



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Effet des lipides cationiques sur la capture d'ADN exogène par des cellules humaines en culture

Laurent, Nathanael

*Award date:*  
1997

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

---

Reçu le 02 DEC. 1996

SECRETARIAT BIOLOGIE  
F. U. N. D. P.  
Rue de Bruxelles, 61  
B - 5000 NAMUR

**EFFET DES LIPIDES CATIONIQUES SUR LA CAPTURE D'ADN  
EXOGENE PAR DES CELLULES HUMAINES EN CULTURE**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences

biologiques par

Nathanaël LAURENT

1996



## *Remerciements*

*Au terme de cette année de travail dans le laboratoire de Chimie Physiologique, je tiens à exprimer de sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont guidé et encouragé.*

*J'adresse un merci tout particulier aux Professeurs R. Wattiaux et M. Jadot pour l'enthousiasme et la passion qu'ils manifestent à travers leur travail de recherche scientifique. Merci aussi à eux pour m'avoir partagé un peu de leur savoir.*

*J'adresse toute ma gratitude au Professeur S. Wattiaux-De coninck pour sa grande attention et son aide précieuse lors de la rédaction de ce mémoire.*

*Merci à A. Aleouaha pour sa communication personnelle concernant le marquage radioactif de l'ADN, et à D. Demirov pour son aide lors de la purification du plasmide et sa disponibilité à tout moment.*

*Un grand merci à Monsieur F. Dubois pour ses conseils rigoureux, sa grande patience et son humeur toujours chaleureuse.*

*Merci à Madame M.J. Vertez pour sa collaboration entre autre lors de la mise en culture des cellules.*

*Je suis extrêmement reconnaissant envers le reste des personnes travaillant au laboratoire de Chimie Physiologique, et que je n'ai pas encore citées, pour m'avoir accueilli, conseillé et aidé, toujours avec bonne humeur. Je pense particulièrement à A. Gilbert, V. Deprez, C. Tans, J. Thiron.*

*Enfin, je remercie spécialement ma famille pour son soutien moral et Céline qui a su me réconforter et m'aider avec le plus grand soin.*

Pendant la réalisation de ce travail, nous avons contribué à une étude parallèle réalisée sur un modèle animal et dont les résultats ont récemment fait l'objet d'une publication:

Wattiaux, R., Jadot, M., Laurent, N., Dubois, F., et Wattiaux-De Coninck, S., 1996, Cationic lipids delay the transfer of plasmid DNA to lysosomes, *BBRC* **227**, 448-454.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont fait l'objet de deux communications:

- "Third Benelux Congress of Zoology" (Adaptation, from molecules to communities), Namur, 8 et 9 novembre 1996.

N. Laurent, M. Jadot, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux, Effect of cationic lipids on the uptake of exogenous DNA by human culture cells.

- Société Belge de Biochimie, Mons, 30 novembre 1996.

N. Laurent, M. Jadot, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux, Effect of cationic lipids on the uptake of exogenous DNA by human culture cells.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

## Effet des lipides cationiques sur la capture d'ADN exogène par des cellules humaines en culture

LAURENT Nathanaël

### Résumé

L'introduction efficace de matériel génétique exogène dans une cellule, étape essentielle dans la mise en oeuvre d'une thérapie génique, doit être optimisée. L'utilisation de vecteurs de transfection favorisent le cheminement de l'ADN exogène depuis le milieu extracellulaire jusqu'au noyau et au centre d'expression de la cellule. Nous nous sommes intéressé plus particulièrement aux propriétés transfectionnelles de lipides cationiques, vecteurs non viraux de transfection. Nous abordons le problème du sort que subit une molécule d'ADN captée par une cellule, et de son cheminement pour atteindre le centre d'expression de la cellule, le noyau.

En utilisant des mélanocytes humains transformés de la lignée A2058 en culture comme cible de transfection, nous avons tenté de suivre le parcours intracellulaire d'un plasmide radiomarqué complexé à différents types de lipides cationiques. Toutes nos observations concourent à montrer que les lipides cationiques non seulement permettent d'augmenter l'efficacité de la capture cellulaire, mais aussi entraînent la rétention de l'ADN intact, capté par ces cellules, dans un compartiment prélysosomal. Nous pouvons dès lors concevoir l'ébauche d'un modèle proposant les premières étapes du trafic intracellulaire de molécules d'ADN complexées à un lipide cationique après leur introduction *ex vivo* dans les cellules A2058.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques  
Décembre 1996

**Promoteur:** Professeur S. Wattiaux-De Coninck

**Co-promoteurs:** Professeurs R. Wattiaux et M. Jadot

Laboratoire de Chimie Physiologique-Faculté de Médecine



# Table des matières.

## Table des matières

Introduction.	1
I. Techniques de transfection et application au domaine de la thérapie génique.	1
I.1. <i>Présentation générale.</i>	1
I.2. <i>Les vecteurs de transfection viraux et non viraux.</i>	3
a) <i>Les vecteurs viraux:.</i>	3
b) <i>Les vecteurs non viraux:.</i>	4
1. Méthodes physiques d'incorporation d'ADN:	5
2. Méthodes de transfection par précipitation employant des cations:.	6
3. Les polymères cationiques:	6
4. Transfection médiée par une interaction de type "ligand"/récepteur:	7
I.3. <i>Les liposomes en tant que vecteurs de transfection.</i>	9
a) <i>Propriétés structurales des liposomes et interaction avec l'ADN:.</i>	9
b) <i>Les lipides cationiques:.</i>	0
c) <i>La capture cellulaire des complexes ADN-liposomes:.</i>	12
II. Endocytose et trafic intracellulaire.	14
II.1. <i>Les échanges entre la cellule et son environnement.</i>	14
II.2. <i>L'endocytose.</i>	15
a) <i>On distingue différents modes d'endocytose:.</i>	15
b) <i>Processus dynamique de l'endocytose:.</i>	16
c) <i>Endosomes précoces et tardifs:.</i>	17
d) <i>Hypothèse d'une maturation des endosomes:.</i>	17
II.3. <i>La phagocytose..</i>	18
Matériel et méthode.	22
I. Marquage radioactif d'ADN plasmidique au moyen de la réaction de nick translation..	22
I.1. <i>Préparation du plasmide pcDNA1/Amp.</i>	22
I.2. <i>Réaction de nick translation.</i>	22
II. Mise en culture des cellules A2058.	24

III. Réalisation d'une expérience de capture.	25
III.1. Préparation des cellules.	25
III.2. Fractionnement de l'homogénat.	25
III.3. Séparation des structures subcellulaires selon leur densité.	26
III.4. Méthode de dosage d'enzymes de référence.	27
III.5. Réalisation d'une courbe de capture.	28
III.6. Description des lipides cationiques utilisés pour complexer l'ADN.	28
IV. Couplage d'une asialoprotéine avec la tyramine-cellobiose marquée à l'iode ( $I^{125}$ ).	28
Résultats.	30
I. Marquage radioactif par "nick translation" d'un vecteur d'expression eucaryotique plasmidique.	30
I.1. Choix de la technique de marquage.	31
I.2. Réaction de nick translation et contrôles..	31
I.3. Présence d'une double conformation spatiale du plasmide marqué..	32
I.4. Conclusion.	33
II. Fractionnement d'un homogénat cellulaire et dosage de plusieurs enzymes de références.	33
II.1. Choix des cellules	33
II.2. Conditions d'homogénéisation et premier fractionnement cellulaire.	33
II.3. Centrifugation isopycniqne en gradient saccharose et dosages d'enzymes de références.	35
II.4 . Conclusion.	36
III. Evolution au cours du temps de la capture d'ADN radioactif complexé à différents types de lipides cationiques.	38
III.1. Introduction.	38
III.2. Résultats.	38
IV. Localisation en gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé au DOTAP. Effet de la durée d'incubation.	39
IV.1. Sédimentation des granules ayant incorporé la radioactivité dans la fraction N en fonction de la vitesse de centrifugation.	39
IV.2. Centrifugation isopycniqne en gradient saccharose de la fraction PNS.	42



<i>IV.3. Résultats.</i>	42
V. Localisation en gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé au TR8. Effet de la durée d'incubation.	43
<i>V.1. Introduction.</i>	43
<i>V.2. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose de la fraction PNS.</i>	43
<i>V.3. Résultats.</i>	44
VI. Localisation en gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé à différents types de lipides cationiques.	45
<i>VI.1. Introduction.</i>	45
<i>VI.2. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose de la fraction PNS.</i>	46
<i>VI.3. Résultats.</i>	46
VII. Corrélation entre la densité des complexes ADN-lipide et celle des granules intracellulaires ayant incorporé ces complexes..	
<i>VII.1. Introduction.</i>	47
<i>VII.2. Détermination de la densité des complexes formés entre l'ADN et les lipides.</i>	47
<i>VII.3. Résultats.</i>	48
VIII. Localisation dans un gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé avec le TR8, après différents temps de chasse.	48
<i>VIII.1. Introduction.</i>	48
<i>VIII.2. Centrifugation isopycnique de la fraction PNS en gradient de saccharose</i>	49
<i>VIII.3. Résultats</i>	50
IX. Etude comparative de la capture d'une asialoprotéine marquée à la $^{125}\text{I}$ -tyramine cellobiose.	50
<i>IX.1. Introduction.</i>	50
<i>IX.2. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose de la fraction PNS.</i>	51
<i>IX.3. Résultats.</i>	51
 Discussion.	 53
 Bibliographie.	 60

# Introduction

Etudier l'influence de lipides cationiques sur la capture de molécules d'ADN exogènes par des cellules en culture, revient à s'intéresser aux phénomènes biologiques propres à la capture cellulaire et dans une perspective plus lointaine au ciblage correct d'ADN en vue d'une application à la thérapie génique.

Pour introduire ce mémoire, nous présenterons brièvement dans un premier temps ce qu'est la **transfection**, ainsi que les méthodes les plus communément employées pour en améliorer l'efficacité. Nous étudierons plus en détail les liposomes en tant que vecteurs de transport non viraux de l'ADN, et nous insisterons particulièrement sur la classe des **lipides cationiques**.

Dans une deuxième partie nous décrirons les grands mécanismes relatifs aux différents types d'**endocytose**. Nous tenterons de comprendre également les modèles actuels qui essaient d'éclairer et de comprendre les mécanismes du **trafic intracellulaire** s'établissant entre les différents compartiments cellulaires impliqués dans ce processus.

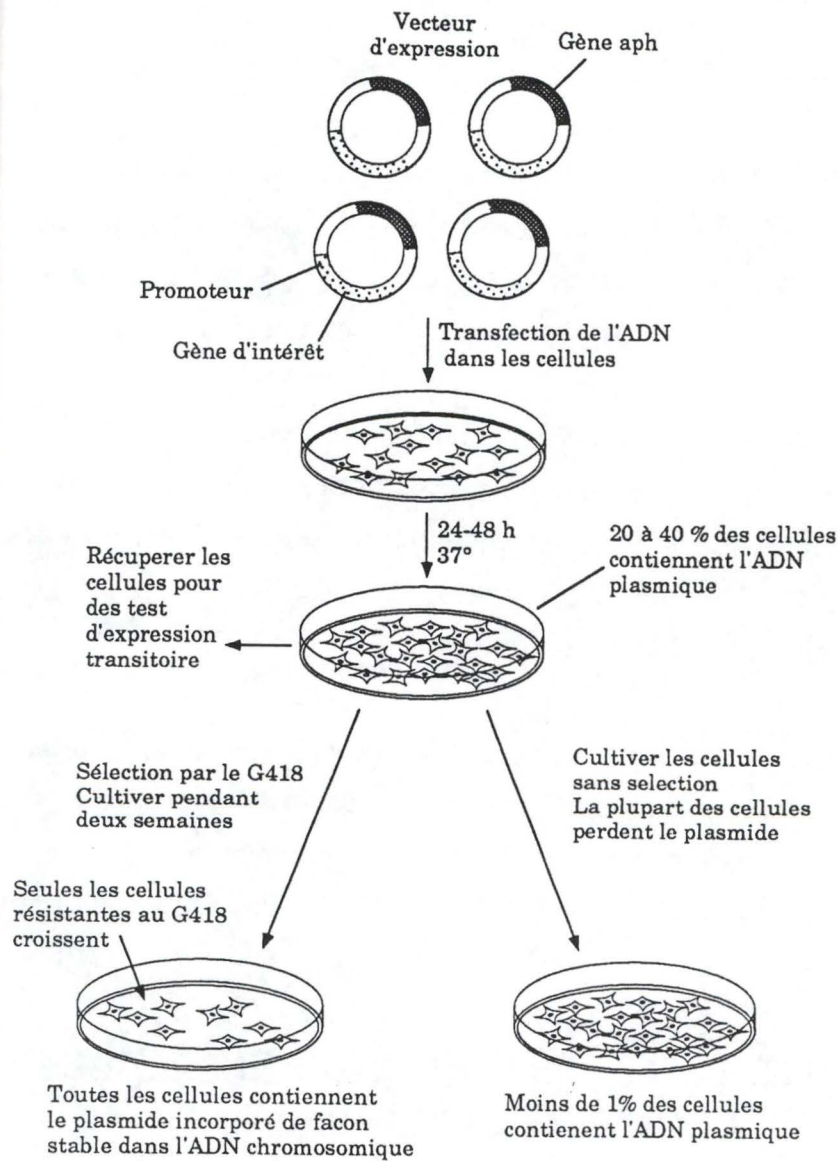
## I. Techniques de transfection et application au domaine de la thérapie génique.

### *I.1. Présentation générale*

Le processus que l'on désigne sous le nom de **transfection** exploite la capacité qu'ont les cellules de capter des molécules d'ADN exogène à partir de leur environnement. Lorsque de l'ADN codant pour une protéine est mis en présence de cellules eucaryotes isolées en culture, l'acide nucléique peut pénétrer dans ces cellules, et dans certaines d'entre elles permettre l'expression de cette protéine.

Dans certains cas, le fait d'introduire de l'ADN dans une cellule réceptrice conduit parfois ce dernier à pouvoir s'intégrer dans le matériel génétique endogène de cette cellule et dès lors à pouvoir être exprimé de façon stable et être transmis ultérieurement comme n'importe quelle portion du génome. Alternativement, et c'est le





**Figure 1.** *ADN se maintenant de façon transitoire dans le noyau de cellules.*

L'ADN transfecté se maintient de façon transitoire dans d nombreuses cellules, mais ne s'intègre de façon stable que dans un petit nombre d'entre elles. Au cours des premières 48 heures suivant la transfection, jusqu'à 50% des cellules en culture contiennent l'ADN transfecté. C'est ce que l'on appelle la phase transitoire, et pour de nombreux types d'expériences, les cultures sont utilisées à cette étape. Au fur et à mesure de l'incubation, la plupart des cellules perdent l'ADN transfecté (ce qui est dû à une combinaison de dégradation et de dilution, l'ADN non intégré n'étant en général pas répliqué avec les chromosomes de la cellule hôte). Ce n'est que dans quelques cellules de la culture que l'ADN est intégré de manière stable dans les chromosomes. L'isolement de ces cellules et de leur descendance nécessite d'exercer une sélection pour la présence d'un gène marqueur (à gauche). La sélection tue toutes les cellules qui n'ont pas réussi à intégrer l'ADN transfecté, ce qui permet aux rares cellules qui l'ont intégré de pousser en grandes colonies isolées (clones), qui peuvent être récupérées pour des analyses plus poussées. (Watson, Gilman, Witkowski, Zoller; ADN Recombinant; De Boek, 2<sup>ème</sup> édition, 1994)



cas le plus fréquent, l'ADN peut ne pas s'intégrer dans un chromosome de la cellule transfectée et conduire dès lors à une expression transitoire (figure 1).

Une question préoccupante à l'heure actuelle, lorsque l'on étudie le phénomène de transfection, concerne la nature du processus mis en jeu lors de l'incorporation de l'ADN, et le trajet intracellulaire que suit l'acide nucléique pour atteindre le noyau de la cellule. Cette question nous conduit à souligner la faiblesse fondamentale de la transfection, à savoir son manque d'efficacité.

Bien que diverses expériences aient montré que dans des conditions appropriées la transfection est applicable aux cellules eucaryotes, et qu'une partie de l'ADN capté peut être localisée ensuite dans le noyau, le phénomène conduisant à l'entrée spontanée de l'ADN intact dans la cellule et à son expression -transitoire ou stable- s'avéra rapidement très peu efficace. C'est pourquoi, la recherche s'est très vite intéressée à diverses méthodes qui ont pour but d'augmenter l'efficacité de la transfection.

Ces méthodes consistent à employer des adjuvants afin d'améliorer la capture et l'expression intracellulaire de molécules d'ADN, et incluent l'utilisation de vecteurs, ou médiateurs, viraux (essentiellement les *rétrovirus* et les *adénovirus*) mais aussi non viraux comme des *polycations*, le *phosphate de calcium*, des *liposomes*, ainsi que les méthodes de *microinjection* et d'*électroporation*. Cependant, les progrès qu'apportent ces procédés de transfection à un ou plusieurs niveaux des étapes de capture et d'expression de l'ADN exogène par les cellules, conservent néanmoins certaines lacunes. Ces dernières peuvent être liées à la toxicité cellulaire du procédé mis en oeuvre, ou à sa pauvre reproductibilité, ou encore à l'inefficacité persistante des processus d'incorporation et d'expression du matériel génétique à l'intérieur des cellules. Enfin, il s'avère que certaines de ces méthodes sont inutilisables *in vivo*.

Une des méthodes qui améliorent le transfert d'ADN à l'intérieur de cellules eucaryotes et qui retient tout particulièrement notre attention, est connue sous le nom de "**lipofection**". Il s'agit d'un procédé qui utilise des lipides sous forme de bicouches sphériques ou "liposomes". Ces liposomes peuvent soit incorporer une molécule d'ADN, soit s'y complexer par adsorption. Ils servent de cette façon de médiateurs

pour le transport, la capture, le ciblage vers le noyau et l'expression, de molécules d'ADN. La lipofection utilise des lipides de diverses natures et structures pour former des liposomes à propriétés variées. Faisant suite aux lipides neutres et anioniques, est apparue voilà une dizaine d'années une nouvelle classe de lipides: la classe des lipides cationiques.

## ***I.2. Les vecteurs de transfection viraux et non viraux.***

Avant d'étudier plus en détail la lipofection et plus particulièrement les lipides cationiques, nous présenterons brièvement les autres méthodes de transfection que l'on peut diviser en deux catégories: l'une caractérisée par l'emploi de **vecteurs viraux**, et l'autre utilisant des **vecteurs non viraux**.

### ***a) Les vecteurs viraux:***

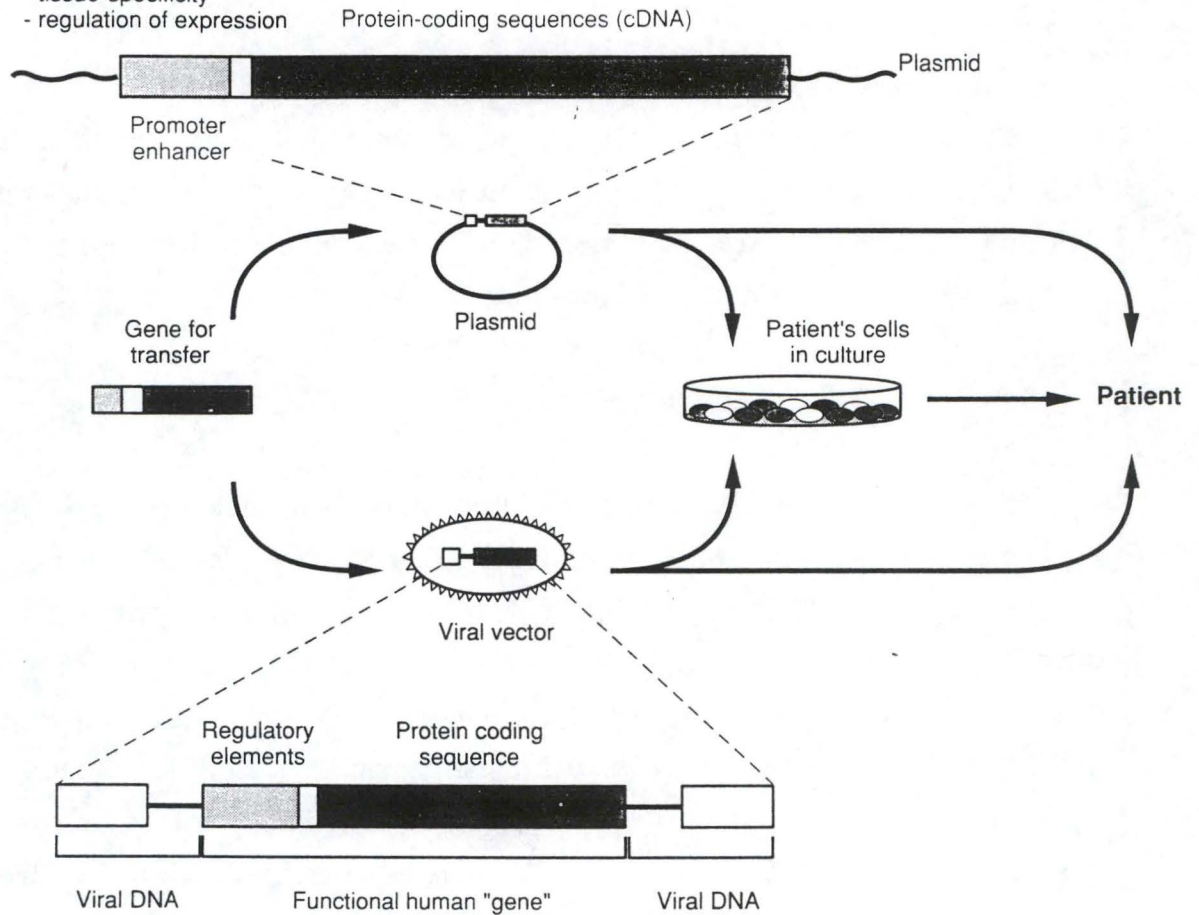
Les méthodes les plus efficaces mises au point pour réaliser le passage d'ADN vers l'intérieur de cellules et pour y induire son expression, restent celles qui utilisent des vecteurs viraux. Ces derniers présentent des inconvénients pouvant être dus à la quantité limitée d'ADN qu'ils peuvent véhiculer (pas plus de 8 kb pour les adénovirus) et à une éventuelle complémentation du virus recombinant par le matériel génétique d'un virus sauvage. C'est d'ailleurs pour cette raison que la recherche s'est aussi intéressée à d'autres types de vecteurs de transfection, et à leur application possible *in vivo*, malgré qu'ils soient relativement inefficaces par rapport aux vecteurs viraux.

La transfection médiée par des virus tels les rétrovirus reste actuellement la méthode la plus largement employée (D. H. Hamer *et al.*, 1979; R. C. Mulligan *et al.*, 1979; A. D. Miller, 1992). Cette technique fut développée au début des années 80 sur des modèles animaux et immédiatement retenue pour sa grande efficacité. Elle implique des processus hautement évolués qui permettent au virus d'entrer dans des cellules en division de l'organisme, et d'acheminer l'ADN viral vers le noyau. Ces processus incluent l'attachement du virus à la surface des cellules cibles, la capture du matériel génétique viral, son passage à travers les membranes périplasmique ou endosomale, et le passage de ce matériel génétique dans le noyau.



**Regulatory elements determining:**

- amount of expression
- tissue-specificity
- regulation of expression



**Figure 2. Méthode de transfert de gène médié par des rétrovirus.**

La figure montre les deux stratégies qui peuvent être utilisées pour transférer un gène à un patient atteint d'une maladie génétique, basée sur l'expression d'un gène humain modifié (en haut) ou basée sur un vecteur rétroviral contenant un ADNc humain pour transférer le gène (en bas). Les composants viraux aux extrémités de la molécule sont requis pour, entre autre, permettre l'intégration du vecteur dans le génome de l'hôte. (Thompson, McInnes, Willard; Genetics In Medecine; Saunders 5<sup>e</sup> édition; p 332)

L'utilisation de ce genre de vecteurs de transfection nécessite le remplacement des gènes encodant pour certaines fonctions virales par le gène d'intérêt, porteur par exemple de fonctions à visée thérapeutique. Cet échange de gènes est possible sans que ne soit éliminée la capacité que possède le virus d'infecter les cellules cibles efficacement et d'induire l'expression des gènes qu'il véhicule. On parle habituellement de particules virales défectives pour désigner ce genre de vecteur modifié génétiquement. (figure 2)

Les limites que comporte la thérapie médiée par des vecteurs viraux sont dues aux éléments viraux résiduels se trouvant encore à l'intérieur des particules défectives, et qui peuvent être immunogènes, cytopathiques ou recombino-gènes. C'est pourquoi, l'ingénierie génétique concernée par l'étude des vecteurs viraux a été fortement sollicitée dans le but de pouvoir éliminer un maximum de fonctions virales indispensables au processus d'infection. Cela a également conduit à fournir des efforts de recherche importants dans le but d'essayer de mimer les mécanismes essentiels de l'infection virale. Ce dernier type de recherche a abouti à la mise au point de particules composées de matériaux synthétiques ou semisynthétiques, et que l'on nomme "**virus artificiels**".

#### b) Les vecteurs non viraux:

L'étude des diverses méthodes de transfection utilisant des vecteurs non viraux passe préférentiellement par des essais et mises au point *ex vivo*, sur des cellules en culture. Cette étape permet la réalisation de modèles pouvant servir à prédire, même de façon imparfaite, le fonctionnement *in vivo* de certains vecteurs de transfection. Malgré leurs défauts, ces modèles sont d'une importance cruciale pour le développement et la compréhension du processus de capture et d'expression des gènes. De plus, ils permettent de réaliser une première validation des systèmes de capture génique qui sont maintenant employés dans plusieurs études sur modèles animaux et lors d'essais cliniques.

Avant de décrire quelques méthodes de transfection médiées par des vecteurs non viraux, signalons que l'**injection directe** d'ADN à l'intérieur d'un tissu fonctionne

	Calcium phosphate precipi- tation	Direct injec- tion	Retro- viral medi- ated	Lipo- fec- tion
Viable <i>in vivo</i>	-	+	?	+
Efficient means of delivery	-	+	+	+
Not disruptive to cell membrane	-	-	+	+
Transfects many cell types	+	+	?	+
Non carcinogenic	+	+	-	+
Metabolizable delivery agent	-	-	-	+
Reproducibility	-	+	+	#
Ability to target to specific tissues <i>in vivo</i>	-	+	-	+
Low cost	+	+	-	-

**Tableau 1.** Une comparaison de quelques méthodes de transfection. Leurs avantages et inconvénients.

(?) La transfection médiée par retrovirus est restreinte au tissu répliatifs.

(#) La reproductibilité de la lipofection est réduite à cause de différences observées entre les échantillons de lipides fournis par les firmes, et les effets variables de chaque lipide sur différents types de tissus. (Smith *et al.*, 1993)



avec succès dans plusieurs cas (M. R. Capecchi, 1980; Folger *et al.*, 1982).

Le tableau 1 résume les avantages et inconvénients liés à certaines de ces techniques de transfert génique.

