dans un dessiccateur sous vide. Les lipides ont ensuite été resuspendus dans de l'eau pure. Les liposomes ainsi obtenus ont été extrudés à travers deux membranes de polycarbonate d'une porosité de 600 nm, puis à travers deux membranes d'une porosité de 200 nm et enfin deux membranes d'une porosité de 100 nm (Millipore). La taille des liposomes a été mesurée et elle s'est effectivement approchée de 100 nm.

2.2.4. Formation du complexe ADN/protamine

Une solution aqueuse de sulfate de protamine plus ou moins diluée dans de l'eau a été rapidement mélangée à une solution aqueuse de plasmide (25 µg d'ADN) dans un tube de 1,5 mL sous agitation, dans un volume final de 200 µl, à température ambiante. Le mélange a été maintenu à température ambiante sans agitation pendant au moins 15 min, afin que les complexes deviennent matures. La faible force ionique des deux solutions a permis à la protamine et à l'ADN de former un complexe stable et de petite taille.

2.2.5. Formation du pré-LPD-II

Une solution de liposome NGPE/DOPE plus ou moins diluée dans de l'eau a été rapidement mélangée à la solution de complexes ADN/protamine, obtenue à l'étape précédente, sous agitation, dans un volume final de 250 µl, à température ambiante. Puis, le mélange a été maintenu à cette température pendant au moins 15 min pour que le pré-LPD-II se forme.

2.2.6. Synthèse du conjugué Sec-PEG-PE (effectuée par le Dr Rajkumar Banerjee)

Le peptide Sec a été synthétisé par le Biotechnology Center de l'Université de Pittsburgh et sa séquence est la suivante: CSIPPEVKFNKPFVFLI. Sec (masse moléculaire 1978, 20 mg soit 10 µmol) a été dissout dans du tampon phosphate 60 mM, pH 6,4. Le conjugué DSPE-PEG₃₄₀₀-maléimide (Nektar Therapeutics, 2941 Da, 24,7 mg, 8,4 µmol) y a été ajouté et la solution a été agitée à température ambiante pendant 3 jours. L'eau a été évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif et le contenu du tube a été redissout dans du diméthylformamide (DMF). Le tube a ensuite été centrifugé et le précipité a été lavé à deux reprises avec du DMF. Le précipité a été finalement dissout dans un mélange chloroforme:méthanol (1:1) et centrifugé à nouveau. Le surnageant a été évaporé pour obtenir le produit final (10,3 mg, rendement de 25 %). Le précipité a été analysé par HPLC (Waters). Le composé a été, de plus, caractérisé par MALDI-TOF MS. Le conjugué Sec-PEG-PE a été utilisé pour la formation de Sec-LPD-II, sans étape supplémentaire de purification.

2.2.7. Formation de Sec-LPD-II

Le volume adéquat de solution de Sec-PEG-PE dans du chloroforme:méthanol (1:1) a été évaporé sous un flux d'azote, dans un tube en verre, pour former un film lipidique. Puis, la solution de pré-LPD-II formée au préalable y a été ajoutée et agitée pendant quelques minutes à température ambiante, avant de l'y incuber à 37°C pendant environ 18 heures.

2.2.8. Mesure de la taille de complexes par Dynamic Light Scattering

Les solutions de liposome, d'ADN/protamine ou de pré-LPD-II ont été diluées dans de l'eau pour obtenir un volume final de 1 mL. Les mesures ont été effectuées avec un Particle Sizer (N4 Plus, Coulter). Le faisceau lumineux incident a été réfléchi par les particules présentes dans la solution et cette lumière réfléchie a été détecté à un angle de 90°. Plus une particule est grosse, plus elle réfléchi de lumière. Les mesures ont été prises en compte lorsque la concentration en particules, fournie par l'appareil, a été ni trop élevée ni trop faible. Une dilution ou une concentration de l'échantillon a été effectuée en conséquence. La taille apparente d'un complexe a été mesurée pendant 2 min, à trois reprises. L'équipement calcule la taille moyenne de la population de particules à la fin de chaque série de mesures. Le diamètre d'une population de particules adopte habituellement une distribution gaussienne.

2.2.9. Mesure du potentiel zêta de complexes

Les solutions de liposome, d'ADN/protamine, de pré-LPD-II et de Sec-LPD-II ont été diluées dans du phosphate de sodium 20 mmol/L, pH 7,4, afin d'apporter les ions nécessaires au passage du courant. En effet, la mesure du potentiel zêta est obtenue en faisant migrer des particules dans un champ électrique par électrophorèse. Les particules chargées positivement migrent vers l'anode et les particules anioniques migrent vers la cathode. Un faisceau lumineux repère la position moyenne de la population de particules dans le champ électrique et détermine le potentiel zêta, qui s'exprime en millivolts. Plus une particule est chargée, plus la valeur du potentiel zêta est élevée. Le potentiel zêta renseigne donc sur la présence, le signe et le nombre relatif de charges électriques à la surface d'une particule. Après calibrage avec une solution standard à -50 mV, l'échantillon dilué dans un volume final de 2-3 mL, a été injecté avec une seringue (Becton Dickinson) dans l'appareil (Zetasizer 4, Malvern). Le potentiel zêta d'un échantillon a été mesuré pendant quelques secondes, à 15 reprises.

2.2.10. Perfusion nasale du vecteur de gènes

Comme cela a été décrit précédemment, des souris CD1 de 6-8 semaines ont été anesthésiées, et placées sur une plaque de polystyrène inclinée après qu'un fin cathéter ait été inséré dans leur narine gauche. Les solutions de pré-LPD-II et de Sec-LPD-II (10 μ g d'ADN dans 100 μ l d'eau) ont été administrées à un débit de 5 μ l/min. 24 heures plus tard, les souris ont été sacrifiées et leurs tissus nasaux ont été prélevés, afin de mesurer les activités luciférase.

2.3. RESULTATS

2.3.1. Taille des complexes ADN/protamine

La première étape de l'assemblage du vecteur Sec-LPD-II est la formation d'un complexe entre le plasmide et le sulfate de protamine. Il s'est agit de trouver le ratio optimal de masse entre l'ADN et la protamine.

A une quantité constante de plasmide pNGVL₃-luc (25 μ g), une quantité croissante de sulfate de protamine y a été ajoutée rapidement, afin de former un complexe stable. De 4 à 32 μ g de protamine, les particules ont été relativement larges (120 nm). Par contre, à partir de 50 μ g de protamine, les complexes ont été plus petits : leur diamètre moyen a été d'environ 90 nm (Figure 11).



Figure 11 Taille des complexes ADN/protamine à différents ratios de masse. Le diamètre moyen des particules ADN/protamine a été déterminé 30 min après le mélange des deux molécules dans de l'eau pure. La taille de chaque complexe a été mesurée 3 fois pendant 2 min.

2.3.2. Potentiel zêta des complexes ADN/protamine

Les potentiels zêta des complexes ADN/protamine aux ratios de masse protamine:ADN de 1 à 6 ont été mesurés (Figure 12). A un ratio de 1, le potentiel zêta a été négatif (-5,4 mV), car une quantité insuffisante de protamine s'est associée à l'ADN ; la surface du complexe est donc restée chargée négativement. A partir d'un ratio de 2, le potentiel zêta est devenu maximal et positif (+3,5 mV). La surface des complexes ADN/protamine a été constituée de protamine, qui lui a donné sa charge positive. Un ratio de masse de 2 a donc été nécessaire et suffisant pour conférer au complexe les charges positives de surface, qui lui permettront d'interagir avec le liposome anionique.



Figure 12 Potentiel zêta des complexes ADN/protamine à différents ratios de masse. 30 min après le mélange de l'ADN et du sulfate de protamine, les solutions ont été diluées et le

potentiel zêta de chaque échantillon a été mesuré à 15 reprises.

D'après les mesures de taille et de potentiel zêta, le plus faible ratio de masse protamine: ADN nécessaire pour générer un complexe cationique a été de 2. Ce ratio a été utilisé par la suite pour préparer le pré-LPD-II.

2.3.3. Taille du pré-LPD-II

Le complexe ADN/protamine chargé positivement a ensuite été mélangé à un liposome anionique composé à 50 % de N-glutarylDOPE (lipide chargé négativement, NGPE) et à 50 % de DOPE (lipide fusiogène). Ces liposomes d'environ 100 nm de diamètre, ont eu pour rôle d'envelopper le complexe ADN/protamine, afin de le stabiliser. Aussi, cette enveloppe lipidique ne devrait pas fixer les composants anioniques du mucus par interactions électrostatiques et servira à ancrer le conjugué Sec-PEG-PE à l'étape suivante (Figure 10).

Le complexe ADN/protamine a été rapidement mélangé au liposome NGPE/DOPE à des ratios de masse liposome:ADN de 2 à 6. La taille des particules ainsi obtenues n'a pas sensiblement varié. Elle a été d'environ 90 nm (Figure 13). Cela a probablement été dû à la faible épaisseur de la membrane lipidique, qui a modérément augmenté le diamètre du complexe.



Figure 13 Taille du pré-LPD-II à divers ratios de masse liposome:ADN. La taille apparente des différents complexes a été mesurée 30 min après le début de leur formation. Chaque échantillon a été mesuré 3 fois pendant 2 min.

2.3.4. Potentiel zêta du pré-LPD-II

Puisque la taille du pré-LPD-II n'a pas beaucoup varié en ajoutant le liposome NGPE/DOPE, pour déterminer le ratio de masse liposome/ADN optimal pour la formation du pré-LPD-II, le potentiel zêta du complexe a donc été mesuré. Le potentiel zêta du liposome seul a été mesuré à -50 mV, le potentiel zêta du pré-LPD-II doit s'approcher de cette valeur puisque la surface de la nanoparticule est composée de la même bicouche lipidique.

Le ratio de masse liposome/ADN a été augmenté de 4 à 17. De 4 à 6, le potentiel zêta a rapidement diminué et s'est stabilisé à environ -50 mV (Figure 14).



Figure 14 Potentiel zêta du pré-LPD-II à divers ratios de masse liposome/ADN. Le potentiel zêta de chaque pré-LPD-II a été mesuré 15 fois pendant plusieurs secondes.

A un ratio de 6, le potentiel zêta a été suffisamment faible. A un ratio liposome/ADN supérieur à 6, la quantité de liposome a probablement été excessive: des liposomes libres en excès ne se sont pas complexés aux particules ADN/protamine. Le diamètre moyen des liposomes étant proche de celui du pré-LPD-II, la mesure de la taille du pré-LPD-II n'aurait pas permis la détection de cet excès de liposomes. Par la suite, la formulation du pré-LPD-II a été de 1:2:6 (ADN/protamine/liposome).

2.3.5. Formation du vecteur Sec-LPD-II

La dernière étape de l'assemblage de Sec-LPD-II a été l'incorporation du conjugué Sec peptide-PEG₂₀₀₀-phosphatidyléthanolamine dans la bicouche lipidique du vecteur. Le peptide Sec est globalement non chargé. Les chaînes de polyéthylène glycol (PEG), qui ne sont pas chargées non plus, devraient masquer les charges négatives du lipide NGPE présent à la surface du pré-LPD-II. La taille de la nanoparticule ne devrait pas changer significativement après incorporation de Sec-PEG-PE. Par contre, le potentiel zêta devrait augmenter et se rapprocher de zéro.

Le potentiel zêta du pré-LPD-II a été mesuré après une incubation d'environ 18 heures avec le conjugué Sec-PEG-PE à 0,5 mol % des lipides totaux. Une expérience préliminaire a montré que cette durée est suffisante pour insérer la totalité du conjugué dans le liposome NGPE/DOPE. Bien que jusqu'à présent, l'assemblage du vecteur se soit effectuée à température ambiante, l'incorporation de Sec-PEG-PE a eu lieu à 37°C, afin d'obtenir des résultats reproductibles. De -48 mV avec le pré-LPD-II, le potentiel zêta a augmenté jusqu'à -14 mV en présence de Sec-PEG-PE (Figure 15).



Figure 15 Potentiel zêta du complexe pré-LPD-II incubé avec 0,5 mol % de Sec-PEG-PE. La particule pré-LPD-II a été incubée avec une solution aqueuse de Sec-PEG₂₀₀₀-PE à 37°C pendant 18 heures, afin de masquer les charges négatives de la membrane vectorielle. Le potentiel zêta a été mesuré après dissolution des nanoparticules dans du phosphate de sodium 20 mmol/L, pH 7,4.

Comme le potentiel zêta a augmenté, cela signifie que le conjugué Sec-PEG-PE s'est efficacement incorporé dans la membrane du pré-LPD-II. Les chaînes de PEG n'ont servi qu'à relier le ligand, le peptide Sec, et le lipide d'ancrage, la phosphatidyléthanolamine ; elles n'ont pas joué un rôle de protection de la surface du vecteur. Quelques copies à quelques dizaines de copies du ligand par vecteur devraient être suffisant pour interagir avec SecR, à la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires.

2.3.6. Transfection de l'épithélium respiratoire nasal avec Sec-LPD-II

Le vecteur de gènes Sec-LPD-II a été préparé en mélangeant le plasmide, la protamine et le liposome NGPE/DOPE à un ratio de 1:2:6. Ensuite, le pré-LPD-II ainsi formé a été incubé pendant 18 heures à 37°C avec le conjugué Sec-PEG-PE à différents mol % des lipides totaux.

Le pré-LPD-II (0 mol % de Sec-PEG-PE) ainsi que Sec-LPD-II de 0,1 à 1 mol % ont modestement transfecté l'épithélium nasal. En effet, les activités luciférase ont été aussi faible que celle obtenue avec le plasmide nu dans du chlorure de sodium à 150 mmol/L (Figure 16). A 0,3 mol % de Sec-PEG-PE, l'expression de la luciférase semble être un peu plus élevée, mais elle est presque deux ordres de grandeur plus faible que celle obtenue avec l'ADN nu dans de l'eau déminéralisée.



Figure 16 Transfection de l'épithélium respiratoire nasal de souris avec Sec-LPD-II. Dix μ g d'ADN encapsulés dans le vecteur LPD-II ont été administrés à chaque souris. Les activités luciférase ont été mesurées 24 heures après la perfusion nasale et comparées à celles obtenues avec 100 μ g d'ADN nu (n = 3-4 souris par groupe). *** P<0,0005 par rapport à l'ADN nu dans de l'eau pure.

2.4. DISCUSSION

L'assemblage du vecteur de gènes Sec-LPD-II a été une réussite. En effet, un complexe ADN/protamine de 90 nm de diamètre et chargé positivement (+3,5 mV) a été mis au point et a interagi avec le liposome N-glutarylDOPE/DOPE pour former le pré-LPD-II. Une quantité suffisante de liposome a été ajouté, car le potentiel zêta du pré-LPD-II a approché celui du liposome seul (-48 mV). L'incorporation de Sec-PEG₂₀₀₀-phosphatidyléthanolamine a eu lieu, d'après le potentiel zêta, qui a significativement augmenté.

Non seulement la transfection de l'épithélium respiratoire n'a pas été plus efficace que celle obtenue avec le plasmide dans de l'eau, mais elle l'a même été beaucoup moins.

Il a été démontré qu'une quantité trop importante de PEG à la surface d'un vecteur de gènes lipidique inhibe la transfection, probablement en inhibant la fusion de la membrane du vecteur avec celle des endosomes/lysosomes [80]. Le vecteur est donc piégé dans ces compartiments et ne parvient pas à accéder au cytosol. A la meilleure quantité de Sec-PEG-PE (0,3 mol %), la quantité de PEG à la surface du vecteur est relativement faible ; les chaînes de PEG ne devraient donc pas inhiber la transfection.

Un vecteur de gène lipidique (lipoplexe) fusionne efficacement avec la membrane anionique des endosomes et lysosomes, s'il est chargée positivement. Or, la membrane de Sec-LPD-II est chargée négativement, ce qui peut expliquer la médiocre aptitude de ce vecteur de gènes à transfecter les cellules épithéliales respiratoires. D'après Lee et Huang, le vecteur LPD-II doté du ligand folate transfecte modestement *in vitro* une lignée cellulaire exprimant un récepteur du folate [106]. Un lipoplexe cationique s'adsorberait sur les composants anioniques du mucus, qui recouvre l'épithélium nasal. Le masquage des charges positives de ce lipoplexe

cationique par des brins de polyéthylène glycol inhiberait la transfection des cellules en inhibant la fusion du lipoplexe avec les endosomes et lysosomes.

La solution résiderait en l'utilisation d'un conjugué PEG-lipide dont le lien séparant le PEG et le lipide est hydrolysable à faible pH. Choi *et al.* ont synthétisé un tel conjugué, ayant une liaison diorthoester entre le PEG et la phosphatidyléthanolamine [27]. A pH neutre, cette liaison chimique est très lentement hydrolysée, tandis qu'au faible pH des endosomes et lysosomes, cette liaison est rapidement clivée et le PEG est libéré. Un lipoplexe cationique recouvert de ce conjugué PEG-diorthoester-PE pourrait ainsi aisément accéder aux cellules épithéliales respiratoires sans s'adsorber ou s'agréger avec les composants du mucus. Une faible quantité de Sec-PEG-PE permettrait au vecteur de pénétrer dans les cellules à partir de leur face apicale, et dans les endosomes/lysosomes, la liaison diorthoester s'hydrolyserait. La membrane cationique du vecteur contenant 50 % de DOPE pourrait alors fusionner avec ces vésicules intracellulaires et libérer le plasmide dans le cytosol. Ce type de vecteur de gènes, doté du peptide Sec ou d'un autre ligand, n'a jamais été testé *in vivo* dans l'épithélium respiratoire.

CHAPITRE 3 : Amélioration de la transfection et de l'expression du transgène

3.1. INTRODUCTION

Puisque l'encapsulation du plasmide pNGVL₃-luc dans le vecteur Sec-LPD-II n'a pas permis d'améliorer le transfert de gènes dans l'épithélium respiratoire nasal, il s'est agit de trouver des méthodes plus efficaces pour transfecter les cellules épithéliales avec le plasmide nu ou d'améliorer l'expression du transgène porté par le plasmide. Trois méthodes ont été envisagées : la co-administration du plasmide avec une autre molécule, la modification génétique du plasmide et la fragmentation du plasmide avec des enzymes de restriction.

Des nucléases capables de digérer le plasmide sont présentes à l'extérieur et à l'intérieur des cellules épithéliales respiratoires [34]. A l'intérieur des cellules, elles se trouvent dans les lysosomes (DNase II) et dans le cytoplasme (DNase I). Il existe peut-être des nucléases qui restent encore méconnues. La dégradation du plasmide, lors de son voyage dans le mucus et le cytoplasme pour atteindre le noyau, est une barrière à la transfection. Moins de un pour cent du plasmide, portant un transgène intact ou réparable, atteint le noyau à partir du cytosol. Toute molécule capable d'inhiber plus ou moins spécifiquement ces nucléases devrait améliorer le transfert de gènes en permettant à davantage de copies du transgène d'atteindre le noyau cellulaire. Une telle molécule, l'acide aurintricarboxylique (ATA), inhibe les enzymes utilisant les acides nucléiques comme substrat : nucléases, topoisomérases et polymérases. L'ATA est donc une molécule relativement toxique, mais elle pourrait protéger l'ADN pendant la transfection. Aussi, de l'ADN simple et double brin pourraient augmenter la demivie du plasmide en saturant les nucléases.

L'expression du transgène porté par le plasmide dépend du promoteur et de l'amplificateur (enhancer), qui contrôlent le gène de la luciférase. Ces régions contiennent les séquences d'activateurs transcriptionnels, tels que Sp1 et NF1. La famille des facteurs de transcription comprend également les répresseurs transcriptionnels, qui diminuent la fréquence de transcription d'un gène en interagissant avec des activateurs transcriptionnels, le complexe de pré-initiation ou le médiateur. YY1 (Yin-Yang 1) est un facteur de transcription, qui se comporte comme un répresseur transcriptionnel dans de nombreux promoteurs cellulaires [115,121,123]. Cependant, YY1 peut aussi exceptionnellement agir comme un activateur transcriptionnel [6,157,172]. Un site consensuel YY1 a été repéré à environ 110 paires de base en amont de l'amplificateur transcriptionnel du CMV de pNGVL₃-luc. Ce site YY1 pourrait diminuer l'expression du gène luciférase, par conséquent, sa mutation pourrait augmenter l'expression du transgène sans avoir à changer la méthode de transfection par choc hypotonique.

L'internalisation du plasmide lors du choc hypotonique se fait par endocytose ou par pinocytose. Le plasmide pNGVL₃-luc a une haute masse moléculaire (environ 3,5 mégadaltons). La troisième méthode consiste à couper la portion bactérienne du plasmide, contenant le gène de résistance à la kanamycine, avec des enzymes de restriction, afin de réduire jusqu'à 30 % la taille de la molécule d'ADN portant le gène luciférase [25]. Outre l'entrée de l'ADN exogène dans les cellules épithéliales respiratoires, certaines étapes ultérieures de la transfection pourraient être améliorées par le raccourcissement de l'ADN, telles que l'échappement de l'ADN des vésicules intracellulaires et la diffusion dans le cytosol jusqu'au noyau. L'ADN bactérien du plasmide pourrait également contenir un ou plusieurs sites de fixation de répresseurs transcriptionnels. Ceux-ci ne diminueraient l'expression luciférase que s'ils sont présents en *cis* par rapport au transgène. Après coupure du plasmide avec des enzymes de restriction, ces séquences seraient séparées du gène luciférase. Or, elles ne peuvent pas affecter l'expression d'un gène en *trans*, qui serait donc significativement améliorée.

3.2. MATERIELS ET METHODES

3.2.1. Matériels

L'ADN double brin de sperme de hareng (0,1 à 3 kb, Promega) et l'ADN simple brin de testicules de saumon (Sigma-Aldrich) ont été fragmentés par sonication par les manufacturiers.

La séquence de l'oligonucléotide mutagène YY1 (Integrated DNA Technologies) a été la suivante: 5'CATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCGGGCCGCGACATTGAT-TATTGACTAGTTATTAATAGTAA3' (le site de restriction Not I est indiqué en caractères gras et les six bases mutées sont soulignées). Il a été dissout dans de l'eau pure à une concentration finale de 1 μ mol/L. La mutagenèse dirigée a été effectuée grâce au kit GeneEditor (Promega).

Les enzymes de restriction Dpn I, Spe I, ApaL I, Dra III, Pvu I et AlwN I ont été achetées chez New England Biolabs.

3.2.2. Préparation de la solution d'acide aurintricarboxylique

L'acide aurintricarboxylique (Sigma-Aldrich) a été dissout dans de l'eau pure et le pH a été ajusté à 7 avec de l'ammoniaque (Sigma-Aldrich). Les matières insolubles ont été éliminées par filtration avec une membrane de $0.22 \ \mu m$ (Millipore). La concentration finale d'aurintricarboxylate d'ammonium a été de 1 mg/mL.

3.2.3. Mutagenèse dirigée du site YY1

3.2.3.1. Dénaturation du plasmide

Deux µg de plasmide pNGVL₃-luc ont été dénaturés par ajout de 2 µl de NaOH 2 mol/L, EDTA 2 mmol/L dans un volume final de 20 µl. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 min, puis la solution basique a été neutralisée avec 2 µl d'acétate d'ammonium 2 mol/L et 75 µl d'éthanol 100 % (préalablement refroidi à 4°C) ont été ajoutés pour permettre la précipitation de l'ADN. Celle-ci a eu lieu en refroidissant l'échantillon à -80°C pendant 30 min et en le centrifugeant à 14.000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot d'ADN a été lavé avec 200 µl d'éthanol 70 % (préalablement refroidi à 4°C) et centrifugé à 14.000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot a ensuite été séché à l'air et dissout dans 17 µl d'eau.

3.2.3.2. Hybridation de l'oligonucléotide amorce

Le plasmide dénaturé (182 ng) a été mélangé à 2 µl de tampon d'hybridation (Promega) et 1,25 µl d'oligonucléotide mutagène YY1 dans un volume final de 20 µl. La solution a été recouverte d'huile minérale (Sigma-Aldrich), afin de prévenir l'évaporation de l'eau, et la solution a été chauffée à 80°C avec un bloc de chauffage (Barnstead / Thermolyne) pendant 5 min et lentement refroidie jusqu'à 37°C.

3.2.3.3. Extension de l'oligonucléotide amorce

L'oligonucléotide mutagène YY1 a servi d'amorce à l'ADN polymérase T4, qui a synthétisé le brin complémentaire du plasmide dénaturé. Pour cela, 3 µl de tampon de synthèse, 1 µl d'ADN polymérase T4 (5-10 U) et 1 µl d'ADN ligase T4 (1-3 U) ont été ajoutés à l'oligonucléotide mutagène hybridé au plasmide dénaturé, dans un volume final de 30 µl. L'échantillon a été incubé pendant 80 min à 37°C.

3.2.3.4. Digestion par Dpn I

Dans la bactérie E. coli, les sites Dpn I (GATC) ont été méthylés. L'enzyme de restriction Dpn I ne clive sa séquence cible que si cette dernière est méthylée. Les brins du plasmide, qui s'est renaturé et sur lequel l'oligonucléotide mutagène YY1 ne s'est pas hybridé, sont tous les deux méthylés. Dpn I peut donc couper les deux brins : le plasmide sauvage sera par conséquent fragmenté et ne pourra pas transformer E. coli à l'étape suivante. Par contre, le plasmide sur lequel l'oligonucléotide amorce s'est hybridé, est composé d'un brin méthylé et d'un brin synthétisé *de novo* par l'ADN polymérase T4, qui ne l'est pas. Dans ce cas, Dpn I ne clive que le brin méthylé. Le plasmide, dont un brin seulement a été coupé, pourra ultérieurement transformer E. coli. Après l'extension de l'oligonucléotide amorce, la solution d'ADN a été incubée avec 1 µl de Dpn I (20 U) et 5 µl de tampon NEBuffer 4 (New England Biolabs) dans un volume final de 50 µl. L'échantillon a été incubé pendant 10 min à 37°C.

3.2.3.5. Transformation des bactéries compétentes BMH 71-18 mutS

Après hybridation de l'amorce et son extension par l'ADN polymérase T4, le site YY1 est composé d'un brin sauvage et d'un brin muté. Puisque le brin sauvage est méthylé au niveau de la séquence Dpn I, E. coli élimine préférentiellement le brin non méthylé mésapparié. La séquence YY1 de la plupart des plasmides redeviendrait sauvage. La mutation mutS affecte ce système de réparation de l'ADN. La probabilité que la séquence YY1 soit mutée augmente donc notablement si la souche BMH 71-18 mutS est d'abord transformée.

Toutes les étapes nécessitant des conditions stériles ont été effectuées à proximité d'un bec benzène. Un tube de polypropylène 17 X 100 mm (Spectrum Laboratory Products) a été refroidi dans de la glace pilée. Les bactéries congelées à -80°C ont été réchauffées sur de la glace et 100 µl ont été transférés au fond du tube de polypropylène. 3 µl d'échantillon d'ADN ont été ajoutés aux bactéries et le mélange a été incubé dans de la glace pendant 10 min. Puis, un choc thermique a été réalisé en chauffant les bactéries à 42°C pendant 47 s et en replaçant immédiatement le tube dans de la glace pendant 2 min. 900 µl de milieu de culture autoclavé (Miller's LB broth base, Invitrogen) dépourvu d'antibiotique ont été ajoutés et les bactéries ont été incubées pendant 60 min à 37°C, sous agitation horizontale (250 rpm). Enfin, 4 mL de milieu de culture complémenté avec du monosulfate de kanamycine (50 µg/mL, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés et les bactéries ont été cultivées toute la nuit à 37°C, sous agitation horizontale (300 rpm). Le lendemain, le plasmide a été extrait et purifié avec le Plasmid Mini kit (QIAGEN).

3.2.3.6. Transformation des bactéries compétentes DH5a

Puisque la souche BMH 71-18 mutS ne permet pas le maintien des plasmides à long terme et que les bactéries transformées contiennent soit un plasmide dont le site YY1 est sauvage, soit un plasmide dont le site YY1 est muté, la souche DH5 α a été transformée avec les plasmides isolés des bactéries mutS.

La procédure a été similaire à celle de la transformation de la souche précédente. Les bactéries mélangées à l'ADN ont été incubées dans de la glace pendant 30 min au lieu de 10 min. L'incubation à 42°C a duré 45 s et 900 µl de milieu SOC (Invitrogen) ont été ajoutés aux bactéries après le choc thermique.

Des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture gélifié ont été préparées en dissolvant 1,5 g de Bacto Agar (Becton Dickinson) et 2,5 g de Luria Broth Base (Invitrogen) dans 100 mL d'eau et en autoclavant le mélange pendant 20 min à 120°C. Lorsque la température du milieu de culture a atteint environ 60°C, 100 µl de monosulfate de kanamycine (50 mg/mL) ont été ajoutés, le mélange a ensuite été coulé dans quatre boîtes de Pétri, refroidi à température ambiante et conservé à 4°C. Suite à l'incubation des bactéries pendant 60 min à 37°C, la culture a été diluée de moitié avec du milieu SOC et 25 µl de suspension cellulaire diluée ont

été dispersés sur chacune des quatre boîtes de Pétri (préalablement réchauffées à température ambiante). Les boîtes de Pétri ensemencées ont été incubées toute la nuit à 37°C. Le lendemain, dix colonies bactériennes isolées ont été prélevées et dispersées dans dix tubes contenant 5 mL de milieu de culture complémenté en kanamycine (50 μg/mL). Les tubes ont été incubés toute la nuit à 37°C, sous agitation horizontale (300 rpm). Le lendemain, le plasmide de chaque colonie a été extrait et purifié avec le Plasmid Mini kit (QIAGEN).

3.2.3.7. Identification des colonies contenant un plasmide mutant

Un µg de chaque plasmide a été digéré avec les enzymes de restriction Dra III et Not I (5 U) dans le tampon NEBuffer 3 complémenté de BSA 1X (New England Biolabs), pendant 2 heures à 37 °C, dans un volume final de 14 µl. 3 µl de tampon de chargement de gel (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés à 7 µl de solution de plasmide digéré. Les solutions d'ADN ont ensuite été introduites dans les puits d'un gel d'agarose 1 % (Bio-Rad) contenant du bromure d'éthidium (environ 75 µg/gel, Sigma-Aldrich), situé à l'intérieur de l'appareil d'électrophorèse Mini-Horizontal Unit (Fischer Scientific). Les échantillons ont migré, au cours de l'électrophorèse effectuée dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate EDTA, pH 8), dans le champ électrique (50 à 75 V) produit par le générateur VWR 105 (VWR Scientific). 10 µl de solution de marqueurs de masse moléculaires (1 kb ladder plus, Invitrogen) ont été introduits dans un puits du gel d'agarose, afin de déterminer la taille des fragments de restriction générés par la digestion des plasmides par Dra III et Not I. Les plasmides qui ont été digérés par Not I possèdent un site YY1 muté. Pour vérifier la taille d'un de ces plasmides mutants, celui-ci a ensuite été digéré avec Dra III seul et AlwN I seul. La taille de ce plasmide a été celle attendue (5,6 kb). Ce plasmide muté a finalement été amplifié dans la souche DH5 α d'E. coli, extrait et purifié avec le Plasmid Midi kit (QIAGEN). Ce plasmide a été administré par la suite dans de l'eau pure, aux souris CD1 par perfusion nasale, comme cela a été décrit précédemment.
3.2.4. Préparation des fragments de restriction

Dans 4 tubes de 2 mL, 500 µg de plasmide pNGVL₃-luc ont été digérés avec les enzymes de restriction désirées (125 à 250 U) dans le tampon le mieux approprié pour le couple d'enzymes (par exemple avec NEBuffer 3 + BSA 1X pour Dra III / AlwN I). La digestion a eu lieu toute la nuit, à 37°C, dans un volume final de 430 µl. Le lendemain, la solution d'ADN digéré a été chauffée à 65°C pendant 20 min, afin de dénaturer les enzymes de restriction et refroidie à température ambiante. Ensuite, 860 µl d'éthanol 100 % (préalablement refroidi à 4°C) ont été ajoutés à la solution de fragments de restriction et refroidie à -80°C pendant 30 min. L'ADN a été précipité par centrifugation à 14.000 rpm pendant 60 min à 4°C. Le surnageant a été précautionneusement éliminé, le culot d'ADN a été lavé avec 1,5 mL d'éthanol 70 % et l'ADN a été centrifugé de nouveau à 14.000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot d'ADN a été séché à l'air. Enfin, l'ADN présent dans chaque tube a été resuspendu dans 125 µl d'eau pure. La concentration d'ADN a été déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm. Le rendement a généralement été proche de 100 %. La solution de fragments de restriction (100 µg) a ensuite été diluée dans de l'eau pure pour atteindre un volume final de 65 µl et l'épithélium nasal de souris CD1 a été perfusé en 15 min avec cette solution diluée.

3.3. RESULTATS

3.3.1. Effet de l'inhibition des nucléases sur la transfection de l'épithélium nasal

L'ADN nu dans de l'eau pure étant le meilleur système de transfection de l'épithélium nasal, la courte demi-vie du plasmide a été une limitation au transfert de gènes dans le noyau cellulaire. De l'ADN simple ou double brin non codant de faible masse moléculaire pourrait pénétrer dans les cellules épithéliales respiratoires lors du choc hypotonique, en même temps que le plasmide et saturer les nucléases intracellulaires, qui digèreraient le plasmide plus lentement. La demi-vie du plasmide s'en trouverait prolongée et davantage de copies du transgène gagneraient le noyau. L'acide aurintricarboxylique (ATA) forme spontanément dans l'eau, de courts polymères anioniques, qui ressemblent à un acide nucléique. L'ATA se comporte donc comme un inhibiteur des nucléases cellulaires et augmenterait donc également la demi-vie de l'ADN [67-69,122,170].

L'épithélium nasal a été perfusé avec 100 μ g de plasmide pNGVL₃-luc et 100 μ g ou 250 μ g d'ADN simple brin non codant (ADNsb). L'activité luciférase a augmenté en moyenne de 2,7 et 3,2 fois, respectivement, par rapport à 100 μ g de plasmide seul (Figure 17). De manière similaire, 10 à 1000 μ g d'ADN double brin non codant (ADNdb) ont été co-administrés avec le plasmide. 10 μ g d'ADNdb n'ont pas significativement amélioré l'expression luciférase, tandis que 100 μ g d'ADNdb ont augmenté l'activité luciférase en moyenne de 5,8 fois. A 1 mg d'ADNdb, l'activité luciférase a diminué par rapport à 100 μ g, mais elle est restée supérieure à celle obtenue avec le plasmide seul (Figure 17).



Figure 17 Transfection de l'épithélium nasal avec 100 µg de plasmide pNGVL₃ et de l'

ADN non codant. sb et db signifient simple et double brin (n = 3-4 souris par groupe).

* P<0,05 et *** P<0,0005 par rapport au plasmide seul.

Par contre, l'administration de 200 µg de plasmide au lieu de 100 µg n'a pas augmenté l'efficacité de la transfection, ce qui signifie que 100 µg d'ADNdb non codant d'environ 2 kb ont amélioré la transfection mais pas la même dose de plasmide de 5,6 kb (Figure 2). Une explication possible est que la plus faible masse moléculaire de l'ADNdb lui aurait permis d'être abondamment internalisé par les cellules épithéliales nasales.

L'épithélium respiratoire nasal a aussi été perfusé avec 100 μ g de plasmide et 10 μ g et 20 μ g d'inhibiteur de nucléases, l'ATA. 10 μ g d'ATA n'a eu aucun effet sur le transfert de gène, tandis que 20 μ g de cette molécule ont augmenté l'activité luciférase de 6,4 fois par rapport au plasmide seul. A 30 μ g, l'expression luciférase n'a pas été davantage améliorée (Figure 18).



Figure 18 Transfection de l'épithélium respiratoire nasal avec le plasmide $pNGVL_3$ -luc et l'acide aurintricarboxylique. Les souris ont été perfusées avec 100 µg de plasmide seul, 100 µg de plasmide et 10 à 30 µg d'ATA et avec 200 µg de plasmide seul (n = 3-4 souris par groupe). * P<0,05 et ⁺⁺ P<0,01 par rapport au plasmide seul.

Parmi les substrats des DNases, l'ADNdb a été plus efficace que l'ADNsb pour améliorer la transfection et l'inhibiteur de DNases, l'ATA, a été encore plus efficace que l'ADNdb. Ces résultats sont en accord avec l'aptitude relative de ces trois molécules à bloquer les nucléases (ATA > ADNdb > ADNsb), afin d'augmenter la demi-vie du plasmide et permettre à davantage de copies de pNGVL₃-luc de pénétrer dans le noyau cellulaire, où le gène luciférase peut s'exprimer.

3.3.2. Mutation du site de fixation du facteur de transcription YY1

La fréquence de l'initiation de la transcription du gène luciférase pourrait être ralentie par la présence d'un ou de plusieurs sites de fixation de répresseurs transcriptionnels dans la portion bactérienne du plasmide. YY1 est un facteur de transcription qui se comporte comme un répresseur transcriptionnel dans la plupart des gènes de mammifères ayant un site YY1 dans leur promoteur. Un site consensuel YY1 se trouve en amont du gène luciférase, il s'est agit de déterminer si YY1 réprime ou active le gène luciférase en interagissant avec les facteurs de transcription, qui se fixent sur le promoteur et l'amplificateur du CMV.

Dans une première étape, un oligonucléotide formant une structure en épingle à cheveux et contenant la séquence consensuelle de YY1 a été mis au point pour piéger le facteur de transcription dans les cellules épithéliales respiratoires nasales (Figure 19). La séquence YY1 contenant des liaisons phosphodiesters a été entourée de séquences riches en GC, afin de stabiliser la structure en épingle à cheveux. Une boucle de trois thymines a permis à l'oligonucléotide de se replier sur lui-même et de former une structure double brin pouvant fixer la protéine YY1. Les régions riches en GC et la boucle de thymines ont été stabilisées vis-à-vis des nucléases par des liaisons phosphorothioates. Un oligonucléotide contrôle a été mis au point selon les mêmes principes, afin de déterminer si l'effet de l'oligonucléotide YY1 a été spécifique de la séquence YY1. La séquence centrale a été brouillée : CGCCATGTT a été remplacé par TATTGCCGC.

⁵'G*G*G*CGCCATGTT*G*C*G*^T* ₃'C*C*C*GCGGTACAA*C*G*C*_T*

Figure 19 Structure de l'oligonucléotide d'ADN YY1. La séquence consensuelle YY1 (CGCCATNTT) a été encadrée de trinucléotides riches en GC et contenant des liaisons phosphorothioates (astérisques).

Le plasmide pNGVL₃-luc a été administré aux souris avec une dose croissante d'oligonucléotide YY1 dans de l'eau. L'activité luciférase a augmenté en moyenne de 2,5 fois à 1 µg d'oligonucléotide et jusqu'à 9,5 fois à 10 µg d'oligonucléotide YY1 par souris. Par contre, l'expression luciférase n'a pas significativement augmenté avec 10 µg d'oligonucléotide dont la séquence a été brouillée (Figure 20).

D'après ces résultats, le piégeage de YY1 avec l'oligonucléotide a réussi à améliorer l'expression du transgène. Soit YY1 ne s'est plus fixé sur sa séquence en amont du gène luciférase et n'a plus réprimé ce dernier, soit YY1 ne s'est plus fixé sur sa séquence située dans la région régulatrice de nombreux gènes cellulaires et cela a indirectement amélioré l'expression du gène luciférase.



Figure 20 Transfection de l'épithélium nasal avec $pNGVL_3$ -luc et l'oligonucléotide YY1. L'épithélium respiratoire a été perfusé avec 100 µg de plasmide, 1 à 10 µg d'oligonucléotide YY1 et 10 µg d'oligonucléotide à séquence brouillée dans de l'eau pure (n = 3-4 souris par groupe). ⁺⁺ P<0,01 ; ** P<0,005 ; ⁺⁺⁺ P<0,001 et *** P<0,005 par rapport au plasmide seul.

Pour différentier un effet direct d'un effet indirect de l'oligonucléotide YY1 sur l'expression du gène luciférase, la séquence YY1 en amont de l'amplificateur transcriptionnel du CMV a été mutée de manière ciblée. La séquence CGCCATGTT a été mutée de manière à créer un site de restriction Not I (séquence soulignée) : C<u>GCGGCCGC</u>, afin d'identifier les plasmides mutants des plasmides sauvages après mutagenèse.

Brièvement, un oligonucléotide mutagène de 70 résidus a été utilisé pour muter le site YY1. Les températures de son appariement au plasmide et de son repliement ont été calculées : 78,5°C et 51,8°C, respectivement. La différence de près de 27°C entre ces deux températures a permis l'appariement de l'oligonucléotide mutagène à sa cible sur le plasmide avant son repliement. Le plasmide a d'abord été dénaturé par la soude, afin de séparer les deux brins d'ADN et permettre à l'oligonucléotide mutagène de s'apparier à sa séquence complémentaire. L'appariement de ce dernier a eu lieu en chauffant le mélange plasmide dénaturé/oligonucléotide mutagène à 80°C et en le refroidissant lentement jusqu'à 37°C. Puis, l'oligonucléotide mutagène apparié à sa séquence complémentaire a servi d'amorce à l'ADN polymérase T4, qui a synthétisé les 5540 paires de base restantes. Après digestion avec Dpn I, la souche bactérienne BMH 71-18 mutS a été transformée avec les produits de la mutagenèse, suivie de la souche DH5a . Le plasmide d'une dizaine de colonies a été extrait et purifié et l'enzyme de restriction Not I a été utilisée pour identifier les plasmides ayant un seul site Not I (plasmides sauvages) et les plasmides ayant deux sites Not I (plasmides mutants). Un des plasmides mutants a été sélectionné et amplifié (cf. Matériels et Méthodes pour plus de détails).

Un des plasmides mutants a été dissout dans de l'eau et l'épithélium nasal de souris CD1 a été perfusé avec ce plasmide et pNGVL₃-luc. L'activité luciférase a diminué de 3,7 fois avec le plasmide muté par rapport au plasmide sauvage (Figure 21).



Figure 21 Transfection de l'épithélium nasal avec $pNGVL_3$ -luc et un plasmide mutant. La séquence YY1 en amont du gène luciférase a été mutée et remplacée par un site de restriction Not I. Cent µg de chaque plasmide ont été administrés à 3-4 souris CD1 par groupe. *** P<0,0005 par rapport au plasmide sauvage.

Cette diminution de l'expression du gène luciférase suggère que le facteur de transcription YY1 se comporte comme un activateur transcriptionnel dans le contexte du promoteur/amplificateur du CMV. Bien que YY1 ne soit pas un répresseur transcriptionnel, il est possible que des sites de fixation de véritables répresseurs transcriptionnels soient présents dans la partie bactérienne du plasmide ou dans la région régulatrice du transgène. En effet, Chao *et al.* ont identifié des sites de fixation du répresseur PDX1 dans le promoteur IE1 du CMV, qui affectent l'expression du transgène dans le pancréas [20].

3.3.3. Clivage de la portion bactérienne du plasmide

Il a été précédemment démontré que de l'ADNdb de 2 kb améliore l'expression luciférase, tandis que la même dose de plasmide (5,6 kb) n'a aucun effet (Figures 17 et 18). Cela suggère qu'une molécule d'ADN de faible masse moléculaire serait plus abondamment internalisée par les cellules épithéliales respiratoires nasales, par choc hypotonique, qu'une molécule de plus haute masse moléculaire. Si la molécule d'ADN contenant le gène luciférase était plus courte que le plasmide, elle pourrait être internalisée plus efficacement par les cellules épithéliales.