### *1. Méthodes physiques d'incorporation d'ADN:*

Parmi les techniques de transfection employant un procédé d'incorporation physique du matériel génétique à l'intérieur de cellules, on peut citer d'abord la **microinjection**. Cette méthode consiste à injecter directement l'ADN dans le noyau de cellules en culture, et mène à l'expression et à l'intégration occasionnelle de gènes dans les chromosomes des cellules injectées (Capecchi, 1980). Le nombre de cellules pouvant être transfectées par ce processus est limité. Aussi, bien que la méthode soit utilisée pour introduire des gènes dans des embryons de manière à engendrer des animaux transgéniques, elle n'a que très peu d'applications en thérapie génique de cellules somatiques.

Le "bombardement" de particules composées d'ADN lié à des microparticules représente une méthode analogue à celle de l'injection directe de gènes dans les cellules. Le "bombardement" de telles particules implique que l'ADN soit préalablement précipité à la surface de celles-ci. Les particules sont projetées sur la membrane plasmique cellulaire grâce à des techniques utilisant la balistique relative aux armes à feu habituelles (Yang *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993). Lorsque les particules recouvertes d'ADN arrivent à l'intérieur de la cellule, le matériel génétique est progressivement relâché de la particule et peut dès lors conduire à l'expression de protéines. Le "bombardement" des particules recouvertes d'ADN conduit à leur entrée dans une cellule sur  $10^4$  à  $10^5$  cellules (Yang *et al.*, 1990).

Une troisième méthode physique utilisée pour le transfert de gènes à l'intérieur de cellules en culture, largement employée en recherche, est l'**électroporation**. Cette technique consiste à exposer les cellules à un haut voltage durant un temps très court en présence de l'ADN exogène (Chu *et al.*, 1987). Les conditions requises pour l'électroporation ont besoin d'être ajustées pour chaque type cellulaire, de manière à

augmenter l'efficacité de la transfection et la proportion des cellules survivantes après l'expérience. L'électroporation peut amener à une transfection transitoire dans plus de 90% des cellules qu'il s'agisse de lignées cellulaires ou de quelques types cellulaires en culture primaire.

## 2. Méthodes de transfection par précipitation employant des cations:

Une des premières méthodes de transfert d'ADN employée dans des cellules en culture au début des années 70, impliquait la précipitation de l'ADN avec du  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  et l'application de ce précipité à des cellules en monocouches (Graham et Van der Eb, 1973; Graham *et al.*, 1974; Anderson, 1992). Les mécanismes responsables de cette voie de transfection sont encore inconnus, mais on estime que les molécules d'ADN ainsi complexées se déposent à la surface des cellules et qu'il s'en suit un processus "d'internalisation" par endocytose non spécifique (Loyter *et al.*, 1982a,b).

L'efficacité de cette méthode varie avec la qualité de la réaction de précipitation, et avec la taille du précipité. Dans les conditions idéales, 10 à 50% des cellules peuvent être transfectées. On observe également que certaines cellules, telles les cellules en culture primaire, sont réfractaires à ce genre de transfection. L'ADN incorporé dans les cellules via cette méthode et atteignant le noyau, reste généralement extrachromosomal; sinon il peut s'intégrer au hasard dans un chromosome, ce qui, *ex vivo*, s'observe avec une fréquence faible de l'ordre de une cellule pour  $10^4$  à  $10^5$  cellules.

Des variantes de cette technique de transfection ont été décrites par la suite (Chen et Okayama, 1987), de même que des méthodes similaires employant d'autres composés ioniques tel que le DEAE (Ishikawa et Homcy, 1992). L'efficacité de ces différents adjuvants de transfection est semblable à celle de précipités d'ADN au phosphate de calcium.

## 3. Les polymères cationiques:

Une technique utilisant un polymère cationique a également été décrite pour



réaliser la transfection efficace de cellules en culture (Haensler et Szoka, 1993a). Cette méthode emploie un dendrimère cationique, c'est-à-dire un polymère cationique composé de polyamidoamines. Ce composé est chargé positivement et un diamètre déterminé par le nombre d'étapes intervenant dans sa synthèse. Les complexes "ADN-dendrimères" ont été construits en employant des dendrimères de différentes tailles, aussi bien qu'en faisant varier le rapport des charges entre les dendrimères cationiques et l'ADN anionique. Ces complexes présentent une efficacité importante en tant que vecteurs de transfection dans une variété de types de cellules en culture.

Comme c'est le cas avec d'autres systèmes employant des vecteurs de transfection cationiques, le complexe "ADN-polymère cationique" est supposé entrer dans les cellules par endocytose induite par une attraction ionique entre la charge positive nette du complexe et la charge négative de la surface cellulaire. Il fut par ailleurs montré que l'on peut augmenter l'efficacité de la capture cellulaire médiée par les dendrimères, en ajoutant des peptides qui facilitent le passage de l'ADN des endosomes vers le cytosol, c'est-à-dire le passage à travers la membrane endosomale (Haensler et Szoka, 1993a). De tels peptides (par exemple l'hémagglutinine trouvée à la surface du virus influenza) ont la particularité de subir un changement de conformation à pH acide (ce qui est le cas à l'intérieur des endosomes) et d'être capables sous cette forme d'induire le passage des complexes "ADN-polymère cationique" à travers la membrane.

#### *4. Transfection médiée par une interaction de type "ligand"/récepteur:*

Une autre méthode permettant d'introduire un gène étranger à l'intérieur d'une cellule, consiste à coupler l'ADN avec des "ligands" capables de se lier à leurs récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules cibles. L'avantage est celui d'un ciblage spécifique vis à vis des cellules possédant un type de récepteur pouvant reconnaître un ligand particulier, les récepteurs ayant une distribution tissulaire variable. De tels complexes sont formés en couplant de façon covalente le ligand à des polylysines, et en formant ensuite un complexe "ligand-polylysine-ADN" grâce à l'interaction ionique s'établissant entre les polylysines chargées positivement et la molécule d'ADN négative (Wu et Wu, 1987, 1988a; Wagner *et al.*, 1990, 1991a; Zenke *et al.*, 1990; Baatz *et al.*, 1994). Ces complexes ont dès lors la capacité



d'interagir spécifiquement avec des récepteurs membranaires à la surface des cellules cibles, ce qui induit une "internalisation" des complexes par endocytose médiée par récepteurs.

Cette technique a été mise à l'épreuve dans de nombreuses études, et apporte des résultats très satisfaisants. Citons à titre d'exemple les expériences au cours desquelles des complexes "transferrine-polylysine-ADN" conduisent à l'incorporation d'ADN et à une expression efficace de protéines à l'intérieur de divers types cellulaires exprimant à leur surface le récepteur pour la transferrine (Wagner *et al.*, 1990). De même les complexes "asialoorosomucoïde-polylysine-ADN" (Wu et Wu, 1987, 1988a) captés par les hépatocytes exploitent la présence de récepteurs à galactose en surface de ces cellules. Enfin, des complexes "surfactant B-polylysine-ADN" (Baatz *et al.*, 1994) sont reconnus spécifiquement à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires.

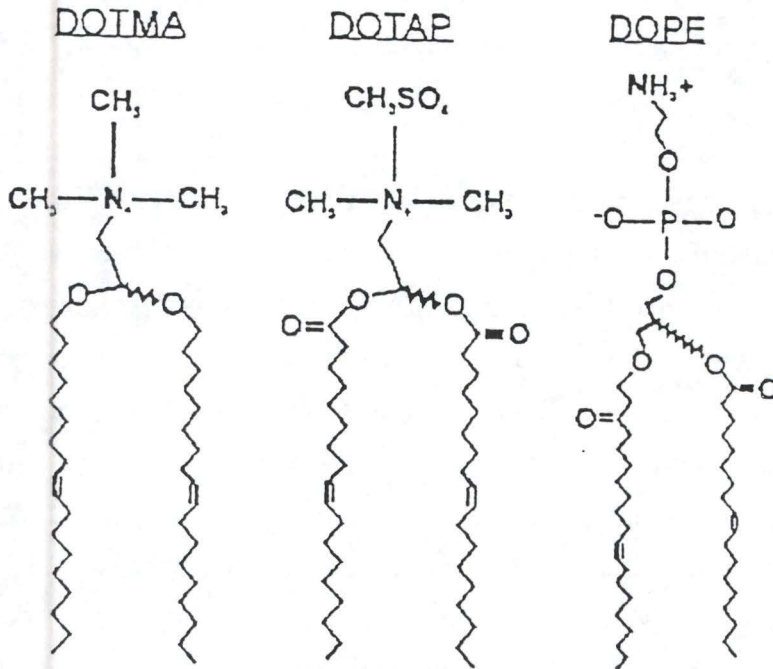
### ***1.3. Les liposomes en tant que vecteurs de transfection.***

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, parmi les méthodes de transfection utilisant des vecteurs non viraux il en est une qui nous intéresse tout particulièrement, et que l'on rencontre sous le nom de **lipofection**. Cette technique se caractérise par l'utilisation de petites vésicules lipidiques, ou liposomes, capables de former des complexes avec des molécules d'ADN. Ces particules liposomales ont été utilisées initialement comme modèles membranaires; elles ont également servi à véhiculer certains médicaments.

En 1987, un nouveau type de vecteur transfectionnel appartenant à la famille des liposomes, un **lipide cationique** synthétique, fit son apparition (Felgner *et al.*, 1987). Il fut décrit comme étant un médiateur cationique formant spontanément des complexes avec l'ADN, et augmentant considérablement l'efficacité de la capture par plusieurs types cellulaires *ex vivo*. Les lipides cationiques se sont avérés être des médiateurs non viraux très prometteurs de la capture d'ADN exogène, *ex vivo* et *in vivo*. Ce succès peut être justifié si l'on considère à la fois leur grande efficacité, leur stabilité, leur facilité de préparation, et leur faible toxicité aux doses requises pour la transfection. Précisons que ce type de vecteur de transfection est composé de lipides cationiques synthétiques qui, soit seuls, soit en association avec des phospholipides neutres, forment spontanément des structures vésiculaires contenant plusieurs bicouches (liposomes multilamellaires) qui soumis aux ultrasons engendrent de petites structures sphériques à une seule bicouche (liposomes unilamellaires).

#### *a) Propriétés structurales des liposomes et interaction avec l'ADN:*

Selon la nature des lipides pouvant composer la bicouche lipidique limitant les liposomes, les propriétés chimiques et physiques de ces structures varient largement. Ces vésicules sphériques ont un diamètre allant d'une dizaine de nanomètres jusqu'à une dizaine de microns. Elles contiennent un volume de solution aqueuse entourée d'une bicouche continue de molécules lipidiques possédant une tête hydrophile (dirigée vers les phases aqueuses) et une queue hydrophobe (une paire d'acides gras au centre de la bicouche). Typiquement, la distance maximale entre deux lipides



**Figure 3.** Structure de trois lipides cationiques.

Le DOTMA (N(1-(2,3-di-oleoyloxy)propyl)-N, N, N-trimethylammonium chloride) fut le premier lipide cationique utilisé (Felgner *et al.*, 1987). Le DOTAP (1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)propane) est un lipide cationique apparu en 1990 (Liventis et Silvius, 1990), et le DOPE (dioléoylphosphatidyléthanolamine) est un lipide neutre que l'on utilise fréquemment en association avec un lipide cationique. (Hodgson et Solaiman, 1996)



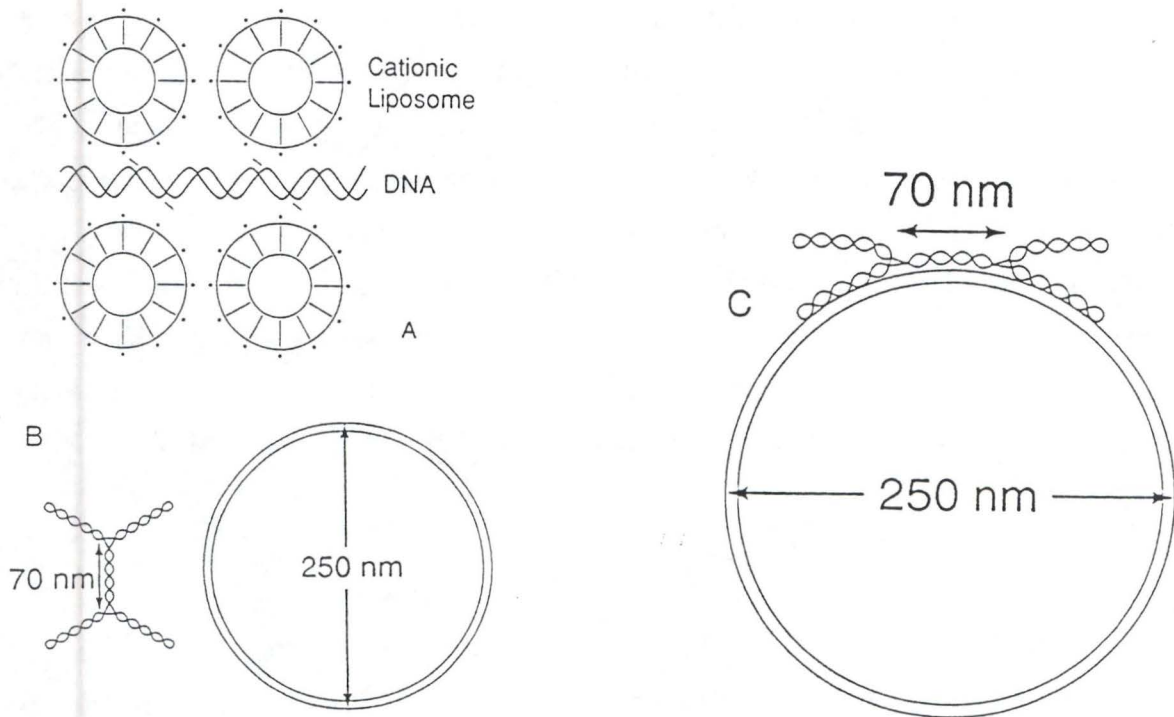
opposés dans une bicouche est de ~6 nm, bien que cette valeur dépende de la force ionique du solvant aqueux.

Un liposome à bicouche lipidique unique est appelée unilamellaire. Des liposomes multilamellaires existent également, et sont formés de plusieurs anneaux de bicouches lipidiques. Ces liposomes peuvent être facilement manipulés en remplaçant certains composants lipidiques ou le volume de solution aqueuse interne, ce qui altère leur structure et leurs propriétés biochimiques. On peut de cette manière façonner le vecteur liposomal de telle manière qu'il réponde à certaines exigences. Pour cette raison, la lipofection fit rapidement l'objet d'essais *ex vivo* et *in vivo*; malheureusement, les capacités de cette méthode contrastent fortement avec le manque d'informations concernant les effets des particules liposomales à l'intérieur des cellules et concernant la (ou les) raison(s) pour lesquelles le rendement de la transfection est nettement amélioré par l'utilisation de ce genre de molécules.

#### b) Les lipides cationiques:

Divers types de liposomes cationiques, composés d'un seul type de lipide ou de l'association de lipides cationiques et non cationiques, furent proposés et étudiés depuis leur apparition en 1987, dans le cadre d'expériences de transfection *ex vivo* et en vue d'une application possible *in vivo*. A cause de leur charge négative (groupements phosphates des nucléotides), les molécules d'ADN interagissent spontanément avec les charges positives des lipides cationiques et forment ainsi des complexes "ADN-liposomes" dans lesquels l'ADN est adsorbé de façon sur les lipides.

Le premier prototype de lipide cationique utilisé pour la transfection fut le DOTMA (Felgner *et al.*, 1987, 1994; Felgner et Ringold, 1989) (figure 3). Généralement, les liposomes cationiques sont formés d'une mixture de lipides cationiques et neutres dans des proportions le plus souvent dictées par essais et erreurs. Par exemple, le premier agent de lipofection à avoir été commercialisé est la "lipofectine<sup>TM</sup>" (Gibco-BRL), composée d'un mélange en teneurs égales de DOTMA, et de DOPE, un phospholipide neutre (figure 3). La lipofectine<sup>TM</sup> forme avec l'ADN des complexes qui peuvent être transfectés très efficacement dans les cellules de nombreux tissus, mais non dans les cellules cervicales de foetus de souris. Ceci illustre



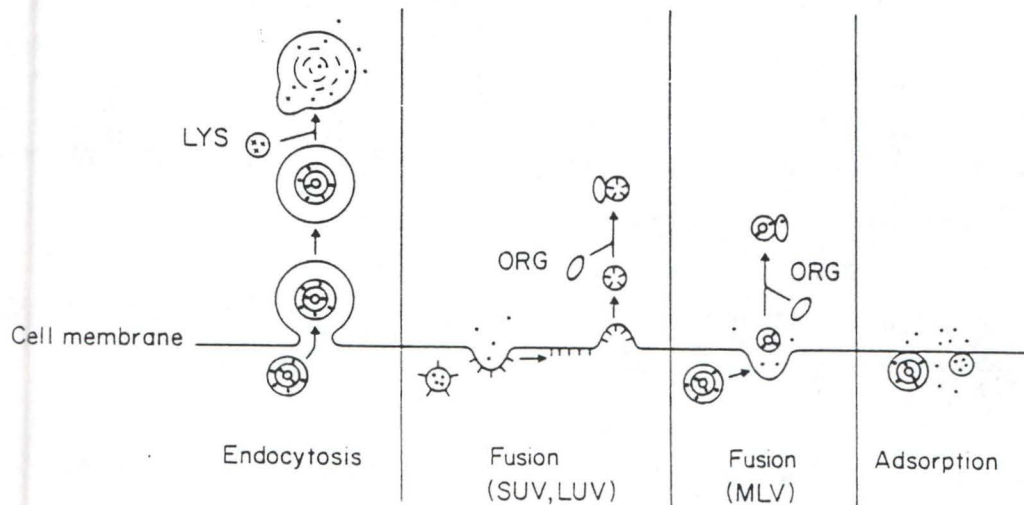
**Figure 4.** Structure approximée d'un liposome de 250 nm de diamètre et d'un plasmide tels que ceux utilisés par Felgner et Ringold.  
 A Modèle électrostatique des complexes "lipide-ADN" proposé par Felgner et Ringold pour décrire l'efficacité du transfert d'ADN médiée par la lipofectine<sup>TM</sup> (mélange de DOTMA et de DOPE en proportion 1:1 ). B Représentation correcte de la structure approximée d'un plasmide de 2500 pb comme celui utilisé par Felgner et Ringold, comparée à un liposome de 250 nm de diamètre. La structure superenroulée du plasmide semblerait permettre la formation de tétramères de liposomes. Cependant, la densité importante des charges positives provoquerait la répulsion des liposomes les uns envers les autres et la dissociation avec l'ADN. C Modèle d'association entre le plasmide et le liposome, peut-être analogue à celle se produisant avec les liposomes cationiques comme la lipofectine<sup>TM</sup>. (Smith *et al.*, 1993)



bien l'influence du type cellulaire sur l'efficacité du procédé de transfection. Il s'est avéré par la suite que le remplacement du DOPE par du cholestérol permet de réaliser une transfection efficace dans ce dernier type de cellules (S. Jiao *et al.*, 1992).

Depuis leur apparition en 1987 (Felgner *et al.*, 1987), les lipides cationiques ont fait l'objet de nombreuses études et leur diversité s'est fortement accrue. Pour illustrer l'élargissement important de l'éventail des lipides cationiques, considérons par exemple les travaux réalisés par R. Leventis *et al.*, en 1989. Ces chercheurs ont mis au point de nouveaux types de lipides cationiques dans lesquels les parties hydrophobe et cationique sont unies par des liens ester clivables. Ces préparations, différentes des premiers lipides cationiques existant comme le DOTMA, peuvent l'avantage de pouvoir être métabolisées plus efficacement après leur incorporation à l'intérieur des cellules grâce aux liens esters qu'elles contiennent. Le DOTAP (1,2-Dioleoyloxy-3-(triméthylammonio)propane) (figure 3), disponible commercialement auprès de la firme Boehringer appartient à cette catégorie.

Les liposomes cationiques peuvent interagir avec les molécules d'ADN de plusieurs manières. Le modèle le plus largement accepté pour représenter les complexes formés entre les liposomes cationique et l'ADN est le modèle présenté à la Figure 4A . Il rappelle le modèle proposé en 1989 par Felgner et Ringold qui propose que les forces électrostatiques sont responsables du succès de l'interaction entre l'ADN et les lipides, et qu'elles facilitent le contact des complexes formés avec la surface des cellules. Felgner et Ringold montrèrent que puisque leurs liposomes ont un diamètre de ~250 nm et qu'ils contiennent chacun 1250 molécules de lipide cationique (DOTMA) en plus du lipide neutre, la neutralisation des charges négatives d'un plasmide standard de 2500 pb requiert la liaison à quatre liposomes (figure 4a). On peut cependant réviser leur modèle en admettant la possibilité que les lipides cationiques se répartissent dans les couches lipidiques internes et externes, et en distinguant les structures de l'ADN sous forme de plasmide et sous forme linéaire. Si l'on considère la structure d'un plasmide superenroulé dont les caractéristiques spatiales ont été déterminées par Boles *et al.* (1990), le modèle précédent devrait être remplacé par celui représenté aux figures 4b et 4c. Ces figures représentent un plasmide de 2500 pb sous une conformation superenroulée dont la taille est comparée à celle d'un liposome de 250 nm de diamètre (4b), et montre la manière dont le



**Figure 5.** Mécanismes possibles d'interaction entre la surface cellulaire et les liposomes.

L'endocytose d'un liposome multilamellaire (ou unilamellaire) est suivie par la fusion de la vacuole d'endocytose contenant le liposome avec un lysosome (LYS). Les phospholipases lysosomiales ou d'autres facteurs disruptent les bicouches lipidiques des liposomes. La fusion d'un liposome unilamellaire avec la membrane plasmique est suivie par l'entrée de son contenu dans le cytoplasme. Des agents incorporés dans la bicouche lipidique du liposome sont transférées dans la membrane de cellule d'où ils pourront être par la suite internalisés durant le processus de phagocytose, et interagir alors avec d'autres organites cellulaires (ORG). La fusion d'un liposome multilamellaire avec la membrane plasmique se produit au niveau de la bicouche la plus externe du liposome, et permet l'entrée dans le cytoplasme des bicouches sphériques lipidiques plus internes. L'adsorption d'un liposome multilamellaire ou unilamellaire sur la surface de la cellule peut n'avoir aucune conséquence, ou induire des changements au niveau de la perméabilité des membranes liposomale et plasmique. (Gregoriadis; Drug Carriers in Biology and Medicine; Academic Press 1979; p. 307)



plasmide pourrait interagir avec le liposome.

La nature du ou des lipides cationiques employés pour complexer l'ADN, les rapports de concentration lipide/ADN, la stabilité des complexes ADN-lipide et le temps d'incubation choisi, le type de cellules transfectées, ainsi que l'efficacité du passage de l'ADN dans la cellule et le noyau, se sont avérés être des paramètres importants qui font varier l'efficacité de la transfection.

En fait, les paramètres décrits ci-dessus ne font que refléter les propriétés des interactions existant entre les lipides, l'ADN exogène et les différents types cellulaires. Comme le soulignent J. G. Smith *et al.* (1993), ces variables peuvent également être mises en relation avec quatre phases qu'il convient de distinguer au cours du processus d'incorporation de l'ADN étranger à l'intérieur d'une cellule:

- 1). la formation de complexes entre l'ADN et le vecteur;
- 2). l'association de ces complexes avec la membrane plasmique;
- 3). l'acheminement de l'ADN intact jusqu'au noyau;
- 4). la transcription à long ou court terme du gène transfecté.

Aujourd'hui encore, il s'avère que le manque de données exactes disponibles concernant les réelles interactions entre l'ADN et les liposomes, ainsi que le manque de renseignements relatifs aux mécanismes qu'emploient ces complexes pour permettre le passage de l'ADN à travers une membrane biologique, freinent fortement les progrès futurs à réaliser dans ce domaine.

### c) La capture cellulaire des complexes ADN-liposomes:

On peut concevoir trois modèles pour représenter l'interaction des liposomes avec la membrane plasmique (Figure 5). L'un propose que les liposomes fusionnent directement avec la membrane plasmique (Felgner *et al.*, 1987). L'autre envisage le transfert des complexes "ADN-liposomes" à travers la membrane plasmique vers le cytosol, et la migration des complexes jusqu'au noyau (Bertling *et al.*, 1991). Enfin, le dernier modèle fait intervenir le processus d'endocytose dans une étape "d'internalisation" des liposomes, et propose que ces derniers interagiraient avec la membrane endosomale pour permettre la sortie de la molécule d'ADN vers le cytosol



(Pinnaduwege et al., 1989; Leventis et Silvius, 1990; Legendre et Szoka, 1992; Zhou et Huang, 1994; Wrobel et Collins, 1995).

En ce qui concerne en particulier les liposomes cationiques, il est généralement admis que l'endocytose est le processus de capture impliqué. Pour illustrer ce fait, sont décrits ci-dessous quelques résultats récents qui prouvent que l'endocytose est bien la voie de capture de complexes formés entre l'ADN et des lipides cationiques.

Au moyen des techniques de centrifugation différentielle et isopycniqque, Wattiaux *et al.* (1995) observent un transfert progressif des complexes formés entre l'ADN et un lipide cationique (le DOTAP) depuis de petites vésicules: pinosomes jusqu'à de plus grandes structures membranaires: endosomes et lysosomes. Leur résultats concordent exactement avec le modèle de l'endocytose. Friend *et al.* (1996) montrent en microscopie électronique que plusieurs types de cellules eucaryotes traitées avec des complexes ADN-DOTMA endocytent ces complexes dans des vésicules recouvertes. Egalement en microscopie électronique, Zabner *et al.* (1995) mettent en évidence le processus d'endocytose de complexes formés entre un plasmide couplé à des billes d'or et des lipides cationiques. Des techniques consistant à inhiber le processus d'endocytose sont utilisées pour mettre en évidence ce phénomène. Farhood *et al.* (1995) emploie la chloroquine pour inhiber la capture de liposomes cationiques. Cette substance est un agent connu pour interférer avec l'endocytose en augmentant (neutralisant) le pH endosomal et lysosomal (Mellman *et al.*, 1986). Wrobel et Collins (1995) montrent l'implication d'un processus d'endocytose dans la capture de complexes "ADN-lipides cationiques" en inhibant cette capture, soit en milieu hypertonique, soit en privant la cellule d'ATP.

L'effet des liposomes cationiques sur la déstabilisation de membranes endosomales reste incertain. La dioléoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) -souvent employée avec les lipides cationiques pour former des liposomes- possède la propriété d'être fusogénique, et pourrait interagir avec la membrane des endosomes (Zhou et Huang, 1994; Huang et al., 1995). On a néanmoins montré que des liposomes cationiques pouvaient permettre la sortie de l'ADN exogène hors des endosomes, ou des lysosomes, sans l'aide du DOPE (Behr et al., 1989; Ito et al., 1990). Des liposomes sensibles à un pH acide sont aussi à l'étude. Ils induisent la fusion des liposomes avec

la membrane des organites dont le pH interne est acide (endosomes, lysosomes). Ces lipides peuvent être anioniques (Horwitz et al., 1980), ou cationiques (Budker et al., 1996).