Une méthode simple pour raccourcir la molécule d'ADN contenant le gène luciférase a consisté à digérer le plasmide avec des enzymes de restriction. En effet, la partie bactérienne du plasmide, contenant le gène de résistance à la kanamycine et l'origine de réplication, possède des sites de restriction uniques (Spe I, Dra III, Pvu I et AlwN I) et deux copies du site ApaL I (Figure 22).



Figure 22 Carte du plasmide pNGVL₃-luc. Les différents sites de restriction présents dans la portion bactérienne du plasmide sont représentés par des double flèches.

La linéarisation du plasmide par sa coupure avec l'enzyme de restriction Dra III, au début du gène de résistance à la kanamycine, a augmenté l'activité luciférase de 1,6 fois, tandis que les double coupures avec Dra III et Pvu I ainsi que Dra III et AlwN I ont amélioré l'expression luciférase en moyenne de 4,5 et 21,4 fois, respectivement, par rapport au plasmide intact (Figure 23).

Le fragment de restriction Dra III-AlwN I est environ 30 % plus court que le plasmide. Le fragment d'ADN contenant le gène luciférase a été rendu encore plus court en coupant la portion bactérienne du plasmide avec ApaL I et, Spe I et AlwN I. L'activité luciférase a diminué par rapport à celle obtenue avec Dra III et AlwN I, mais elle est restée plus élevée que celle obtenue avec le plasmide intact (Figure 23).



Figure 23 Transfection de l'épithélium nasal avec divers fragments de restriction. $pNGVL_3$ luc a été digéré avec une ou deux enzymes de restriction à la fois et 100 µg de fragments de restriction ont été administrés dans les fosses nasales de 3-4 souris CD1 par groupe. ** P<0,005 ; *** P<0,0005 par rapport au plasmide intact (pADN).

Les enzymes Dra III et AlwN I ont coupé le plasmide à environ 500 paires de bases en amont et en aval du gène luciférase. Le cytoplasme des cellules de mammifère contient des exonucléases capables de digérer les acides nucléiques linéaires. Le meilleur résultat a donc été obtenu en clivant un fragment de 1,7 kb du reste du plasmide, ce qui a notablement raccourci le fragment d'ADN contenant le gène luciférase. Les deux régions d'environ 0,5 kb flanquant le transgène ont pu le protéger des exonucléases cytosoliques, pendant le passage de l'ADN dans le cytoplasme, avant l'atteinte du noyau. Le clivage du plasmide plus près du transgène a raccourci davantage la molécule d'ADN, mais les régions flanquantes sont probablement devenues trop courtes pour protéger le transgène vis-à-vis des exonucléases.

Pour traiter des pathologies respiratoires par thérapie génique, l'expression du transgène doit non seulement être élevée 24 heures après transfection, mais elle doit aussi se maintenir à ce haut niveau pendant plusieurs semaines. La cinétique de l'activité luciférase a alors été déterminée avec le plasmide pNGVL₃-luc intact et suite à sa digestion par les enzymes Dra III et AlwN I. Dans les deux cas, l'expression luciférase a rapidement diminué entre jour 1 et jour 4 et plus lentement par la suite jusqu'à sa stabilisation, à partir du jour 10, à un très faible niveau (environ 2300 URL/mg protéine, Figure 24). Néanmoins, les activités luciférase obtenues avec les fragments Dra III-AlwN I ont été plus élevées que celles obtenues avec le plasmide intact pendant environ 10 jours.



Figure 24 Cinétique de l'expression luciférase dans l'épithélium nasal transfecté par choc hypotonique avec de l'ADN nu. Le tissu nasal a été perfusé avec 100 µg de plasmide intact (courbe rouge) et avec 100 µg de plasmide préalablement digéré par les enzymes de restriction Dra III et AlwN I (courbe bleue) et 4 souris par groupe ont été sacrifiées après 1 à 14 jours. ⁺⁺ P<0,01 et *** P<0,0005 par rapport au plasmide intact.

La fragmentation du plasmide avec des enzymes de restriction a donc permis d'obtenir des niveaux d'expression du transgène plus élevés, mais l'expression luciférase n'a pas été maintenue dans le temps.

3.4. DISCUSSION

Pour améliorer la transfection de l'épithélium respiratoire nasal avec de l'ADN nu, par choc hypotonique, la première méthode a consisté à co-administrer le plasmide et une molécule capable d'augmenter la demi-vie de ce dernier. L'ADNsb et l'ADNdb de faible masse moléculaire ont effectivement amélioré l'activité luciférase de 3,2 fois et 5,8 fois, respectivement. Ces molécules d'ADN ont probablement saturé les nucléases cellulaires, ce qui a permis à davantage de copies intactes du plasmide d'entrer dans le noyau cellulaire. Le second type de molécule pouvant augmenter la demi-vie du plasmide a été l'ATA, qui se comporte comme un inhibiteur de nucléases. L'ATA a augmenté l'activité luciférase de 6,4 fois à une plus faible dose que les ADNs non codant, ce qui confirme que cette molécule n'est pas métabolisée par les nucléases contrairement aux ADNs. L'ATA est une molécule trop toxique pour pouvoir être utilisée comme adjuvant de transfection chez l'homme, car outre les nucléases, elle inhibe d'autres enzymes comme les topoisomérases et les polymérases.

L'avenir de cette stratégie dépend de la mise au point d'un inhibiteur de DNase(s) beaucoup plus spécifique et biodégradable, donc, on l'espère, moins toxique. Choi *et al.* ont découvert un peptide inhibant la DNase I par « phage display library » [29]. Malheureusement, ce peptide a une trop faible affinité pour la DNase I pour être utilisée *in vivo*. Un dérivé de ce peptide, ayant une affinité beaucoup plus élevée pour la DNase I, pourrait être utilisé comme adjuvant de transfection de l'épithélium respiratoire.

L'activité luciférase est non seulement le résultat du transfert du gène luciférase dans le noyau des cellules épithéliales, mais aussi du niveau d'expression du gène. La fréquence de transcription est contrôlée par les activateurs transcriptionnels, qui stimulent l'expression des gènes, et les répresseurs transcriptionnels, qui la réprime. La portion bactérienne du plasmide

pNGVL₃-luc et la région régulatrice sont longues de 2850 paires de bases. Il est possible qu'un ou plusieurs sites de fixation de répresseurs transcriptionnels soient présents dans cette partie du plasmide. YY1 est le plus souvent un répresseur transcriptionnel et un site YY1 consensuel se situe en amont du gène luciférase. Tandis qu'un oligonucléotide YY1 a augmenté l'activité luciférase de 9,5 fois, la mutation du site YY1 a abouti à une diminution de l'expression luciférase de 3,7 fois. Ceci suggère que YY1 se comporte comme un activateur transcriptionnel au niveau des séquences régulatrices CMV. YY1 contrôle aussi l'expression de nombreux gènes cellulaires. Bien que l'oligonucléotide YY1 ait diminué l'expression du gène luciférase en empêchant le facteur de transcription de se fixer sur le plasmide, il a pu augmenter l'expression de gènes cellulaires dont les produits sont impliqués dans l'expression génique : la transcription, la maturation de l'ARNm, l'export de l'ARNm du noyau, la traduction, la stabilité de l'ARNm et celle de la protéine luciférase. L'oligonucléotide YY1 aurait indirectement augmenté l'expression luciférase en augmentant l'expression de certains gènes cellulaires. Ainsi, l'activité luciférase a globalement augmenté

en présence de l'oligonucléotide YY1.

Bien que le site YY1 situé en amont de l'amplificateur CMV ne soit pas un site de répresseur transcriptionnel, il est possible que de tels sites existent dans la partie non codante du plasmide pNGVL₃-luc et d'autres vecteurs. Cette hypothèse est prématurée, car elle nécessite de connaître la séquence cible et la distribution tissulaire de tous les répresseurs transcriptionnels de mammifères. Ces informations restent encore trop limitées et disparates. Par contre, l'oligonucléotide YY1 a significativement amélioré l'expression de la luciférase. L'utilisation d'un tel oligonucléotide pourrait devenir une stratégie en elle-même pour augmenter l'expression d'un transgène en augmentant l'expression de gènes cellulaires impliqués dans l'expression génique. Un résultat similaire a été obtenu en incubant des cellules transfectées avec un inhibiteur de désacétylases des histones (communication

personnelle de Dr Robert Debs). Ce type de molécule augmente la fréquence de la transcription de gènes cellulaires en débobinant la chromatine recouvrant leur région régulatrice. De manière similaire à l'oligonucléotide YY1, certains de ces gènes cellulaires seraient impliqués dans l'expression génique et augmenteraient l'expression du transgène.

Le clivage de la portion bactérienne du plasmide avec les enzymes de restriction Dra III et AlwN I a fortement amélioré l'activité luciférase (21,4 fois). Cela pourrait être dû à une amélioration de la transfection : davantage de copies du gène luciférase ont atteint le noyau cellulaire. Toutes les barrières de la transfection pourraient être un peu mieux franchies, de l'internalisation de l'ADN à la traversée du pore nucléaire, parce que la molécule d'ADN portant le transgène est environ 30 % plus courte que le plasmide et linéaire. L'augmentation de l'activité luciférase pourrait aussi être le résultat de l'amélioration de l'expression du transgène : la fréquence de transcription du gène luciférase n'a plus été diminuée par des protéines se fixant sur le fragment bactérien Dra III-AlwN I. Ces protéines pourraient être des répresseurs transcriptionnels, qui interagiraient avec le complexe d'initiation de la transcription présent sur la région régulatrice du gène luciférase. Enfin, ces deux hypothèses combinées pourraient expliquer l'augmentation de plus de 20 fois de l'activité luciférase.

La coupure d'une partie de la portion bactérienne du plasmide avec des enzymes de restriction est une méthode simple pour l'éliminer du reste du plasmide. Chen *et al.* ont mis au point une souche d'Escherichia coli qui exprime de manière inductible une recombinase dont les deux séquences cibles se situent de part et d'autre du transgène [23]. A la fin de la croissance exponentielle des bactéries, l'expression de la recombinase est induite et cette enzyme élimine la majeure partie de la portion bactérienne du plasmide, incluant le gène de résistance à un antibiotique et l'origine de réplication. Deux molécules d'ADN circulaires sont ainsi générées : l'une contient le transgène et l'autre contient les séquences bactériennes (minicercles d'ADN). Ces deux molécules d'ADN circulaires sont ensuite extraites des bactéries et purifiées comme un plasmide. Cette stratégie est plus appropriée à la production à grande échelle de courtes molécules d'ADN contenant le transgène d'intérêt que la digestion du plasmide avec des enzymes de restriction. D'après les résultats obtenus avec les fragments d'ADN, ces courtes molécules d'ADN circulaire contenant un transgène pourraient transfecter l'épithélium respiratoire plus efficacement que des plasmides et/ou elles pourraient être plus fréquemment transcrites par l'ARN polymérase II.

La cinétique de l'expression luciférase a révélé que les fragments Dra III-AlwN I n'ont pas maintenu l'activité luciférase au niveau atteint 24 heures après la perfusion. Plusieurs raisons pourraient expliquer la diminution de l'expression luciférase, telles que l'atténuation de la région régulatrice, le retour du plasmide nucléaire dans le cytoplasme et la dégradation du plasmide à l'intérieur du noyau. Le clivage de la partie bactérienne du plasmide avec des enzymes de restriction ne peut pas empêcher la survenue de ces évènements. Il n'est donc pas surprenant que l'expression luciférase ait diminué en 10 jours à un niveau identique à celui atteint par le plasmide intact.

Il a été démontré que, dans un système « cell free », de l'ADN s'adsorbe sur les filaments intermédiaires du cytosquelette [159] et sur les microtubules par l'intermédiaire de MAP2 [166]. Néanmoins, il n'a pas été démontré que de l'ADN se fixe sur ces filaments du cytosquelette dans le cytoplasme d'une cellule vivante. Si cela est le cas, l'ADNdb pourrait saturer ces filaments et davantage de copies du plasmide atteindraient alors le noyau. De plus, le raccourcissement du plasmide, en le coupant avec des enzymes de restriction, diminuerait l'avidité de l'ADN pour ces filaments et davantage de copies du transgène transloqueraient dans le noyau. <u>CHAPITRE 4</u> :

Fixation non covalente de peptides sur un plasmide via un bis-PNA

4.1. INTRODUCTION

La transfection est un processus comprenant plusieurs étapes. Après l'internalisation de l'ADN nu ou encapsulé dans un vecteur de gènes, par endocytose ou pinocytose, le plasmide doit s'échapper de vésicules intracellulaires (généralement endosomes et lysosomes) et passer dans le cytosol. Dans ce compartiment cellulaire, le plasmide doit encore atteindre l'enveloppe nucléaire en traversant le réseau de filaments du cytosquelette et franchir un pore nucléaire. Il a été démontré qu'environ 0,1 % des copies du plasmide parviennent à se réfugier dans le noyau à partir du cytosol. Les autres copies sont progressivement dégradées par des nucléases cytosoliques. La faible efficacité de translocation du plasmide dans le noyau suggère que les étapes d'atteinte du noyau et de franchissement du pore nucléaire pourraient être significativement améliorées.

La transfection par choc hypotonique implique le transfert d'ADN nu dans l'épithélium respiratoire. Des molécules de synthèse capables d'améliorer la translocation nucléaire du plasmide doivent par conséquent se fixer de manière stable sur l'ADN. Pour cela, ces molécules doivent être chimiquement conjuguées avec une autre molécule ayant une forte affinité pour l'ADN. Cette dernière ne doit pas se fixer sur le transgène, afin de ne pas inhiber sa transcription. Cela signifie que la fixation de ce composé sur le plasmide doit être spécifique d'une séquence d'ADN et que cette séquence doit se situer dans la portion bactérienne du plasmide.

Le PNA (Peptide Nucleic Acid) est une molécule ayant un squelette de type peptidique sur lequel sont conjuguées les bases des acides nucléiques (Figure 25).



Figure 25 Structure chimique du PNA.

Il peut s'apparier à un brin d'ADN ou d'ARN de séquence complémentaire par des liaisons hydrogène de type Watson-Crick. Contrairement aux acides nucléiques, le squelette du PNA n'est pas chargé. Il n'y a donc pas de répulsions électrostatiques entre le brin de PNA et le brin d'ADN ou d'ARN. L'hétéroduplex PNA/ADN est par conséquent plus stable que l'homoduplex ADN/ADN. Lorsque l'ADN est bicaténaire, le PNA semble être capable de séparer les deux brins d'ADN et de s'apparier à sa séquence complémentaire. Un bis-PNA est une molécule constituée de deux brins PNA non complémentaires reliés par une charnière. Le premier brin de PNA s'apparie au brin d'ADN complémentaire par des liaisons hydrogènes de type Watson-Crick, tandis que le second brin de PNA s'apparie au même brin d'ADN par des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen. Cela constitue un triplex PNA/ADN/PNA, qui est plus stable qu'un duplex PNA/ADN.

Puisque le squelette du PNA est de type peptidique, il est possible de synthétiser chimiquement un peptide sur une résine et de le prolonger par un bis-PNA de séquence désirée. Le conjugué peptide-bis-PNA est alors clivé de la résine et purifié comme un peptide traditionnel. Le plasmide pGeneGrip-luc (6779 bp) possède le gène luciférase sous le contrôle du promoteur du CMV, ainsi qu'une région riche en dinucléotides GA, nommée site pGG et située dans la portion bactérienne du plasmide, dont la séquence est la suivante :

Les séquences CCATGG sont des sites de restriction Kpn I et les dinucléotides GA constituent la cible d'un bis-PNA constitué de cytosines et de thymines (Figure 26).



Figure 26 Carte du plasmide pGeneGrip-luc.

Un bis-PNA traditionnel est doté d'une base spéciale dans le brin interagissant avec l'ADN par des liaisons de type Hoogsteen. Cette base est un dérivé de la cytosine : la pseudoisocytosine (J). La synthèse d'un bis-PNA contenant cette base est hasardeuse ; par conséquent le coût d'un bis-PNA traditionnel est élevé. La compagnie Gene Therapy Systems commercialise le bis-PNA traditionnel pouvant se fixer sur le site pGG du plasmide pGeneGrip-luc. Le triplex PNA/ADN/PNA est représenté ci-dessous :



Le second brin d'ADN a été déplacé par le bis-PNA. Le résidu « O » est un lien d'acide 8amino-3,6-dioxaoctanoïque. Un trimère de « O » relie les deux brins du bis-PNA. Pour transfecter des souris, le plasmide pGeneGrip-luc devrait être incubé avec une grande quantité de bis-PNA conjugué à un peptide. Or, le coût élevé du bis-PNA traditionnel ne le permettrait pas. La pseudoisocytosine (J) établi deux liaisons hydrogène avec les guanines du brin d'ADN, tandis qu'une cytosine dans le brin PNA « Hoogsteen » n'en établirait qu'une seule. Un bis-PNA moins onéreux a été mis au point en substituant les résidus « J » par des cytosines. Comme le nombre de liaisons hydrogène entre le brin PNA « Hoogsteen » et l'ADN est plus faible, l'affinité de ce bis-PNA pour l'ADN serait également plus faible. Pour pallier ce problème, les deux brins de PNA ont été prolongés de deux résidus supplémentaires. Le complexe entre l'ADN et ce bis-PNA dépourvu de résidus « J » et conjugué à un peptide est représenté ci-dessous :

Une liaison amide bloque l'extrémité C-terminale du peptide et un dimère de « O » sépare le peptide du bis-PNA. Il s'agira de démontrer que ce bis-PNA dépourvu de résidus « J » peut se fixer sur le plasmide pGeneGrip-luc aussi bien que le bis-PNA traditionnel. En théorie, une demi-douzaine d'exemplaires de ce nouveau bis-PNA pourrait se fixer sur le site pGG (Figure 27). L'extrémité C-terminale du bis-PNA peut être conjuguée à un peptide et l'extrémité N-terminale peut être conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) pour rendre le bis-PNA fluorescent.



Figure 27 Représentation schématique de quatre molécules de bis-PNA-peptide fixées au plasmide pGeneGrip-luc.

Dans les cellules quiescentes, la présence de l'enveloppe nucléaire oblige les plasmides à entrer dans le noyau en traversant un pore nucléaire. Le nombre limité de pores dans l'enveloppe nucléaire et la masse moléculaire élevée des plasmides rendent le franchissement de l'enveloppe nucléaire difficile. L'ADN exogène reste donc dans le cytoplasme pendant des heures au contact des nucléases cytosoliques. Les protéines nucléaires possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS), qui interagit avec l'importine α. L'importine β et la GTPase, Ran, forment ensuite un complexe avec l'importine α et transportent activement la protéine nucléaire à travers un pore. La protéine nucléaire est alors libérée dans le nucléosol [120]. Branden *et al.* ont obtenu une augmentation de 8 fois de l'efficacité de la transfection en conjuguant un peptide doté d'un motif NLS à un PNA [15]. Celui-ci a ensuite été fixé à un plasmide sur une région située dans la partie bactérienne. Le NLS a amélioré le franchissement du pore nucléaire et davantage de copies du plasmide sont entrées dans le noyau. Le bis-PNA dépourvu de résidus « J » a prolongé l'extrémité N-terminale d'un peptide contenant le motif NLS de l'antigène T de SV40, dont la séquence est la suivante : PKKKRV.

La dynéine est une ATPase, qui transporte activement des vésicules et diverses protéines, telles que nNOS, IκBα et Kid-1, le long des microtubules [124]. L'extrémité (+) des microtubules se situe près de la membrane apicale des cellules épithéliales et l'extrémité (-) se situe à proximité du noyau. La dynéine transporte ses cargos de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des microtubules, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, et les libère près du noyau. Elle est composée de nombreux polypeptides, incluant la chaîne légère de 8 kDa (LC8). Il a été démontré que la NO synthase neuronale (nNOS) possède un motif interagissant avec LC8, dont voici la séquence : KDTGIQVDR. Puisque la nNOS s'accumule à proximité du noyau peptide de fixation à la dynéine, pourrait être activement transporté dans le cytoplasme jusqu'à l'enveloppe nucléaire. Si le plasmide atteint l'enveloppe nucléaire plus rapidement, la probabilité qu'il se réfugie dans le noyau avant d'être dégradé, devrait être plus grande. L'efficacité de la transfection devrait alors augmenter. Un peptide contenant le motif de la nNOS a donc été prolongé à son extrémité N-terminale par le bis-PNA, dépourvu de résidus « J », susceptible de se fixer sur le site pGG de pGeneGrip-luc.

Le plasmide pNGVL₃-luc ne possède pas le site pGG sur lequel peut se fixer le bis-PNA. Le plasmide pGeneGrip-luc a donc été utilisé dans cette étude à la place de pNGVL₃-luc. Un fragment de PCR doté de sites de fixation du bis-PNA a aussi été testé. Les complexes ADN/bis-PNA-peptides ont été testés sur des lignées cellulaires, à l'aide du vecteur de gènes, Lipofectamine 2000, afin de déterminer si les bis-PNA-peptides améliorent le trafic intracellulaire de l'ADN.

4.2. MATERIELS ET METHODES

4.2.1. Peptides

Les peptides NLS et DBP ont été synthétisés par le Biotechnology Center de l'Université de Pittsburgh. Leur extrémité N-terminale n'a pas été déprotégée (le groupement Fmoc n'a pas été clivé) et les peptides n'ont pas été clivés de la résine sur laquelle ils ont été polymérisés.

4.2.2. Synthèse du bis-PNA

Les monomères de PNA (Applied Biosystems) ont été réchauffés à température ambiante. Les monomères portant les bases cytosine et thymine et le monomère d'espacement « O » ont ensuite été dissous dans 3,25 ml et 2,4 mL de NMP, respectivement, et ils ont été placés dans le synthétiseur de PNA (Expedite Nucleic Acid Sytnhesis System, PerSeptive Biosystems). Quatre µmol de peptide correspondant à environ 20 mg de résine-peptide, ont été introduits dans une colonne vide, qui a été placée par la suite dans le synthétiseur de PNA. La séquence du bis-PNA a été entrée dans l'ordinateur relié au synthétiseur : 5' NH₂-O-(TC)₅-O-O-(CT)₅-O-O-(CT)₅-O-O 3'. La synthèse automatique a duré environ 8 heures et l'extrémité N-terminale du bis-PNA prolongeant les peptides a été déprotégée : la présence d'un groupement NH₂ à l'extrémité du bis-PNA permettra sa conjugaison à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

4.2.3. Conjugaison du bis-PNA au FITC

La colonne contenant la résine conjuguée au peptide-bis-PNA, a été retirée du synthétiseur et placées à 4°C jusqu'à l'étape suivante. Une solution fraîche de FITC a été préparée en dissolvant 48 mg de FITC (Sigma-Aldrich) dans 40 mg de DIPEA et 300 μ l de DMF. La colonne a ensuite été séchée dans un dessiccateur sous vide pendant au moins 30 min. La résine sèche a été introduite dans un tube de micro-centrifugation contenant une membrane de PTFE de 0,2 μ m (Amicon Ultrafree-MC, Millipore). Environ 200 μ l de solution de FITC a été ajoutée à la résine, qui a été incubé à température ambiante pendant 2 heures dans le noir. Le

tube a été centrifugé à 2.000 rpm pendant 2 min et le filtrat a été éliminé. La résine a été lavée à quatre reprises avec 450 μl de DMF et à quatre reprises avec 450 μl de méthanol en centrifugeant à 2.000 rpm pendant 5 min et en éliminant à chaque fois le filtrat. La résine lavée a ensuite été séchée dans un dessiccateur sous vide pendant au moins 30 min et placée à 4°C pendant toute la nuit.

4.2.4. Clivage, déprotection et extraction du FITC-bis-PNA-peptide

Le tube a été réchauffé à température ambiante et incubée avec 40 µl de m-crésol, 5 µl d'EDT et 155 µl d'acide trifluoroacétique (TFA) pendant 90 min à température ambiante, afin de cliver le peptide de la résine et les groupements protecteurs des chaînes latérales d'acide aminés et de monomères de PNA. Après centrifugation à 2.000 rpm pendant 5 min, un second traitement a été effectué pour cliver autant de peptides de la résine que possible. Le filtrat contient le conjugué bis-PNA-peptide. Ce dernier a été précipité à trois reprises en ajoutant 1 mL de diéthyl-éther, en centrifugeant à 14.000 rpm pendant 3 min et en éliminant le surnageant. Après cette étape de pré-purification, le précipité de bis-PNA-peptide a été séché dans un dessiccateur sous vide pendant au moins 30 min et placé à 4°C.

4.2.5. Purification du FITC-bis-PNA-peptide par Reverse Phase-HPLC

Le solvant A a été préparé en diluant 1 mL de TFA dans 999 ml d'eau (TFA 0,1 %) et en filtrant le mélange, tandis que le solvant B a été préparé en diluant 1 mL de TFA dans 999 mL d'acétonitrile et en filtrant le mélange. Les deux solvants ont été purgés avec de l'argon pendant 20 min. La colonne de HPLC hydrophobe a été chauffée à 50°C et le détecteur (Tunable Absorbance Dectector : 486, Waters) a été réglé sur la longueur d'onde 260 nm, que le PNA absorbe, grâce à ses cytosines et thymines. Le précipité de bis-PNA-peptide a été dissout dans 200 µl de TFA 0,1 % et centrifugé à 2.000 rpm pendant 5 min. Cinquante µl d'échantillon ont été injecté dans l'appareil et 100 % de solvant A a circulé dans la colonne de HPLC grâce à une pompe (Pump : 600, Waters). Progressivement, le pourcentage de solvant A a diminué et celui-ci a été remplacé par le solvant B, qui est moins hydrophile. Le bis-PNA-

peptide a été élué de la colonne de HPLC après environ 20 min et l'éluat a été récupéré dans des tubes de 50 ml (Corning), qui ont ensuite été rapidement congelés dans un mélange d'éthanol et de glace sèche. Le bis-PNA-peptide congelé a été transféré dans un lyophiliseur (Freezemobile 5SL, Virtis), afin d'éliminer l'eau, l'acétonitrile et le TFA par sublimation.

4.2.6. Préparation de la solution de bis-PNA-peptide

Après au moins deux jours, les tubes ont été retirés du lyophiliseur, les lyophilisats ont été dissous dans 250 μ l d'eau pure et les tubes ont été centrifugés à 2.000 rpm pendant 2 min. Les parois des tubes ont été lavées avec 250 μ l d'eau supplémentaires et les tubes ont été à nouveau centrifugés à 2.000 rpm pendant 2 min. Les solutions de bis-PNA-peptide de différents tubes ont été rassemblées dans le même tube, qui a été centrifugé une dernière fois à 2.000 rpm pendant 2 min. La solution de bis-PNA-peptide a été aliquotée et les aliquotes ont été immédiatement congelées à -80°C à l'exception de 10 μ l de solution, qui ont été dilués dix fois dans du phosphate de sodium 20 mmol/L pH 6,9 et congelés à -20°C.

4.2.7. Détermination de la concentration de bis-PNA-peptide

Les bis-PNA-peptides contiennent un résidu de cystéine, dont le groupement thiol peut spécifiquement réagir avec le DTNB à pH 8,0. Contrairement à ce dernier, le produit de la réaction absorbe à 412 nm. Une gamme d'étalonnage a été obtenue avec des solutions de concentration croissante de cystéine. Une solution de DTNB a été préparée en dissolvant 4 mg de réactif d'Ellman (DTNB, Pierce) dans 1 mL de phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 8,0. 5,5 µl de solution de bis-PNA-peptide à pH 6,9 ont été mélangés à 2 µl de solution de DTNB et 100 µl de phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 8,0. Le mélange a été incubé pendant 15 min à température ambiante et l'absorbance à 412 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (DU 640, Beckman Coulter). La concentration des solutions stocks de bis-PNA-peptides a habituellement été d'environ 25 µmol/L.

4.2.8. Fixation du bis-PNA-peptide sur le plasmide pGeneGrip-luc

À 15,6 pmol de plasmide pGeneGrip-luc (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L) 78 pmol de FITC-bis-PNA-peptide ont été ajoutés (ratio molaire PNA/ADN = 5) avec du phosphate de sodium 20 mmol/L pH 6,9 dans un volume final de 312 µl. Le bis-PNA a été capable d'envahir la double hélice d'ADN, au niveau de la région pGG de pGeneGrip-luc et de se fixer à son brin complémentaire de séquence (GA)₅. Cette invasion de l'ADN ne nécessite pas de chauffer le mélange bis-PNA/ADN. La fixation du bis-PNA-peptide sur pGeneGrip-luc a donc eu lieu à température ambiante, à pH 6,9. A ce pH, la fixation du bis-PNA à l'ADN est rapide et spécifique de la séquence d'ADN.

4.2.9. Filtration en gel du mélange bis-PNA-peptide/pGeneGrip-luc

Dix mL de gel Sephacryl S-300 (Pharmacia Biotech) ont été introduits dans une colonne de 30 mL (Bio-Rad) et ont été lavés avec 30 mL de phosphate de sodium 10 mmol/L pH 7,4. Le mélange FITC-bis-PNA-peptide/ADN a été délicatement déposé sur le gel et après sa pénétration dans le gel, 20 mL de phosphate de sodium 10 mmol/L pH 7,4 ont été ajoutés pour éluer ces deux molécules. L'élution a eu lieu à pH 7,4, afin de mimer le pH du milieu extracellulaire. Des fractions d'environ 500 µl ont été collectées dans des tubes de 2mL.

4.2.10. Mesure de la fluorescence (512 nm) et de l'absorbance (260 nm) du complexe FITC-bis-PNA-peptide/plasmide

Du phosphate de sodium 20 mmol/L pH 4,9 a été ajouté jusqu'à ce que le volume final de chaque fraction soit de 2 mL. A pH acide, la fluorescence de la fluorescéine est amplifiée, ce qui a permis de détecter l'émission de photons à 512 nm, après l'excitation de la fluorescéine à 496 nm de chaque fraction diluée, grâce à un fluorimètre (LS 50 B, Perkin Elmer). 110 µl de chaque éluat dilué ont été transférés dans une cuvette en quartz (micro cell 8 mm high, Beckman Coulter), afin de mesurer l'absorbance du plasmide à 260 nm. L'absorbance du bis-PNA à 260 nm est négligeable par rapport à celle de l'ADN.

4.2.11. Culture et ensemencement des lignées cellulaires

Les cellules NIH3T3 et Hela ont été cultivées dans des flacons de polystyrène de 75 cm² (Sarstedt), dans du DMEM (BioWhittaker, Cambrex) supplémenté de 10 % de sérum de bœuf. Les cellules ont été détachées de la surface du flacon grâce à un mélange de trypsine et d'EDTA (Gibco BRL). Après comptage, $1,5x10^5$ cellules ont été transférées dans chacun des puits d'une plaque de 24 puits (cluster Costar 3526, Corning), dans 500 µl de milieu de culture. La plaque a ensuite été incubée pendant 24 heures, à 37°C, dans un incubateur (Fisher Scientific).

4.2.12. Formation des complexes bis-PNA-peptide/ADN/Lipofectamine 2000

Trente µg de pGeneGrip-luc et un bis-PNA-peptide ont été mélangés à un ratio molaire de 5 à 20 dans du phosphate de sodium 20 mmol/L pH 6,9 (60 µl final) supplémenté de dithiothréitol 0,8 mmol/L (DTT, Sigma-Aldrich). Le DTT a prévenu l'oxydation de la cystéine du bis-PNA-peptide. L'incubation a duré 30 min et a eu lieu à température ambiante. 1,35 µg de liposome cationique Lipofectamine 2000 (LF2000, Invitrogen) ont été dilués dans 2,698 mL de milieu de culture appauvri en sérum, OPTIMEM-I (Gibco BRL) et 500 ng de plasmide ou de complexe bis-PNA-peptide/ADN ont été dilués dans 2,499 mL d'OPTIMEM-I. Six cent cinquante µl de LF2000 diluée et 650 µl de plasmide ou de complexe bis-PNA-peptide/ADN dilué ont été mélangés et incubés pendant 45 min, à température ambiante. Suite à cette incubation, un complexe ADN/liposome (lipoplexe) s'est formé et servira à la transfection des lignées cellulaires.

4.2.13. Transfection des lignées cellulaires

Cent µl de chaque lipoplexe ont été introduits dans 3 puits de la plaque, qui a été replacée dans l'incubateur à 37 °C, pendant 24 heures. Le lendemain, le milieu de culture a été aspiré et 500 µl de tampon de lyse (Tris-HCl, EDTA, Triton X-100) ont servi à resuspendre et lyser les cellules transfectées de chaque puits. Les lysats ont été transférés dans des tubes de 1,5 mL, qui ont ensuite été centrifugés à 14.000 rpm, pendant 5 min, à température ambiante. Dix μl de chaque lysat ont été introduits dans des tubes de borosilicate (VWR Scientific) pour la mesure de l'activité luciférase en unité relative de lumière (URL). Cinq μl de chaque lysat et 1 mL de bleu de Coomassie (Pierce) ont été introduits dans des cuvettes en plastique 10x4x45mm (Sarstedt) et l'absorbance à 595 nm a été mesurée, pour déterminer la concentration en protéines, qui est exprimée en microgrammes.

4.2.14. Production d'un fragment de PCR contenant le gène luciférase

Le mélange a été chauffé à 94°C pendant 5 min et 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 56°C et 3 min à 72 °C ont été accomplis. Finalement, la PCR s'est achevée par une période de chauffe à 72°C pendant 10 min, afin d'optimiser l'élongation des derniers brins d'ADN. Le fragment de PCR a ensuite été placé à 4°C. La qualité du fragment de PCR a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose. Le fragment de PCR a été purifié grâce au QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) et la concentration de l'ADN a été déterminée par la mesure de son absorbance à 260 nm.

La fixation des bis-PNA-peptides sur le fragment de PCR et l'encapsulation de l'ADN dans le liposome LF2000 ont été effectuées de la même manière qu'avec le plasmide pGeneGrip-luc. 50 ng de fragment de PCR complexés à LF2000 ont été transférés dans chaque puits, d'une plaque de 24 puits, contenant des cellules Hela et les activités luciférase ont été mesurées comme cela a été décrit auparavant.

4.3. RESULTATS

4.3.1. Fixation du bis-PNA dépourvu de résidus « J » sur le plasmide pGeneGrip-luc

Puisque certains groupes sont parvenus à améliorer le franchissement du pore nucléaire en fixant un ou plusieurs peptides NLS sur la molécule d'ADN portant un transgène [15], le bis-PNA a été synthétisé à partir de l'extrémité N-terminale d'un peptide contenant un motif NLS. De plus, l'extrémité N-terminale du bis-PNA a été conjuguée à la fluorescéine (Figure 28).

FITC-NH-O-(TC)₅-O-O-(CT)₅-O-O-CO-NH-CPPKKKRKVED-CO-NH₂

Figure 28 Séquence du bis-PNA conjugué à du FITC et à un peptide NLS. Un peptide contenant le motif NLS de l'antigène T de SV40 (séquence en gras) a été synthétisé sur une résine PAL-PEG-PS, son extrémité N-terminale a été prolongée par le bis-PNA dépourvu de résidus « J » et l'extrémité N-terminale du bis-PNA a été conjuguée au FITC pour rendre la molécule fluorescente.

Le peptide NLS a été prolongé d'un résidu de cystéine, afin que le conjugué bis-PNA-NLS possède un groupement thiol. Ce dernier a été nécessaire pour déterminer la concentration de bis-PNA-NLS, après sa purification, en utilisant le réactif spécifique du groupement thiol, le DTNB.

Il a été démontré que l'appariement d'un PNA à sa séquence cible d'ADN est spécifique et rapide à pH 6,9. La fixation de FITC-bis-PNA-NLS sur le site pGG du plasmide pGeneGripluc a donc été effectuée dans du phosphate de sodium 20 mmol/L pH 6,9 à un ratio molaire bis-PNA/ADN de 5.

Afin de déterminer la cinétique de fixation du bis-PNA sur le plasmide, ces deux molécules ont été mélangées pendant 5 à 15 min. Elles ont ensuite été séparées par filtration en gel. Si le
bis-PNA s'est fixé de manière stable sur le plasmide, il devrait être élué du gel en même temps que celui-ci. Dans la fraction contenant le plus d'ADN, ce dernier a été détecté grâce à son absorbance à 260 nm et le bis-PNA a été détecté grâce à la fluorescence à 512 nm de la fluorescéine conjuguée à son extrémité N-terminale. Le ratio fluorescence (512 nm) / absorbance (260 nm) a été calculé et a renseigné sur la quantité de FITC-bis-PNA-NLS fixé sur l'ADN. Le ratio fluorescence/absorbance a été maximal après 10 min d'incubation du plasmide avec le bis-PNA (Figure 29). Comme la séparation complète de ces deux molécules dans le gel a nécessité quelques minutes, la fixation du bis-PNA sur l'ADN a donc requis un peu plus de 10 min. Par la suite, le plasmide pGeneGrip-luc a été incubé avec les bis-PNApeptides pendant 30 min, afin de s'assurer de la fixation complète de ces conjugués sur l'ADN.



Figure 29 Cinétique de fixation du bis-PNA-NLS sur le plasmide pGeneGrip-luc. La fluorescence du FITC-bis-PNA-NLS à 512 nm (unités arbitraires) et l'absorbance de l'ADN à 260 nm ont été mesurées et les ratios fluorescence/absorbance ont été calculés aux différents temps d'incubation.

La démonstration directe de la fixation du FITC-bis-PNA-NLS sur le plasmide pGeneGrip-luc a été apportée en incubant ces deux molécules pendant 30 min à température ambiante et en collectant les différentes fractions de la filtration en gel. L'ADN de chaque fraction a été détecté grâce à son absorbance à 260 nm et le bis-PNA a été détecté grâce à la fluorescéine, qui émet des photons à 512 nm, après excitation à 496 nm (Figure 30). La haute masse moléculaire du plasmide lui a permis d'être rapidement élué du gel (principalement dans la fraction 6). La faible masse moléculaire du bis-PNA-NLS l'a retardé dans le gel. Nous avons observé, au cours d'expériences préliminaires, que le bis-PNA-NLS seul a principalement été élué dans la fraction 16, tandis qu'après son incubation avec pGeneGrip-luc, aucune fluorescence significative n'a été détectée dans cette fraction.



Figure 30 Filtration en gel du mélange pGeneGrip-luc/FITC-bis-PNA-NLS. L'ADN a été détecté par absorbance à 260 nm et le PNA par fluorescence à 512 nm.

Les courbes d'absorbance de l'ADN à 260 nm et de fluorescence du FITC-bis-PNA-NLS à 512 nm se sont superposées, ce qui signifie que le bis-PNA dépourvu de résidus « J » s'est effectivement fixé de manière stable au plasmide pGeneGrip-luc. Une simple incubation du plasmide avec le conjugué bis-PNA-peptide, à température ambiante pendant 30 min, a donc permis d'attacher le peptide NLS sur l'ADN. Néanmoins, cette expérience n'a pas permis d'estimer le nombre de peptides NLS par plasmide.

Dans le cytosol, l'atteinte de l'enveloppe nucléaire pourrait être améliorée si un peptide de fixation à la dynéine est attaché au plasmide par l'intermédiaire du bis-PNA. Un second conjugué, bis-PNA-DBP, a donc été synthétisé (Figure 31).

FITC-NH-O-O-(TC)5-O-O-(CT)5-O-O-CO-NH-CMKDTGIQVDRDLDG-CO-NH2

Figure 31 Séquence du bis-PNA conjugué à du FITC et à un peptide DBP (Dynein Binding Peptide). Le peptide de fixation à la chaîne légère de dynéine a été prolongée par le bis-PNA et celui-ci a ensuite été conjugué au FITC.

_4.3.2. Transfection de lignées cellulaires avec des complexes ADN/bis-PNA-peptide L'étape suivante a consisté à tester les complexes plasmide/bis-PNA-peptide dans un système de transfection des lignées cellulaires NIH3T3 et Hela. Le plasmide pGeneGrip-luc a été incubé avec soit le bis-PNA-NLS, soit le bis-PNA-DBP ou les deux bis-PNA-peptides à un ratio molaire PNA/ADN de 5, dans du phosphate de sodium 20 mmol/L pH 6,9 pendant 30 min, à température ambiante. Les complexes ADN/bis-PNA-peptide(s) ont ensuite été encapsulés dans un liposome cationique (Lipofectamine), afin de transférer efficacement le plasmide dans les cellules. Plus de $1,5x10^5$ cellules NIH3T3 et Hela ont été incubées pendant 24 heures avec 10 ng de plasmide complexé à un ou deux bis-PNA-peptides et à la Lipofectamine. Après 24 heures, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée (Figure 32).



Figure 32 Transfection de cellules NIH3T3 et Hela avec les bis-PNA-NLS et bis-PNA-DBP. Le plasmide pGeneGrip-luc a été complexé aux bis-PNA-peptides suivi de la Lipofectamine pour transfecter les deux lignées cellulaires. pGeneGrip-luc a aussi été incubé avec les deux bis-PNA-peptides à la fois, à un ratio PNA/ADN de 2,5 pour chaque molécule (bis-PNA-NLS+DBP). Dix ng d'ADN ont été introduits dans chaque puits. Chaque expérience a été effectuée à trois reprises. Au ratio molaire PNA/ADN de 5, aucun des deux bis-PNA-peptides n'a amélioré la transfection des cellules NIH3T3 et Hela. La demi-vie du plasmide pGeneGrip-luc a probablement été courte, car seulement 10 ng d'ADN ont été transférés dans les cellules. Après l'incubation du plasmide avec un bis-PNA-peptide, de l'ADN de thymus de veau de haute masse moléculaire a été ajouté, afin que les cellules NIH3T3 soient transfectées avec 100 fois plus d'ADN (10 ng de plasmide et 990 ng d'ADN non codant). Le ratio PNA/ADN a été augmenté jusqu'à 20, afin de déterminer si le nombre de copies de bis-PNA-peptide sur le plasmide n'a pas été suffisant au cours de l'expérience précédente. Le mélange de plasmide/bis-PNA-peptide et d'ADN de thymus de veau a ensuite été encapsulé dans le liposome Lipofectamine (Figure 33).



Figure 33 Transfection de cellules NIH3T3 avec pGeneGrip-luc complexé à un bis-PNApeptide et de l'ADN de thymus de veau. 10 ng de plasmide ont été incubés avec le bis-PNA-NLS ou le bis-PNA-DBP à un ratio molaire de 5 à 20 et 990 ng d'ADN de thymus de veau (T.V.) y ont été ajoutés avant de complexer l'ADN total avec de la Lipofectamine. Chaque expérience a été effectuée à trois reprises. * P<0,05 ; ⁺⁺ P<0,01 ; ** P<0,005 ; ⁺⁺⁺ P<0,001 et *** P<0,0005 par rapport au plasmide seul.

L'ADN de thymus de veau a significativement amélioré la transfection des cellules NIH3T3 avec le plasmide pGeneGrip-luc non complexé à un bis-PNA-peptide (4,5 fois). Cela conforte les résultats obtenus dans l'épithélium respiratoire nasal de souris avec de l'ADN de sperme de hareng (Chapitre 3). Seul le bis-PNA-NLS à un ratio PNA/ADN de 20 a légèrement augmenté l'activité luciférase par rapport au plasmide mélangé à de l'ADN de thymus de veau (1,5 fois).

Une raison possible de l'absence d'amélioration du transfert de gène obtenue précédemment (Figure 32) pourrait être la séquestration du plasmide dans le cytoplasme, qui l'empêcherait d'atteindre la dynéine et le pore nucléaire. L'ADN exogène pourrait s'adsorber sur des éléments cytoplasmiques, tel que le cytosquelette, bien que cela n'ait pas encore été démontré. Si la molécule d'ADN était plus courte, elle parviendrait à se mouvoir plus aisément dans le cytoplasme et accéderait à la dynéine circulant le long des microtubules, ainsi qu'aux pores nucléaires. Les peptides NLS et DBP pourraient alors améliorer la transfection.