## II. Endocytose et trafic intracellulaire.

### *II.1. Les échanges entre la cellule et son environnement.*

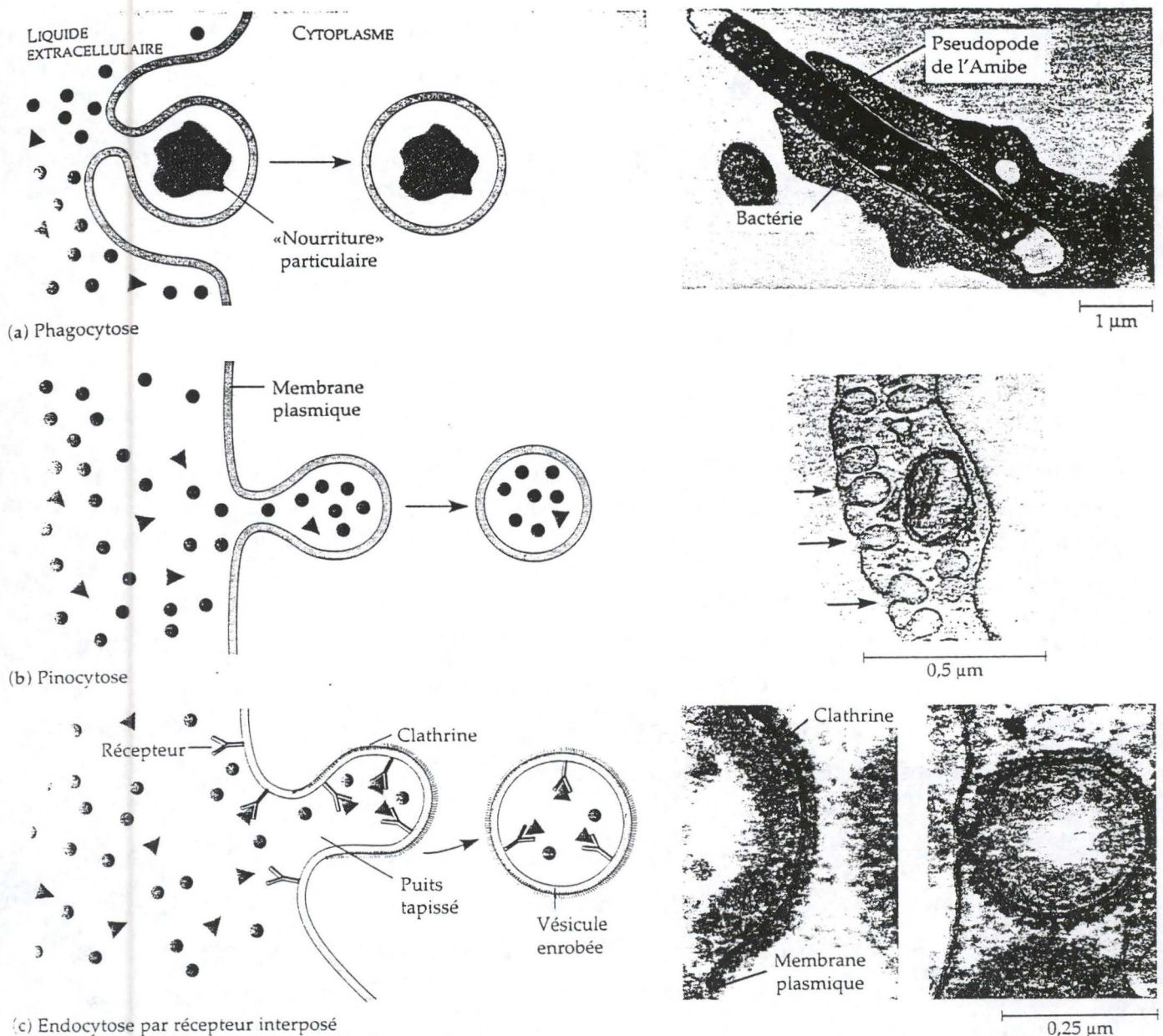
La cellule, au niveau de la membrane plasmique, est en relation étroite avec le milieu extérieur qui lui fournit les substances indispensables à ses fonctions, ainsi que des molécules "signal" capables de déclencher des réponses diverses.

Si certaines de ces substances extracellulaires suffisamment lipophiles peuvent franchir la "barrière" que constitue la membrane plasmique par simple diffusion, il en va tout autrement en ce qui concerne les ions, les substances relativement polaires, les macromolécules et les particules pour lesquelles la bicouche lipidique de la membrane plasmique constitue un obstacle infranchissable.

Pour contourner cet obstacle, les cellules ont mis au point des systèmes capables de faire passer à l'intérieur de la cellule les substances citées ci-dessus. Ainsi, des protéines formant des **canaux** transmembranaires permettent le passage de petites substances polaires selon leur gradient de concentration, des "**pompes**" consommant de l'énergie (sous la forme d'ATP) peuvent faire migrer de petites molécules dans le sens opposé à celui défini par leur gradient de concentration, et enfin des processus nommés **endocytose** et **phagocytose**, permettent aux cellules de capter des macromolécules et des particules.

Reconnus aujourd'hui comme étant fondamentalement différents, les mécanismes d'endocytose et de phagocytose ont tous deux pour but "d'internaliser" des macromolécules et des particules à partir du milieu ambiant. Le terme d'endocytose reste néanmoins largement utilisé pour désigner le phénomène tout à fait général de capture cellulaire.





**Figure 6.** *Différents types d'endocytose.*

(a) Dans la phagocytose, des pseudopodes encerclent une particule et l'enveloppent dans une vacuole. La micrographie électronique montre une Amibe ingérant une Bactérie. (b) Dans la pinocytose, des gouttelettes de liquide extracellulaire sont incorporées à la cellule dans de petites vésicules. La micrographie électronique montre des vésicules (flèches) en cours de formation dans une cellule de l'épithélium d'un capillaire, un petit vaisseau sanguin. (c) Dans l'endocytose par récepteur, des puits tapissés forment des vésicules lorsque certaines molécules se lient aux récepteurs situés sur la surface de la cellule. Une protéine fibreuse appelée clathrine renforce la face cytoplasmique des puits tapissés. Les micrographie électronique montrent deux stades successifs de l'endocytose par récepteur interposé. (Campbell; Biology; De Boek 1995)

## II.2. L'endocytose.

### a) On distingue différents modes d'endocytose:

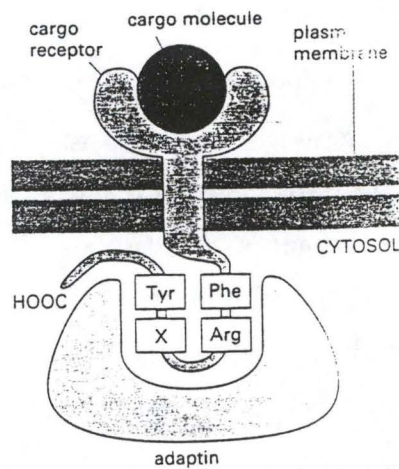
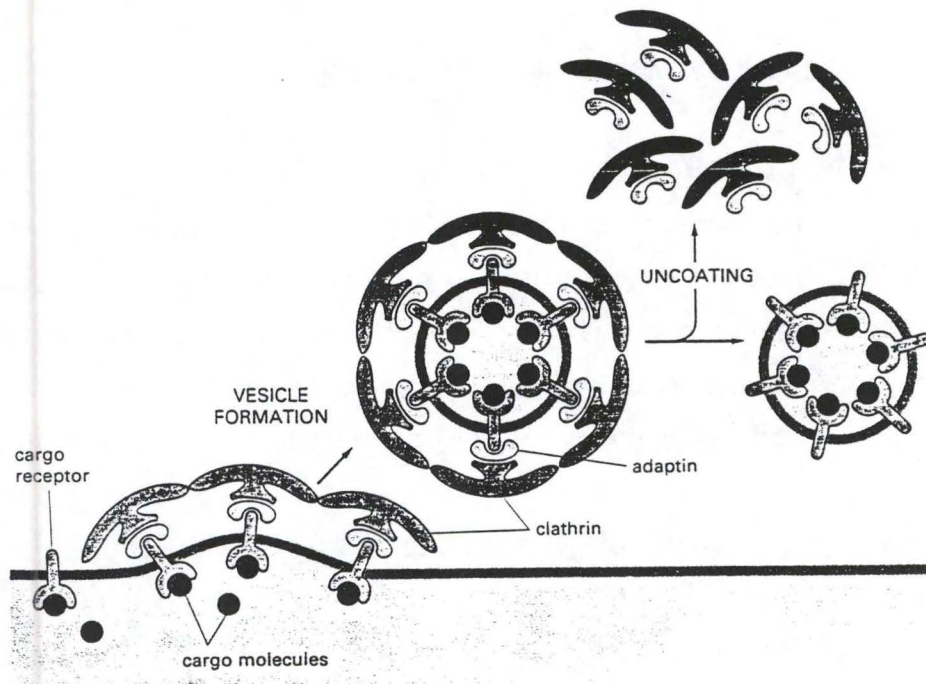
On parle souvent d'endocytose pour désigner le phénomène général de capture cellulaire; mais il convient néanmoins de distinguer en son sein les processus particuliers de phagocytose, de pinocytose fluide, et d'endocytose adsorptive médiée ou non par des récepteurs membranaires (Figure 6). Pour être effective, l'endocytose nécessite de l'énergie fournie habituellement par l'hydrolyse de l'ATP; la présence de calcium dans le liquide extracellulaire, et des éléments du cytosquelette dans la cellule.

La **pinocytose fluide** est définie comme étant un mode de capture non spécifique des liquides extracellulaires. C'est un processus constitutif qui se déroule à la surface de la plupart des cellules, et grâce auquel celles-ci isolent dans de petites vésicules cytoplasmiques des gouttelettes de liquide extracellulaire. Tout soluté du milieu extracellulaire est incorporé proportionnellement à sa concentration dans ce milieu.

L'**endocytose adsorptive** (ou parfois encore appelée "pinocytose adsorptive" par certains auteurs) a lieu lorsque la substance est internalisée après une étape d'adsorption au site de liaison inséré dans la membrane plasmique. Elle peut ou non être médiée par des récepteurs spécifiques. L'endocytose adsorptive non médiée par récepteurs est due à un grand nombre de sites de faible affinité présents à la surface cellulaire. Au cours de ce processus, une petite zone de la membrane plasmique s'invagine au point de former une nouvelle vésicule intracellulaire bordée d'une membrane et atteignant plus ou moins 0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre.

L'endocytose adsorptive médiée par des récepteurs spécifiques joue un rôle important dans la régulation et la nutrition. Ce type d'endocytose se distingue par le fait que la liaison de la substance aux protéines réceptrices membranaires est un phénomène spécifique et saturable. Il se distingue également parce que les ligands forment des complexes avec les récepteurs auxquels ils se fixent, et que ces derniers se rassemblent dans des régions particulières appelées puits recouverts (voir plus loin). On peut également ajouter que "l'internalisation" est plus rapide dans ce cas (quelques secondes à quelques minutes) et qu'elle est efficace même lorsque le ligand





**Figure 7.** *Transport sélectif médié par les vésicules recouvertes de clathrine.*

(a) Les adaptines se lient aux triskélions de clathrine et aux récepteurs membranaires.  
 (b) Les diverses protéines réceptrices de la membrane plasmique qui sont endocytées dans des vésicules recouvertes de clathrine porteraient ce signal, qui est reconnu par les adaptines. Les acides aminés montrés forment une partie essentielle du signal. (Molecular biology of the Cell, Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts and Watson, 3d edition 1994, Garland, New York and London)

se trouve en faible concentration.

Les matériaux parvenus dans la cellule par endocytose ou phagocytose peuvent être secrétés dans le milieu même où ils ont été prélevés, ou bien (dans certains types cellulaires et avec certains ligands) ils peuvent être transportés à travers la cellule et secrétés du côté opposé par un processus appelé transcytose. Cependant, les matériaux ingérés sont d'habitude dirigés vers les lysosomes pour y être dégradés.

#### b) Processus dynamique de l'endocytose:

La première étape dans le processus d'endocytose adsorptive se caractérise par la fixation, spécifique ou non, sur la membrane plasmique d'une molécule destinée à être ingérée. Des régions spécialisées de la membrane plasmique sont le centre de formation des vésicules d'endocytose; elles sont pourvues du côté cytoplasmique de **clathrine**, et d'autres protéines associées nommées **adaptines** (voir figure 7).

Cette couverture protéique ("coat") est essentiellement constituée de triskélions de clathrine, qui sont eux-mêmes formés de trois chaînes lourdes de 180 kDaltons et de trois chaînes légères intimement associées de ~30kD. Les adaptines sont des hétérotétramères composés de deux molécules de ~100-110 kD, et de deux unités plus petites de 47-50 et 17-19 kD (revu par Pearse et Robinson, 1990).

Ces régions spécialisées dont il vient d'être question forment, de par leur couverture protéique, ce que l'on appelle des **puits recouverts** ("coated pits"), pouvant s'invaginer et donner naissance sur la face cytoplasmique de la membrane à des **vésicules recouvertes** ("coated vesicles"). Ces petits organites perdent ensuite leur manteau de clathrine et sont dès lors appelés **endosomes**. Les vésicules recouvertes possèdent une membrane dont la composition est semblable à celle de la membrane plasmique dont elles sont issues.



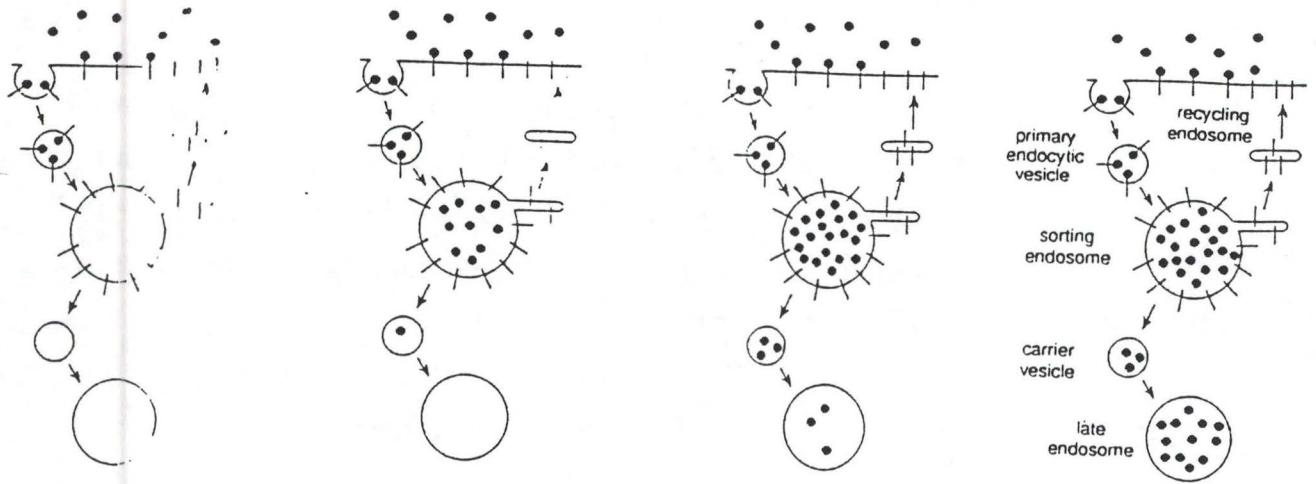
### c) Endosomes précoces et tardifs:

Helenius *et al.*, en 1983, mirent en évidence deux types d'endosomes: d'une part les **endosomes précoces** ("early") ou périphériques, et d'autre part les **endosomes tardifs** ("late") localisés dans la région du Golgi et des lysosomes. Ces derniers, plus larges, peuvent être sphériques, ou formés de structures tubulaires. Marsh *et al.* (1987) ont déterminé le pH intra-endosomal en utilisant des sondes fluorescentes sensibles aux variations de pH; il s'avéra que les endosomes précoces sont moins acides (pH 6,0-6,2) que les endosomes tardifs (pH 5,5-6,0) et que les lysosomes (pH < 5).

La composition membranaire de ces deux types d'endosomes confirme leur rôle et leur localisation. Par exemple, les endosomes précoces localisés près de la membrane plasmique possèdent certains composants protéiques identiques à celle-ci (Evans et Hardison, 1985), tandis que les endosomes tardifs ont une composition protéique nettement différente. Beaucoup de "GTP-binding proteins" ont été mises en évidence au niveau de la membrane des endosomes, par exemple: rab 5 intervient dans la régulation de la fusion homotypique impliquant les endosomes précoces (Gorvel *et al.*, 1991; Bucci *et al.*, 1992); rab 4 intervient dans le recyclage des récepteurs depuis les endosomes précoces vers la membrane plasmique (Van der Sluijs *et al.*, 1992); rab 9 est localisée principalement à la surface des endosomes tardifs et facilite le transport des récepteurs au mannose-6 phosphate depuis ces endosomes vers le "trans Golgi network" (Lombardi *et al.*, 1993).

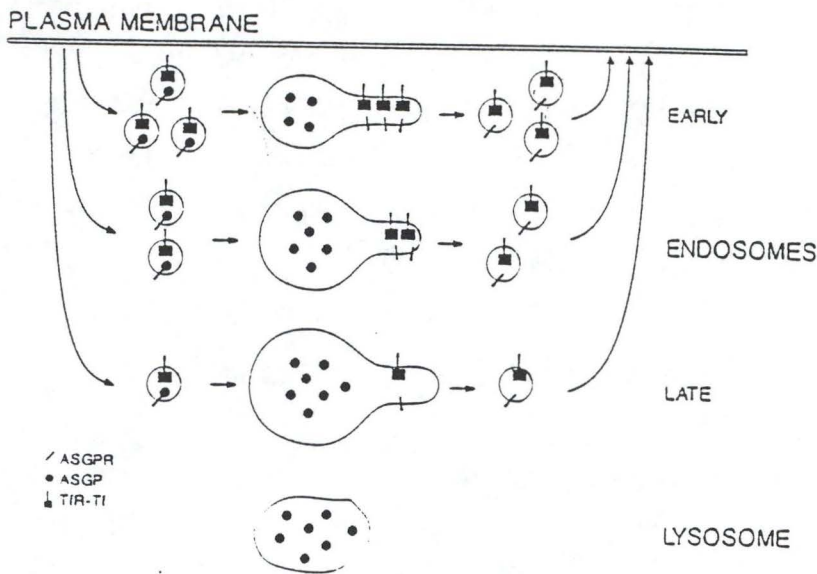
### e) Hypothèse d'une maturation des endosomes:

Les mécanismes par lesquels les molécules endocytées sont transportées depuis les endosomes précoces jusqu'aux endosomes tardifs et finalement aux lysosomes n'ont pas été entièrement élucidés. On a pu montrer que les substances endocytées destinées à être dégradées dans le compartiment lysosomal passent d'abord les endosomes précoces juste après leur capture. On sait également que les hydrolases lysosomales néosynthétisées sont amenées depuis le Golgi aux endosomes tardifs. Enfin, de nombreux phénomènes de fusion ont été observés *in vitro* entre endosomes précoces isolés (Gruenberg et Howell, 1986, 1989; Braell, 1987; Diaz *et*



**Figure 8.** Schéma présentant le modèle des compartiment endosomaux préexistants.

Dans ce modèle, les ligands s'accumulent dans des endosomes de triage jusqu'à ce que les taux du flux de ligand rentrant et sortant de ces endosomes soient égaux. (Dunn et al., 1992)



**Figure 9.** Maturation des endosomes.

Les vésicules d'endocytose formées au niveau de la membrane plasmique et contenant TfR et ASGPR, fusionnent tous les endosomes mais particulièrement avec les précoces (early). De la même façon, le transport vésiculaire au départ d'endosomes relativement plus tardifs vers la membrane est moins actif que celui se faisant au départ des endosomes précoces. ASGP est découplé de son récepteur et retenu dans l'endosome, tandis que Tf lié à son récepteur est recyclé vers la membrane plasmique au moyen des mêmes vésicules que pour le ASGPR (Stoorvogel *et al.*, 1989). Cela se produit jusqu'à ce que les endosomes précoces aient mûri en endosomes tardifs. (Stoorvogel *et al.*, 1991)



*al.*, 1988), et entre compartiments endosomaux de cellules intactes (Salzman et Maxfield, 1988, 1989; Dunn *et al.*, 1989).

Deux modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer le trafic intracellulaire d'une molécule endocytée (voir figures 8 et 9). Le premier affirme que les endosomes précoces et tardifs sont des compartiments préexistants qui communiquent via des échanges vésiculaires, indépendamment du trafic membranaire s'établissant entre la membrane plasmique et les endosomes précoces (Gruenberg *et al.*, 1989). L'inhibition du transport de matériel endocyté vers les endosomes tardifs à 18°C (Salzman et Maxfield, 1989), ainsi que l'inhibition du transfert vers ces derniers endosomes par le nocodazole, agent dépolymérisateur des microtubules, (Gruenberg *et al.*, 1989) sont en faveur de cette hypothèse. Le second modèle implique la transformation progressive des vésicules endosomales précoces en lysosomes. Il s'agit de l'hypothèse de la maturation graduelle des endosomes. Lors de ce processus, les échanges vésiculaires entre la membrane plasmique et les endosomes diminuerait peu à peu durant la transformation de ceux-ci en lysosomes acides et contenant des hydrolases. La maturation résulterait d'un apport d'hydrolases acides vers les endosomes, qu'elles proviennent du "trans Golgi Network" ou de lysosomes préexistants. Ce phénomène est en accord avec les études *ex vivo* démontrant qu'au cours du temps les endosomes sont de moins en moins fusogènes (Braell, 1987; Diaz *et al.*, 1988). Ce modèle soutenu par les travaux de Stoorvogel *et al.* (1989 et 1991) se base également sur l'observation que les endosomes, vacuoles au départ bien distinctes des lysosomes, ont une densité qui augmente progressivement avec le temps pour finalement atteindre celle des lysosomes. Les travaux de Dunn *et al.* en 1992 rejoignent également ce modèle de la maturation endosomale. Leurs résultats montrent en effet que les endosomes retiennent et accumulent des ligands destinés à être digérés dans les lysosomes, jusqu'à ce qu'ils perdent leur capacité de fusionner avec les vésicules endosomales néoformées. De plus, ils mettent en évidence que de nouvelles vésicules endosomales sont continuellement formées pour remplacer celles qui sont devenues des endosomes tardifs et des lysosomes au terme de la maturation.

#### ***1.4. La phagocytose.***

La phagocytose est le processus particulier de l'endocytose par lequel les

cellules "internalisent" de larges particules destinées à être dégradées par des hydrolases acides dans un compartiment phagolysosomal. Des cellules spécialisées appartenant aux familles des polymorphonucléaires et des monocytes, comme les neutrophiles et les macrophages, réalisent de façon prédominante la phagocytose.

On distingue généralement trois étapes dans le processus de phagocytose:

1. La particule (bactérie, virus ou autre particule de grande taille) s'attache à la surface cellulaire, via une interaction spécifique médiée par des **récepteurs**.
2. La membrane plasmique englobe petit à petit la particule, et forme autour d'elle une enveloppe membranaire qui se détache du côté cytoplasmique pour donner naissance à un **phagosome**.
3. Il se forme un **phagolysosome** dans lequel la dégradation de la particule phagocytée a lieu (Siverstein *et al.*, 1989).

Récemment, une hypothèse postulant qu'il y aurait **maturation** des phagosomes a été avancée par A. Pitt *et al.* (1992) et C. de Chastelier *et al.* (1995).

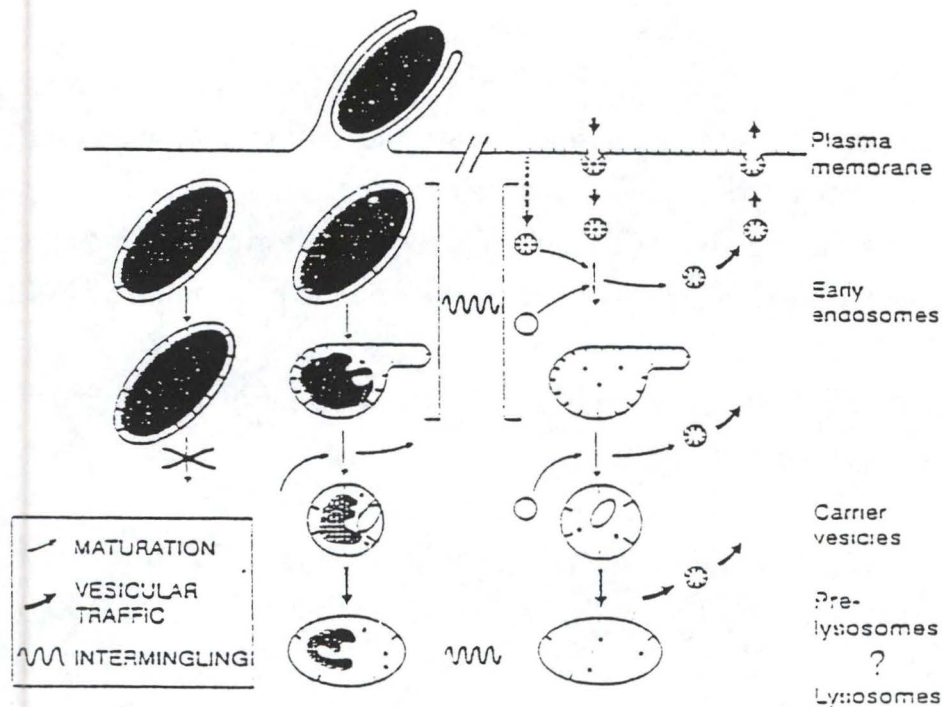
Précédemment, avaient déjà été mis en évidence avant la formation du phagolysosome:

- Un apport aux phagosomes en hydrolases provenant du Golgi ou d'endosomes tardifs (Blum *et al.*, 1991);
- Un abaissement progressif du pH de ces derniers se produisait avant la formation du phagolysosome (Geisow *et al.*, 1981).

Selon Pitt (1992) et de Chastelier (1995), des phénomènes de fusion pourraient se produire entre phagosomes et endosomes avant que ne s'effectue le transfert du contenu phagosomal, prédigéré ou non, vers les lysosomes. La fusion entre phagosomes et endosomes tardifs fut observée par Rabinowitz en 1992, et plusieurs chercheurs montrèrent que des fusions étaient possibles entre phagosomes et endosomes précoces (Hart et Young, 1991; Mayorga *et al.*, 1991; Pitt *et al.*, 1992). Notons également qu'un recyclage membranaire est observé depuis les phagosomes vers la membrane plasmique (Muller *et al.*, 1980).

Bien que les phagosomes puissent acquérir des enzymes lysosomales, certains travaux mettent néanmoins en évidence que les phagosomes peuvent fusionner avec





**Figure 10.** *Maturation des phagosomes.*

Après l'internalisation, les phagosomes deviennent une partie de la population des endosomes précoces. Les endosomes précoces, incluant à présent les phagosomes nouvellement formés, évoluent en "carrier vesicles" qui perdent leur capacité de fusionner avec les endosomes et phagosomes se formant par la suite. Ces "carrier vesicles" vont délivrer leur contenu aux lysosomes par l'intermédiaire de vésicules de transport, après la période typique d'incubation de 5 minutes requise pour que les endosomes maturent. Si la particule phagocytée résiste à la dégradation, le phagosome ne pourra pas devenir mature et gardera les caractéristiques des endosomes précoces. Les phagosomes non matures ne fusionnent pas avec les lysosomes secondaires. Néanmoins, ils accumuleront des constituants lysosomaux qui arrivent dans la voie endocyttaire via les endosomes précoces. (de Chastellier *et al.*, 1995)

les lysosomes interviennent indirectement dans la digestion, en fournissant les hydrolases aux phagosomes (Wattiaux *et al.*, 1996). Rappelons que ces enzymes digestives peuvent également être amenées aux phagosomes par fusion avec les endosomes.