Le gène luciférase du plasmide $pNGVL_3$ -luc a été amplifié par PCR grâce à deux amorces. L'amorce qui s'est fixé en amont du gène luciférase, a été prolongée d'une séquence (GA)₁₅. En théorie, deux copies du bis-PNA-peptide pourraient se fixer sur cette séquence. Ce fragment de PCR a été environ 45 % plus court que le plasmide. Il a été incubé avec le bis-PNA-NLS ou le bis-PNA-DBP dans du phosphate de sodium 20 mmol/L pH 6,9 pendant 30 min, à température ambiante et à un ratio PNA/ADN de 3. Les complexes fragment de PCR/bis-PNA-peptide ont ensuite été encapsulé dans le liposome Lipofectamine et les vecteurs de gènes ainsi formés ont servi à transfecter des cellules Hela (Figure 34).



Figure 34 Transfection de cellules Hela avec un fragment de PCR contenant le gène luciférase complexé à un bis-PNA-peptide. Cinquante ng d'ADN ont été introduits dans chaque puits. Chaque expérience a été effectuée à trois reprises. * P<0,05 par rapport au fragment de PCR seul.

La fixation de chacun des deux bis-PNA-peptides sur le fragment de PCR a faiblement augmenté l'activité luciférase dans les cellules Hela (1,7 fois).

Puisque les améliorations de la transfection des lignées cellulaires n'ont été que modestes, aucun peptide mutant issu des peptides NLS et DBP n'a été conjugué au bis-PNA pour servir de témoin négatif. De plus, les bis-PNA-peptides n'ont pas été testés dans l'épithélium respiratoire nasal de souris, car le rapport bénéfice/coût a été trop faible pour leur utilisation *in vivo*.

4.4. DISCUSSION

La translocation nucléaire de l'ADN portant un transgène d'intérêt est si faible qu'il est indispensable de trouver des solutions viables à ce problème. Trois barrières à la transfection pourraient expliquer la médiocre translocation nucléaire de l'ADN exogène : sa séquestration dans le cytoplasme par des éléments cytoplasmiques, sa dégradation par des nucléases et son aptitude limitée à traverser le pore nucléaire. La fixation sur l'ADN d'un peptide contenant un motif NLS pourrait améliorer le franchissement du pore nucléaire et le transport actif de l'ADN exogène par la dynéine accélérerait la translocation nucléaire, permettant à davantage de copies intactes du transgène de se réfugier dans le noyau.

Les peptides NLS et DBP ne peuvent se fixer de manière stable à l'ADN par eux-mêmes. Ils ont dû être conjugués à une molécule ayant une forte affinité pour l'ADN. Les bis-PNAs peuvent s'attacher à de l'ADN double brin, sans chauffage pour dénaturer la double hélice, en déplaçant le brin riche en pyrimidines et en s'appariant au brin riche en purines. Bien que le bis-PNA traditionnel avec ses résidus « J », soit trop onéreux pour être utilisé *in vivo*, Liang et al. ont obtenu une modeste amélioration de la transfection de cellules musculaires chez la souris avec un bis-PNA traditionnel conjugué à la transferrine [110].

Cette étude a démontré qu'un bis-PNA dépourvu de résidus « J » peut se fixer rapidement à un plasmide contenant la séquence cible de ce bis-PNA. Puisque la chimie de synthèse des peptides et des PNAs est identique, il a été possible de synthétiser un peptide et de le prolonger par le bis-PNA dépourvu de résidus « J ».

Seul le peptide NLS a modérément amélioré la transfection des cellules NIH3T3, suite au mélange du plasmide pGeneGrip-luc à un large excès d'ADN non codant. Ce dernier a pu saturer les nucléases cytosoliques et/ou les éléments cytoplasmiques sur lesquels le plasmide

s'adsorberait. En présence d'ADN de thymus de veau, davantage de copies intactes du plasmide parviendraient à atteindre l'enveloppe nucléaire. La présence de plusieurs copies du peptide NLS, attachées sur le plasmide par l'intermédiaire du bis-PNA, a ensuite faiblement amélioré la traversée du pore nucléaire. Une meilleure amélioration de la transfection pourrait être obtenue en créant d'autres sites pGG dans la portion bactérienne du plasmide. Davantage de copies du bis-PNA-NLS faciliteraient le franchissement du pore nucléaire par le plasmide.

La seconde possibilité pour limiter l'adsorption de l'ADN exogène sur des éléments cytoplasmiques, est de diminuer l'avidité de la molécule d'ADN en la raccourcissant. Un fragment de PCR possédant deux sites de fixation pour le bis-PNA a été synthétisé. L'appariement des bis-PNA-NLS et bis-PNA-DBP sur la région située en amont du gène luciférase a légèrement augmenté le transfert de gène (Figure 34).

Si la demi-vie de l'ADN exogène dans le cytosol était relativement longue et si l'ADN exogène s'adsorbait peu sur certains éléments cytoplasmiques, de nombreuses copies du transgène atteindraient l'enveloppe nucléaire. La transfection serait significativement amélioré et les peptides NLS et DBP deviendraient alors inutiles. La solution au problème de translocation nucléaire de l'ADN réside dans la découverte d'inhibiteur(s) de nucléases cytosoliques et dans l'identification des éléments cytoplasmiques séquestrant l'ADN (cytosquelette?). *In vivo*, l'ADN non codant et le clivage du plasmide avec des enzymes de restriction ont d'ailleurs amélioré la transfection de l'épithélium nasal (Chapitre 3). <u>CHAPITRE 5</u> :

Modifications de l'amplificateur transcriptionnel IE1 du cytomégalovirus

5.1. INTRODUCTION

La thérapie génique implique non seulement le transfert d'un ou de plusieurs gènes dans un tissu, mais aussi l'expression de ces gènes doit être suffisamment forte et durable. Le clivage du plasmide avec des enzymes de restriction a permis d'obtenir une expression luciférase, qui devrait être suffisamment élevée pour traiter diverses maladies des voies respiratoires, telle que la mucoviscidose (Chapitre 3). Cependant, l'expression luciférase n'a été que de courte durée. Il est indispensable de maintenir l'expression du transgène à un haut niveau pendant des semaines ou des mois pour faire de la thérapie génique humaine une réalité.

Au moins deux événements semblent être responsables de la diminution de l'expression du transgène, ayant lieu entre jour 1 et jour 10, dans l'épithélium respiratoire.

Un premier phénomène est à l'œuvre dans les cellules transfectées. Il a été démontré par plusieurs groupes que la quantité d'ADN exogène, qui a été transféré dans les noyaux cellulaires lors de la transfection, diminue avec le temps pendant environ une semaine après l'atteinte du pic d'expression du transgène. Une explication de cet événement serait le retour du plasmide dans le cytoplasme. L'ADN exogène, qui est entré dans le noyau à partir du cytoplasme, en franchissant un pore nucléaire au cours de la transfection, sortirait du noyau en traversant un pore nucléaire dans la direction opposée. Ce modèle est supporté par la découverte du maintien de l'ADN génomique du virus herpétique Epstein-Barr (EBV) dans le noyau d'une cellule infectée. Au cours de l'infection latente, l'ADN génomique de l'EBV, qui est épisomal, est séquestré dans le noyau grâce à une protéine virale, EBNA-1. Cette dernière est une protéine de fixation à l'ADN, dont la séquence-cible est présente en 20 exemplaires dans une région du génome viral, la famille de répétitions (FR). De plus, EBNA-1 possède des domaines de fixation à la matrice nucléaire : elle peut par conséquent ponter l'ADN génomique EBV, au niveau de FR, et la matrice nucléaire [87]. L'épisome EBV est

immobilisé dans le noyau et ne peut donc pas en sortir. Ce système de rétention nucléaire de l'épisome EBV a été exploité avec succès pour maintenir un plasmide, portant un transgène d'intérêt, dans le noyau de cellules transfectées. L'expression globale du transgène a significativement moins diminué lorsque le plasmide comporte, en plus du transgène, le gène EBNA-1 et la région FR [161]. Cependant, la protéine EBNA-1 est un facteur de transcription, qui risquerait de stimuler l'expression de proto-oncogènes humains et de favoriser la transformation tumorale. Un système de rétention nucléaire de l'ADN exogène de substitution, plus sûr, serait nécessaire pour une utilisation humaine.

Le second phénomène est l'atténuation du promoteur et de l'amplificateur (enhancer) transcriptionnels : certains facteurs de transcription, qui stimulaient le transgène au cours des premières heures après la transfection, cessent de le faire par la suite. L'expression du transgène est alors de moins en moins forte.

La première cause d'atténuation des séquences régulatrices serait liée à la présence de sites de fixation de facteurs de transcription inductibles dans le promoteur et l'amplificateur transcriptionnels. En effet, les séquences régulatrices IE1 (Immediate Early 1) du Cytomégalovirus (CMV) possèdent 4 sites de fixation de NF- κ B, 4 sites CRE et un site de fixation d'AP-1. NF- κ B, AP-1 et les protéines de la famille ATF/CREB sont des facteurs de transcription, qui sont activés directement ou indirectement par phosphorylation par des protéine kinases. Il est possible que la transfection d'une cellule stimule une ou des voies de transduction, qui aboutiraient à l'activation de certaines protéine kinases. La stimulation du gène luciférase par ces facteurs de transcription ne serait alors que temporaire : après quelques dizaines d'heures, NF- κ B et/ou AP-1 et/ou ATF/CREB cesseraient d'être activés et ne stimuleraient plus le transgène. Ce mode d'atténuation du promoteur/amplificateur IE1 du CMV, contrôlant l'expression d'un transgène, n'a jamais été démontré.

La seconde cause d'atténuation des séquences régulatrices, qui est d'ailleurs liée à la première, serait la formation d'une chromatine sur le promoteur et l'amplificateur. En effet, plusieurs heures à quelques dizaines d'heures après l'entrée de l'ADN exogène dans le noyau, les histones parviendraient à envahir la région régulatrice et à former des nucléosomes avec l'ADN. Certains facteurs de transcription ne pourraient alors plus se fixer sur leur séquence-cible, ce qui diminuerait la stimulation de la transcription [156]. De plus, si par la suite les histones étaient modifiées chimiquement par désacétylation de lysines, éventuellement suivie par une méthylation de certaines lysines, la chromatine se condenserait et davantage de facteurs de transcription ne parviendraient plus à se fixer sur l'ADN. Ensemble, les deux causes de l'atténuation des séquences régulatrices aboutiraient à un ralentissement de l'initiation de la transcription.

Le plasmide pNGVL₃-luc possède l'amplificateur IE1 du CMV, encadré des sites de restriction uniques Spe I et SnaB I, ainsi que le promoteur IE1 du CMV. En aval de celui-ci se trouve un site de restriction Sac I, qui n'est malheureusement pas unique dans le plasmide. Cette étude a donc consisté à substituer les sites de fixation des facteurs de transcription NFκB et ATF/CREB, du seul amplificateur transcriptionnel, par des sites de fixation d'un facteur de transcription ubiquitaire et constitutif. De plus, des sites de fixation non consensuels de deux autres facteurs de transcription ont été, par la suite, remplacés par leurs séquences consensuelles, afin de rendre l'amplificateur transcriptionnel plus robuste. Le but poursuivi par cette étude a été de limiter l'atténuation de l'amplificateur transcriptionnel. Le promoteur IE1 du CMV, n'ayant pas été modifié génétiquement, a été atténué dans toutes les expériences. De plus, aucun plasmide n'a été doté du gène EBNA-1 et de la région FR, ce qui signifie qu'une partie de l'ADN exogène nucléaire a été perdu, jour après jour, malgré les modifications de la séquence de l'amplificateur transcriptionnel. L'expression luciférase n'a donc pas pu être maintenue au niveau atteint 24 heures après la perfusion nasale.

5.2. MATERIELS ET METHODES

5.2.1. Matériels

Les oligonucléotides (Integrated DNA Technologies) ont comporté de 61 à 71 bases et ont été purifiés par PAGE (gel de polyacrylamide). La plupart d'entre eux ont été conjugués à un phosphate en 5', afin d'être reliés par l'ADN ligase T4. Les enzymes de restriction et l'ADN ligase T4 ont été achetées chez New England Biolabs.

5.2.2. Elimination de l'amplificateur transcriptionnel du plasmide pNGVL₃-luc

L'amplificateur transcriptionnel IE1 du CMV est encadré des sites de restriction uniques Spe I et SnaB I. La première étape a donc consisté à couper le plasmide pNGVL₃-luc avec ces enzymes de restriction et de séparer le fragment contenant l'amplificateur transcriptionnel sauvage de celui contenant le reste du plasmide. Pour cela, 10 µg de plasmide pNGVL₃-luc ont été incubés avec Spe I (30 U) et SnaB I (20 U) dans le tampon NEBuffer 4 complémenté de sérum albumine bovine. La digestion a eu lieu pendant 2 heures, à 37°C, dans un volume final de 60 µl. Puis, 30 µl de tampon de chargement de gel (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés au mélange et 15 µl d'échantillon ont été introduits dans chacun des six puits d'un gel d'agarose 1 %. L'électrophorèse a eu lieu dans du TAE 1X, à température ambiante, à 48 V au début et jusqu'à 75 V par la suite, avec une Mini-Horizontal Unit (Fischer Scientific). A la fin de l'électrophorèse, les deux bandes d'ADN ont été visualisées sous une lumière UV, les blocs d'agarose contenant l'ADN de 5,3 kb ont été excisées à l'aide d'un scalpel (Roboz) et ont été placées à l'intérieur de tubes de 1,5 mL, à raison de 200 à 350 mg d'agarose par tube. L'ADN a ensuite été extrait des blocs d'agarose grâce au QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN). Brièvement, l'agarose a été dissout grâce au tampon QX1 et l'ADN s'est adsorbé sur la résine OIAEX II. Après lavage de la résine avec les tampons OX1 et PE, la résine a été séchée à l'air et l'ADN a été élué de la résine avec du Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,5. Une

solution d'ADN à 12,7 μg/mL, correspondant au plasmide dépourvu de l'amplificateur transcriptionnel IE1 du CMV, a ainsi été obtenue.

5.2.3. Formation de duplexes d'oligonucléotides reconstituant l'amplificateur transcriptionnel

La séquence complète de chaque amplificateur transcriptionnel mutant a été reconstituée à l'aide de 5 oligonucléotides consécutifs, appariés à 5 autres oligonucléotides de séquence complémentaire, formant ainsi 5 duplexes d'environ 69 paires de bases. Les duplexes adjacents ont été dotés d'extrémités cohésives de 5 nucléotides, qui serviront par la suite à la formation d'un fragment unique par ligation. Les 10 oligonucléotides ont été dissous séparément dans du tampon STE (Tris-HCl 10 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8,0) à un concentration de 4 OD_{260 nm}/100 µl. 10 µl de chaque solution d'oligonucléotides complémentaires ont ensuite été mélangés dans 5 tubes différents. Le mélange a été recouvert de 4 µl d'huile minérale (Sigma-Aldrich), chauffé à 95°C pendant 5 min et lentement refroidi à température ambiante, afin de former les 5 duplexes. Ces derniers ont ensuite été dilués dans de l'eau par atteindre des concentrations d'ADN d'environ 2,7 ng/µl.

5.2.4. Assemblage des plasmides contenant un amplificateur transcriptionnel mutant

Un µl de chaque duplexe dilué a été mélangé et incubé avec l'ADN ligase T4, pendant 1 heure, à 16°C, dans un volume final de 10 µl, afin de reconstituer un fragment de restriction Spe I-SnaB I de 0,3 kb, correspondant à l'amplificateur transcriptionnel mutant. Puis, 8 µl de fragment de restriction SnaB I-Spe I de 5,3 kb, ainsi que davantage d'ADN ligase T4, ont été ajoutés, afin de joindre l'amplificateur transcriptionnel mutant au reste du plasmide. La réaction de ligation a duré plus de 2 heures, à 16°C, et 5 µl du mélange (5,4 ng d'ADN) ont été prélevés pour la transformation d'E.coli.

5.2.5. Transformation de la souche DH5α d'Escherichia coli

Un tube de polypropylène 17 X 100 mm (Spectrum Laboratory Products) a été refroidi dans de la glace pilée. Les bactéries congelées à -80°C ont été réchauffées sur de la glace et 100 µl

ont été transférés au fond du tube de polypropylène. 5 µl d'échantillon d'ADN ont été ajoutés aux bactéries et le mélange a été incubé dans de la glace pendant 30 min. Puis, un choc thermique a été effectué en chauffant les bactéries à 42°C pendant 45 s et en replaçant immédiatement le tube dans de la glace pendant 2 min. 900 µl de SOC (Invitrogen) ont été ajoutés et les bactéries ont été incubées pendant 60 min à 37°C, sous agitation horizontale (250 rpm). Cent µl, 150 µl, 200 µl et 250 µl de la suspension bactérienne ont été dispersés sur quatre boîtes de Pétri préalablement réchauffées à température ambiante. Les boîtes de Pétri ensemencées ont ensuite été incubées toute la nuit à 37°C. Le lendemain, 9 colonies bactériennes isolées ont été prélevées et dispersées dans 9 tubes contenant 5 mL de milieu de culture complémenté en kanamycine (50 µg/mL). Les tubes ont été incubés toute la nuit à 37°C, sous agitation horizontale (300 rpm). Le lendemain, le plasmide de chaque colonie a été extrait et purifié avec le Plasmid Mini kit (QIAGEN).

5.2.6. Identification des colonies contenant un plasmide mutant

Un μ g de chaque plasmide a été digéré avec les enzymes de restriction Spe I (5 U) et SnaB I (2,5 U) dans le tampon NEBuffer 4 complémenté de BSA 1X (New England Biolabs), pendant 90 min à 37 °C, dans un volume final de 14 μ l. 3 μ l de tampon de chargement de gel (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés à 7 μ l de solution de plasmide digéré. Les solutions d'ADN ont ensuite été introduites dans les puits d'un gel d'agarose 1 % (Bio-Rad) contenant du bromure d'éthidium (environ 75 μ g/gel, Sigma-Aldrich). Les échantillons ont migrés au cours d'une électrophorèse effectuée dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate EDTA, pH 8). 10 μ l de solution de marqueurs de poids moléculaires (1 kb ladder plus, Invitrogen) ont été introduits dans un puits du gel d'agarose, afin de déterminer la taille des fragments de restriction générés par la digestion des plasmides. Un plasmide mutant a été identifié, amplifié dans la souche DH5 α d'E. coli, extrait et purifié avec l'Endo-free Plasmid Mega kit (QIAGEN). Ce

plasmide a été administré par la suite, dans de l'eau pure, aux souris CD1 par perfusion nasale, comme cela a été décrit précédemment.

Des expériences préliminaires ont montré que l'activité luciférase n'était pas significativement diminuée à 24 heures, après l'administration de quatre fois moins d'ADN (25 µg de plasmide au lieu de 100 µg).

5.3. RESULTATS

5.3.1. Transfection de l'épithélium nasal avec le plasmide pNGVL₃-luc

L'amplificateur transcriptionnel IE1 du CMV est composé de deux sites NF1 non

consensuels, de trois sites Sp1 dont une seul est consensuel, de trois sites CRE consensuels et

de deux sites NF-kB consensuels regroupés sur 231 paires de bases (Figure 35).

5' ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT-Spe I

GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA-NF1 CGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA-Sp1 CRE GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG-NF-ĸB CRE Sp1 CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCCTATTGACGTCAATGACGG-CRE Sp1 TAAATGGCCCGC<u>CTGGC</u>ATTAT<u>GCCCA</u>GTACATGACCTTAT<u>GGGACTTTCC</u>TACT-NF1 NF-ĸB TGGCAGTACATCTACGTA 3' SnaB I

Figure 35 Séquence sauvage de l'amplificateur transcriptionnel IE1 du CMV, contrôlant l'expression du gène luciférase, dans le plasmide pNGVL₃-luc. Les séquences des sites de fixation de facteurs de transcription sont soulignées. NF1 reconnaît deux séquences de 5 paires de bases séparées par un segment de 5 paires de bases. Les bases des sites de fixation non consensuels de facteurs de transcription sont indiquées en rouge. Les sites de restriction Spe I et SnaB I sont en italique.

Cet amplificateur transcriptionnel dépend donc de 5 protéines ATF/CREB et NF-κB, qui sont des facteurs de transcription inductibles. En effet, l'activation de NF-κB requiert la

phosphorylation de I κ B, qui est suivie de sa dégradation par le protéasome [102]. NF- κ B est alors libéré et migre dans le noyau cellulaire, où il peut stimuler l'expression, entre autres, du gène luciférase porté par le plasmide pNGVL₃-luc. Les protéines ATF/CREB doivent être directement phosphorylées pour se fixer à l'ADN et stimuler l'expression du gène luciférase à partir de l'amplificateur IE1 du CMV. Si les protéines NF- κ B et/ou ATF/CREB étaient activées au cours de la transfection, l'expression luciférase serait transitoirement dopée. En effet, la dégradation de ces deux activateurs transcriptionnels et l'arrêt des phosphorylations aboutirait à l'arrêt de la stimulation de l'expression du transgène par ces protéines.

La cinétique de l'expression luciférase, au cours des deux semaines qui ont suivi la perfusion nasale de souris CD1, a été déterminée avec le plasmide pNGVL₃-luc, comportant l'amplificateur transcriptionnel sauvage IE1 du CMV (Figure 38). L'activité luciférase a été relativement élevée 24 heures après la transfection (145419,6 URL/mg protéine). Elle a rapidement diminué entre le premier et le quatrième jour et plus lentement jusqu'au dixième jour, à partir duquel l'expression luciférase a stagné. Entre le premier et le quatorzième jour, l'activité luciférase a diminué de 61 fois.

5.3.2. Transfection de l'épithélium respiratoire nasal avec le plasmide pNGVL₄-luc

Les premières modifications de l'amplificateur transcriptionnel ont consisté à remplacer les sites NF- κ B et CRE par des sites de fixation du facteur de transcription ubiquitaire et constitutif, Oct-1 (Octamer-1, OTF-1). Contrairement à ATF/CREB et NF- κ B, Oct-1 est actif en permanence. La séquence de l'amplificateur transcriptionnel du nouveau plasmide (pNGVL₄-luc) n'a bénéficié d'aucune modification supplémentaire (Figure 36).

5' ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT-Spe I

GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC<u>CTGGC</u>TGACC<u>GCCCA</u>A-NF1

CGAC<u>CCCCGCCCA</u>T<u>ATGCAAAT</u>ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA-Sp1 Oct-1

ATGCAAATCCATATGCAAATATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG-Oct-1 Oct-1 Sp1

CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCCTATATGCAAATATGACGG-Sp1 Oct-1

TAAATGGCCCGC<u>CTGGC</u>ATTAT<u>GCCCA</u>GTACATGACCTTATG<u>ATGCAAAT</u>CTACT-NF1 Oct-1

TGGCAGTACATCTACGTA 3' SnaB I

Figure 36 Séquence modifiée de l'amplificateur transcriptionnel contrôlant l'expression du gène luciférase dans le plasmide pNGVL₄-luc. Les bases modifiées par rapport à la séquence précédente sont indiquées en vert. Les séquences des sites de fixation de facteurs de transcription sont soulignées. Les bases des sites de fixation non consensuels de facteurs de transcription sont indiquées en rouge. Les sites de restriction sont en italique.

Des souris CD1 ont été perfusées avec 25 μ g de plasmide pNGVL₄-luc et ont été sacrifiées après 1 à 14 jours (Figure 38). Bien que l'activité luciférase ait été légèrement plus faible, 24

heures après la perfusion, que celle obtenue par $pNGVL_3$ -luc (124583,4 URL/mg protéine), elle n'a diminué que de 22,5 fois entre le premier et le quatorzième jour. Au quatorzième jour, l'expression luciférase a été 2,3 fois plus élevée que celle obtenue par le transgène, sous le contrôle de l'amplificateur transcriptionnel sauvage.

5.3.3. Transfection de l'épithélium nasal avec le plasmide pNGVL₅-luc

Puisque le remplacement des sites CRE et NF- κ B a permis d'améliorer l'expression luciférase à moyen terme, la séquence de l'amplificateur transcriptionnel a été modifiée davantage pour générer un troisième plasmide, pNGVL₅-luc (Figure 37). Les deux sites NF1 et les deux sites Sp1 non consensuels ont été modifiés de telle sorte qu'ils deviennent consensuels. Trois sites Oct-1 et Sp1 séparés que d'1 à 4 paires de bases, ont été éloignés (10 paires de bases au total) pour permettre aux deux protéines de se fixer sur l'ADN, sans se gêner l'une l'autre. Enfin, la cytosine de 8 dinucléotides CpG a été remplacée par une thymine. En effet, la méthylation de la cytosine du dinucléotide CpG par une ADN méthyltransférase, est suivie par la fixation de protéines spécifiques, tel que MeCP2 [167]. Cette dernière forme un complexe avec une histone désacétylase, qui clive les groupements acétate des histones présentes sur les séquences régulatrices. Les histones deviennent alors encore plus chargées positivement et les nucléosomes condensent l'ADN davantage. Certains facteurs de transcription ne parviennent plus à se fixer sur leurs séquences-cibles et le gène est alors moins activement transcrit. La mutation des CpG pourrait donc prévenir cette forme d'atténuation de l'amplificateur transcriptionnel.

5' ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT-Spe I

GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCTGCTTGGCTGACTGCCAAA NF1 TGACCCCCGCCCATATAATGATGATGATGCAAATTATGTTCCCATAGTAATGCCAAT-Sp1 Oct-1 ATGCAAATACCATATGCAAATATATTTATGGTGGGCGGAGTAAACTGCCCACTTGG-Oct-1 Oct-1 Sp1 CAGTACATCAAGTGTATCATACTCCGCCCCTGCCAACTATGCCAAATATGATGG-Sp1 Oct-1 TAAATGGCCTGCTTGGCATTATGCCAAGTACATGACCTTATATGCAAATCCTACT-NF1 Oct-1 TGGCAGTACATCTACGTA 3' SnaB I

Figure 37 Séquence modifiée de l'amplificateur transcriptionnel contrôlant l'expression du gène luciférase dans le plasmide pNGVL₅-luc. Les bases modifiées par rapport à la séquence précédente sont indiquées en vert. Les séquences des sites de fixation de facteurs de transcription sont soulignées. Toutes les séquences-cibles des facteurs de transcription sont consensuelles. Les sites de restriction sont en italique.

Le plasmide $pNGVL_5$ -luc a été administré dans les cavités nasales de souris CD1 et la cinétique de l'expression luciférase a été établie (Figure 38). A 24 heures, l'activité luciférase a été légèrement plus élevée que celle obtenue par $pNGVL_4$ -luc (153409,1 URL/mg protéine). De plus, l'expression luciférase a seulement diminué de 18,7 fois entre le premier le quatorzième jour, pour être 3,4 fois plus élevée que celle obtenue par $pNGVL_3$ -luc, au quatorzième jour.



Figure 38 Cinétique de l'expression luciférase dans l'épithélium respiratoire nasal transfecté par choc hypotonique. Vingt cinq µg de pNGVL₃-luc, pNGVL₄-luc et pNGVL₅-luc ont été administrés, dans de l'eau pure, dans les fosses nasales de souris CD1 en 20 min. L'activité luciférase a été mesurée 1 à 14 jours après la perfusion nasale (n = 5 souris par groupe). * P<0,05; ⁺⁺ P<0,01; ** P<0,005 et *** P<0,005 par rapport à pNGVL₃-luc.

5.4. DISCUSSION

Au cours de l'infection lytique d'une cellule par le CMV, le gène IE1 est très activement transcrit pendant la phase très précoce. Cependant, l'amplificateur et le promoteur IE1 du CMV ne sont pas adaptés pour une expression durable : le gène IE1 n'est pas activement transcrit au cours de l'infection latente. En effet, les séquences régulatrices IE1 contiennent 4 sites CRE, 4 sites NF- κ B et un site AP-1. Le virus latent est réactivé lorsque la cellule est stimulée, par des cytokines, tel que TNF α , qui activent certaines protéine kinases [84]. Ces dernières activent à leur tour NF- κ B et AP-1, qui se fixent sur les gènes très précoces, comme IE1, et les stimulent. L'amplificateur et le promoteur IE1 du CMV sont utilisés depuis de nombreuses années pour obtenir une expression robuste d'un gène marqueur, comme le gène luciférase. Vingt quatre heures après la perfusion nasale, l'expression luciférase est effectivement forte, mais elle ne se maintient pas à ce haut niveau. La thérapie génique nécessite non seulement une expression suffisamment robuste du transgène d'intérêt, à court terme, mais aussi la persistance de cette forte expression génique pendant des semaines, voire des mois ou des années. Pour cela, l'expression du transgène doit être constitutive.

Dans cette étude, les sites de fixation des facteurs de transcription inductibles, ATF/CREB et NF- κ B, ont été remplacés par des sites de fixation du facteur de transcription ubiquitaire et constitutif, Oct-1. L'expression luciférase a significativement moins diminué, en deux semaines, avec l'amplificateur transcriptionnel mutant qu'avec la région sauvage (22,5 fois au lieu de 61 fois). Cela est en accord avec le modèle d'activation transitoire de NF- κ B et/ou ATF/CREB au cours de la transfection. Ces facteurs de transcription inductibles seraient activés au cours des premières heures qui suivent la perfusion nasale. Ils seraient ensuite dégradés et leur activation par des protéine kinases cesserait. L'expression luciférase serait forte 24 heures après transfection, grâce à NF- κ B et/ou ATF/CREB, mais l'arrêt de la stimulation du gène luciférase par ces dernières aboutirait à l'atténuation de son expression.

Dans un second temps, la principale modification de l'amplificateur transcriptionnel a consisté à rendre deux séquences NF1 et deux séquences Sp1 consensuelles. Le raisonnement a été le suivant : les facteurs de transcription NF1 et Sp1 ont une plus grande affinité pour leurs séquences consensuelles que pour celles qui ne le sont pas. Ils seraient plus fréquemment et resteraient plus longuement sur l'ADN de l'amplificateur transcriptionnel. Ils pourraient donc limiter l'atténuation de celui-ci. En effet, l'expression luciférase a seulement chuté de 18,7 fois avec pNGVL₅-luc, entre les jours 1 et 14, au lieu de 22,5 fois avec pNGVL₄-luc.

Il a été démontré que NF1, Sp1 et Oct-1 peuvent se fixer sur la matrice nucléaire, comme le facteur de transcription viral EBNA-1 [78,153-154,165]. Ce dernier se fixe sur la matrice nucléaire par l'intermédiaire de ses domaines d'activation de la transcription. Il est possible que les trois facteurs de transcription cellulaires puissent ponter le plasmide, au niveau des séquences régulatrices, à la matrice nucléaire. En d'autres termes, ils pourraient séquestrer le plasmide dans le noyau et limiter son retour dans le cytoplasme, où il peut être dégradé. A ce jour, la possibilité qu'une partie de l'amélioration de la cinétique de l'expression luciférase soit due à ce phénomène, ne peut pas être exclue. La multiplication de sites consensuels de fixation de facteurs de transcription cellulaires constitutifs pourrait fortement stimuler l'expression du transgène d'intérêt et ancrer l'épisome sur la matrice nucléaire.

Il a été démontré que Sp1 et Oct-1 interagissent physiquement et que le dimère Sp1/Oct-1 stimule davantage la transcription que les deux protéines, dont les sites de fixation sont séparés de plusieurs paires de bases [88,151]. Le site Sp1 doit se situer en amont du site Oct-1, ils doivent adopter la même orientation et deux paires de bases doivent les séparer. Le promoteur IE1 du CMV pourrait être modifié selon les mêmes règles que l'amplificateur transcriptionnel pour constituer une région régulatrice artificielle (Figure 39).

| Spe I | | | |
|--|------------------------------------|---------------------------------|---|
| GGAGTTCCGCGTTACAT | AACTTACGGTA | AATGGCCCGC <u>TTG</u> | <u>GC</u> TGACC <u>GCCAA</u> AC- NF1 |
| GAC <u>GGGGGGGGG</u> CT <u>ATC</u> Sp1 O | <u>GCAAAT</u> ATAATC ct-1 | GACGTATGTTCCCA | ATAGTAACGCCAA- |
| TA <u>ATGCAAAT</u> CCAT <u>GGG</u> Oct-1 | <u>GCGGGG</u> CT <u>ATG</u> Sp1 | CAAAT Oct-1 | GTAAACTGCCCAC- |
| <u>TTGGC</u> AGTAC <u>GCCAA</u> GT NF1 | GTATCATATGC | CAA <u>GGGGGGGGG</u> Sp1 | CT <u>ATGCAAAT</u> ATG- Oct-1 |
| ACGGTAAATGGCCCGC <u>T</u> | <u>TGGC</u> ATTAT <u>GC</u> NF1 | <u>CAA</u> GTACATGACC | CTTATG <u>ATGCAAAT</u> - Oct-1 |
| CTAC <u>TTGGC</u> AGTAC <u>GCC.</u> NF1 | <u>AA</u> CGTATTAGT(| CATCGCTATTACC. | ATGGTGATG- |
| <u>TTGGC</u> AGTAC <u>GCCAA</u> CG NF1 | GTT <u>GGGGCGGG</u> Sp1 | GAT <u>ATGCAAAT</u> CA Oct-1 | AGCGGTG <u>ATGCAAAT</u> - Oct-1 |
| CAAGT <u>GGGGGGGG</u> AT <u>A</u> Sp1 Oct-1 | <u>ATGCAAAT</u> ATGO I | GAGTTTGTTTTGC | GCACCAAAATCAACG- |
| GGGGCGGGGGATATGCAA Sp1 Oct-1 | <u>AT</u> CAAAATGTO | CGTAACAATGACG | CAAA <u>GGGGGGGGG</u> - Sp1 |
| GGCGTGTACGGTGGGAG | GTC <u>TATATAA</u> G TATA box | CAGAGCTC 3' Sac I | |

5' ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT-

Figure 39 Séquence d'un amplificateur et d'un promoteur transcriptionnels artificiels.

Trois autres sites NF1 non-consensuels comportant deux à trois mutations ponctuelles seront aussi remplacés par leur séquence consensuelle TTGGC(N)₅GCCAA. Cette région régulatrice artificielle sera ultérieurement testée chez la souris, dans un autre tissu que l'épithélium respiratoire.

Discussion et

Perspectives

Les principales difficultés techniques ont été rencontrées au cours de la perfusion nasale des souris CD1. Les écueils se sont situés à deux niveaux : l'anesthésie et la perfusion de la solution d'ADN. L'anesthésie a été induite par injection intrapéritonéale de 2,2,2-tribromoéthanol. Bien que tous les animaux provenaient de la même souche (CD1), étaient de même sexe (femelles) et avaient le même âge (6 à 8 semaines), le volume d'injection a notablement varié d'une souris à l'autre (0,7 à 1,1 mL). Il a été évalué pour chaque animal et cette estimation s'est lentement améliorée par l'expérience acquise au fil du temps. Cependant, de nombreuses souris n'ont pas été suffisamment anesthésiées, elles se sont débattues lors de la perfusion et leur respiration a été trop rapide. Puisque le succès de la transfection de l'épithélium nasal nécessitait une lente administration de la solution d'ADN, l'efficacité de la transfection n'a pas été prise en compte pour ces animaux. Inversement, d'autres souris ont été trop anesthésiées et sont décédées pendant ou peu après la perfusion.

La propension des souris à respirer par leur nez a nécessité d'améliorer la technique de perfusion nasale, qui m'a été enseignée par le Dr Raymond Farley. Les fosses nasales ont rapidement été obstruées par la solution d'ADN, qui ne devait en aucun cas être aspirée par l'animal vers la gorge et les voies aériennes inférieures. L'astuce a consisté à aider la souris à respirer par sa bouche, en tirant sa langue hors de la bouche à l'aide d'une pince à épiler et à la maintenir ainsi en coinçant un morceau de papier entre la langue et les lèvres de l'animal. Pouvant aisément respirer par leur bouche, les souris correctement anesthésiées ont été facilement perfusées.

La seconde difficulté majeure a été de déterminer le volume de la solution de plasmide (40 à 75 μ l) et le solvant de l'ADN (eau pure). Puis, le débit a sans cesse été ralenti pour atteindre des valeurs aussi faible que 3 μ l/min. La pompe péristaltique ne permettait pas la perfusion à un si faible débit. Ainsi, ce dernier a été estimé en évaluant le volume de la solution d'ADN

restant dans le tube connecté à la pompe péristaltique. Pour cela, la pompe a alternativement été allumée et éteinte, afin de ralentir la perfusion qui fut par conséquent discontinue. L'angle d'inclinaison de la souris, sur la plaque de polystyrène, a aussi été augmenté et a finalement été fixé à environ 60°. La solution d'ADN à administrer aux souris a été introduite dans le tube connecté à la pompe péristaltique. La circulation de la solution de plasmide dans ce tube a fréquemment entraîné l'apparition de bulles d'air, qui ont affecté la transfection de l'épithélium nasal, pour des raisons inconnues. Le cathéter, qui a été inséré dans une narine de la souris, avait un diamètre interne très faible. De petits débris de plastique provenant de la pompe péristaltique ont régulièrement obstrué le cathéter, ce qui a compliqué l'estimation du débit de la perfusion et a souvent nécessité le remplacement du cathéter. Toutes les améliorations et perfectionnements de la technique de perfusion nasale ont fait l'objet d'une multitude d'expériences préliminaires et certaines perfusions nasales ont échoué, à cause des diverses difficultés techniques rencontrées au cours de ce travail.

Il est clairement apparu dans notre étude que l'ADN nu est le meilleur système non-viral pour transfecter l'épithélium respiratoire. En effet, la fixation de molécules cationiques à l'ADN n'améliore pas la transfection, voire même elle peut notablement l'inhiber (Chapitre 2). Le plasmide nu doit être administré dans de l'eau pure, formant ainsi une solution hypotonique par rapport au tissu nasal. D'après nos résultats, l'eau pure induit un choc hypotonique, qui se caractérise par un gonflement de la cellule, suivi du retour à son volume initial, au cours duquel la cellule épithéliale internaliserait l'ADN exogène par endocytose ou pinocytose. Bien que d'une manière générale les médicaments sont préférentiellement administrés dans une solution isotonique, certaines solutions médicamenteuses hypotoniques sont déjà administrées sous forme d'aérosols dans les voies respiratoires de patients asthmatiques (Chapitre 1). Un plasmide dans de l'eau déminéralisée transfecte significativement l'épithélium respiratoire nasal. Cependant, l'efficacité de la transfection devrait être améliorée de plus de dix fois pour envisager de traiter certaines affections bronchiques, telles que l'asthme et la mucoviscidose.

Pour cela, la meilleure solution a consisté à raccourcir la molécule d'ADN en la coupant à l'aide d'enzymes de restriction (Chapitre 3). L'expression luciférase a atteint un niveau inégalé par les vecteurs de gènes actuels, dans l'épithélium respiratoire. Bien que cette méthode soit simple et rapide, la solution à long terme consisterait à mettre au point un minicercle d'ADN, qui est une molécule d'ADN bicaténaire circulaire ne comportant que le transgène. Une recombinase génère deux mini-cercles d'ADN à partir du plasmide initial, dans E. coli, et celui qui contient les séquences bactériennes est ensuite éliminé. Un mini-cercle d'ADN a transfecté le foie de souris 10 à 100 fois plus efficacement que le plasmide correspondant, ce qui est en accord avec les résultats obtenus pour l'épithélium nasal avec les fragments de restriction (amélioration de la transfection de 21 fois). La production de grandes quantités de mini-cercles d'ADN est possible et le rendement est assez élevé [24].

D'après les résultats obtenus avec le virus de Sendaï, l'expression du transgène atteinte 24 heures après l'administration des fragments de restriction Dra III-AlwN I devrait être suffisamment élevée pour traiter la mucoviscidose (3x10⁶ URL/mg protéine). En effet, la protéine luciférase a été extraite des cellules épithéliales grâce à un tampon de lyse et à trois cycles de congélation/décongélation. Néanmoins, la protéine luciférase n'a probablement pas été totalement extraite du tissu nasal ; le nombre d'unités relatives de lumière a par conséquent été sous-estimé. Inversement, le tissu nasal entier a été prélevé des souris transfectées. Une minorité de la masse totale de protéines tissulaires provenait de l'épithélium. Ainsi, l'activité spécifique de la luciférase, dans l'épithélium respiratoire nasal, est en réalité beaucoup plus élevée que les valeurs indiquées dans ce travail. Il nous semble

alors qu'il n'y a pas lieu de tenter d'améliorer davantage la transfection en combinant plusieurs méthodes, qui ont permis d'augmenter l'activité luciférase. De plus, notre objectif est de mettre au point le système de transfection le plus simple possible. Ce dernier est constitué d'une courte molécule d'ADN nu dissoute dans de l'eau pure. Ce système serait peu onéreux, ce qui rendrait le coût de la thérapie génique de la mucoviscidose acceptable pour la collectivité.

Jusqu'à présent, l'administration de l'ADN nu dans les voies respiratoires sous forme d'aérosols n'était pas possible, car les nébuliseurs conventionnels endommagent l'ADN nu en le fragmentant. Davies *et al.* ont récemment démontré qu'une nouvelle technique d'aérosolisation, la fragmentation électrohydrodynamique, n'endommage pas l'ADN nu d'une taille allant jusqu'à 15 kb [40]. Cette technique a été utilisée avec succès pour transfecter les poumons de souris par choc hypotonique. Grâce à ce type d'équipement, il est donc envisageable de transférer des gènes portés par de courtes molécules d'ADN, dans les poumons de patients, par choc hypotonique. Dans le cas de la thérapie génique de la mucoviscidose, l'administration de l'ADN devra s'effectuer sur une période d'environ trente minutes, car la diminution régulée du volume cellulaire au cours du choc hypotonique est plus lente dans les cellules épithéliales de patients atteints de mucoviscidose.

Avant cela, une courte molécule d'ADN portant le gène CFTR, dissoute dans de l'eau pure, devra être transférée dans les poumons de souris CFTR^{-/}, afin de déterminer si l'efficacité de la transfection est suffisante pour corriger le déficit de transport de chlorure. La mucoviscidose se caractérise également par une hyperabsorption de sodium, qui est due à l'activité du canal épithélial sodique EnaC. Alternativement, une diminution de l'expression de cette protéine aboutirait à une augmentation de la teneur en eau du mucus, à une amélioration du transport mucociliaire et par conséquent à un bénéfice clinique. Un gène codant pour un ARN antisens ou un ARN interférant spécifique d'EnaC serait beaucoup plus
court que le gène CFTR, dont l'ADNc est de 4,4 kb. Le transfert de ce gène porté par un minicercle d'ADN dans l'épithélium respiratoire serait alors plus efficace que celui du gène CFTR.

Si l'efficacité de la transfection était suffisamment élevée en utilisant cette approche, le dernier obstacle à franchir avant de considérer le traitement de la maladies affectant les voies aériennes, par thérapie génique non-virale, est la diminution rapide de l'expression du transgène au cours des dix jours qui suivent la transfection. La disparition du produit du transgène dans l'épithélium respiratoire est en partie due à l'atténuation des séquences régulatrices. Les modifications effectuées dans l'amplificateur transcriptionnel IE1 du CMV ont abouti à une réduction de la diminution de l'expression du gène de la luciférase (18,7 fois au lieu de 61 fois). Ces modifications ont consisté à remplacer les sites de fixation de facteurs de transcription inductibles (NF- κ B et ATF/CREB) par le site de fixation du facteur de transcription constitutif, Oct-1, et à remplacer les sites de fixation non-consensuels par leurs homologues consensuels. De plus, si chaque site Oct-1 était précédé par un site Sp1, ces deux protéines stimuleraient davantage la transcription et pourraient prévenir plus efficacement l'atténuation de la région régulatrice. De plus, trois sites NF1 non-consensuels supplémentaires localisés dans l'amplificateur et le promoteur IE1 du CMV peuvent être remplacés par leur séquence consensuelle. Ces modifications additionnelles de l'amplificateur transcriptionnel et la modification du promoteur IE1 du CMV, selon les mêmes règles, seront effectuées lors d'un travail ultérieur. Dans l'épithélium respiratoire nasal, l'activité luciférase ne diminuerait que d'environ 6 fois avec les séquences régulatrices modifiées, au lieu de 61 fois avec le plasmide pNGVL₃-luc.

Il faudra également déterminer si le gène du virus Epstein-Barr, EBNA-1, et la famille de répétitions qui comporte vingt exemplaires de la séquence-cible de cette protéine, améliorent le maintien de l'expression du transgène à un haut niveau dans l'épithélium respiratoire. Cela

n'a pas encore été réalisé dans ce tissu. EBNA-1 effectuerait un pontage entre le plasmide et la matrice nucléaire, ce qui séquestrerait le plasmide dans le noyau cellulaire et l'empêcherait de retourner dans le cytoplasme, où il serait rapidement dégradé par les nucléases cytosoliques. Le gène EBNA-1 est généralement sous le contrôle du promoteur IE1 du CMV. L'atténuation de ce dernier diminuerait l'expression de la protéine EBNA-1 et certaines copies du plasmide pourraient s'échapper du noyau et être détruites dans le cytoplasme. Le promoteur artificiel, dont la séquence est basée sur celle du promoteur IE1 du CMV, pourrait maintenir l'expression de la protéine EBNA-1 à un niveau suffisant pour retenir en permanence le plasmide dans le noyau.

Enfin, il est probable que l'ADN exogène soit également dégradé à l'intérieur du noyau cellulaire. En effet, quatre DNases nucléaires ont été isolées du noyau de foie de rat [104]. L'ADN exogène transféré dans le noyau, est dépourvu d'histones, tandis que l'ADN génomique est en partie protégé par ces protéines. Les histones recouvrent le plasmide pour former des nucléosomes, en quelques heures à plusieurs dizaines d'heures, dans diverses lignées cellulaires [19]. Il est possible que cela prenne plus de temps dans des cellules quiescentes, comme les cellules épithéliales respiratoires. Il a été démontré que les nucléosomes adjacents à une coupure double brin participent à la réparation de l'ADN [63]. Des coupures simple et/ou double brin s'accumuleraient, ce qui aboutirait à la destruction complète de la plupart des plasmides. Après quelques jours, les copies du plasmide qui n'auraient pas été détruites, formeraient des nucléosomes avec les histones néo-synthétisées par la cellule transfectée, deviendraient plus résistantes à l'attaque par les DNases nucléaires et seraient plus rapidement réparées.

Jusqu'à présent, aucun groupe n'a tenté de résoudre ce problème de dégradation de l'ADN dans le noyau des cellules transfectées. Pourtant, il serait possible de prévenir la dégradation du plasmide en le protégeant par formation de nucléosomes *in vitro* avec les histones H2A,

H2B, H3 et H4 purifiées et en co-administrant le plasmide et l'inhibiteur de DNases, l'acide aurintricarboxylique [65]. Ces approches expérimentales seront évaluées sur d'autres tissus que l'épithélium nasal. Néanmoins, la dégradation du transgène dans le noyau cellulaire survient probablement dans la plupart des tissus. Les progrès effectués dans la compréhension de ce phénomène bénéficieront également à la transfection de l'épithélium respiratoire.

La thérapie génique non-virale de la mucoviscidose deviendra une réalité à condition que l'efficacité de la transfection de l'épithélium bronchique soit suffisante et que l'expression du transgène soit assez élevée pendant plusieurs semaines. L'épithélium bronchique est progressivement altéré par les infections bactériennes et l'inflammation qui leur sont associées. La thérapie génique de la mucoviscidose apportera probablement plus de bénéfices cliniques aux enfants en bas âge, dont l'épithélium bronchique est peu altéré, qu'aux patients plus âgés.

Références

bibliographiques

1 AILLES LE, NALDINI L.

HIV-1-derived lentiviral vectors.

Curr Top Microbiol Immunol 2002; 261: 31-52.

2 ALTON EW, MIDDLETON PG, CAPLEN NJ, SMITH SN, STEEL DM, MUNKONGE FM et al.

Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice.

Nat Genet 1993 ; 5 (2) : 135-142.

3 ALTON EW, STERN M, FARLEY R, JAFFE A, CHADWICK SL, PHILLIPS J et al. Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis : a double-blind placebo-controlled trial.

Lancet 1999 ; 353 (9157) : 947-954.

4 ARMSTRONG DS, GRIMWOOD K, CARLIN JB, CARZINO R, GUTIERREZ JP, HULL J et al.

Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 156 (4 Pt 1) : 1197-1204.

5 BEAR CE, LI C, KARTNER N, BRIDGES RJ, JENSEN TJ, RAMJEESINGH M et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).

Cell 1992 ; 68 (4) : 809-818.

6 BEGON DY, DELACROIX L, VERNIMMEN D, JACKERS P, WINKLER R.

Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells.

J Biol Chem 2005 ; 280 (26) : 24428-24434.

7 BISGAARD H, PEDERSEN SS, NIELSEN KG, SKOV M, LAURSEN EM, KRONBORG G et al.

Controlled trial of inhaled budesonide in patients with cystic fibrosis and chronic bronchopulmonary Pseudomonas aeruginosa infection.

Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 156 (4 Pt 1) : 1190-1196.

8 BITZER M, UNGERECHTS G, BOSSOW S, GRAEPLER F, SEDLMEIER R, ARMEANU S et al.

Negative-strand RNA viral vectors: intravenous application of Sendai virus vectors for the systemic delivery of therapeutic genes.

Mol Ther 2003 ; 7 (2) : 210-217.

9 BOBADILLA JL, MACEK M, FINE JP, FARRELL PM.

Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening.

Hum Mutat 2002 ; 19 (6) : 575-606.

10 BONFIELD TL, PANUSKA JR, KONSTAN MW, HILLIARD KA, HILLIARD JB, GHNAIM H et al.Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs.

Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 152 (6 Pt 1) : 2111-2118.

11 BOSWORTH DG, NIELSON DW.

Effectiveness of home versus hospital care in the routine treatment of cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1997 ; 24 (1) : 42-47.

12 BOUCHER RC.

An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Adv Drug Deliv Rev 2002 ; 54 (11) : 1359-1371.

13 BOUSSIF O, LEZOUALC'H F, ZANTA MA, MERGNY MD, SCHERMAN D, DEMENEIX B et al.

A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.

Proc Natl Acad Sci USA 1995 ; 92 (16) : 7297-7301.

14 BRADBURY NA, CLARK JA, WATKINS SC, WIDNELL CC, SMITH HS 4th, BRIDGES RJ.

Characterization of the internalization pathways for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

Am J Physiol 1999 ; 276 (4 Pt 1) : L659-L668.

15 BRANDEN LJ, MOHAMED AJ, SMITH CI.

A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA.

Nat Biotechnol 1999 ; 17 (8) : 784-787.

16 BRAUNSTEIN GM, ROMAN RM, CLANCY JP, KUDLOW BA, TAYLOR AL,

SHYLONSKY VG et al.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation.

J Biol Chem 2001 ; 276 (9) : 6621-6630.

17 BUNING H, NICKLIN SA, PERABO L, HALLEK M, BAKER AH.

AAV-based gene transfer.

Curr Opin Mol Ther 2003 ; 5 (4) : 367-375.

18 CARTON I, HERMANS D, EGGERMONT J.

Hypotonicity induces membrane protrusions and actin remodeling via activation of small GTPases Rac and Cdc42 in Rat-1 fibroblasts.

Am J Physiol Cell Physiol 2003 ; 285 (4) : C935-C944.

19 CEREGHINI S, YANIV M.

Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoterenhancer region upon replication.

EMBO J 1984 ; 3 (6) : 1243-1253.

20 CHAO SH, HARADA JN, HYNDMAN F, GAO X, NELSON CG, CHANDA SK et al.

PDX1, a cellular homeoprotein, binds to and regulates the activity of human cytomegalovirus immediate early promoter.

J Biol Chem 2004 ; 279 (16) : 16111-16120.

21 CHESNOY S, HUANG L.

Enhanced cutaneous gene delivery following intradermal injection of naked DNA in a high ionic strength solution.

Mol Ther 2002 ; 5 (1) : 57-62.

22 CHEN QR, ZHANG L, LUTHER PW, MIXSON AJ.

Optimal transfection with the HK polymer depends on its degree of branching and the pH of endocytic vesicles.

Nucleic Acids Res 2002 ; 30 (6) : 1338-1345.

23 CHEN ZY, HE CY, EHRHARDT A, KAY MA.

Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo.

Mol Ther 2003; 8(3): 495-500.

24 CHEN ZY, HE CY, KAY MA.

Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. Hum Gene Ther 2005 ; 16 (1) : 126-131.

25 CHEN ZY, YANT SR, HE CY, MEUSE L, SHEN S, KAY MA.

Linear DNAs concatemerize in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver.

Mol Ther 2001 ; 3 (3) : 403-410.

26 CHENG SH, GREGORY RJ, MARSHALL J, PAUL S, SOUZA DW, WHITE GA et al.

Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis.

Cell 1990 ; 63 (4) : 827-834.

27 CHOI JS, MacKAY JA, SZOKA FC Jr.

Low-pH-sensitive PEG-stabilized plasmid-lipid nanoparticles: preparation and characterization.

Bioconjug Chem 2003 ; 14 (2) : 420-429.

28 CHOW CW, LANDAU LI, TAUSSIG LM.

Bronchial mucous glands in the newborn with cystic fibrosis. Eur J Pediatr 1982 ; 139 (4) : 240-243.

29 CHOI SJ, SPERINDE JJ, SZOKA FC Jr.

Identification of a deoxyribonuclease I inhibitor from a phage-peptide library. Mol Cells 2005 ; 19 (1) : 54-59.

30 CHUAH MK, SCHIEDNER G, THORREZ L, BROWN B, JOHNSTON M, GILLIJNS V et al.

Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia. A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. Blood 2003 ; 101 (5) : 1734-1743.

31 COLOSIMO A, GONCZ KK, NOVELLI G, DALLAPICCOLA B, GRUENERT DC. Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments.

Mol Ther 2001 ; 3 (2) : 178-185.

32 COMMUNI D, PAINDAVOINE P, PLACE GA, PARMENTIER M, BOEYNAEMS JM.Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung.Br J Pharmacol 1999 ; 127 (2) : 562-568.

33 CORMET-BOYAKA E, DI A, CHANG SY, NAREN AP, TOUSSON A, NELSON DJ et al.

CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99 (19) : 12477-12482.

34 COUNIS MF, TORRIGLIA A.

DNases and apoptosis.

Biochem Cell Biol 2000 ; 78 (4) : 405-414.

35 CROOK K, McLACHLAN G, STEVENSON BJ, PORTEOUS DJ.

Plasmid DNA molecules complexed with cationic liposomes are protected from degradation by nucleases and shearing by aerosolization.

Gene Ther 1996 ; 3 (9) : 834-839.

36 CRYSTAL RG, McELVANEY NG, ROSENFELD MA, CHU CS, MASTRANGELI A, HAY JG et al.

Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis.

Nat Genet 1994 ; 8 (1) : 42-51.

- 37 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry.2001 Annual Data Report to the Center Directors.Bethesda, MD : Cystic Fibrosis Foundation ; 2002.
- 38 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry.2003 Annual Data Report to the Center Directors.Bethesda, MD : Cystic Fibrosis Foundation ; 2004.
- 39 DAKIN CJ, NUMA AH, WANG H, MORTON JR, VERTZYAS CC, HENRY RL. Inflammation, infection and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 2002 ; 165 (7) : 904-910.

40 DAVIES LA, HANNAVY K, DAVIES N, PIRRIE A, COFFEE RA, HYDE SC et al.
Electrohydrodynamic comminution: a novel technique for the aerosolisation of plasmid DNA.
Pharm Res 2005 ; 22 (8) : 1294-1304.

41 DAVIS PB, DRUMM M, KONSTAN MW.

Cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 1996 ; 154 (5) : 1229-1256.

42 DAVIS PB, KONSTAN MW.

Developing CF therapies: from the laboratory to the patient.

Pediatr Pulmonol 2004 ; Suppl 27 : 18.

43 DEAN M, RZHETSKY A, ALLIKMETS R.

The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.

Genome Res 2001 ; 11 (7) : 1156-1166.

44 de BENTZMANN S, ROGER P, DUPUIT F, BAJOLET-LAUDINAT O, FUCHEY C,

PLOTKOWSKI MC et al.

Asialo-GM1 is a receptor for Pseudomonas aeruginosa adherence to regenerating respiratory epithelial cells.

Infect Immun 1996 ; 64 (5) : 1582-1588.

45 DESAGER KN, Van BEVER HP, STEVENS WJ.

Osmolality and pH of anti-asthmatic drug solutions.

Agents Actions 1990 ; 31 (3-4) : 225-228.

46 DESMOND KJ, SCHWENK WF, THOMAS E, BEAUDRY PH, COATES AL.

Immediate and long-term effects of chest physiotherapy in patients with cystic fibrosis. J Pediatr 1983 ; 103 (4) : 538-542.

47 DEZAKI K, TSUMURA T, MAENO E, OKADA Y.

Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells.

Jpn J Physiol 2000 ; 50 (2) : 235-241.

48 DMITRIEV I, KRASNYKH V, MILLER CR, WANG M, KASHENTSEVA E, MIKHEEVA G et al.

An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. J Virol 1998 ; 72 (12) : 9706-9713.

49 DORIN JR, FARLEY R, WEBB S, SMITH SN, FARINI E, DELANEY SJ et al.

A demonstration using mouse models that successful gene therapy for cystic fibrosis requires only partial gene correction.

Gene Ther 1996 ; 3 (9) : 797-801.

- 50 DORING G, CONWAY SP, HEIJERMAN HG, HODSON ME, HOIBY N, SMYTH A et al. Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J 2000 ; 16 (4) : 749-767.
- 51 DRANSFIELD DT, BRADFORD AJ, SMITH J, MARTIN M, ROY C, MANGEAT PH et al.
 Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein.
 EMBO J 1997 ; 16 (1) : 35-43.
- 52 DRAPKIN PT, O'RIORDAN CR, YI SM, CHIORINI JA, CARDELLA J, ZABNER J et al. Targeting the urokinase plasminogen activator receptor enhances gene transfer to human airway epithelia.

J Clin Invest 2000 ; 105 (5) : 589-596.

53 DRISKELL RA, ENGELHARDT JF.

Current status of gene therapy for inherited lung diseases.

Annu Rev Physiol 2003 ; 65 : 585-612.

54 EMERSON J, ROSENFELD M, MCNAMARA S, RAMSEY B, GIBSON RL.

Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis.

Pediatr Pulmonol 2002 ; 34 (2) : 91-100.

55 ERBACHER P, REMY JS, BEHR JP.

Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway.

Gene Ther 1999 ; 6 (1) : 138-145.

56 ESKANDARI S, WRIGHT EM, KREMAN M, STARACE DM, ZAMPIGHI GA.

Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy.

Proc Natl Acad Sci USA 1998 ; 95 (19) : 11235-11240.

57 FAJAC I, BRIAND P, MONSIGNY M, MIDOUX P.

Sugar-mediated uptake of glycosylated polylysines and gene transfer into normal and cystic fibrosis airway epithelial cells.

Hum Gene Ther 1999 ; 10 (3) : 395-406.

58 FARHOOD H, SERBINA N, HUANG L.

The role of dioleoylphosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta 1995 ; 1235 (2) : 289-295.

59 FERANCHAK AP, FITZ JG, ROMAN RM.

Volume-sensitive purinergic signaling in human hepatocytes.

J Hepatol 2000 ; 33 (2) : 174-182.

60 FERNANDEZ-FERNANDEZ JM, NOBLES M, CURRID A, VASQUEZ E, VALVERDE MA.

Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line.

Am J Physiol Cell Physiol 2002 ; 283 (6) : C1705-C1714.

61 FITZSIMMONS SC.

The changing epidemiology of cystic fibrosis.

J Pediatr 1993 ; 122 (1) : 1-9.

62 FLOTTE TR, ZEITLIN PL, REYNOLDS TC, HEALD AE, PEDERSEN P, BECK S et al.

Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study.

Hum Gene Ther 2003 ; 14 (11) : 1079-1088.

63 FOSTER ER, DOWNS JA.

Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. FEBS J 2005 ; 272 (13) : 3231-3240.

64 GALIMI F, VERMA IM.

Opportunities for the use of lentiviral vectors in human gene therapy. Curr Top Microbiol Immunol 2002 ; 261 : 245-254.

65 GHOSH U, PANDIT B, DUTTA J, BHATTACHARYYA NP.

Induction of apoptosis by benzamide and its inhibition by aurintricarboxylic acid (ATA) in Chinese hamster V79 cells.

Mutat Res 2004 ; 554 (1-2) : 121-129.

66 GILL DR, SMYTH SE, GODDARD CA, PRINGLE IA, HIGGINS CF, COLLEDGE WH et al.

Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1 alpha promoter.

Gene Ther 2001 ; 8 (20) : 1539-1546.

67 GLASSPOOL-MALONE J, MALONE RW.

Marked enhancement of direct respiratory tissue transfection by aurintricarboxylic acid. Hum Gene Ther 1999 ; 10 (10) : 1703-1713.

68 GLASSPOOL-MALONE J, SOMIARI S, DRABICK JJ, MALONE RW.

Efficient nonviral cutaneous transfection. Mol Ther 2000 ; 2 (2) : 140-146.

69 GLASSPOOL-MALONE J, STEENLAND PR, McDONALD RJ, SANCHEZ RA, WATTS TL, ZABNER J et al.

DNA transfection of macaque and murine respiratory tissue is greatly enhanced by use of a nuclease inhibitor.

J Gene Med 2002 ; 4 (3) : 323-332.

70 GREBER UF, WILLETTS M, WEBSTER P, HELENIUS A.

Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells.

Cell 1993 ; 75 (3) : 477-486.

71 GRIESENBACH U, CASSADY RL, FERRARI S, FUKUMURA M, MULLER C, SCHMITT E et al.

The nasal epithelium as a factory for systemic protein delivery.

Mol Ther 2001 ; 5 (2) : 98-103.

72 GRIESENBACH U, GEDDES DM, ALTON EW.

Gene therapy for cystic fibrosis: an example for lung gene therapy. Gene Ther 2004 ; 11 Suppl 1 : S43-S50.

73 GUYOT A, HANRAHAN JW.

ATP release from human airway epithelial cells studied using a capillary cell culture system. J Physiol 2002 ; 545 (Pt 1) : 199-206.

74 HALBERT CL, ALLEN JM, MILLER AD.

Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors.

J Virol 2001 ; 75 (14) : 6615-6624.

75 HALL RA, OSTEDGAARD LS, PREMONT RT, BLITZER JT, RAHMAN N, WELSH MJ et al.

A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na+/H+ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins.

Proc Natl Acad Sci USA 1998 ; 95 (15) : 8496-8501.

76 HALLOWS KR, McCANE JE, KEMP BE, WITTERS LA, FOSKETT JK.

Regulation of channel gating by AMP-activated protein kinase modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in lung submucosal cells. J Biol Chem 2003 ; 278 (2) : 998-1004.

77 HAY JG, MCELVANEY NG, HERENA J, CRYSTAL RG.

Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. Hum Gene Ther 1995 ; 6 (11) : 1487-1496.

78 HE S, SUN JM, LI L, DAVIE JR.

Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3. Mol Biol Cell 2005 ; 16 (9) : 4073-4083.

79 HENDERSON RC, MADSEN CD.

Bone mineral content and body composition in children and young adults with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1999 ; 27 (2) : 80-84.

80 HOLLAND JW, HUI C, CULLIS PR, MADDEN TD.

Poly(ethylene glycol)-lipid conjugates regulate the calcium-induced fusion of liposomes composed of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. Biochemistry 1996 ; 35 (8) : 2618-2624.

81 HOWELL LD, BORCHARDT R, KOLE J, KAZ AM, RANDAK C, COHN JA.

Protein kinase A regulates ATP hydrolysis and dimerization by a CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) domain.

Biochem J 2004 ; 378 (Pt 1) : 151-159.

82 HUANG P, LAZAROWSKI ER, TARRAN R, MILGRAM SL, BOUCHER RC, STUTTS MJ.

Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; 98 (24) : 14120-14125.

83 HULKA GF.

Head and neck manifestations of cystic fibrosis and ciliary dyskinesia. Otolaryngol Clin North Am 2000 ; 33 (6) : 1333-1341.

84 HUMMEL M, ABECASSIS MM.

A model for reactivation of CMV from latency. J Clin Virol 2002 ; 25 Suppl 2 : S123-S136.

85 ILIES MA, SEITZ WA, BALABAN AT.

Cationic lipids in gene delivery: principles, vector design and therapeutical applications. Curr Pharm Des 2002 ; 8 (27) : 2441-2473.

86 IMREN S, PAYEN E, WESTERMAN KA, PAWLIUK R, FABRY ME, EAVES CJ et al.

Permanent and panerythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells.

Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99 (22) : 14380-14385.

87 ITO S, EDA H, BAN F, YANAGI K.

Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 colocalizes with lamin B1 in the nucleoplasm and along the nuclear rim.

Arch Virol 2003 ; 148 (8) : 1633-1642.

88 JANSON L, PETTERSSON U.

Cooperative interactions between transcription factors Sp1 and OTF-1. Proc Natl Acad Sci USA 1990 ; 87 (12) : 4732-4736.

89 JIANG Q, ENGELHARDT JF.

Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis.

Eur J Hum Genet 1998 ; 6 (1) : 12-31.

90 KAISER J.

Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial.

Science 2003 ; 299 (5606) : 495.

91 KHAN TZ, WAGENER JS, BOST T, MARTINEZ J, ACCURSO FJ, RICHES DW.

Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 151 (4) : 1075-1082.

92 KICHLER A, LEBORGNE C, MARZ J, DANOS O, BECHINGER B.

Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells.