La biogenèse des phagolysosomes apparaîtrait donc comme étant un processus dynamique régulé par l'apparition et la disparition séquentielle de protéines clés (comme des GTPases), et impliquant des phénomènes de fusion multiples entre le phagosome et les endosomes (identifiés grâce aux protéines membranaires Rab 5 et Rab 7) ainsi qu'entre les phagosomes et les lysosomes. C. de Chastelier (1995) montre par ailleurs qu'aussi longtemps que les particules phagocytées restent intactes, les phagosomes restent capables de fusionner avec les endosomes précoces. Ceci est particulièrement bien observé lors d'expériences au cours desquelles des particules qui ne peuvent être digérées (billes de latex par exemple) sont phagocytées par les cellules. Dans ce cas, les phagosomes ne mûrissent pas en (phago)-lysosomes et, restant fusogéniques, continuent à mélanger leur contenu et membrane avec les endosomes précoces néoformés (les endosomes précoces restent fusogéniques pendant plus ou moins 3 minutes après leur formation (Dunn *et al.*, 1992; Thilo *et al.*, 1995). Cependant, on montre que les membranes des phagosomes contenant des billes de latex acquièrent malgré tout les protéines membranaires lysosomales Lamp-1 et Lamp-2 (également associées à la membrane des endosomes tardifs), et perdent quelques protéines caractéristiques des endosomes précoces (Rab 5) (Desjardins *et al.*, 1994).

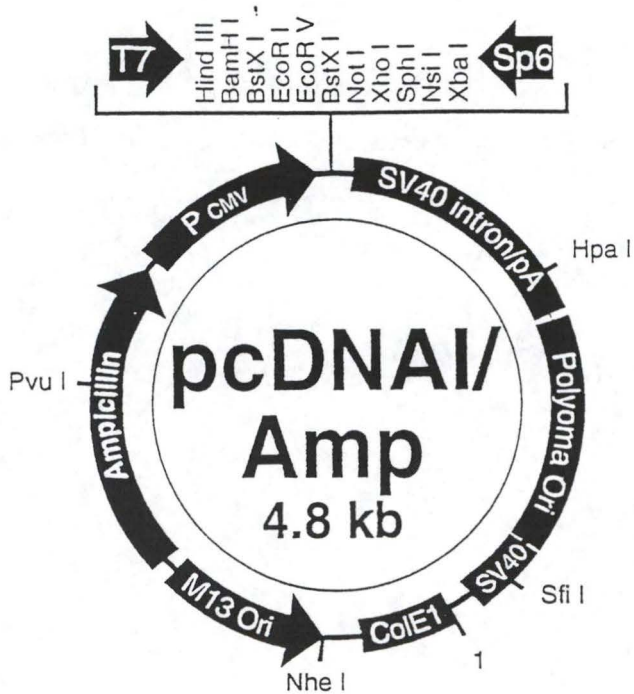
Plus généralement, la formation des phagolysosomes, quel que soit leur contenu, implique l'acquisition graduelle et régulée de marqueurs protéiques provenant d'organites appartenant à la voie endocytaire. Parmi elles citons des membres de la famille des Rab protéines, qui sont des "GTP-binding proteins" connues pour avoir un rôle dans les processus de fusion (Pfeffer 1992; Zerial et Stenmark, 1993). On trouve également les protéines Lamp situées entre autre dans la membrane des endosomes tardifs (Kornfeld et Mellman, 1989).

M. Desjardins (1995) a proposé récemment un modèle dans lequel les interactions entre phagosomes et endosomes sont représentées par une fusion momentanée entre ces organites, suivie d'une fission rapide. De tels mécanismes



avaient déjà été avancés pour expliquer les interactions dynamiques entre endosomes précoces et tardifs (Gruenberg *et al.*, 1989; Gruenberg et Clague, 1992). Ils permettent de rendre compte, dans le cas des interactions entre phagosomes et endosomes, de mélanges rapides entre contenus vésiculaires, tandis que la diffusion des protéines membranaires reste limitée.

La figure 10 tente de synthétiser les données actuelles concernant les différentes étapes de la phagocytose, les interactions entre les voies endocytaires et phagocytaires durant la maturation des phagosomes, ainsi que les points d'interrogation restant encore à élucider.



Col E1 origin: bases 1-587  
 M13 origin: bases 588-1180  
 Ampicillin gene: bases 1360-2303  
 CMV promoter: bases 2304-2954  
 T7 primer sequence: bases 2938-2957  
 Polylinker: bases 2956-3074  
 Sp6 primer sequence: bases 3075-3093  
 Splice and PolyA: bases 3094-3792  
 Polyoma origin - bases 3798-4693  
 SV40 origin - bases 4634-4797

*Structure et caractéristiques du plasmide pcDNA 1/Amp de 4801pb. (Invitrogen coporation)*



# Matériel et méthodes

## I. Marquage radioactif d'ADN plasmidique au moyen de la réaction de nick translation.

La technique de "nick translation" a été retenue pour marquer radioactivement le vecteur d'expression eucaryotique, le **pcDNAI/Amp**. Ce plasmide de 4801 pb, fourni par la firme Invitrogen (Abington, U.K.), est un vecteur multifonctionnel destiné à être utilisé pour exprimer du cDNA dans des cellules eucaryotes. Il contient entre autre un promoteur CMV et un "enhancer", ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. La figure 11 montre le pcDNAI/Amp avec ses principaux attributs.

### *I. 1. Préparation du plasmide pcDNAI/Amp.*

Le plasmide est extrait d'une culture bactérienne (DH5 $\alpha$ ), qui a été transformée en présence du pcDNAI/Amp, soit par choc thermique soit par électroporation. Les bactéries transformées sont mises en culture dans du milieu 2XYT auquel on a préalablement ajouté de l'ampicilline (50  $\mu$ g par ml). Après avoir passé une nuit à 37°C dans une étuve à agitation, les milieux de culture sont centrifugés à froid (4°C) durant 10 minutes à 6000 tours par minute. On extrait ensuite le plasmide, soit en utilisant le kit PC500 Nucleobond AX (Macherey-Nagel), soit en utilisant le protocole plus efficace d'extraction/purification de plasmides décrit par Maniatis *et al.* (Molecular cloning, second edition, 1989) et auquel nous apportons deux modifications. Premièrement, on resuspend les culots obtenus après traitement à l'isopropanol dans une solution TE (10 mM Tris/1 mM EDTA; pH 7,4), mais sans les sécher auparavant. Deuxièmement, la RNase est ajoutée après et non avant l'étape de précipitation. Une lecture au spectrophotomètre (A<sub>260</sub>) permet de connaître la concentration du plasmide extrait (lecture sur 5 $\mu$ l dilué 200 fois).

### *I. 2. Réaction de nick translation.*

La réaction de marquage radioactif par "nick translation" est réalisée en suivant les indications prescrites dans le kit N5500 de la firme Amersham auxquels on apporte quelques changements (en gras).

### Ingrédients:

- 10 µl d'une mixture dNTP (moins le dATP-S<sup>35</sup>),
- 10 µl d'un tampon 10x (0,5M Tris HCL pH 7,5; **0,1M MgSO<sub>4</sub>**; **1mM DTT**; **500 µg/ml BSA -fraction V, Sigma-**),
- **10 µg de ADN** (au lieu de 1 µg),
- 2 µl de mixture enzymatique (10pg/µl de DNaseI dans du Tris/HCl pH 7,5, MgCl<sub>2</sub>; 0,5 unités/µl de DNA polymerase I),
- **2 µl de ADN polymerase I**,
- 5 µl de dATP-<sup>35</sup>S.
- 61 µl d'eau.

La réaction de "nick translation" utilise la capacité que possède l'ADN Polymerase I (provenant de bactéries *Escherichia coli*) d'allier les activités de polymérase dans le sens 5'-3', et d'exonucléase dans la même direction. Ainsi, des nucléotides sont ajoutés séquentiellement à la terminaison 3' des "trous" ("nick") réalisés par la désoxyribonucléase I pancréatique dans le duplex d'ADN, tandis que d'autres nucléotides sont extraits de la terminaison 5' adjacente.

On incube le mélange réactionnel à 15°C pendant 2 heures. La réaction est alors arrêtée en ajoutant 4 µl d'EDTA 0,5M pH 8 et l'ADN est précipité à l'éthanol (100 µl d'acétate d'ammonium 4M pH 4,5 + 800 µl d'éthanol à 100% glacé). La précipitation est réalisée en laissant la préparation à -80°C durant au minimum une demi heure. Ensuite, on récupère le précipité après avoir centrifugé la préparation pendant 15 minutes en chambre froide. On ajoute au culot 800 µl d'une solution d'acétate d'ammonium 0,67 M/ pH 4,5 et contenant 67% d'éthanol, et on centrifuge à nouveau pendant 10 minutes. Le culot est additionné de 800 µl d'éthanol 90%, et le tout est centrifugé durant 5 minutes. On sèche alors le culot obtenu sous vide, et on le solubilise dans 200 µl d'une solution TE (10 mM Tris-1 mM EDTA) à pH 7,4. Un comptage est effectué en prenant 1 µl de l'ADN en solution; 2 µl sont utilisés pour une migration sur un gel d'agarose à 1,5 %, ce qui permet de contrôler la taille du plasmide. La piste d'agarose où l'ADN a migré est ensuite découpée en petits cubes d'un demi cm de côté et chaque bloc d'agarose est laissé durant 24 heures dans une fiole remplie d'aqualuma (Lumac LSC) pour permettre la diffusion de l'ADN hors de l'agarose. La radioactivité est ensuite estimée durant 10 minutes en plaçant les fioles dans un compteur Beckman LS.8000.



## II. Mise en culture des cellules A2058.

Les expériences de capture ont été réalisées sur des **cellules mélanocytaires métastatiques humaines** de la lignée A2058.

Ces cellules ont été maintenues en culture dans du "Minimum Essential Medium Eagle" (MEM) de la firme Sigma. On ajoute à ce milieu 3,3 gr par litre de  $\text{NaHCO}_3$ . Le MEM est également additionné de 10% de sérum de veau foetal (Gibco BRL) ainsi que de 10 ml d'une préparation d'antibiotique contenant 5 mg/ml de streptomycine sulfate (Sigma  $\Sigma 1501$ ) et 3,02 mg/ml de pénicilline (Sigma  $\Sigma$  PEN-NA). Les cellules sont ainsi mises en culture dans des boîtes de Petri "Nunclon" de 80  $\text{cm}^2$  placées dans une étuve maintenue à 37°C et contenant une atmosphère composée de 5% de  $\text{CO}_2$ .

Notons que nous nous sommes rendu compte, lors du maintien de nos cellules en culture, que ces dernières sont extrêmement exigeantes en ce qui concerne la **fraîcheur du milieu**. Ce dernier ne peut pas dépasser 10 jours d'âge.

En vue de réaliser les expériences de capture, les cellules, après être arrivées à confluence, sont transférées d'une ou plusieurs boîtes "Nunclon", de 80  $\text{cm}^2$ , dans des boîtes de Petri "Nunclon" de 100 mm de diamètre contenant le même milieu MEM additionné de  $\text{NaHCO}_3$ , de sérum et d'antibiotiques. Pour ce faire, les cellules de la boîte "Nunclon" de 80  $\text{cm}^2$  sont lavées une fois au moyen d'une solution de Hanks (composition pour un litre: 8g  $\text{NaCl}$ , 0,4g  $\text{KCl}$ , 0,06g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,06g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g glucose, 0,35g  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 7,5), puis détachées de leur support grâce à une solution saline de trypsine (trypsine 0,1%). Elles sont alors réparties, à la dilution voulue, dans les boîtes de culture contenant 10 ml de milieu complet.

### III. Réalisation d'une expérience de capture.

#### *III.1. Préparation des cellules.*

Pour réaliser une expérience de capture, six boîtes de culture sont préparées comme décrit ci-dessus. L'ensemencement est réalisé de façon telle qu'après 48 heures de culture à 37°C, les cellules soient à 70/80% de confluence. Les boîtes sont alors rincées deux fois avec du milieu MEM uniquement additionné de NaHCO<sub>3</sub>, (sans sérum ni antibiotiques). On ajoute ensuite à chaque boîte 5 ml de ce même milieu non complet additionné de 0,15 µg du plasmide marqué radioactivement complexé ou non à 0,75 µg d'un lipide cationique. Le complexe ADN-lipide est formé de la façon suivante: dans un tube eppendorf, on place 18,8 µl de la préparation finale de plasmide radiomarqué et la quantité voulue de lipide cationique (4,7 µl de DOTAP liposomal en dispersion aqueuse fourni par la firme Boehringer à la concentration de 1 µg/µl; ou 2,35 µl d'une des préparations deux fois plus concentrées contenant le TR2, TR4 ou TR8 et fournies dans le "perfect transfection kit" de la firme Invitrogen). Ce mélange est laissé durant 15 à 30 minutes à température ambiante avant d'être ajouté à 32 ml de milieu de culture dont 30 ml seront répartis entre 6 boîtes de Petri et 2 ml serviront à réaliser un comptage de la radioactivité totale.

Après le temps d'incubation souhaité pour l'expérience (voir légendes), les cellules sont lavées 5 fois au moyen d'une solution de Hanks glacée, détachées des boîtes de culture par grattage, et homogénéisées dans une solution glacée de saccharose 0,25M au moyen d'un homogénéiseur de Dounce (petit modèle; 7 ml) de type serrant. L'homogénéisation est suffisante (estimation visuelle au microscope à contraste de phase) après 30 à 40 passages du piston.

#### *III.2. Fractionnement de l'homogénat.*

L'homogénat est ensuite fractionné par **centrifugation différentielle**, cette technique permettant de séparer des structures subcellulaires selon leur coefficient de sédimentation qui est principalement fonction de leur taille. On centrifuge l'homogénat pendant 10 minutes à 600 ou 1500 tours par minute (voir légendes), à une température de 4°C, dans une centrifugeuse de type "International PR-2". On



obtient de cette manière un culot appelé fraction N (pour "Nuclear"), et un surnageant nommé fraction PNS (pour "Post Nuclear Supernatant").

Comme son nom l'indique, la **fraction N** est constituée essentiellement de noyaux, mais aussi de gros fragments cellulaires et de quelques cellules intactes ayant résisté à l'étape d'homogénéisation. La **fraction PNS** quant à elle contient le cytosol, ainsi que les divers organites -à l'exception du noyau- de la cellule. Le cytosol, qui est donc inclus dans la fraction PNS, peut être séparé des organites cellulaires en centrifugeant le PNS dans un rotor Beckman 50TI à 35 000 rpm pendant 40 minutes.

### *III.3. Séparation des structures subcellulaires selon leur densité.*

On sépare ensuite les différents types d'organites subcellulaires selon leur densité en utilisant la technique de **centrifugation isopycnique**. Cette technique consiste à laisser migrer les organites dans un champ centrifuge où ils traversent des zones de densité croissante, jusqu'à ce que leur progression s'arrête lorsque leur densité propre est identique à celle du milieu extérieur. Une partie de la fraction PNS est placée au sommet d'un gradient de densité en saccharose s'étendant depuis 1,30 g/ml (base du gradient) jusqu'à une densité de 1,05 g/ml (sommet du gradient). Les gradients sont préparés à partir de deux solutions de saccharose (4,1 ml de chaque solution), l'une ayant une densité de 1,05 g/ml et l'autre de 1,30 g/ml. Des tubes Beckman de type "Quick Seal" dans lesquels on a déposé 0,5 ml de Maxidens (1,9 g/ml) serviront à recueillir le gradient de saccharose à sa sortie du mélangeur. Après avoir déposé 0,5 ml de la fraction PNS au sommet du tube, celui-ci est scellé. La centrifugation est alors réalisée dans un rotor Beckman vertical VTI65, à 50 000rpm durant 3 heures à 4°C. Les fractions sont obtenues en sectionnant le tube contenant le gradient tous les 3 mm au moyen d'une lame horizontale aiguisée. En général, les fractions de deux gradients identiques sont récupérées dans un même tube, et leur densité est estimée en mesurant leur indice de réfraction. La concentration en saccharose est fournie par conversion de cette mesure en g/ml.

Dans certaines expériences, la radioactivité acido-soluble est mesurée. Pour cela l'échantillon est additionné d'un volume égal d'acide tetrachlorique (TCA) à 10%. La préparation est alors centrifugée pendant 10 minutes en chambre froide

(centrifugeuse "Microfuge E" Beckman), et le comptage de la radioactivité soluble est réalisé sur le surnageant.

### III.4. Méthode de dosage d'enzymes de référence.

L'activité enzymatique de différents enzymes de référence a été mesurée dans les fractions N et PNS et dans les fractions isolées par centrifugation isopycniqne. Chaque enzyme est supposé être spécifique de l'organite subcellulaire qui le contient, ce qui permet ainsi de suivre le comportement de ce dernier en centrifugation différentielle ou isopycniqne.

Le tableau présenté ci-dessous résume les conditions expérimentales employées pour doser ces enzymes et spécifie les références qui y sont associées.

Enzyme de référence	Organite associé	Substrat et pH	Méthode de mesure	Référence
<u>Cathepsine C</u>	Lysosomes	Glycyl-L-arginine- $\beta$ -naphtylamide. pH 5	Fluorimétrie ( $\beta$ -naphtylamine)	Jadot <i>et al.</i> . (1984)
<u><math>\alpha</math>-Mannosidase</u>	Lysosomes	Méthylumbelliferyl $\alpha$ -D Mannoside. pH 4,5	Fluorimétrie (Méthylumbelliférone)	Peters <i>et al.</i> . (1972)
<u><math>\beta</math>-Galactosidase</u>	Lysosomes	4-méthylumbelliféryl $\beta$ - Dgalactopyranoside. pH 4	Fluorimétrie (4-méthylumbelliférone)	Peters <i>et al.</i> . (1972)
<u>Phosphodiesterase alcaline</u>	Membrane plasmique	Thymidine 5'monophosphate p-nitrophényl-ester. pH 9,6	Colorimétrie (p-nitrophénol)	Beaufay <i>et al.</i> . (1974)
<u>Galactosyl transférase</u>	Golgi	UDP galactose C <sup>14</sup> . pH 6,2	Transfert de galactose C <sup>14</sup> sur ovalbumine	Beaufay <i>et al.</i> . (1974)



### ***III.5. Réalisation d'une courbe de capture.***

Pour réaliser l'expérience permettant la détermination d'une courbe de capture de l'ADN-S<sup>35</sup> en fonction du temps, les cellules sont repiquées 48 heures avant l'expérience et incubée avec les complexes formés entre l'ADN-S<sup>35</sup> et des liposomes cationiques comme décrit précédemment. Après une durée d'incubation déterminée (voir légendes), elles sont lavées 5 fois à l'aide de la solution de Hanks glacée, et sont lysées par incubation en présence de 3 ml d'une solution glacée de Triton X-100 à 0,5% pendant 15 minutes. Un comptage de la radioactivité contenue dans 200 µl de cette solution cellulaire est ensuite réalisé durant 10 minutes.

### ***III.6. Description des lipides cationiques utilisés pour complexer l'ADN.***

Quatre types de lipides cationiques (ou préparations de lipides cationiques) furent complexés au plasmide pcDNA I/Amp pour servir de médiateurs de capture par les cellules en culture. La formation des complexes lipide cationique-ADN est réalisé comme décrit précédemment.

Le premier lipide cationique utilisé fut le N-{1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl}N,N,N-triméthylammonium méthylsulfate, plus couramment appelé DOTAP (Boehringer, Mannheim, Germany). Trois autres préparations de lipides cationiques furent également testées; elles proviennent du "Perfect Transfection Kit" fourni par la firme Invitrogen (Abingdon, U.K.) et leur composition exacte n'est pas disponible. Ces lipides sont désignés par l'appellation TR, suivie par un chiffre qui est celui que l'on retrouve dans le catalogue du vendeur. La préparation TR4 est composée d'une mixture 1:1 de deux lipides cationiques, les préparations TR2 et TR8 sont quant à elles formées d'un seul lipide cationique.

## **IV. Couplage d'une asialoprotéine avec la tyramine-cellobiose marquée à l'iode (<sup>125</sup>I).**

Dans le but de suivre à titre de comparaison le cheminement intracellulaire d'une protéine endocytée, nous avons choisi d'utiliser une asialoprotéine, l'asialofétuine. Le couplage d'une molécule de tyramine cellobiose marquée à l'iode à

cette protéine permet de localiser l'organite où apparaissent les produits de dégradation. En effet, la tyramine cellobiose n'est pas en mesure de traverser la membrane lysosomale, à l'inverse des acides aminés. Cette particularité fut mise en évidence par Berg *et al.* en 1985.

Les méthodes que nous avons utilisées pour réaliser le couplage de l'asialofétuine à la tyramine cellobiose, ainsi que le marquage de cette dernière à l' $I^{125}$ , sont celles décrites par Pittman *et al.* (1983), et modifiées par Hysing et Tolleshaug (1986).



# Résultats

## I. Marquage radioactif par "nick translation" d'un vecteur d'expression eucaryotique plasmidique.

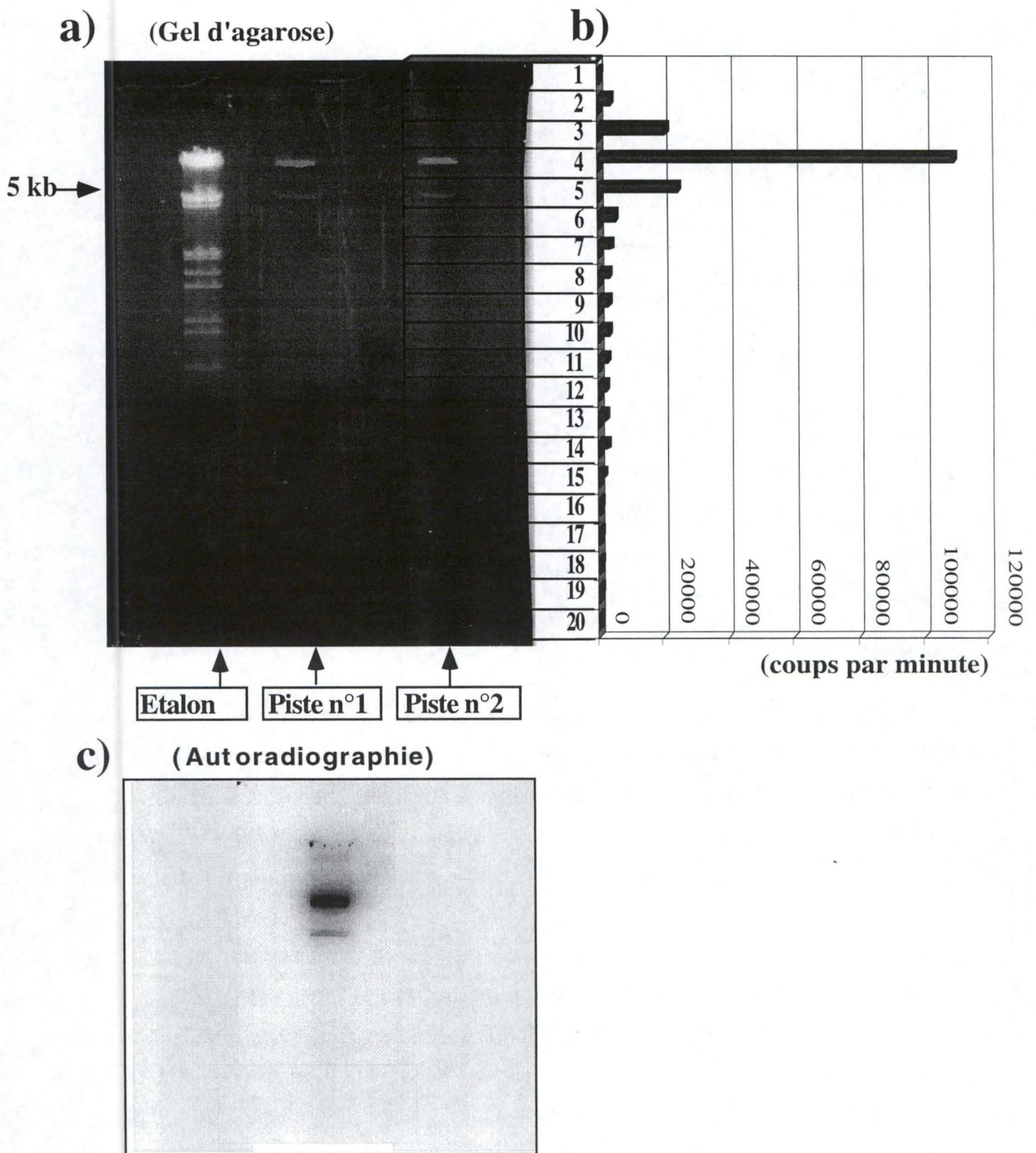
### *I.1. Choix de la technique de marquage.*

Dans le but d'étudier les différentes étapes conduisant à "l'internalisation" éventuelle d'un plasmide associé à un lipide cationique, nous avons choisi de marquer la molécule d'ADN radioactivement. Le plasmide que nous utilisons comme sonde radioactive est le pcDNA1/Amp de 4801 paires de base vendu par la firme Invitrogen. Il s'agit d'un vecteur multifonctionnel désigné, entre autre, pour l'expression de cDNA dans des systèmes eucaryotiques.

Le choix de la méthode de marquage demande une certaine attention si l'on veut pouvoir répondre à plusieurs exigences. L'efficacité du marquage doit être telle que le plasmide radioactif soit détectable en assez faible concentration. Le matériel marqué doit conserver une taille uniforme et égale à celle du plasmide de départ. Enfin, la récupération du produit radioactif doit être suffisamment importante et aisée.

Plusieurs tentatives de marquage ont été mises en oeuvre avant de trouver la méthode possédant les qualités requises. L'incorporation de dATP-S<sup>35</sup> par "nick translation" réalisée au moyen du kit N5500 de la firme Amersham, avait permis de marquer un plasmide utilisable lors d'expériences de transfection *in vivo* réalisées au laboratoire. Cependant, les produits de marquage obtenus par cette technique étaient hétérogènes du point de vue de leur taille. L'analyse de l'ADN ainsi marqué, par électrophorèse en gel d'agarose et également par chromatographie sur une colonne de Sephacryl S-500, révéla que la "sonde" radioactive était principalement composée de molécules d'ADN de 500 kD (Wattiaux *et al.*, 1995).

C'est une communication personnelle de A. Aleouaha, chercheur travaillant dans le laboratoire du professeur Ruyschaert (ULB), qui nous permit d'obtenir une méthode de marquage par "nick translation" appropriée à nos exigences. Il s'agit de



**Figure 11.** Estimation de la taille de la taille du plasmide marqué sur gel d'agarose.

a) Photographie du gel d'agarose sur laquelle sont visibles deux bandes après la migration du plasmide marqué par "nick translation". Trois pistes sont visibles sur la photographie: la première est celle de l'étalon, les deux autres sont celles où le plasmide marqué a migré. b) Graphique montrant la quantité (en coups par minute) de radioactivité répartie le long d'une piste de migration de l'ADN marqué. c) Autoradiographie du gel séché faisant apparaître les zones radioactives.



modifications apportées au kit de chez Amersham dont il a déjà été question. Celles-ci consistent à utiliser dans la réaction dix fois plus de plasmide non marqué et d'ajouter à la quantité prescrite dans le kit, dix unités supplémentaires d'ADN polymérase I. Ces deux changements permettent d'obtenir un plasmide radiomarqué dont la séquence nucléotidique est uniforme et dès lors de taille définie.