Proc Natl Acad Sci USA 2003 ; 100 (4) : 1564-1568.

93 KIRCHHAUSEN T, BONIFACINO JS, RIEZMAN H.

Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. Current Opin Cell Biol 1997 ; 9 (4) : 488-495.

94 KNOWLTON RG, COHEN-HAGUENAUER O, Van CONG N, FREZAL J, BROWN VA, BARKER D et al.

A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. Nature 1985 ; 318 (6044) : 380-382.

95 KOBERNA K, STANEK D, MALINSKI J, ELTSOV M, PLISS A, CTRNACTA V et al.

Nuclear organization studied with the help of a hypotonic shift: its use permits hydrophilic molecules to enter into living cells.

Chromosoma 1999 ; 108 (5) : 325-335.

96 KOBINGER GP, WEINER DJ, YU QC, WILSON JM.

Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo.

Nat Biotechnol 2001 ; 19 (3) : 225-230.

97 KOCH C, LANNG S.

Other organ systems.

<u>In</u> :

Cystic fibrosis.

Hodson ME and Geddes DM, Ed.

London : Arnold ; 2000 : 314-338.

98 KOCHANEK S, SCHIEDNER G, VOLPERS C.

High-capacity 'gutless' adenoviral vectors.

Curr Opin Mol Ther 2001 ; 3 (5) : 454-463.

99 KOHN DB, SADELAIN M, GLORIOSO JC.

Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID.

Nat Rev Cancer 2003 ; 3 (7) : 477-488.

100 KOIZUMI T.

Tissue distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) activity level in mice and its sexual dimorphism.

Exp Anim 1995 ; 44 (3) : 181-185.

101 KONSTAN MW, BYARD PJ, HOPPEL CL, DAVIS PB.

Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med 1995 ; 332 (13) : 848-854.

102 KRAPPMANN D, SCHEIDEREIT C.

A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways.

EMBO Rep 2005 ; 6 (4) : 321-326.

103 KREDA SM, PICKLES RJ, LAZAROWSKI ER, BOUCHER RC.

G-protein-coupled receptors as targets for gene transfer vectors using natural small-molecule ligands.

Nat Biotechnol 2000 ; 18 (6) : 635-640.

104 LEBEDEVA LG, ALEXANDROVA SS, VOTRIN II, BASNAKIAN AG.

In vitro proteolysis of endonucleases in rat liver nuclei extracts. Biochem Mol Biol Int 1995 ; 35 (2) : 433-440.

105 LEE ER, MARSHALL J, SIEGEL CS, JIANG C, YEW NS, NICHOLS MR et al.

Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to lung.

Hum Gene Ther 1996 ; 7 (14) : 1701-1717.

106 LEE RJ, HUANG L.

Folate-targeted anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cellspecific gene transfer.

J Biol Chem 1996 ; 271 (14) : 8481-8487.

107 LEHRMAN S.

Virus treatment questioned after gene therapy death.

Nature 1999 ; 401 (6753) : 517-518.

108 LEIPZIGER J.

Control of epithelial transport via luminal P2 receptors.

Am J Physiol Renal Physiol 2003 ; 284 (3) : F419-F432.

109 LEVENTIS R, SILVIUS JR.

Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles.

Biochim Biophys Acta 1990 ; 1023 (1) : 124-132.

110 LIANG KW, HOFFMAN EP, HUANG L.

Targeted delivery of plasmid DNA to myogenic cells via transferrin-conjugated peptide nucleic acid.

Mol Ther 2000 ; 1 (3) : 236-243.

111 LIGHT DB, DAHLSTROM PK, GRONAU RT, BAUMANN NL.

Extracellular ATP activates a P2 receptor in Necturus erythrocytes during hypotonic swelling. J Membr Biol 2001 ; 182 (3) : 193-202.

112 LIOU TG, ADLER FR, CAHILL BC, FITZSIMMONS SC, HUANG D, HIBBS JR et al.

Survival effect of lung transplantation among patients with cystic fibrosis.

JAMA 2001 ; 286 (21) : 2683-2689.

113 LIU D, REN T, GAO X.

Cationic transfection lipids.

Curr Med Chem 2003 ; 10 (14) : 1307-1315.

114 MANTHORPE M, CORNEFERT-JENSEN F, HARTIKKA J, FELGNER J, RUNDELL A, MARGALITH M et al.

Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice.

Hum Gene Ther 1993 ; 4 (4) : 419-431.

115 MARINER PD, LUCKEY SW, LONG CS, SUCHAROV CC, LEINWAND LA.

Yin Yang 1 represses alpha-myosin heavy chain gene expression in pathologic cardiac hypertrophy.

Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 326 (1) : 79-86.

116 MASTRANGELO MJ, LATTIME EC.

Virotherapy clinical trials for regional disease: in situ immune modulation using recombinant poxvirus vectors.

Cancer Gene Ther 2002 ; 9 (12) : 1013-1021.

117 McKENZIE DL, SMILEY E, KWOK KY, RICE KG.

Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers. Bioconjug Chem 2000 ; 11 (6) : 901-909.

118 MEYER KB, THOMPSON MM, LEVY MY, BARRON LG, SZOKA FC Jr.

Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics.

Gene Ther 1995 ; 2 (7) : 450-460.

119 MIDOUX P, PICHON C.

Peptide-based gene delivery systems.

<u>In</u> :

Pharmaceutical Perspectives of Nucleic Acid-Based Therapeutics.

Mahato R and Wan Kim S, Ed.

London ; New York : Taylor & Francis ; 2002 : 334-366.

120 MOROIANU J.

Molecular mechanisms of nuclear protein transport.

Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1997 ; 7 (1-2) : 61-72.

121 NACKLEY AC, SHEA-EATON W, LOPEZ D, McLEAN MP.

Repression of the steroidogenic acute regulatory gene by the multifunctional transcription factor Yin Yang 1.

Endocrinology 2002 ; 143 (3) : 1085-1096.

122 NIEDZINSKI EJ, CHEN YJ, OLSON DC, PARKER EA, PARK H, UDOVE JA et al.

Enhanced systemic transgene expression after nonviral salivary gland transfection using a novel endonuclease inhibitor / DNA formulation.

Gene Ther 2003 ; 10 (26) : 2133-2138.

123 O'CONNOR MJ, TAN SH, TAN CH, BERNARD HU.

YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. J Virol 1996 ; 70 (10) : 6529-6539.

124 OIWA K, SAKAKIBARA H.

Recent progress in dynein structure and mechanism.

Curr Opin Cell Biol 2005 ; 17 (1) : 98-103.

125 OKADA Y, HAZAMA A, HASHIMOTO A, MARUYAMA Y, KUBO M.

Exocytosis upon osmotic swelling in human epithelial cells. Biochim Biophys Acta 1992 ; 1107 (1) : 201-205.

126 OLIVER A, CANTON R, CAMPO P, BAQUERO F, BLAZQUEZ J.

High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection. Science 2000 ; 288 (5469) : 1251-1254.

127 PARENTE RA, NIR S, SZOKA FC Jr.

Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. Biochemistry 1990 ; 29 (37) : 8720-8728.

128 PEDROSO de LIMA MC, NEVES S, FILIPE A, DUZGUNES N, SIMOES S.

Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications. Curr Med Chem 2003 ; 10 (14) : 1221-1231.

129 PICHER M, BOUCHER RC.

Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces.

J Biol Chem 2003 ; 278 (13) : 11256-11264.

130 PICHON C, GONCALVES C, MIDOUX P.

Histidine-rich peptides and polymers for nucleic acids delivery.

Adv Drug Deliv Rev 2001 ; 53 (1) : 75-94.

131 PICKLES RJ, McCARTY D, MATSUI H, HART PJ, RANDELL SH, BOUCHER RC.

Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer.

J Virol 1998 ; 72 (7) : 6014-6023.

132 PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung. Proc Natl Acad Sci USA 1997 ; 94 (22) 12088-12093.

133 PORTEL L, TUNON de LARA JM, VERNEJOUX JM, WEISS I, TAYTARD A.

Osmolarity of solutions used in nebulization.

Rev Mal Respir 1998 ; 15 (2) : 191-195.

134 RAPER SE, YUDKOFF M, CHIRMULE N, GAO GP, NUNES F, HASKAL ZJ et al.

A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency.

Hum Gene Ther 2002 ; 13 (1) : 163-175.

135 READ ML, BREMNER KH, OUPICKY D, GREEN NK, SEARLE PF, SEYMOUR LW et al.

Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. J Gene Med 2003 ; 5 (3) : 232-245.

136 RECZEK D, BRETSCHER A.

The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule.

J Biol Chem 1998 ; 273 (29) : 18452-18458.

137 RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z et

al.

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.

Science 1989 ; 245 (4922) : 1066-1073.

138 ROBINSON M, HEMMING AL, REGNIS JA, WONG AG, BAILEY DL, BAUTOVICH GJ et al.

Effect of increasing doses of hypertonic saline on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis.

Thorax 1997; 52 (10): 900-903.

139 ROMAN RM, FERANCHAK AP, SALTER KD, WANG Y, FITZ JG.

Endogenous ATP release regulates Cl⁻ secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells.

Am J Physiol 1999 ; 276 (6 Pt 1) : G1391-G1400.

140 ROSENBERG MF, KAMIS AB, ALEKSANDROV LA, FORD RC, RIORDAN JR.

Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).

J Biol Chem 2004 ; 279 (37) : 39051-39057.

- 141 SARDINI A, AMEY JS, WEYLANDT KH, NOBLES M, VALVERDE MA, HIGGINS CF.Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels.Biochim Biophys Acta 2003 ; 1618 (2) : 153-162.
- 142 SAWA T, MIYAZAKI H, PITTET JF, WIDDICOMBE JH, GROPPER MA, HASHIMOTO S et al.
 Intraluminal water increases expression of plasmid DNA in rat lung.
 Hum Gene Ther 1996 ; 7 (8) : 933-941.

143 SCHREIBER R, NITSCHKE R, GREGER R, KUNZELMANN K.

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells.

J Biol Chem 1999 ; 274 (17) : 11811-11816.

144 SCHWIEBERT EM, ZSEMBERY A.

Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. Biochim Biophys Acta 2003 ; 1615 (1-2) : 7-32.

145 SHAH AC, BENOS D, GILLESPIE GY, MARKERT JM.

Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. J Neurooncol 2003 ; 65 (3) : 203-226.

146 SMITH JJ, TRAVIS SM, GREENBERG EP, WELSH MJ.

Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. Cell 1996 ; 85 (2) : 229-236. 147 St GEORGE JA.

Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors.

Gene Ther 2003 ; 10 (14) : 1135-1141.

148 STAFANGER G, KOCH C.

N-acetylcysteine in cystic fibrosis and Pseudomonas aeruginosa infection: clinical score, spirometry and ciliary motility.

Eur Respir J 1989 ; 2 (3) : 234-237.

149 STUTTS MJ, CANESSA CM, OLSEN JC, HAMRICK M, COHN JA, ROSSIER BC et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels.

- - -

Science 1995 ; 269 (5225) : 847-850.

150 STRAUB SG, DANIEL S, SHARP GW.

Hyposmotic shock stimulates insulin secretion by two distinct mechanisms. Studies with the βHC9 cell.

Am J Physiol Endocrinol Metab 2002 ; 282 (5) : E1070-E1076.

151 STROM AC, FORSBERG M, LILLHAGER P, WESTIN G.

The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression.

Nucleic Acids Res 1996 ; 24 (11) : 1981-1986.

152 SUMMERFORD C, SAMULSKI RJ.

Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions.

J Virol 1998 ; 72 (2) : 1438-1445.

153 SUN JM, CHEN HY, DAVIE JR.

Nuclear factor 1 is a component of the nuclear matrix.

J Cell Biochem 1994 ; 55 (2) : 252-263.

154 SUN JM, CHEN HY, LITCHFIELD DW, DAVIE JR.

Developmental changes in transcription factors associated with the nuclear matrix of chicken erythrocytes.

J Cell Biochem 1996 ; 62 (4) : 454-466.

155 SURI R, METCALFE C, LEES B, GRIEVE R, FLATHER M, NORMAND C et al.

Comparison of hypertonic saline and alternate-day or daily recombinant human deoxyribonuclease in children with cystic fibrosis: a randomised trial. Lancet 2001 ; 358 (9290) : 1316-1321.

156 SVAREN J, KLEBANOW E, SEALY L, CHALKLEY R.

Analysis of the competition between nucleosome formation and transcription factor binding. J Biol Chem 1994 ; 269 (12) : 9335-9344.

157 TAN DP, NONAKA K, NUCKOLLS GH, LIU YH, MAXSON RE, SLAVKIN HC et al.
 YY1 activates Msx2 gene independent of bone morphogenetic protein signaling.
 Nucleic Acids Res 2002 ; 30 (5) : 1213-1223.

158 THOMAS PJ, SHENBAGAMURTHI P, SONDEK J, HULLIHEN JM, PEDERSEN PL.

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and the stability of a synthetic peptide. J Biol Chem 1992 ; 267 (9) : 5727-5730.

159 TOLSTONOG GV, WANG X, SHOEMAN R, TRAUB P.

Intermediate filaments reconstituted from vimentin, desmin and glial fibrillary acidic protein selectively bind repetitive and mobile DNA sequences from a mixture of mouse genomic DNA fragments.

DNA Cell Biol 2000 ; 19 (11) : 647-677.

160 TSUI LC.

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Am J Respir Crit Care Med 1995 ; 151 (3 Pt 2) : S47-S53.

161 TU G, KIRCHMAIER AL, LIGGITT D, LIU Y, LIU S, YU WH et al.

Non-replicating Epstein-Barr virus-based plasmids extend gene expression and can improve gene therapy in vivo.

J Biol Chem 2000 ; 275 (39) : 30408-20416.

162 VALVERDE MA, O'BRIEN JA, SEPULVEDA FV, RATCLIFF RA, EVANS MJ,

COLLEDGE WH.

Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. Proc Natl Acad USA 1995 ; 92 (20) : 9038-9041.

163 van de WETERING P, MORET EE, SCHUURMANS-NIEUWENBROEK NM, van STEENBERGEN MJ, HENNINK WE.

Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery.

Bioconjug Chem 1999 ; 10 (4) : 589-597.

164 van der WIJK T, TOMASSEN SF, HOUTSMULLER AB, de JONGE HR, TILLY BC.
Increased vesicle recycling in response to osmotic cell swelling. Cause and consequence of hypotonicity-provoked ATP release.
J Biol Chem 2003 ; 278 (41) : 40020-40025.

165 van WIJNEN AJ, BIDWELL JP, FEY EG, PENMAN S, LIAU JB, STEIN JL et al.
Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to Sp1, ATF, CCAAT, C/EBP, Oct-1 and AP-1.
Biochemistry 1993 ; 32 (33) : 8397-8402.

166 VILLASANTE A, CORCES VG, MANSO-MARTINEZ R, AVILA J.

Binding of microtubule protein to DNA and chromatin: possibility of simultaneous linkage of microtubule to nucleic and assembly of the microtubule structure. Nucleic Acids Res 1981 ; 9 (4) : 895-908.

167 WADE PA.

Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. Oncogene 2001 ; 20 (24) : 3166-3173.

168 WAGNER E, PLANK C, ZATLOUKAL K, COTTEN M, BIRNSTIEL ML.

Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. Proc Natl Acad Sci USA 1992 ; 89 (17) : 7934-7938.

169 WAGNER JA, NEPOMUCENO IB, MESSNER AH, MORAN ML, BATSON EP, DIMICELI S et al.

A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. Hum Gene Ther 2002 ; 13 (11) : 1349-1359.

170 WALTHER W, STEIN U, SIEGEL R, FICHTNER I, SCHLAG PM.

Use of the nuclease inhibitor aurintricarboxylic acid (ATA) for improved non-viral intratumoral in vivo gene transfer by jet-injection.

J Gene Med 2005 ; 7 (4) : 477-485.

171 WANG G, DAVIDSON BL, MELCHERT P, SLEPUSHKIN VA, van Es HH, BODNER M et al.

Influence of cell polarity on retrovirus-mediated gene transfer to differentiated human airway epithelia.

J Virol 1998 ; 72 (12) : 9818-9826.

172 WANG CY, LIANG YJ, LIN YS, SHIH HM, JOU YS, YU WC.

YY1AP, a novel co-activator of YY1.

J Biol Chem 2004 ; 279 (17) : 17750-17755.

173 WARD CL, OMURA S, KOPITO RR.

Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway.

Cell 1995 ; 83 (1) : 121-127.
174 WEIXEL KM, BRADBURY NA.

Mu 2 binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to clathrinmediated endocytic pathway.

J Biol Chem 2001 ; 276 (49) : 46251-46259.

175 WELSH MJ, SMITH AE.

Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis.

Cell 1993 ; 73 (7) : 1251-1254.

176 WELSH MJ, TSUI LC, BOAT TF, BEAUDET AL.

Cystic fibrosis.

<u>In</u> :

The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases: Membrane Transport Systems. Scriver C, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, Ed.

New York, NY : McGraw-Hill ; 1995 : 3799-3876.

177 WIDDICOMBE JH, AZIZI F, KANG T, PITTET JF.

Transient permeabilization of airway epithelium by mucosal water.

J Appl Physiol 1996; 81 (1): 491-499.

178 WILKERSON EH, DIBONA DR, SCHAFER JA.

Analysis of structural changes during hypotonic swelling in Ehrlich ascites tumor cells.

Am J Physiol 1986 ; 251 (1 Pt 1) : C104-C114.

179 WROBEL I, COLLINS D.

Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis.

Biochim Biophys Acta 1995 ; 1235 (2) : 296-304.

- YEW NS, ZHAO H, WU IH, SONG A, TOUSIGNANT JD, PRZBYLSKA M et al.
 Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs.
 Mol Ther 2000 ; 1 (3) : 255-262.
- 181 YONEMITSU Y, KITSON C, FERRARI S, FARLEY R, GRIESENBACH U, JUDD D et al.
 Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus.
 Nat Biotechnol 2000 ; 18 (9) : 970-973.

182 ZHANG L, BUTTON B, SKIADOPOULOS MH, DANG Y, BUKREYEV A, GABRIEL SE et al.

Restoration of periciliary liquid volume to normal levels in human CF airway epithelium after targeted expression of CFTR in ciliated cells with a parainfluenza virus type 3-CFTR gene transfer vector.

Pediatr Pulmonol 2003 ; Suppl 25 : 256-257.

183 ZHDANOV RI, PODOBED OV, VLASSOV VV.

Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes for gene transfer and therapy. Bioelectrochemistry 2002 ; 58 (1) : 53-64.

184 ZIADY AG, FERKOL T, GERKEN T, DAWSON DV, PERLMUTTER DH, DAVIS PB. Ligand substitution of receptor targeted DNA complexes affects gene transfer into hepatoma cells.

Gene Ther 1998 ; 5 (12) : 1685-1697.

185 ZIADY AG, GEDEON CR, MILLER T, QUAN W, PAYNE JM, HYATT SL et al.

Transfection of airway epithelium by stable PEGylated poly-L-lysine DNA nanoparticles in vivo.

Mol Ther 2003; 8(6): 936-947.

186 ZIADY AG, KELLEY TJ, MILLIKEN E, FERKOL T, DAVIS PB.

Functional evidence of CFTR gene transfer in nasal epithelium of cystic fibrosis mice in vivo following luminal application of DNA complexes targeted to the serpin-enzyme complex receptor.

Mol Ther 2002 ; 5 (4) : 413-419.

187 ZIELENSKI J, TSUI LC.

Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations.

Annu Rev Genet 1995 ; 29 : 777-807.

LEMOINE Jérôme Transfection de l'épithélium respiratoire nasal normal de souris Th. Univ. : Reims : 2005 ; N°

RESUME

La mucoviscidose est une maladie génétique affectant principalement les poumons, qui est due à la mutation du gène CFTR. La protéine CFTR est un canal chlorique. Le transfert du gène CFTR sauvage dans l'épithélium bronchique peut être obtenu à l'aide de vecteurs de gènes non-viraux. Ces transferts n'ont pas permis, jusqu'à présent, de corriger complètement le transport de chlorure. Dans cette étude, nous avons démontré que de l'ADN nu dissout dans de l'eau déminéralisée transfecte les cellules épithéliales nasales plus efficacement que dans une solution isotonique ou hypertonique. Cette méthode a été baptisée : transfection par choc hypotonique. Le plasmide serait internalisé par les cellules épithéliales au cours de l'étape dite de diminution régulée du volume cellulaire du choc hypotonique. La stratégie la plus simple pour améliorer la transfection a consisté à raccourcir le plasmide, en le coupant dans la portion bactérienne à l'aide d'enzymes de restriction. L'expression du transgène obtenue suite à l'administration de fragments d'ADN nu, dissous dans de l'eau pure, a atteint un très haut niveau. L'amplificateur transcriptionnel IE1 du CMV contient des sites de fixation pour NFκB et ATF-CREB, qui ont été remplacés par des sites Oct-1. Les sites de fixation nonconsensuels NF1 et Sp1, ont été remplacés par leurs homologues consensuels. Ces modifications ont permis de réduire la diminution de l'expression du transgène entre les jours un et dix. La thérapie génique de la mucoviscidose deviendra concevable s'il est possible d'atteindre et de maintenir pendant plusieurs semaines, un niveau élevé d'expression du transgène dans l'épithélium bronchique des patients.

| Rubrique de classement : biologie moléculaire et cellulaire | |
|--|---|
| Mots-clés : mucoviscidose, thérapie génique, épithélium, techniques transfert de gènes | |
| JURY | |
| | |
| Président : | Moncef GUENOUNOU, Professeur des Universités, REIMS |
| | |
| Rapporteurs : | Michel Francis BUREAU, Docteur, Université de PARIS V |
| | |
| | Joël PESTEL, Directeur de recherche CNRS, Université de LILLE 1 |
| | |
| Directeur de thèse : | Bernard DESOIZE, Professeur des Universités, REIMS |
| | |
| Adresse de l'auteur : LEMOINE Jérôme - 3, rue des Mûriers 51220 LOIVRE | |