## *1.2. Réaction de nick translation et contrôles.*

Le marquage radioactif du plasmide pcDNAI/Amp fut donc réalisé par "nick translation" en utilisant le kit N5500 d'Amersham auquel on applique les modifications citées ci-dessus. Les détails de la réaction sont décrits dans le chapitre consacré aux méthodes.

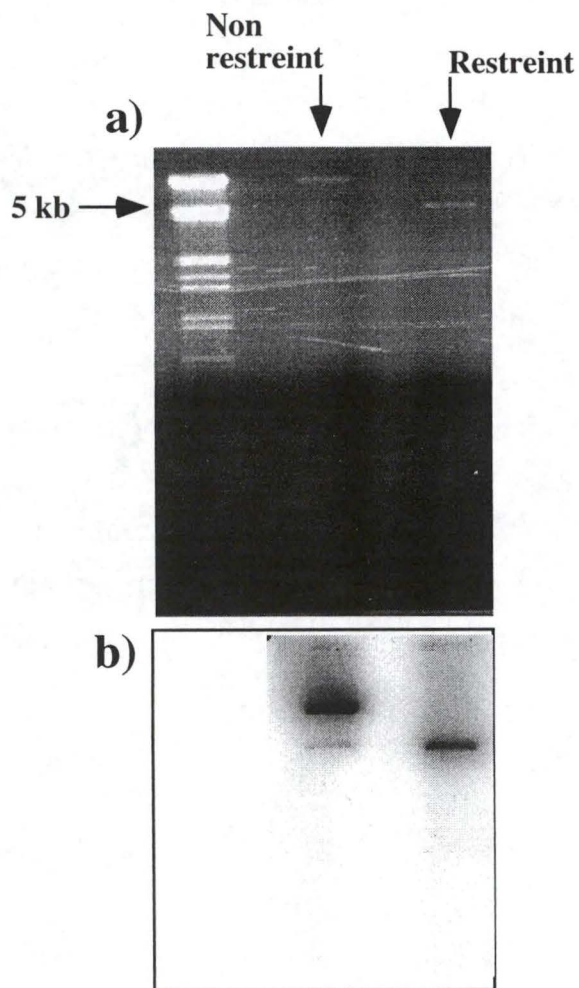
Pour vérifier si le produit marqué est toujours un plasmide de ~5 kb, et si le dATP radioactif a bien été incorporé dans la molécule d'ADN pendant la réaction de "nick translation", plusieurs contrôles sont réalisés.

Premièrement, un rapide comptage est effectué sur 1  $\mu$ l de la préparation finale de l'ADN marqué (10  $\mu$ g de plasmide marqué, qui a été précipité, et resuspendu dans 200  $\mu$ l de solution Tris EDTA à pH 7,4). Ensuite, le contrôle de la taille du plasmide marqué consiste à faire migrer dans un gel d'agarose (1,5%) 2  $\mu$ l de la préparation finale de plasmide marqué.

Deux bandes sont visibles sur le gel d'agarose après la migration des produits issus de la réaction de marquage au dATP-S<sup>35</sup> (fig.11a). La bande ayant migré le plus loin se situe dans la zone de taille attendue, soit ~5 kb. La seconde correspondrait, semble-t-il, à une molécule d'ADN de taille plus importante.

La présence de deux types de molécules d'ADN de tailles différentes après le marquage par "nick translation" pourrait correspondre à l'existence d'une double conformation structurale du plasmide. En effet, on sait que la forme superenroulée d'un plasmide migre plus lentement que la forme lâche de ce dernier.

Un deuxième contrôle consiste à regarder la répartition de la radioactivité le long de la zone de migration de l'ADN marqué sur le gel d'agarose. La figure 11b représente un graphique montrant la répartition de cette radioactivité mesurée dans



**Figure 12.** Restriction par *ecoRI* du plasmide marqué par nick translation.  
 a) Photographie du gel d'agarose sur laquelle est visible la bande d'ADN de ~5kb après restriction du plasmide marqué par "nick translation" (piste 2). La piste 1 est celle où a migré le plasmide non restreint b) Autoradiographie du gel séché faisant apparaître les zones radioactives.



des petits blocs obtenus en découpant la bandelette d'agarose le long de laquelle l'ADN a migré. Il apparaît clairement que la radioactivité se répartit largement dans les deux bandes d'ADN visibles sur la photo du gel à la figure 1a. Le nombre de coups par minutes est indiqué sur le graphique et représente la radioactivité localisée dans les blocs d'agarose après migration de 2  $\mu$ l de la préparation finale du plasmide marqué, par rapport à la radioactivité totale mesurée dans 2  $\mu$ l de cette préparation.

Une manière non quantitative, mais tout aussi représentative de mettre en évidence la radioactivité dans les bandes ayant migré dans le gel d'agarose, est de réaliser une autoradiographie. La figure 11c. montre l'autoradiographie du gel de la figure 11a., et laisse apparaître distinctement que seules les deux bandes ayant migré sont radioactives.

### ***1.3. Présence d'une double conformation spatiale du plasmide marqué.***

Il reste donc à vérifier l'hypothèse selon laquelle le plasmide marqué est présent sous deux conformations structurales différentes, et que dès lors les deux bandes d'ADN visibles sur le gel d'agarose correspondent bien à deux formes migrant à des vitesses différentes d'un même plasmide de longueur "totale". On effectue pour cela une **restriction enzymatique** à l'aide de l'enzyme EcoRI qui scinde le plasmide en un seul endroit de manière à provoquer sa linéarisation.

La figure 12a montre la photo d'un gel d'agarose sur lequel ont migré côte à côte 1  $\mu$ l de la préparation finale du plasmide marqué tel quel, ainsi qu'incubée durant une heure en présence de l'enzyme EcoRI. De cette façon, il apparaît clairement qu'après restriction nous ne retrouvons plus dans la préparation d'ADN marqué que la forme linéaire du plasmide, qui migre dans la région de taille attendue (~5 kb). Une autoradiographie du gel confirme que la radioactivité est uniquement localisée dans deux bandes avant, ou une bande après restriction (fig. 12b).

Nous utilisons par réaction de marquage 10  $\mu$ g de plasmide froid, et 5  $\mu$ l de dATP-S<sup>35</sup> représentant 0,5 mci (1,85 MBq). La radioactivité spécifique de l'ADN précipité après la réaction de marquage et resuspendu dans 200  $\mu$ l de solution tris-EDTA (pH 7,4) peut varier entre 4000 et 10.000 coups par minute par ng d'acide nucléique. Le plasmide est alors suffisamment radioactif que pour pouvoir servir de

traceur lors des expériences de capture au cours desquelles nous incuberons les boîtes de culture avec un milieu contenant 30 ng d'ADN radiomarqué par millilitre.

### ***I.4. Conclusion.***

La réaction de nick translation telle qu'elle vient d'être décrite a donc permis de marquer au  $S^{35}$  un plasmide de ~ 5 kb, tout en conservant une uniformité de taille du produit marqué. La radioactivité spécifique obtenue est suffisante pour les expériences que nous allons décrire.

## **II. Fractionnement d'un homogénat cellulaire et dosage de plusieurs enzymes de références.**

### ***II.1. Choix des cellules.***

Pour réaliser les expériences de transfection *ex vivo*, nous avons décidé d'utiliser une souche de cellules d'origine humaine comme cible de transfection. Cette souche présentait les avantages d'être disponible au laboratoire, de pouvoir être maintenue en culture très aisément, et de provenir de tissu humain. Il s'agit de cellules cancéreuses métastasiées humaines provenant d'un mélanome, et répertoriées sous le nom de cellules A2058.

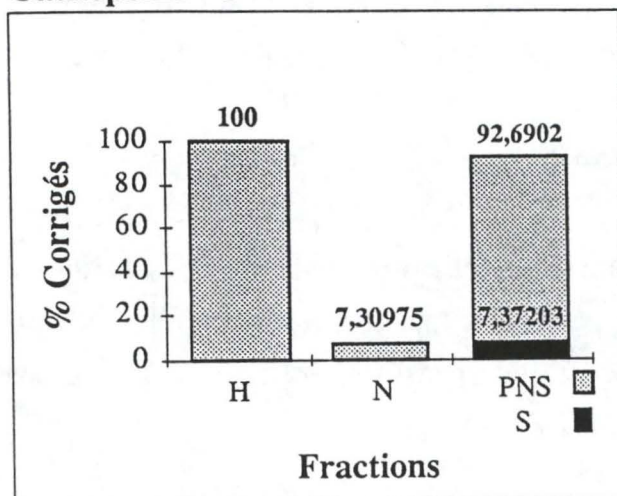
### ***II.2. Conditions d'homogénéisation et premier fractionnement cellulaire.***

Dans le but de pouvoir suivre la "sonde" radioactive lors de son passage éventuel à l'intérieur des cellules, on réalise le fractionnement cellulaire. Dans un premier temps, les cellules seront brisées de manière à ce que leur contenu forme un homogénat dans lequel chaque organite se retrouve libéré. Des conditions optimales d'homogénéisation doivent être trouvées pour atteindre un état d'individualisation maximal des structures subcellulaires.

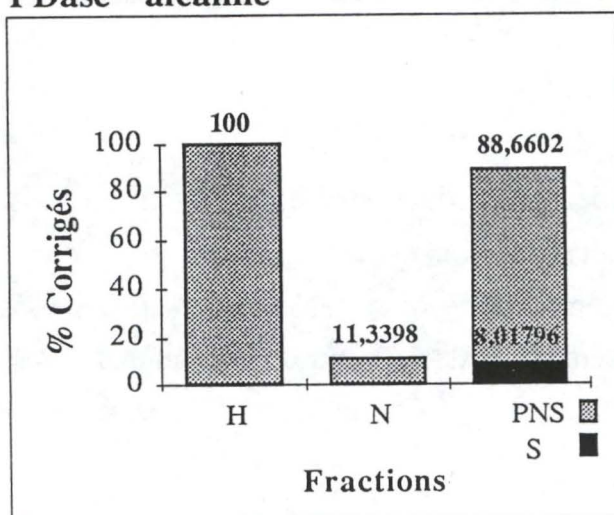
Les cellules sont récupérées après grattage des boîtes de culture et suspendues dans une solution de saccharose 0,25M. On obtient ensuite un homogénat cellulaire en utilisant l'**homogénéisateur de Dounce** de type "serrant". On réalise 30 à 35 passages du piston pour briser, grâce aux forces de cisaillement, les membranes



### Cathepsine C



### PDase alcaline



**Figure 13.** Dosage de deux enzymes différents dans les fractions N, PNS et S d'un homogénat cellulaire.

Un homogénat cellulaire est fractionné par centrifugation différentielle en un culot N et un surnageant PNS. Ce PNS est lui même divisé par centrifugation de manière à récupérer un surnageant S. Les pourcentages corrigés de l'activité de la cathepsine C et la de la phosphodièstérase alcaline sont calculés pour ces différentes fractions.

plasmiques des cellules présentes dans la solution de saccharose. Un rapide coup d'oeil au microscope à contraste de phase permet d'estimer l'état de rupture des membranes plasmiques et ainsi de corriger le nombre de passages à effectuer avec le piston dans le "Dounce".

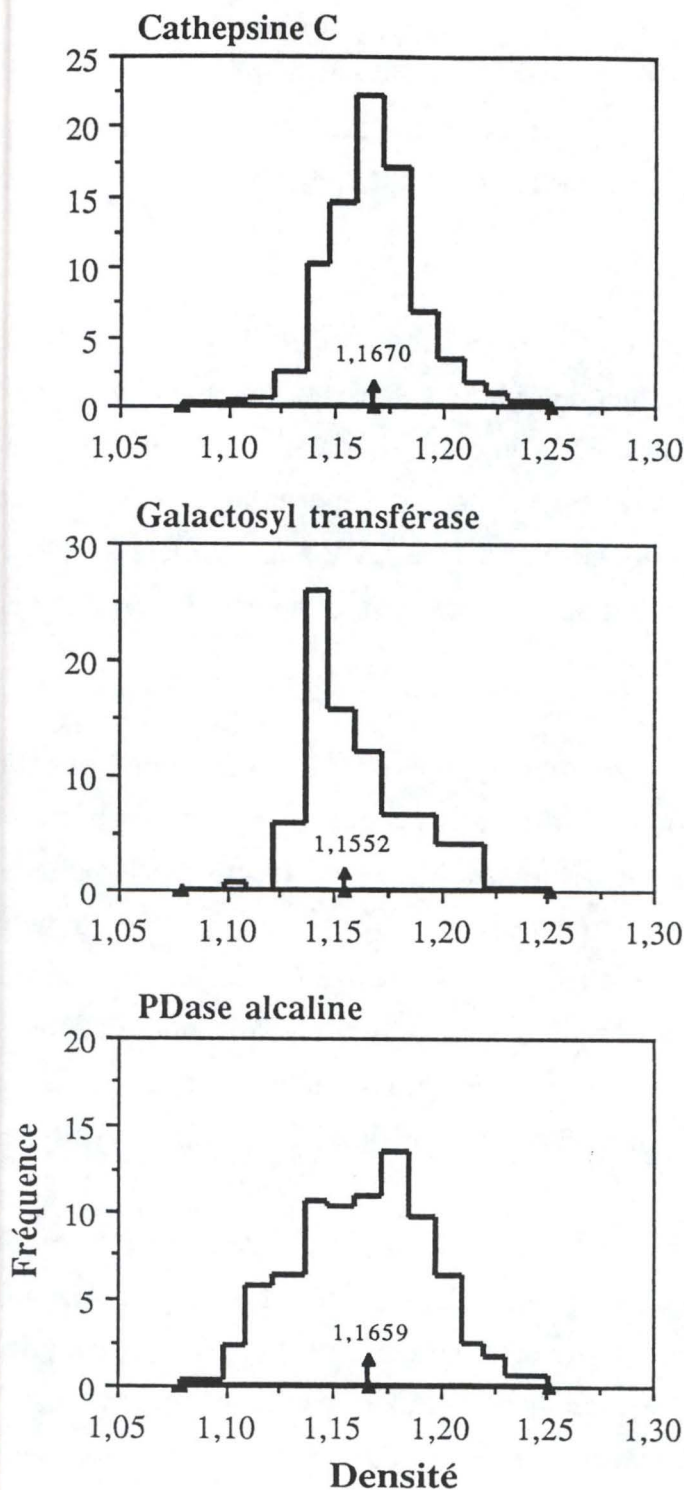
Le premier fractionnement des organites cellulaires est réalisé par **centrifugation différentielle** et permet de séparer les gros fragments cellulaires ainsi que les noyaux (fraction N, pour Nuclear), du cytosol contenant les autres organites intracellulaires (fraction PNS, pour "Post Nuclear Supernatant"). Cette dernière fraction peut, par la suite, être fractionnée par centrifugation de manière à sédimenter toutes les structures membranaires intracellulaires, et à récupérer le cytosol dans le surnageant final nommé fraction S.

Le choix du milieu dans lequel on suspend les cellules pour ensuite les homogénéiser au moyen du "Dounce", est un paramètre également important qui influence la qualité de l'homogénat cellulaire, ainsi que le comportement de cet homogénat dans les étapes de fractionnement qui suivent. Nous avons débuté nos expériences en employant du **saccharose isotonique 0,25M** comme milieu d'homogénéisation. Cette solution très simple, sans qu'il n'y soit ajouté aucun sel ni tampon, nous a permis d'homogénéiser correctement nos cellules, et de les fractionner efficacement au moyen des techniques de centrifugation différentielle et isopycnique.

Le dosage d'**enzymes de référence** caractéristiques d'organites subcellulaires, fournit une indication supplémentaire sur l'état d'homogénéisation des cellules brisées, et permet également d'estimer le taux de sédimentation des organites subcellulaires dans la fraction N. En effet, si beaucoup de cellules restent intactes après l'étape d'homogénéisation effectuée grâce aux passages dans le "Dounce", les activités enzymatiques propres à divers organites tels que les lysosomes seront d'autant plus importantes dans la fraction N où les cellules vont sédimenter. De la même façon, si la vitesse de centrifugation est telle qu'un organite d'une certaine taille sédimente dans la fraction N, l'activité de l'enzyme qui y est associé sera d'autant plus grande dans la fraction sédimentée.

La figure 13 montre la répartition de l'activité de deux enzymes de référence entre les fractions N, PNS et S: la **cathepsine C**, marqueur lysosomal, ainsi que la **phosphodiesterase alcaline**, marqueur de la membrane plasmique, sont les deux





**Figure 14.** Profils de distribution de trois enzymes de référence après centrifugation isopycniqne d'une fraction PNS dans un gradient de saccharose .

Une fraction PNS obtenue par centrifugation différentielle est centrifugée à 50.000 tours/min. pendant 3 heures dans un gradient de densité de saccharose. Le gradient est coupé en fractions dans lesquelles est dosés chaque enzyme. L'ordonnée représente la fréquence calculée par la formule  $Q/\Sigma Q\Delta\rho$ , où Q représente l'activité mesurée dans la fraction,  $\Sigma Q$  l'activité totale associée à l'ensemble des fractions et  $\Delta\rho$  la différence de densité entre le haut et le bas de la fraction. L'abscisse représente le densité donnée en g/ml.

enzymes dosées. Le pourcentage corrigé de l'activité enzymatique correspondant à chacune de ces trois fractions est représenté en ordonnée des histogrammes.

Pour ces deux enzymes, on mesure ~90% de l'activité dans la fraction PNS. Très peu d'activité est donc localisée dans le culot N ayant sédimenté lors de la première centrifugation à basse vitesse (1500 tours par minute).

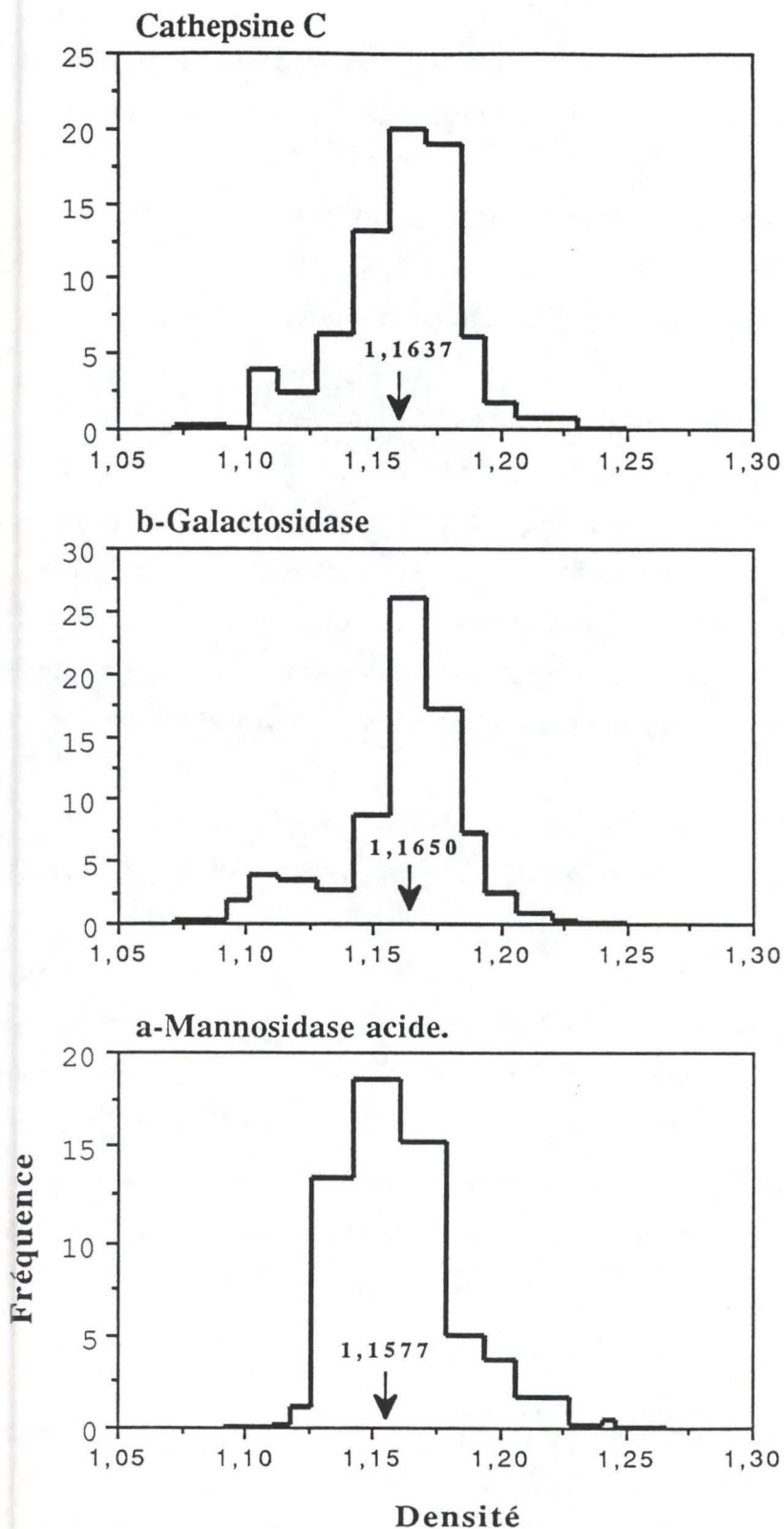
On retrouve également très peu d'activité dans les surnageants S après centrifugation totale de la fraction PNS à 35.000 tours par minute pendant 40 minutes. Cette fraction S est uniquement composée du cytosol, puisque les organites se retrouvent dans le culot. On en déduit donc que les conditions d'homogénéisation et de centrifugation différentielle sont telles que l'on obtient une proportion importante d'organites intacts, et qu'une proportion minime des organites sont endommagés et relarguent leur contenu enzymatique dans le cytosol (fraction S).

### ***II.3. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose et dosages d'enzymes de références.***

La deuxième étape d'un fractionnement cellulaire est réalisée par **centrifugation isopycnique** et permet de séparer les organites intracellulaires selon leur densité. Pour cela, on dépose la fraction PNS obtenue par centrifugation différentielle sur un gradient de densité de saccharose que l'on centrifuge à 50.000 tours par minute dans un rotor vertical Beckman VTI65 durant 3 heures. Le gradient de saccharose est découpé en fractions de 3 mm de hauteur. Elles serviront à mesurer l'activité de plusieurs enzymes de référence de manière à déterminer la distribution des organites auxquels elles sont associées.

Un premier gradient constitue une mise au point du fractionnement des structures subcellulaires de cellules A2058 "non traitées" et est effectué sans que les cellules aient été mises en présence d'ADN plasmidique. La figure 14 montre la distribution de plusieurs enzymes de référence dans un tel gradient de densité. Sur les histogrammes est indiquée en ordonnée la fréquence de distribution de l'enzyme dosé. Celle-ci est calculée par la formule  $Q/\sum Q\Delta\rho$ , où Q représente l'activité mesurée dans la fraction,  $\sum Q$  l'activité totale associée à l'ensemble des fractions et  $\Delta\rho$  la différence de densité entre le haut et le bas de la fraction. La densité est représentée en abscisse, et s'étend depuis 1,05 g/ml jusque 1,30 g/ml. Trois enzymes ont été dosées dans les





**Figure 15.** Profils de distribution de trois enzymes lysosomaux après centrifugation isopycniqne d'une fraction PNS dans un gradient de saccharose .

Une fraction PNS obtenue par centrifugation différentielle est centrifugée à 50.000 tours/min. pendant 3 heures dans un gradient de densité de saccharose. Le gradient est coupé en fractions dans lesquelles est dosés chaque enzyme. L'ordonnée représente la fréquence calculée par la formule  $Q/\sum Q\Delta\rho$ , où Q représente l'activité mesurée dans la fraction,  $\sum Q$  l'activité totale associée à l'ensemble des fractions et  $\Delta\rho$  la différence de densité entre le haut et le bas de la fraction. L'abscisse représente le densité donnée en g/ml.

différentes fractions d'un tel gradient de saccharose: la cathepsine C, enzyme de référence propre aux lysosomes, la galactosyl transférase, caractéristique de l'appareil de Golgi et la phosphodiesterase alcaline qui identifie les vésicules de membrane plasmique.

Les densités d'équilibre médianes sont indiquées pour les trois enzymes. Les trois distributions se chevauchent en partie, mais des différences sont néanmoins visibles entre chacune d'elles. Ainsi, l'appareil de Golgi identifié par la galactosyl transférase, semble être le plus "léger" des trois organites étudiés, avec une médiane de distribution égale à 1,1552 g/ml. Le pic d'activité maximale de cette enzyme se situe vers 1,14 g/ml. Les lysosomes représentés par la cathepsine C, quant à eux, sont plus denses et présentent une médiane d'équilibre égale à 1,1670 g/ml. Le maximum d'activité de la cathepsine C se situe à cette même densité. La phosphodiesterase alcaline montre une distribution plus étalée qui chevauche celle des deux autres enzymes. Sa densité médiane d'équilibration reste cependant plus proche de celle de la cathepsine C, et le pic d'activité maximale correspond à une densité de ~1,1650 g/ml.

La figure 15 quant à elle montre la distribution de trois enzymes marqueurs des lysosomes: la cathepsine C, l' $\alpha$ -mannosidase acide et la  $\beta$ -galactosidase, trois hydrolases à pH optimum acide. Les trois enzymes présentent une similitude de distribution extrêmement marquée, et leur densité médiane d'équilibre se situe entre une densité 1,1577 g/ml pour l' $\alpha$ -mannosidase acide et 1,165 g/ml pour la  $\beta$ -galactosidase. La cathepsine C quant à elle présente une densité médiane d'équilibre intermédiaire (1,167 g/ml).

#### ***II.4 . Conclusion.***

Les expériences décrites jusqu'à présent nous permettent de caractériser le comportement des organites subcellulaires, en centrifugation différentielle et isopycnique après homogénéisation des structures cellulaires suspendues dans une solution de saccharose isotonique.

L'utilisation de différents enzymes de référence caractéristiques de plusieurs compartiments intracellulaires nous fournit une indication sur la validité du fractionnement de l'homogénat cellulaire tant par centrifugation différentielle

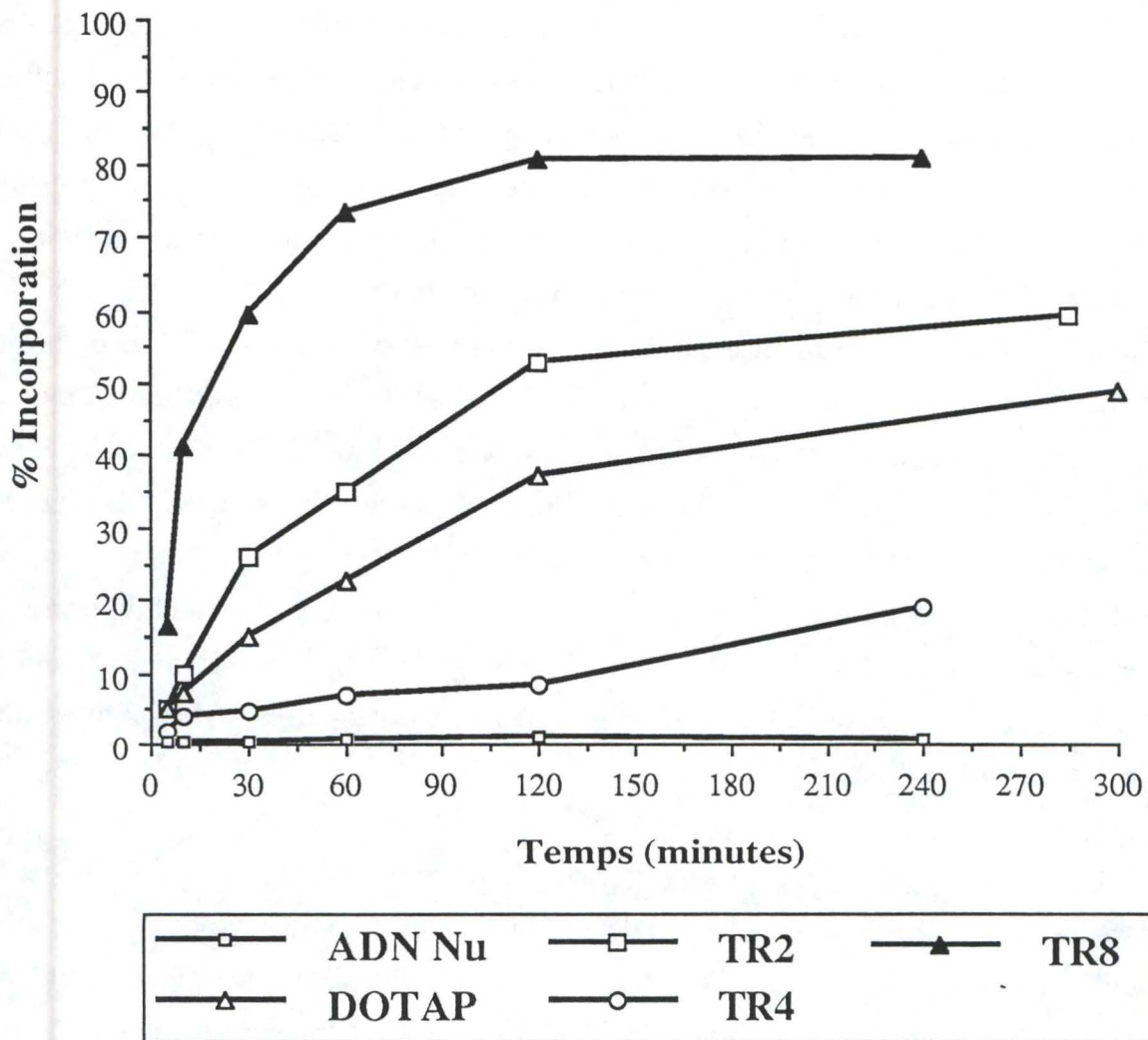


qu'isopycnique.

Pour réaliser les expériences ultérieures au cours desquelles nous envisageons de suivre le trajet intracellulaire d'un plasmide radiomarqué, les conditions suivantes de fractionnement des organites cellulaires seront retenues: la centrifugation différentielle permettant de séparer les noyaux ainsi que divers gros fragments cellulaires sédimentables dans une fraction N, sera réalisée en centrifugeant à une vitesse de 1500 tours par minute durant 10 minutes l'homogénat cellulaire dans le saccharose isotonique. On montre que le surnageant post nucléaire (PNS) recueilli de cette manière, contient quant à lui les organites intracellulaires identifiables par le dosage des enzymes qui leur sont propres. La présence réduite d'activité enzymatique dans la fraction N indique que la proportion de cellules intactes après l'étape d'homogénéisation est très faible. L'activité enzymatique est également extrêmement réduite dans le surnageant S provenant de la sédimentation totale, à grande vitesse, de la fraction PNS. Ceci démontre que les organites isolés dans cette dernière fraction sont intacts et entièrement sédimentables lors d'une centrifugation à 35.000 tours par minute durant 40 minutes.

La centrifugation isopycnique permet de différencier les organites présents dans la fraction PNS selon leur densité d'équilibre. Le dosage d'enzymes de référence particuliers à plusieurs types de ces organites permet de localiser leur répartition dans le gradient de densité. Ainsi, l'appareil de Golgi (galactosyl transférase) apparaît être localisé dans une zone de densité plus légère (médiane égale à 1,1552 g/ml) que celle où l'on trouve les lysosomes (cathepsine C, dont la médiane de distribution se situe vers 1,1650 g/ml). La phosphodiesterase alcaline, marqueur de la membrane plasmique, présente une distribution plus étalée, qui recouvre celle des deux autres enzymes dosées. Enfin, deux enzymes supplémentaires caractéristiques des lysosomes ont permis de confirmer leur distribution dans le gradient de densité, localisée autour d'une densité médiane de ~ 1,1560 g/ml.

L'utilisation de ces techniques de fractionnement d'un contenu cellulaire à la lignée A2058 s'est donc révélée d'application aisée et tout à fait adéquate. Elles permettront de suivre le trafic intracellulaire du plasmide radiomarqué après sa capture éventuelle par les cellules en culture. Vu que de nombreuses études ont mis en évidence que des complexes formés entre l'ADN et des liposomes cationiques sont "internalisés" via le processus d'endocytose (voir le chapitre d'introduction), il nous



**Figure 16.** Evolution de la vitesse de capture de l'ADN- $S^{35}$  complexé ou non à différents types de lipides cationiques. Les cellules sont mises en présence d'ADN radiomarqué nu ou complexé à un lipide cationique (DOTAP, TR2, TR4, TR8) pendant des temps croissant. Après chaque temps d'incubation, les cellules sont lavées et lysées. Le pourcentage de la radioactivité incorporée aux cellules récupérées est calculé en se rapportant à la quantité de radioactivité initialement déposée dans le milieu.



est apparu essentiel de nous intéresser particulièrement au comportement de l'appareil vacuolaire et des lysosomes, en particulier au cours des fractionnements cellulaires. En effet, ces derniers constituent dans de nombreux cas le point final du trafic intracellulaire faisant suite à l'endocytose. Les endosomes, de par leur rôle en tant que "véhicules" servant de navette intermédiaire entre la membrane plasmique et les lysosomes, sont également d'un grand intérêt dans le cadre de notre étude. Cependant, leur comportement lors d'un fractionnement cellulaire ne peut être représenté que par la distribution des molécules endocytées qu'ils contiennent. Notre "sonde" radioactive pourra dès lors éventuellement servir de marqueur endosomal.

### **III. Evolution au cours du temps de la capture d'ADN radioactif complexé à différents types de lipides cationiques.**

#### ***III.1. Introduction.***

La première expérience que nous avons réalisée a pour objet de mesurer l'incorporation par des cellules en culture d'ADN nu ou associé à différents types de lipides cationiques, et d'observer l'évolution de cette capture en fonction du temps d'incubation.

Pour cela, les cellules sont incubées en présence du plasmide marqué radioactivement complexé à quatre types différents de lipides cationiques: DOTAP, TR2, TR4 et TR8 (voir explications dans le chapitre consacré aux matériel et méthodes). Après avoir été lavées cinq fois au PBS glacé, les cellules sont ensuite lysées à 4°C dans une solution contenant 0,5% de Triton X-100: Un comptage de la radioactivité est réalisé sur 200 µl de la mixture de cellules lysées ainsi obtenue.

#### ***III.2. Résultats.***

Le graphique de la figure 16 présente en ordonnée le pourcentage de radioactivité incorporée calculé sur base de la quantité de radioactivité récupérée dans le lysat cellulaire rapportée à la quantité totale de radioactivité déposée au départ dans le milieu de culture; en abscisse est indiqué le temps d'incubation mesuré

en minutes.

Sur ce graphique, on peut comparer l'évolution du taux de radioactivité associé aux cellules lorsque l'ADN est ou n'est pas associé à un lipide cationique. On peut également se rendre compte de l'effet particulier de chaque lipide cationique sur l'augmentation d'incorporation de l'ADN radioactif dans la fraction cellulaire, qu'ils induisent.

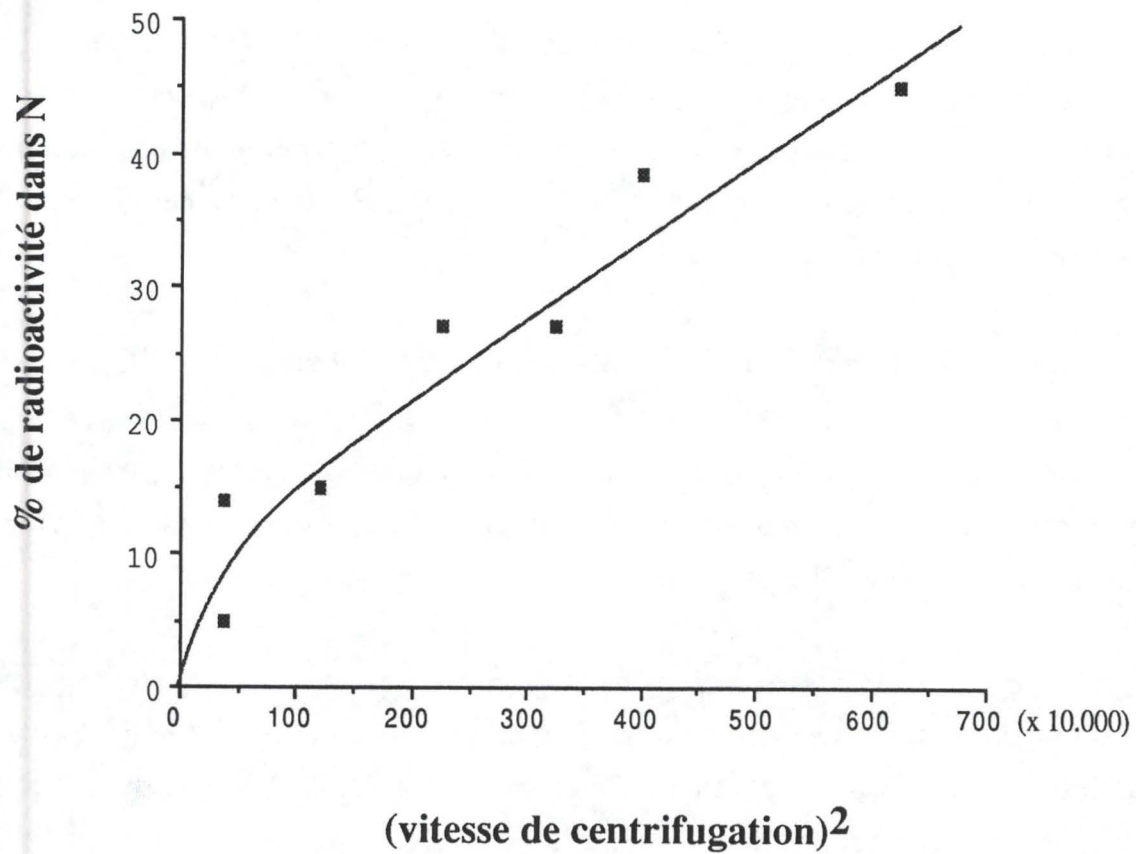
Il apparaît clairement que l'ADN ne reste essentiellement dans le milieu de culture et que moins d'un pourcent de la radioactivité est associé à la fraction cellulaire après 4 heures d'incubation. Par contre, les lipides cationiques préalablement complexés au plasmide, augmentent franchement le taux de radioactivité associé aux cellules à chaque temps d'incubation.

Ce graphique laisse également clairement apercevoir que chaque lipide cationique a un effet d'une amplitude différente sur l'incorporation d'ADN radioactif dans les cellules A2058. L'efficacité d'incorporation relative à la vitesse et au taux maximum de capture varie de manière décroissante selon l'ordre suivant: TR8>TR2>DOTAP>TR4. Un plateau semble être atteint après un temps d'incubation qui va de 2 heures dans le cas du TR8, jusqu'à plus de 4 heures pour les autres transfectants. Cette dernière observation nous laisse envisager deux possibilités: la première est que la quantité de complexe disponible dans le milieu est devenue trop faible et que dès lors sa vitesse d'incorporation par les cellules tend à ralentir, puis à s'arrêter; la deuxième possibilité est que l'on atteint un état d'équilibre entre la fraction des complexes radiomarqués qui s'intègrent aux cellules et la fraction qui sort des cellules par exocytose.

#### **IV. Localisation en gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé au DOTAP.** **Effet de la durée d'incubation.**

##### ***IV.1. Sédimentation des granules ayant incorporé la radioactivité dans la fraction N en fonction de la vitesse de centrifugation.***





**Figure 17.** Courbe de sédimentation des granules contenant l'ADN radioactif en fonction de la vitesse de centrifugation.

Les cellules sont incubées avec l'ADN-S<sup>35</sup> complexé au DOTAP pendant 30 minutes. L'homogénat cellulaire est centrifugé durant 10 minutes à des vitesses croissantes, et la radioactivité sédimentable est mesurée dans la fraction N.

Le premier fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle à 1500 tours par minute de l'homogénat des contenus cellulaires nous permet de séparer une fraction nucléaire N d'une seconde fraction PNS contenant les autres organites intracellulaires. Grâce à la mesure de la proportion de radioactivité récupérée dans les fractions N et PNS, nous avons constaté qu'une partie importante de l'ADN-S<sup>35</sup> se retrouvait dans la fraction sédimentable N. Rappelons que les conditions de centrifugation (1500 tours/minute) ont été initialement choisies sur base des données "classiques" fournies par les travaux de de Duve *et al.*, en 1955. L'utilisation de ces conditions de fractionnement des cellules A2058 s'étaient avérées être applicables, comme le montrent les premières expériences de mise au point décrites au point II de ce chapitre, et qui se basaient sur le dosage d'enzymes de référence.

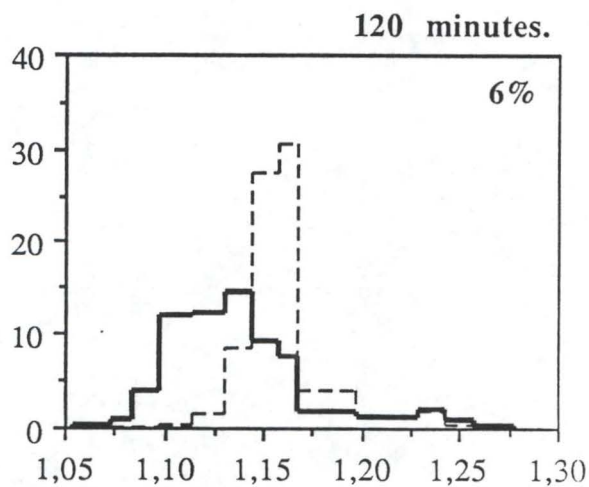
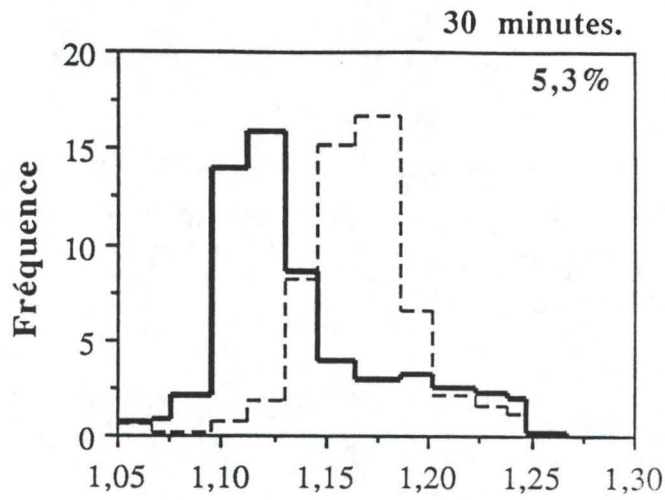
Dans le but de cerner les conditions optimales de sédimentation de la fraction N, c'est-à-dire les conditions permettant de récupérer un maximum de radioactivité dans la fraction PNS, nous avons réalisé une courbe de sédimentation des granules contenant la radioactivité en fonction de la vitesse à laquelle est centrifugé l'homogénat cellulaire.

La figure 17 montre cette courbe de sédimentation des structures ayant incorporé la radioactivité dans le culot N, après que les cellules aient été incubées pendant 30 minutes en présence d'ADN complexé au DOTAP. Elle nous indique que la taille des granules intracellulaires ayant incorporé la radioactivité est telle que leur sédimentation atteint ~25% après 10 minutes de centrifugation à une vitesse de 1500 tours par minute.

Soulignons ici que ce résultat fournit une première indication quant au type de granules qui accueillent l'ADN radiomarqué. Leur sédimentation en proportion relativement élevée dans la fraction N obtenue à basse vitesse de centrifugation indique en effet que les structures impliquées dans le transport de la "sonde" radioactive après 30 minutes ont une taille relativement importante. Cette observation est d'ailleurs également rapportée par R. Wattiaux *et al.* (1996) à partir des résultats de leur étude de capture d'un plasmide radiomarqué et des complexes "ADN-liposomes cationiques" identiques à ceux utilisés dans nos expériences et réalisée *in vivo*.



En vue des expériences de fractionnement futures, et dans le but de récupérer le plus possible de matériel radioactif dans la fraction PNS, nous avons choisi sur base de ces résultats de fractionner dorénavant l'homogénat cellulaire en centrifugation différentielle à une vitesse de 600 tours par minute. A cette vitesse, moins de 10% des granules radioactifs sédimentent dans la fraction N.



**Densité**

**Figure 18.** *Distribution de la radioactivité dans un gradient de saccharose après 30 minutes d'incubation en présence de complexes formés entre l'ADN et le DOTAP.*

Les cellules sont incubées pendant 30 et 120 minutes avec l'ADN- $S^{35}$  complexé au DOTAP. Les fractions PNS sont déposées au sommet d'un gradient de densité de saccharose et fractionnées par centrifugation isopycnique. La radioactivité (trait plein) et la cathepsine (trait pointillé) sont mesurées dans chaque fraction du gradient coupé. Le pourcentage de radioactivité acido-soluble dans le PNS est indiqué sur chaque histogramme. La fréquence présentée en ordonnée a déjà été définie précédemment.



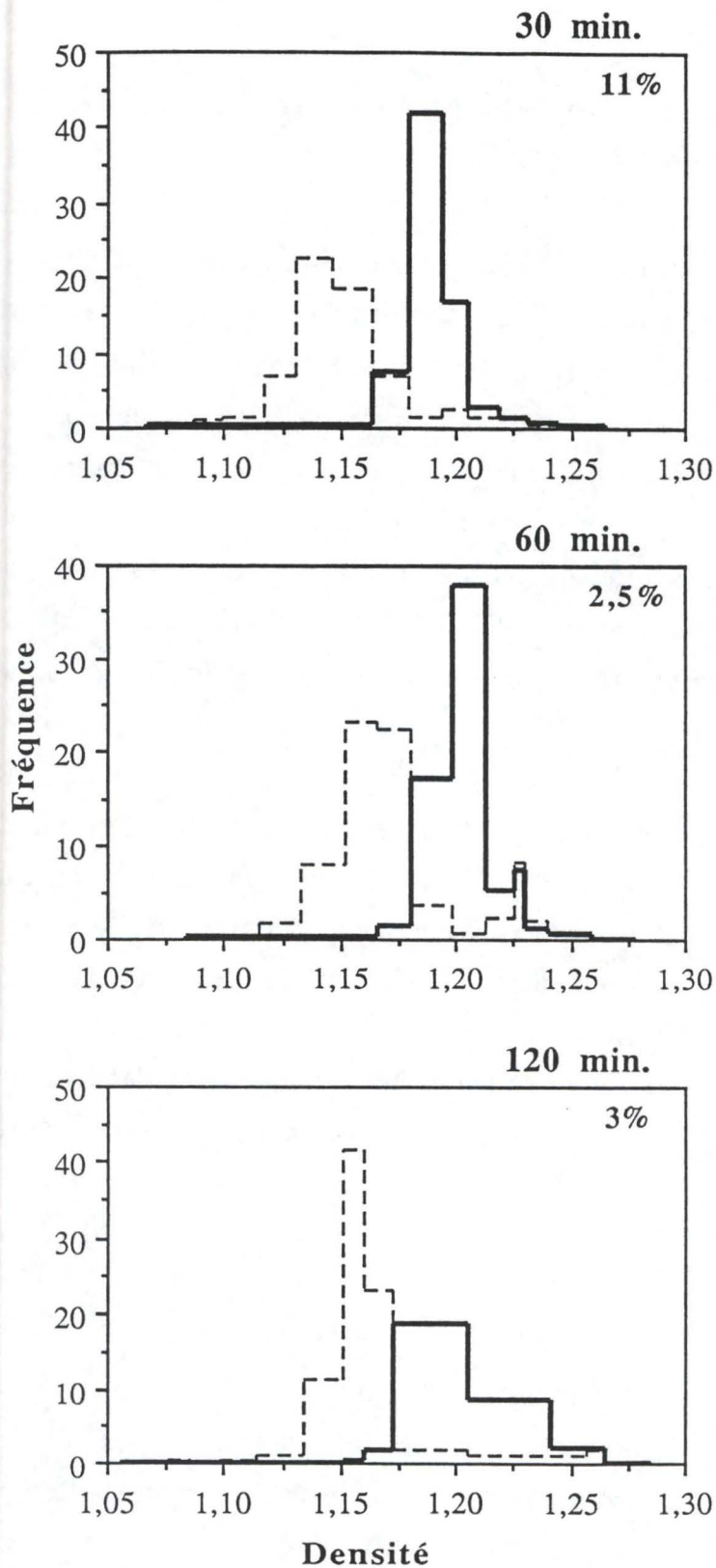
## ***IV.2. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose de la fraction PNS.***

Le but que nous poursuivons à présent est de distinguer les différents types d'organites contenus dans la fraction PNS qui sont impliqués dans le transport du matériel endocyté depuis la membrane plasmique jusqu'au compartiment lysosomal. La première étape pour y parvenir, est de comparer en gradient de densité de saccharose les distributions des lysosomes et des structures contenant la radioactivité. Les lysosomes sont, pour rappel, localisés grâce au dosage de la cathepsine C. Dans l'expérience décrite ci-dessous, nous avons réalisé l'analyse par centrifugation isopycnique de fractions PNS récoltées après 30 et 120 minutes d'incubation des cellules en présence des complexes formés entre l'ADN-S<sup>35</sup> et un lipide cationique, le DOTAP.

La figure 18 montre sous la forme d'histogrammes la distribution de la radioactivité totale (surface hachurée) et de la cathepsine C (trait en pointillé) dans le gradient de densité, après centrifugation isopycnique de la fraction PNS récoltée après 30 et 120 minutes d'incubation du plasmide dans le milieu de culture des cellules. En ordonnée est représentée la fréquence  $Q/\Sigma Q\Delta\rho$ , où Q est la radioactivité associée à la fraction,  $\Sigma Q$  la radioactivité totale récupérée dans toutes les fractions, et  $\Delta\rho$  les limites de densité de la fraction; en abscisse on trouve la densité mesurée en g/ml.

## ***IV.3. Résultats.***

Nous observons qu'après 30 minutes et 120 minutes d'incubation, les granules auxquels est associée la radioactivité restent localisés dans une zone de densité clairement distincte de celle où sont distribués les lysosomes représentés par la cathepsine C. Une densité médiane de ~1,1250 g/ml est caractéristique du compartiment ayant incorporé la radioactivité, alors que la cathepsine C représentant les organites lysosomaux se situe, comme on s'y attend (voir point II. de ce chapitre), aux environs de 1,1650 g/ml. Rappelons ici que les lysosomes ont été localisés au même endroit dans les gradients de densité réalisés lors des expériences de mise au point (point II.), grâce au dosage de trois hydrolases acides caractéristiques de ce compartiment.



**Figure 19.** Distribution de la radioactivité après 30, 60 et 120 minutes d'incubation en présence de complexes formés entre l'ADN et le TR8.

Les cellules sont incubées pendant 30 60 ou 120 minutes avec l'ADN- $S^{35}$  complexé au TR8. Les fractions PNS sont déposées au sommet d'un gradient de densité de saccharose et fractionnées par centrifugation isopycnique. La radioactivité (trait plein) et la cathepsine (trait pointillé) sont mesurées dans chaque fraction du gradient coupé. Le pourcentage de radioactivité acid-soluble dans le PNS est indiqué sur chaque histogramme. La fréquence présentée en ordonnée à déjà été définie précédemment.



Nous constatons d'autre part que le pourcentage de radioactivité acido-soluble associé aux granules ayant incorporé l'ADN est remarquablement bas, ce qui indiquerait que même après 120 minutes d'incubation le plasmide reste protégé contre toute dégradation hydrolytique.

## **V. Localisation en gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé au TR8. Effet de la durée d'incubation.**

### ***V.1. Introduction.***

Des classes de lipides cationiques de plus en plus nombreuses sont commercialisées et décrites comme ayant un effet plus ou moins important (principalement selon le type de cellules transfectées) pour améliorer l'efficacité de la transfection. Nous avons dès lors voulu nous rendre compte du comportement des structures auxquelles est associée la radioactivité dans le cas où les cellules A2058 issues d'un mélanome humain sont incubées en présence de complexes formés entre l'ADN-S<sup>35</sup> et un lipide cationique autre que le DOTAP.

Dans cette expérience, le lipide cationique que l'on trouve sous le nom de "TR8" dans le "Perfect Transfection Kit" fourni par la firme Invitrogen, fut complexé à l'ADN radiomarqué, et incubé en présence des cellules pendant 30, 60 ou 120 minutes.

### ***V.2. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose de la fraction PNS.***

De la même façon que lors de l'expérience précédente, la distribution des organites contenant la radioactivité dans un gradient de densité après centrifugation isopycnique de la fraction PNS fut établie. L'expérience fut répétée en utilisant des temps croissants d'incubation des cellules A2058 en présence des complexes formés entre le plasmide radioactif et le lipide cationique TR8, à savoir 30, 60 et 120 minutes.

La figure 19 montre les distributions des structures ayant incorporé la radioactivité (trait plein) et de la cathepsine C (trait pointillé) après centrifugation

dans un gradient de densité de saccharose. L'ordonnée (fréquence) et l'abscisse (densité) de ces histogrammes sont identiques à celles utilisées précédemment. Le pourcentage de radioactivité acido-soluble (TCA précipitable) est indiqué dans le coin supérieur droit de chaque histogramme.

### ***V.3. Résultats.***

De manière identique à ce que nous avons déjà observé dans le cas du DOTAP, la distribution des granules radioactifs est bien distincte de celle des lysosomes représentés par la cathepsine C, quel que soit le temps d'incubation en présence des complexes "ADN-TR8". De même, après 2 heures d'incubation, la radioactivité reste localisée strictement dans la même région du gradient de densité (vers 1,20 g/ml), et seule une quantité très faible d'ADN-S<sup>35</sup> ne semble être co-localisé avec le compartiment lysosomal. De nouveau, on constate que le taux de radioactivité acido-soluble reste très faible même après deux heures d'incubation, ce qui indique que l'ADN serait protégé, ou resterait à l'écart, d'une dégradation hydrolytique.

Il est intéressant de remarquer que la distribution des organites contenant la radioactivité, lorsque l'ADN a été complexé au TR8, est clairement distincte de celle observée dans le cas où le DOTAP est utilisé comme transfectant (voir la figure 8). Si la distribution des "organites radioactifs" était dans le cas du DOTAP située dans une région plus légère (~1,1250 g/ml) que celle où est localisé le compartiment lysosomal (~1,1650 g/ml), cette distribution se retrouve en présence de TR8 au contraire dans une région de densité plus importante (~1,20 g/ml).

Deux possibilités se présentent pour expliquer cette différence de densité du compartiment contenant la radioactivité en fonction du type de lipide cationique complexé à l'ADN. On peut ainsi envisager que, soit les complexes formés entre l'ADN radiomarqué et les différents lipides cationiques sont incorporés par les cellules dans des organites différents (des organites différents, en tout cas aux temps d'incubation des cellules utilisés lors de nos expériences); soit que la radioactivité se retrouve dans le même type d'organite, mais que la densité de ce dernier varie en fonction du lipide cationique employé pour complexer l'ADN-S<sup>35</sup>. C'est cette deuxième hypothèse que nous avons voulu vérifier grâce à l'expérience suivante au cours de laquelle nous testons l'effet de plusieurs lipides cationiques sur la densité d'équilibre des organites



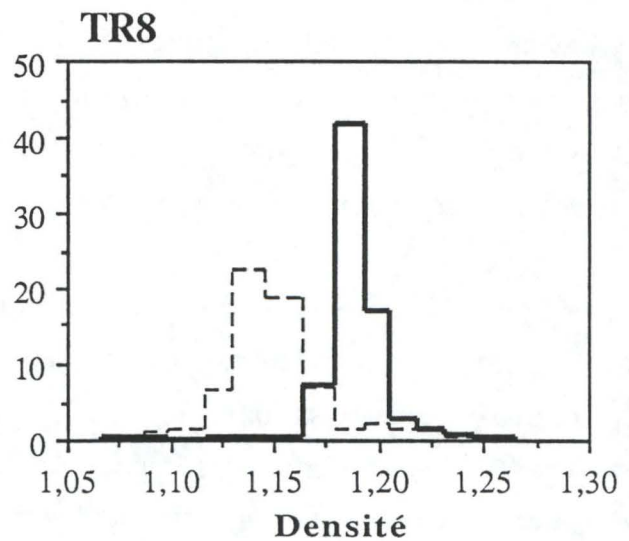
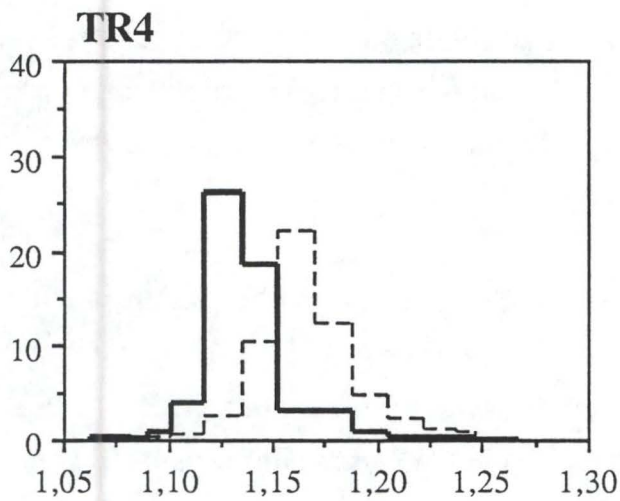
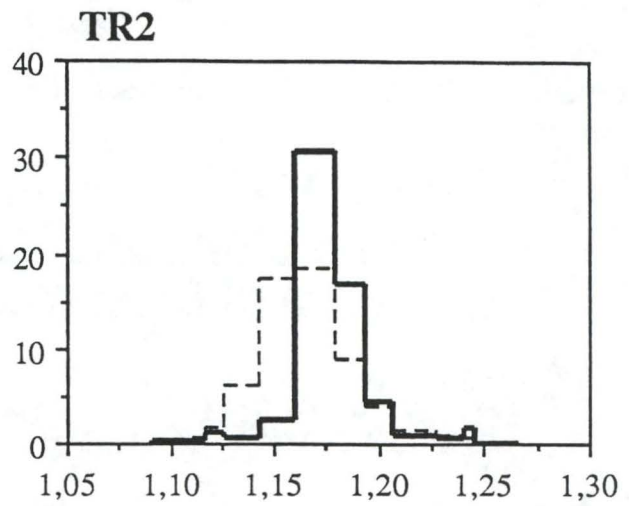
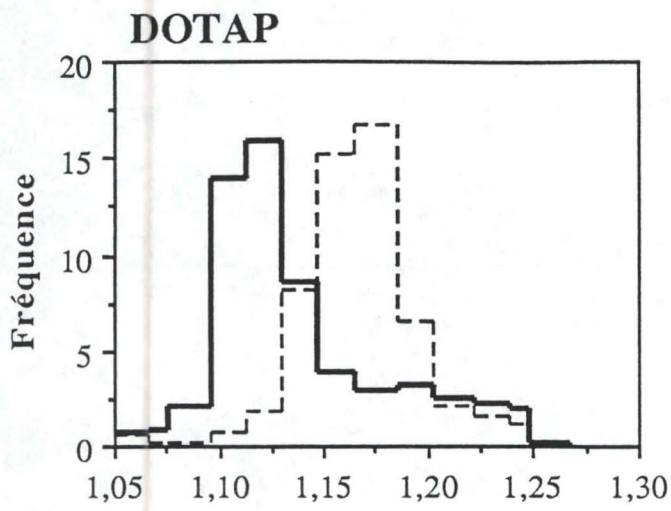
contenant la radioactivité dans un gradient de saccharose.

## **VI. Localisation en gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé à différents types de lipides cationiques.**

### ***VI.1. Introduction.***

Au vu des résultats précédents, il apparaît que le type de lipide cationique utilisé pour complexer l'ADN influence la distribution des organites d'une fraction PNS ayant endocyté l'ADN complexé et que, quelle que soit la durée d'incubation des cellules en présence d'ADN radiomarqué, et quel que soit le transfectant employé, la distribution variable des granules radioactifs reste néanmoins nettement dissociée de la répartition du compartiment lysosomal.

Pour essayer de vérifier cet effet de la nature du lipide cationique sur la densité des organites contenant le matériel radioactif endocyté, il nous est paru intéressant de répéter une expérience similaire à celles décrites précédemment (voir chapitre V et VI), avec cette fois quatre lipides cationiques différents. Il sera de cette façon possible de comparer directement les densités médianes de distribution des organites radioactifs en gradient de densité, après un même temps d'incubation des cellules en présence des différents types de complexes lipide-ADN formés.



**Figure 20.** Distribution de la radioactivité après 30 minutes d'incubation en présence de complexes formés entre l'ADN et les lipides cationiques DOTAP, TR2, TR4 et TR8.

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec l'ADN- $S^{35}$  complexé à quatre lipides cationiques différents. Les fractions PNS sont déposées au sommet d'un gradient de densité de saccharose et fractionnées par centrifugation isopycniqne. La radioactivité (trait plein) et la cathepsine (trait pointillé) sont mesurées dans chaque fraction du gradient coupé. La fréquence présentée en ordonnée a déjà été définie précédemment.



## ***VI.2. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose de la fraction PNS.***

Une fraction PNS a été isolée après que les cellules aient été incubées pendant 30 minutes en présence d'ADN-S<sup>35</sup> complexé à un des quatre transfectants suivants: TR2, TR4, TR8 ou DOTAP. A été réalisée ensuite la centrifugation isopycnique des fractions PNS en gradient de saccharose, de la même manière que pour les expériences précédentes. La figure 20 présente les résultats obtenus sous la forme d'histogrammes.

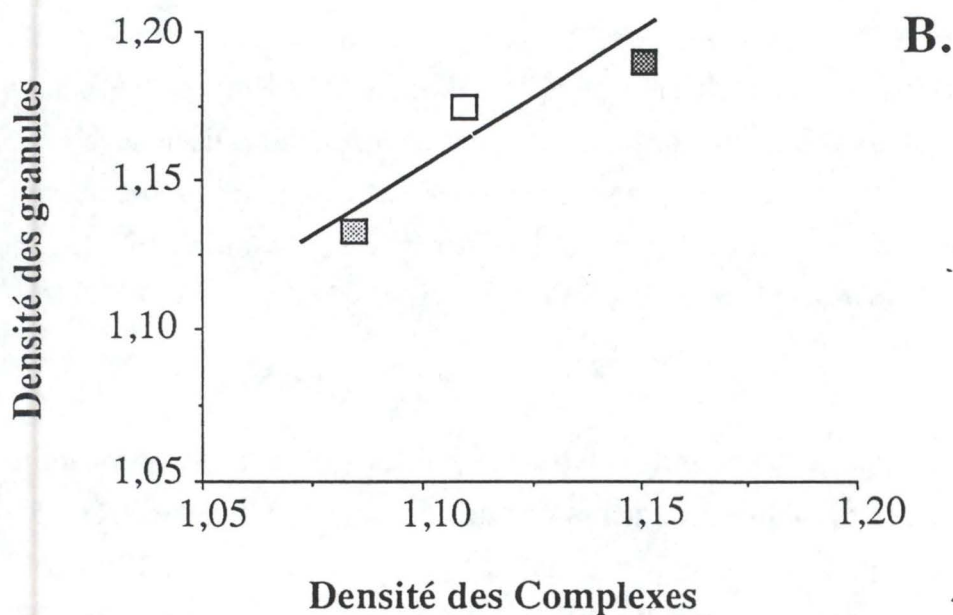
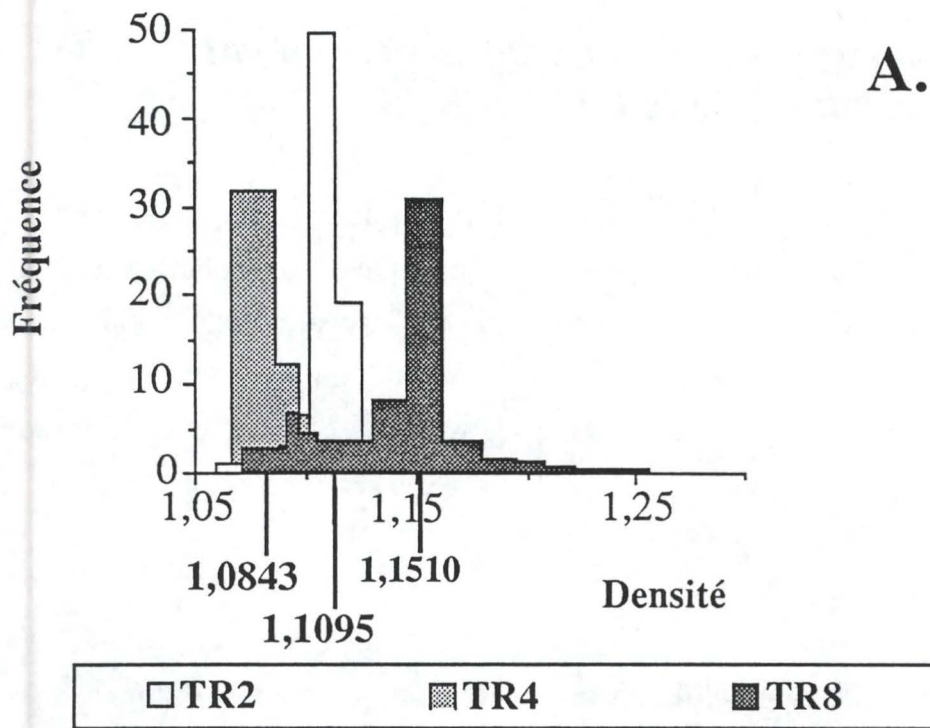
## ***VI.3. Résultats.***

Après 30 minutes de capture, il apparaît clairement que les distributions de la radioactivité obtenues sont fortement différentes selon le type de lipide cationique complexé à l'ADN-S<sup>35</sup>.

Les distributions que l'on observe dans le cas du DOTAP et du TR8 sont identiques à celles obtenues auparavant lors des expériences déjà réalisées avec ces deux types de lipides cationiques. Les granules auxquels est associée la radioactivité se distribuent à nouveau de part et d'autre du compartiment lysosomal, présentent respectivement des densités médianes de ~1,1250 et ~1,20 g/ml pour le DOTAP et le TR8.

En ce qui concerne les deux autres types de lipides cationiques, on observe que les distributions des organites radioactifs ont des densités médianes différentes intermédiaires. Ainsi, la distribution de la radioactivité se situe autour de ~1,1350 g/ml dans le cas du transfectant TR4 après 30 minutes d'incubation, et autour de 1,1750 g/ml lorsque l'ADN est complexé au TR2.

Une possibilité d'explication de ce phénomène est que la densité d'équilibre médiane des structures non lysosomales ayant incorporé la radioactivité serait influencée par le type de transfectant utilisé. C'est ce que nous allons tenter de montrer plus directement lors de l'expérience présentée dans le point suivant.



**Figure 21.** *Corrélation entre la densité des complexes "ADN-lipide" et celle des granules intracellulaires contenant la radioactivité.*

A Distribution de l'ADN-S35 complexé au TR2, TR4 ou TR8 sur un gradient de densité de saccharose après centrifugation isopycniq. B Densité médiane d'équilibre des particules en fonction de la densité médiane d'équilibre des complexes.



## **VII. Corrélation entre la densité des complexes ADN-lipide et celle des granules intracellulaires ayant incorporé ces complexes.**

### ***VII.1. Introduction.***

L'expérience précédente laisse entrevoir la possibilité que la capture des complexes ADN-lipide cationique conduit à l'accumulation d'une quantité de lipides suffisante que pour perturber le comportement en centrifugation de l'organite qui les contient.

Pour en savoir plus sur ce phénomène, nous avons déterminé la densité médiane d'équilibre en gradient de saccharose, des complexes formés entre chaque type de lipide cationique et le plasmide marqué au  $S^{35}$  en absence de toute internalisation. On peut dès lors comparer cette densité d'équilibration des complexes formés entre l'ADN et les différents transfectants sans internalisation à celle des structures ayant incorporé la radioactivité après 30 minutes de capture et déterminée précédemment (voir point VI.). Il s'agit donc non plus de mesurer la distribution dans un gradient de densité des granules ayant incorporé la radioactivité, mais bien de mesurer la densité d'équilibre des complexes formés entre l'ADN- $S^{35}$  et les différents types de lipides cationiques.

### ***VII.2. Détermination de la densité des complexes formés entre l'ADN et les lipides.***

La figure 21 montre deux graphiques: le graphique (A) présente la distribution en gradient de densité après centrifugation isopycnique, de l'ADN- $S^{35}$  associé à différents types de lipides cationiques (TR2, TR4 ou TR8). Les centrifugations furent réalisées à 240,000g dans le rotor Beckman VTI65 durant 240 minutes, à 4°C. Le gradient de saccharose employé s'étendait de 1,034 g/ml à 1,26 g/ml.

Le graphique (B) quant à lui représente les densités médianes d'équilibre des granules contenant la radioactivité après 30 minutes d'endocytose (calculées à partir des distributions établies à la figure 10), en fonction des densités médianes d'équilibre des complexes formés entre l'ADN et chaque type de lipide cationique, (graphique A).

### *VII.3. Résultats.*

Cette expérience révèle qu'après 30 minutes d'incubation, une corrélation linéaire semble pouvoir être établie entre la densité d'équilibre des organites ayant incorporé la radioactivité, et la densité d'équilibre des complexes formés entre le plasmide et les différents lipides cationiques. Cette observation est compatible avec l'hypothèse selon laquelle la présence d'un type particulier de lipide dans les complexes formés avec l'ADN radiomarqué influence la densité de ces complexes ainsi que la densité de la structure subcellulaire dans laquelle ces derniers s'accumulent.

## **VIII. Localisation dans un gradient de densité de l'ADN radioactif ayant été complexé avec le TR8, après différents temps de chasse.**

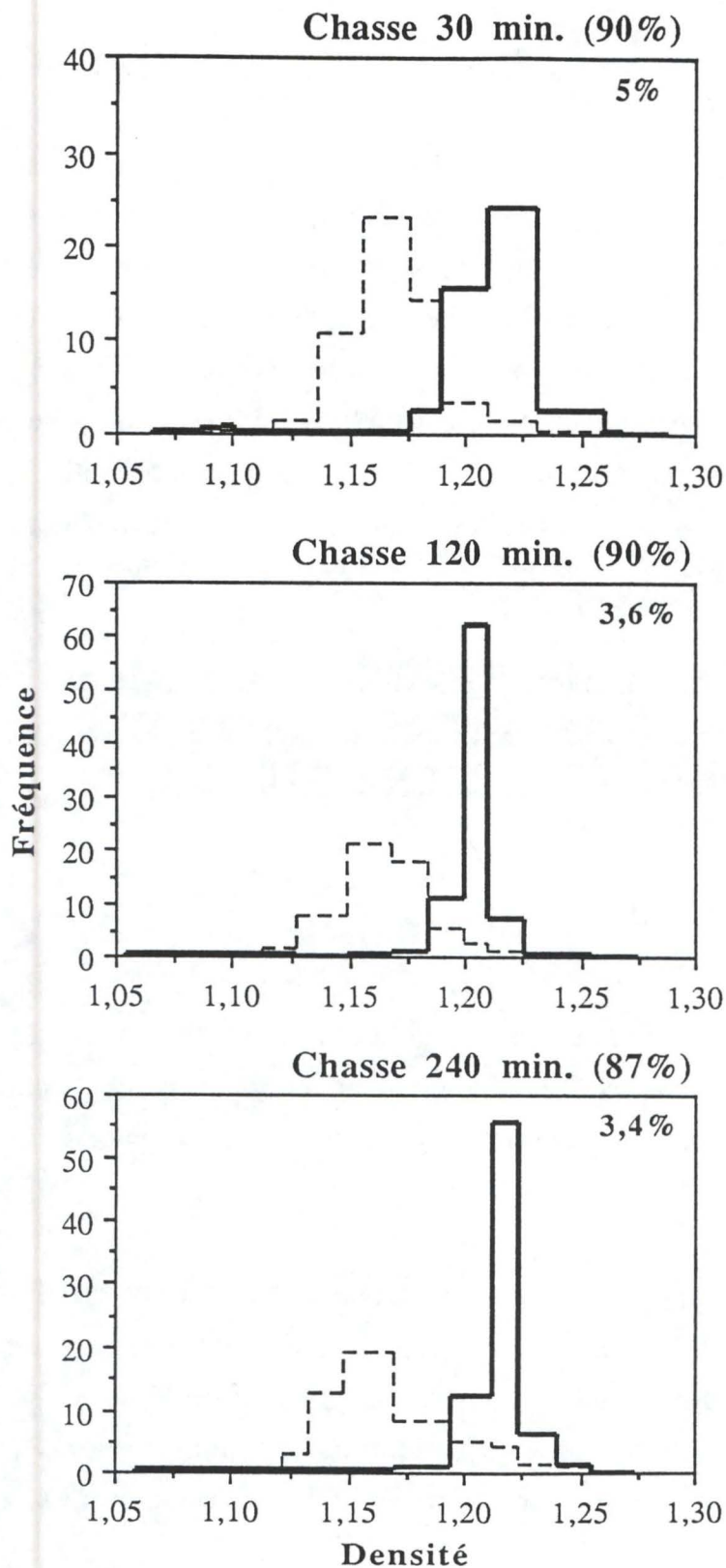
### *VIII.1. Introduction.*

Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent qu'une proportion très faible de matériel radioactif acido-soluble est associée aux distributions des granules contenant la radioactivité établies dans les différents gradients de saccharose, et cela quel que soit le lipide cationique employé pour complexer l'ADN-S<sup>35</sup>, et quel que soit également le temps d'incubation en présence des cellules.

Comme nous l'avons déjà signalé, ces données tendent à démontrer que les molécules d'ADN seraient protégées et/ou tenues à l'écart d'une dégradation hydrolytique. Cette deuxième possibilité serait d'ailleurs en accord avec le fait de ne jamais retrouver de réelle co-localisation en gradient de saccharose entre le compartiment transportant l'ADN-S<sup>35</sup>, et les lysosomes identifiés par la cathepsine C.

Cette absence de co-localisation pourrait trouver deux explications complètement différentes l'une de l'autre. Ainsi, on peut imaginer que le cheminement intracellulaire du matériel endocyté est relativement lent et qu'il n'a pas encore rejoint le compartiment lysosomal ou qu'il ne le rejoindra jamais. La deuxième explication consisterait à dire que les produits d'endocytose seraient amenés aux lysosomes, mais





**Figure 22.** Distribution de la radioactivité après plusieurs temps de chasse.

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec l'ADN- $S^{35}$  complexé TR8. Le milieu est ensuite renouvelé en absence, cette fois, de complexes transfectants, et les cellules sont maintenues de cette façon pendant 30, 120 et 240 minutes. Les fractions PNS sont déposées au sommet d'un gradient de densité de saccharose et fractionnées par centrifugation isopycnique. La radioactivité (trait plein) et la cathepsine (trait pointillé) sont mesurées dans chaque fraction du gradient coupé. Le pourcentage de radioactivité acido-soluble dans le PNS est indiqué sur chaque histogramme (% inférieur), ainsi que le % de radioactivité restant associée aux granules (% souligné). La fréquence présentée en ordonnée a déjà été définie précédemment.

qu'ils y seraient dégradés et éliminés immédiatement de manière à ce que les techniques employées ici ne permettent pas de les y localiser. Cette dégradation instantanée serait compensée par l'endocytose continue de nouvelles molécules. Pour pouvoir discriminer entre ces deux possibilités, une expérience de "pulse-chase" est réalisée avec pour but de suivre le sort d'une quantité limitée de matériel radiomarké, en l'absence de toute endocytose additionnelle.

Ce type d'expérience consiste à incuber les cellules en présence de complexes formés entre un lipide cationique et l'ADN-S<sup>35</sup> pendant un temps relativement court ("pulse"), et de retirer ensuite ces complexes d'ADN-lipide en lavant à plusieurs reprises la culture de cellules. On laisse ensuite s'écouler un temps variable appelé temps de chasse, durant lequel tout nouvel apport de matériel radioactif aux cellules est exclu. Ces dernières sont homogénéisées et fractionnées en centrifugation différentielle de la même façon que pour les expériences précédentes, et la fraction PNS est déposée sur un gradient de densité de saccharose de manière à analyser par centrifugation isopycnique le comportement des vésicules d'endocytose marquées radioactivement qu'il contient.

### ***VIII.2. Centrifugation isopycnique de la fraction PNS en gradient de saccharose.***

La figure 22 montre la distribution de la radioactivité totale (trait plein) et de la cathepsine C (trait en pointillé) sur un gradient de saccharose après centrifugation isopycnique de la fraction PNS récoltée après différents temps de chasse.

Suite à une incubation de 30 minutes (pulse) des cellules dans du milieu contenant l'ADN complexé au TR8, on lave les cellules deux fois avec du milieu frais ayant une température proche de 37°C. Les fractions PNS sont isolées après différents temps de chasse (30, 120 et 240 minutes), et sont centrifugées en gradient de saccharose comme décrit dans le chapitre consacré aux méthodes. L'ordonnée et l'abscisse des histogrammes représentent comme précédemment la fréquence et la densité. Le premier pourcentage (en haut) se rapporte à la radioactivité restante après chaque temps de chasse; le second pourcentage (juste en dessous) représente la fraction de radioactivité acido-soluble mesurée après les différents temps de chasse.



### **VIII.3. Résultats.**

La figure 12, indique que l'ADN radioactif isolé dans un compartiment non lysosomal reste en proportion relativement constante au cours du temps et qu'il demeure à l'état acido-précipitable même après 4 heures de chasse. Après un temps aussi long, on constate donc que le matériel capté radiomarqué ne rejoint pas les lysosomes représentés par la cathepsine C.

Cette expérience de "pulse-chase" semble donc montrer que la radioactivité endocytée durant les 30 minutes de "pulse" ne rejoint pas les lysosomes représentés par la cathepsine C, même après des temps longs de chasse. L'ADN radiomarqué reste acido-précipitable également après 4 heures de chasse, ce qui indique la grande stabilité de l'ADN associé aux cellules même après des temps d'incubation très longs.

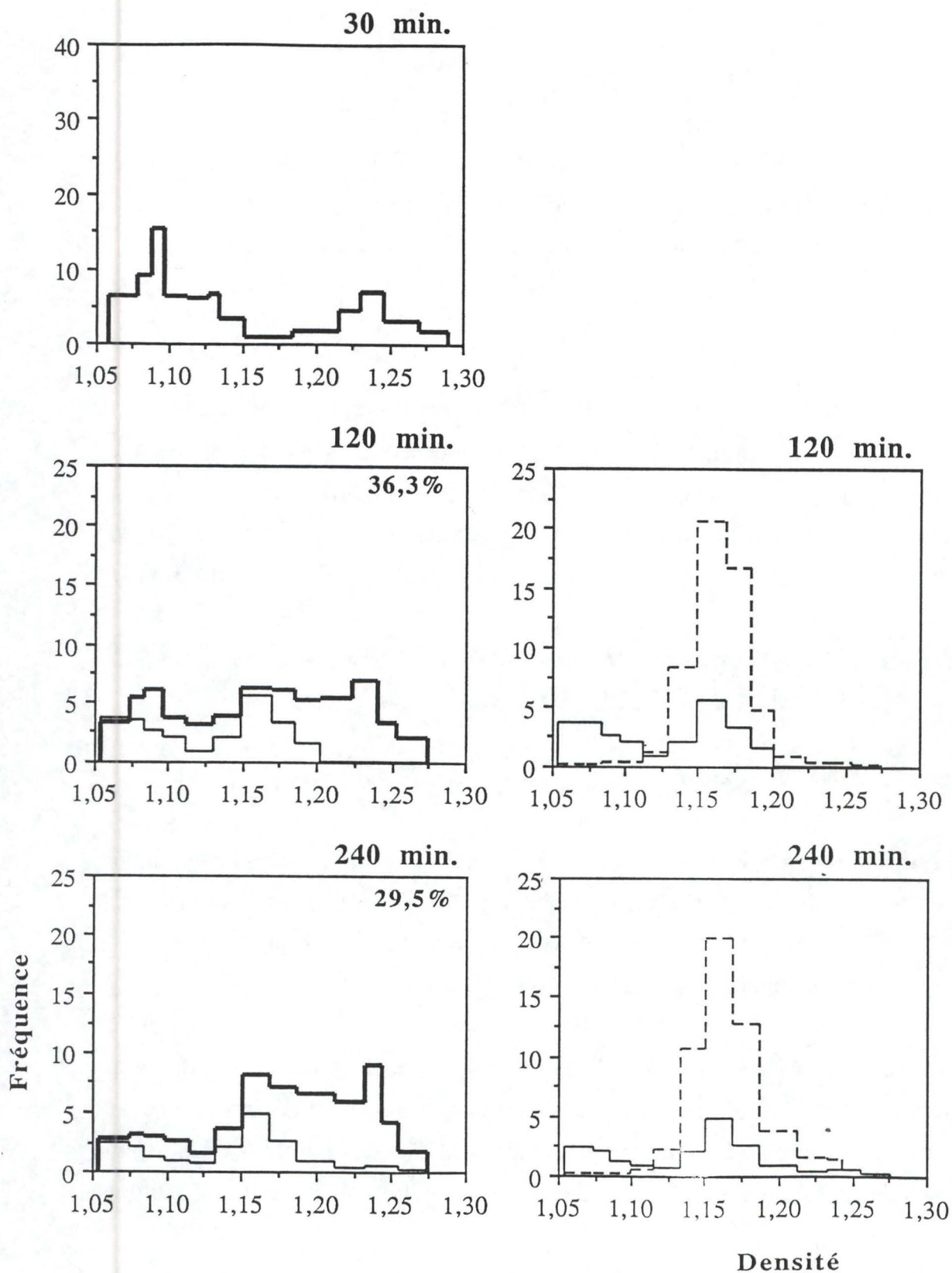
## **IX. Etude de la capture d'une protéine marquée à la I<sup>125</sup>-tyramine cellobiose.**

### **IX.1. Introduction.**

Puisque la voie normale d'endocytose conduit normalement les éléments captés par la cellule jusqu'au compartiment lysosomal où ils sont dégradés par diverses hydrolases acides, il semble étonnant de ne jamais observer de distribution d'ADN radioactif superposable à celle de la cathepsine C.

De manière à connaître le cheminement intracellulaire d'une molécule endocytée, et pour nous assurer du fonctionnement normal du processus d'endocytose dans le cas de la lignée cellulaire A2058, nous avons tenté plusieurs expériences de capture d'une asialoprotéine couplée à la tyramine cellobiose marquée à l'I<sup>125</sup>.

La protéine choisie est l'asialofétuine, utilisée précédemment au laboratoire lors de travaux relatifs à l'endocytose (Jadot *et al.*, 1984.). Son marquage consiste en une réaction de couplage entre la protéine et la tyramine cellobiose elle-même radiomarquée. L'avantage de coupler la tyramine cellobiose (TC) marquée à l'I<sup>125</sup> à l'asialofétuine, est que un des produits d'hydrolyse, à savoir la tyramine cellobiose,



**Figure 23.** Distribution de la radioactivité totale et soluble après 30, 120 et 240 minutes d'incubation en présence d'asialoféтуine couplée à la tyramine cellobiose(TC).

Les cellules sont incubées pendant trois temps différents avec l'asialoféтуine couplée au TC- $I^{125}$ . Les fractions PNS sont déposées au sommet d'un gradient de densité de saccharose et fractionnées par centrifugation isopycnique. La radioactivité totale (trait plein large), la radioactivité acido-soluble (trait plein étroit) et la cathepsine (trait pointillé) sont mesurées dans chaque fraction du gradient coupé. La fréquence présentée en ordonnée à déjà été définie précédemment.



possède la particularité de ne pas pouvoir diffuser hors du compartiment où il apparaît. De cette façon, si la TC-asialofétuine suit le trajet intracellulaire d'une molécule endocytée, elle devrait atteindre le compartiment lysosomal. Après sa dégradation par les hydrolases lysosomales, les produits iodés devraient donc s'accumuler dans cet organite. Une co-distribution entre la TC-I<sup>125</sup> et la cathepsine C est dès lors attendue dans un gradient de densité après centrifugation isopycnique.

### ***IX.2. Centrifugation isopycnique en gradient saccharose de la fraction PNS.***

La figure 23 montre les distributions de radioactivité totale (trait plein gras) après trois temps d'incubation (30, 120 et 240 minutes) des cellules en présence de l'asialofétuine-TC-I<sup>125</sup>, ainsi que de la radioactivité acido-soluble pour les deux derniers temps (trait plein normal), et de la cathepsine C (trait pointillé), après centrifugation isopycnique des fractions PNS déposées sur des gradients de saccharose. L'ordonnée représente la fréquence et l'abscisse la densité.

### ***IX.3. Résultats.***

L'évolution au cours du temps de la distribution des granules marqués à l'I<sup>125</sup> apparaît à la figure 23. Après 30 minutes d'incubation, une distribution bimodale apparaît clairement, répartie de part et d'autre du compartiment lysosomal représenté par la cathepsine C. Dès 120 minutes d'incubation, on observe l'apparition d'une distribution plus importante d'I<sup>125</sup> co-localisée avec la cathepsine C. Ce même type de distribution est retrouvé après 4 heures d'incubation et est alors encore plus nettement marqué sur le gradient de saccharose.

A ce stade, il est essentiel que nous puissions vérifier si les produits iodés co-localisés avec la cathepsine C proviennent bien de la dégradation de l'asialofétuine-TC-I<sup>125</sup> ayant atteint par la voie d'endocytose le compartiment lysosomal. Pour cela, la répartition de radioactivité acido-soluble a été mesurée dans les gradients après 120 et 240 minutes d'incubation (figure 23). Il apparaît clairement sur les histogrammes présentés sur cette figure, que parallèlement à la distribution de la cathepsine C, on retrouve un pic de radioactivité acido-soluble, ce qui est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la protéine aboutirait aux lysosomes où elle y serait dégradée.

# Discussion

Des vecteurs viraux et non viraux sont employés pour médier la transfection d'ADN exogène en présence de cellules en culture ou *in vivo*. Cependant, ces moyens qui sont utilisés pour faire entrer l'acide nucléique à l'intérieur des cellules et plus particulièrement à l'intérieur du noyau, présentent tous certains inconvénients. Un problème -sans doute un des plus essentiels- concerne le manque flagrant d'efficacité des vecteurs de transfection non viraux. Voilà une dizaine d'années, est apparue une nouvelle classe de transfectants, les lipides cationiques, qui permettent d'augmenter fortement l'efficacité de l'expression de protéines à partir d'un matériel génétique exogène (Felgner *et al.*, 1987; Debs *et al.*, 1990). Ces lipides forment de petits liposomes (~250 nm de diamètre) et présentent comme qualité essentielle de pouvoir interagir spontanément avec des molécules d'ADN chargées négativement (interactions électrostatiques) (Felgner *et al.*, 1987).

Une question reste néanmoins omniprésente à travers toutes les études portant sur la transfection médiée par des lipides cationiques: pourquoi ce type de vecteur induit-il une telle augmentation de l'expression de protéines à partir d'ADN exogène et, par quels mécanismes cet ADN parvient-il au noyau des cellules transfectées? L'approche que nous avons choisie d'aborder dans le cadre de cette étude consiste à suivre le sort intracellulaire de complexes formés entre un plasmide radiomarqué et plusieurs types de lipides cationiques. Nous nous intéressons plus précisément aux premières étapes du processus de capture de ces complexes par des mélanocytes cancéreux humains en culture (lignée A2058). Nous n'avons dès lors pas abordé ici les problèmes plus directement liés à l'expression induite par les lipides cationiques de protéines encodées par l'ADN exogène. Signalons simplement que des transfactions ont été réalisées avec succès au laboratoire sur les mêmes cellules A2058 en employant le DOTAP complexé à un ADN codant pour le gène de la protéine lysosomale Lamp II de rat (Jadot, communication personnelle).

Une première manière d'approcher la question soulevée ci-dessus, consiste à envisager plusieurs effets imputables aux lipides cationiques, et qui expliqueraient l'efficacité accrue de la transfection: on peut émettre l'hypothèse que les lipides cationiques

1) augmentent la stabilité de la molécule d'ADN dans le milieu extracellulaire et/ou



dans le milieu intracellulaire,

2) facilitent l'accès de l'ADN au cytoplasme ou encore,

3) médient la sortie du matériel génétique vers le cytosol, si les complexes "ADN-lipides" sont captés par les cellules au sein d'un système de transport vésiculaire.

*L'endocytose est la voie d'entrée dans les cellules de l'ADN complexé aux lipides cationiques.*

En ce qui concerne la voie d'entrée dans les cellules des complexes formés entre l'ADN et des lipides cationiques, une revue de la littérature laisse clairement apparaître qu'un processus d'endocytose est le plus fréquemment observé. Plusieurs exemples qui illustrent et démontrent ce phénomène de capture dans le cas des complexes "ADN-lipides cationiques" sont décrits dans le chapitre d'introduction. Signalons d'abord les travaux réalisés *in vivo* au laboratoire sur la capture d'ADN par le foie de rat, qui ont permis de mettre en évidence par des techniques semblables à celles que nous avons employées, le cheminement intracellulaire de l'ADN complexé au DOTAP (Wattiaux et al., 1995). Cette étude montre que l'ADN passe par un compartiment prélysosomal (endosomal) avant d'atteindre les lysosomes, lieu privilégié de la digestion des molécules endocytées. D'autres auteurs, comme par exemple Legendre et Szoka (1992), Zhou et Huang (1994), ainsi que Felgner *et al.* (1994) ont également montré que l'endocytose est la voie majeure de capture d'ADN exogène par les cellules au cours de la transfection médiée par les lipides cationiques.

Nos résultats mettent bien en évidence l'effet important de différents lipides cationiques sur l'augmentation de la capture des complexes qu'ils forment avec l'ADN. La figure 16 illustre bien ce phénomène, en montrant que la vitesse de capture du plasmide-S<sup>35</sup> est considérablement augmentée lorsqu'il est complexé à un des quatre lipides cationique testés. En ce qui concerne la stabilité des complexes "ADN-lipides cationiques" à l'intérieur de la cellules, nos résultats révèlent qu'après la capture, l'ADN-S<sup>35</sup> associé à des vésicules de densité définie, reste acido-précipitable jusqu'à des temps relativement long d'incubation. L'effet de protection (stabilisation) de l'ADN qui serait, au vu de ces résultats, imputable aux lipides cationiques sera discuté plus loin.

Les résultats que nous avons obtenus ne montrent jamais l'accès aux

lysosomes de notre "sonde" radioactive. Une éventualité que nous devons prendre en compte de manière à être suffisamment prudents, est que les complexes "ADN-lipide cationiques" n'atteignent pas les lysosomes par le simple fait qu'ils ne seraient pas "internalisés". Il faudrait alors admettre que des vésicules d'une taille relativement importante contenant les complexes adsorbés sur la membrane plasmique se formeraient lors de l'étape d'homogénéisation des cellules. Pensons aussi que cet effet d'adsorption des complexes "ADN-lipides cationiques" sur la surface des cellules devrait être assez important pour résister aux cinq lavages successifs avec du PBS glacé que les cellules subissent avant d'être homogénéisées. Mais l'argument sans doute le plus important allant à l'encontre de cette hypothèse peu probable consiste à se référer aux courbes de capture de l'ADN-S<sup>35</sup> complexé à différents types de lipides cationiques. Ces courbes atteignent toutes un plateau après un minimum d'une heure d'incubation (figure 16). Or, si un simple phénomène d'adsorption (peut-être par interaction électrostatique entre les charges positives des lipides cationiques et les charges négatives de l'ADN) des complexes sur la membrane plasmique était en jeu, on devrait s'attendre à observer l'apparition de ce plateau très rapidement, ce qui n'est pas le cas.

*Stabilité à l'intérieur des cellules de l'ADN complexé à des lipides cationiques.*

Le problème important qui reste soulevé lorsque l'on considère que les complexes "ADN-lipides cationiques" sont captés dans les cellules par la voie d'endocytose, est de comprendre comment l'ADN peut échapper au sort que subit normalement une molécule endocytée, à savoir sa dégradation dans le compartiment lysosomal.

A ce niveau également, on peut supposer que des lipides cationiques pourraient avoir plusieurs rôles à jouer. Voici quelques uns des effets "protecteurs" dont pourraient être responsables les lipides cationiques vis-à-vis de l'ADN endocyté:

- 1) Les lipides cationiques peuvent avoir un rôle dans la protection de l'ADN contre une activité déoxyribonucléasique, comme le montrent certains travaux (Capaccoli *et al.*, 1993; Gershon *et al.*, 1993).
- 2) On peut envisager d'autre part que les lipides cationiques facilitent le transfert de l'ADN à travers la membrane d'une vésicule de la voie endocyttaire tel qu'un



endosome, une vésicule de transport ou les lysosomes. Remarquons cependant que la concentration très élevée en hydrolases acides à l'intérieur du compartiment lysosomal rend peu probable la sortie d'un produit endocyté ayant atteint cet organite. Pour illustrer ce rôle des lipides cationiques, citons une étude assez récente de Farhood *et al.* (1995) qui montre que des liposomes cationiques contenant le phospholipide neutre DOPE déstabilisent la membrane endosomale (particulièrement à pH acide, comme le montre Nayar et Schroit en 1985) et permettent le passage de l'ADN vers le cytosol. Signalons également que des observations faites au laboratoire ont montré que le DOTAP avait un effet de type détergent sur des membranes biologiques (Wattiaux, communication personnelle).

3) Une troisième hypothèse est d'envisager que les lipides cationiques s'adsorbent sur la face interne de la membrane endosomale, et qu'ils favorisent ainsi la sortie de l'ADN lors d'évènements de "fusion-fission" pouvant se produire entre vésicules de la voie d'endocytose.

En rapport avec les hypothèses qui viennent d'être proposées concernant les rôles possibles que joueraient les lipides cationiques pour augmenter la stabilité de l'ADN et par conséquent l'efficacité de la transfection, rappelons que nos résultats montrent clairement que l'ADN complexé à un lipide cationique et capté par les cellules A2058 en culture est très stable. Cela est particulièrement bien mis en évidence au cours de l'expérience de "pulse-chase" qui laissè apparaître pendant quatre heures de chasse que l'ADN-S<sup>35</sup> capté lors d'un "pulse" de 30 minutes reste acido-précipitable (figure 22). Cette possibilité d'explication impliquerait un effet de la présence du lipide sur la vitesse du transport de notre "sonde" vers les lysosomes. Ainsi, les lipides cationiques complexés à l'ADN pourraient induire un ralentissement notable du transport vésiculaire du matériel endocyté. Les conséquences d'un tel effet serait que l'ADN associé aux lipides cationiques demeurerait plus longtemps dans un organite de type "prélysosomal" d'où il aurait plus de chance de pouvoir "s'échapper" intact.

Les résultats que nous obtenons nous permettent d'observer que la nature du lipide cationique utilisé a un effet direct sur la densité des complexes qu'il forme avec l'ADN, et que la densité de ces complexes semble influencer la densité des organites non lysosomaux contenant l'ADN-S<sup>35</sup> après la capture (figure 21). Cette observation semble montrer qu'une accumulation importante de lipides cationiques complexés à



l'ADN se produit à l'intérieur d'organites prélysosomaux. Nos résultats montrent que le séjour prolongé de l'ADN dans ces structures prélysosomales est dès lors en accord avec l'hypothèse que nous venons d'évoquer.

*Pourquoi observe-t-on un retard dans le transfert aux lysosomes de l'ADN complexé avec les lipides cationiques?*

Nos résultats montrent que lorsqu'il est complexé à un lipide cationique, le plasmide radiomarqué capté par les cellules A2058 demeure durant un temps très long dans des organites subcellulaires d'une taille relativement grande et possédant une densité variable (fonction du type de lipide cationique utilisé). Nous avons mis en évidence que ces organites étaient d'une taille relativement importante lors de la réalisation d'une courbe de sédimentation des vésicules contenant la radioactivité en fonction de la vitesse de centrifugation (figure 17). Cette expérience a été réalisée avec l'ADN-S<sup>35</sup> complexé au DOTAP, et en incubant les cellules en présence de ces complexes durant 30 min.

Il a été démontré que des mélanocytes de provenance humaine ou animale maintenus en culture, pouvaient réaliser la phagocytose (Le Poole *et al.*, 1993; Schraemeyer, 1994, 1995; Mishima, 1994). Ces auteurs ont également montré que les phagosomes formés dans ces cellules fusionnent avec les mélanosomes, qui peuvent fonctionner comme des organites lysosomaux spécialisés. Parallèlement à ces données, il est intéressant de faire référence à des travaux récents sur la phagocytose, qui semble indiquer que les phagosomes subissent une maturation avant que leur contenu ne puisse être transféré aux lysosomes (Pitt *et al.*, 1992; de Chastelier, 1995). Durant cette maturation, une digestion du contenu phagosomal s'opère, et serait requise pour permettre aux produits de la digestion de rejoindre les lysosomes (par fusion entre les phagosomes et les lysosomes, ou plus probablement grâce à un transport vésiculaire d'un compartiment à l'autre). Ce modèle de la maturation phagosomale a été récemment suggéré pour expliquer des observations tirées de travaux réalisés sur un modèle animal (Wattiaux *et al.*, 1996a). Par ailleurs, il a été montré également que des complexes "ADN-lipides cationiques" (identiques à ceux que nous utilisons), captés *in vivo* par le foie de rat, demeurent durant une longue période à l'intérieur d'un compartiment prélysosomal. (Wattiaux *et al.* 1996 b)



Sur base de ces travaux, et pour répondre à la question que nous nous sommes posé au vu de nos résultats (voir plus haut), nous sommes tenté d'émettre l'hypothèse suivante que la taille importante des complexes formés entre l'ADN et les lipides cationiques (Zabner et al., 1995; Walker et al., 1996) induirait un processus de capture semblable à la phagocytose par les mélanocyte cancéreux humains de la lignée A2058. A l'intérieur des phagosomes, les complexes "ADN-lipide cationique" ne pourraient être dégradés que très lentement, et resteraient donc "prisonniers" de ce compartiment prélysosomal pendant un temps très long. De Chastelier *et al.* (1995) ont montré en étudiant la phagocytose par des macrophages issus de moëlle épinière murine, de billes de latex, que l'impossibilité de dégrader le contenu phagosomal bloque la maturation de ces vésicules et empêche dès lors le transfert de leur contenu vers les lysosomes.

Notons que l'effet que jouerait la taille du matériel capté par les cellules sur le mode d'endocytose nous entraîne à penser que la capture du plasmide-S<sup>35</sup> non complexé à un lipide cationique pourrait ne plus impliquer un processus de capture de type phagocytose, mais bien un processus de pinocytose. Seulement, les essais de capture du plasmide nu que nous avons réalisés n'ont pas permis d'obtenir des résultats significatifs. Cela est dû au fait que la capture de ces molécules dans les cellules A2058 est extrêmement faible (figure 6).

Une explication alternative que l'on pouvait envisager au vu de nos résultats, et plus particulièrement si l'on considère les phénomène de rétention des complexes "ADN-lipide cationique" dans un compartiment non lysosomal, serait de prétendre que les lysosomes repérés par la cathepsine C n'accueillent pas le matériel endocyté dans les cellules A2058. Cependant, l'expérience de capture d'une asialoprotéine couplée à la tyramine cellobiose (Figure 23), montre que les produits de dégradation de cette "sonde" endocytée apparaissent dans les lysosomes que nous identifions en dosant une hydrolase caractéristique de ce compartiment: la cathepsine C. Notons que deux autres hydrolases acides servant communément de marqueurs du compartiment lysosomal ont également été dosées, et localisées dans le même compartiment que celui où l'on trouve la cathepsine C (fig 15).

### *Conclusion.*

Nos résultats montrent que le plasmide pcDNA I/Amp qui a été complexé avec

un lipide cationique, est capturé par les cellules A2058 de mélanome humain et demeure dans des organites subcellulaires de densité variable selon le type de lipide cationique utilisé. Pour expliquer que le matériel endocyté soit retenu dans un compartiment prélysosomal et qu'il y soit maintenu intact, nous postulons l'hypothèse selon laquelle la taille relativement importante des complexes endocytés pourrait induire un processus de capture semblable à celui de la phagocytose. En accord avec cette idée, il fut montré que les mélanocytes sont capables de phagocyter (Le Poole *et al.*, 1993). De plus, le modèle de la maturation des phagosomes proposée par Pitt *et al.* (1992) et de Chastelier *et al.* (1995) explique la lenteur du passage depuis le compartiment phagosomal jusqu'aux lysosomes dans le cas de particules difficilement dégradables. En effet, une digestion dans les phagosomes est requise pour que le contenu de ces derniers puisse être transféré aux lysosomes.

Grâce aux lipides cationiques, l'ADN exogène après sa capture par les cellules, est protégé de la dégradation lysosomale et reste durant une longue période à l'intérieur d'un compartiment subcellulaire et y est maintenu intact. L'ADN aurait dès lors plus de chance de "s'échapper" vers le cytosol par un mécanisme qu'il reste encore à déterminer, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, les effets favorables des lipides cationiques dans le processus de transfection.



# Bibliographie

- Anderson, W. F. (1992) Human gene therapy. *Science* **256**, 808-813
- Baatz, J.E., Bruno, M.D., Ciralo, P.J., Glasser, S.W., Sripp, B.R., Smyth, K.L. and Korfhagen, T.R. (1994). Utilization of modified surfactant-associated protein B for delivery of DNA to airway cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2547-2551.
- Behr, J.P., Demeneix, B., Leoffler, J.P., and Perez-Mutul, J. (1989). Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6982-6986.
- Benveniste, M., Schlessinger, J., and Kam, Z. (1989). Characterization of internalization and endosomes formation of epidermal growth factor in transfected NIH-3T3 cells by computerized image-intensified three-dimensional fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **109**, 2105-2115.
- Berteling, W. M., Gareis, M., Paspaleeva, V., Zimmer, A., Kreuter, J., Nurnberg, E., and Harrer, P. (1991). Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**, 390-450.
- Blum, J.S., M.L. Fiani, P.D. Stahl. (1991): Proteolytic cleavage of ricin A chain in endosomal vesicles. *J. Biol. Chem.* **266**, 22091-22095.
- Boles, T.C., White-JH, Cozzarelli-NR. (1990). Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **20**, **213** (4), 931-951.
- Braell, W. A. (1987). Fusion between endocytic vesicles in a cell free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 1137-1141.
- Budker, V., Gurevich, V., Hagstrom, J.E, Bortov, F., and Wolff, J.A. (1996). pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector. *Nature Biotechnology* **14**, 760-764.
- Bucci, C., R.G. Parton, I.H. Mather, H. Stunnenberg, K. Simons, B. Hofflack, and M. Zerial. (1992). The small GTPase rab 5 functions as a regulatory factor in the early

endocytic pathway. *Cell*. **70**, 715-728.

Capaccioli, S., Di Pasquale, G., Mini, E., Mazzei, T., and Quattrone, A. (1993) Cationic lipids improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 818-825

Capecchi, M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22**, 479-488.

Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745-2752.

Cheng, L., Ziegelhoffer, P.R., and Yang, N.S. (1993). In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4455-4459.

Chu, G., Hayakawa, H., and Berg, P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1311-1326.

Debs R.J., Freedman-LP, Edmunds-S, Gaemsler-KL, Duzgunes N., Yamamoto-KR..(1990) Regulation of gene expression in vivo by liposome-mediated delivery of a purified transcription factor. *J. Biol-Chem.* **25**; **265** (18), 10189-10192.

de Chastellier, C., Lang, T., Thilo, L. (1995) Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, Mycobacterium avium, in comparison to phagosomes wich contain Bacillus subtilis or latex beads. *Eur. J. Cell Biol.* **68**, 167-182

Desjardins, M., Celis, J. E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., and Huber, L. A. (1994) Molecular characterization of phagosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 32194-32200

Desjardins, M., Huber, L. A., Parton, R. G., and Griffiths, G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J. Cell Biol.* **124**, 677-688

Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends Cell Biol.* **5**, 183-186



- Diaz, R., Mayorga, L., and Stahl, P. (1988). In vitro fusion of endosomes following receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **263**, 6093-6100.
- Dunn, K. W., and Maxfield, F. R. (1989) Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* **109**, 3303-3314.
- Dunn, K. W., and Maxfield, F. R. (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell Biol.* **117**, 301-310
- Evans and Hardison, Phospholipid, Cholesterol, Polypeptide and glycoprotein composition of hepatic endosome subfraction. W.G.M. (1985). *Biochem. J.* **232**, 33-36.
- Farhood, H., Bottega, R., Epand, R. M., and Huang, L. (1992) Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1111**, 239-246
- Farhood, H., Serbina, N., Huang, L. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfert. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 289-295
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J. P. Norhtrop, G.M. Ringold and M. Danielson. (1987). Lipofection: a novel highly efficient lipid mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 7413-7417.
- Felgner, P.L. and G.M. Ringold. (1989). Cationic liposome mediated transfection. *Nature* **331**: 461-462.
- Felgner, J. H., Kumar, R., Sridhar, C. N., Wheeler, C. J., Tsai, Y. J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., and Felgner, P. L. (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* **269**, 2550-2561
- Folger, KR, Wong-EA, Wahl-G, Capecchi-MR. (1982). Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.* **2**, (11), 1372-1387.

- Friend, D. S., Papahadjopoulos, D., Debs, R. J. (1996) Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1278**, 41-50
- Geisow, M.J., P. D'Arcy Hart, and M.R. Young. (1981). Temporal changes of lysosomes and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages; studies by fluorescence spectroscopy. *J. Cell Biol.* **89**, 645-652.
- Gershon-H, Ghirlando\_R, Guttman\_SB, Minsky-A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry.* **20**, **32** (28), 7143-7151.
- Gorvel, J.P., P. Chavrier, M. Zerial, and J. Gruenberg. (1991). rab 5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* **64**, 915-925.
- Graham, F.L., and Van Der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-460.
- Graham, F.L., Abrahams, P.J., Mulder, C. Heynecker, H.L., Warnaar, S.O., Devries, F.A.J., Fiers, W., and Van Der Eb, A.J. (1974). Studies on in vitro transformation by DNA and DNA fragments of human adenovirus and simian virus 40. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **39**, 637-640.
- Gruenberg, J., and Howell, K.E. (1986). Reconstitution of vesicle fusion occurring in endocytosis with a cell-free system. *EMBO J.* **5**, 3091-3101.
- Gruenberg, J., Griffiths, G., and K.E. Howell. (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.* **108**, 1301-1316.
- Gruenberg, J., and M.J. Clague. (1992). Regulation of intracellular membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 593-599.
- Haensler, J., and Szoka, F.C. Jr. (1993a). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* **4**, 372-379.
- Hamer, D.H., P. Leder. (1979). Splicing and the formation of stable RNA. *Cell.* **18**, 1299-1302.



- Harding, C.V., H.J. Geuze.(1992): Class II MHC molecules are present in macrophage lysosomes and phagolysosomes that function in the phagocytic processing of *Listeria monocytogenes* for presentation to T cells *J. Cell Biol.* **119**, 531-542.
- Hart, P D'Arcy, J.A. Armstrong (1974): Strain virulence and the lysosomal response in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **10**, 742-746.
- Hart, P. D'Arcy, and M.R. Young. (1991). Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosomes-endosome fusion, and open a novel pathway; studies of a pathogenic mycobacterium and nonpathogenic yeast. *J. Exp. Med.* **174**, 881-889.
- Horwitz-BA, Yatvin-MB, Kreutz-W, Shinitzky-M. (1980). pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. *Science.* **12;210 (4475)**, 1253-1255.
- Huang, L., Farhood, H., Serbina, N., Teepe, A. G., and Barsoum, J. (1995) Endosomolytic activity of cationic liposomes enhances the delivery of human immunodeficiency virus-1 transactivator protein (TAT) to mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 761-768
- Ishikawa, Y., and Homcy, C. J. (1992). High efficiency gene transfer into mammalian cells by a double transfection protocol. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4367
- Ito, A. Miyazoe, R., Mitoma, J.-y., Akao, T., Osaki, T. and Kunitake, T. (1990). *Biochem. Intl.* **22**, 235-241.
- Jiao, S., Williams, P., Berg, R.K., Hodgeman, B.A., Liu, L., Repetto,G., and Wolff, J.A. (1992). Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum. Gene Ther.* **3**, 21-33.
- Kawai, S., and Nishizawa, M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cel. Biol.* **4**, 1172-1174.
- Kielian, M.C., and Z.A. Cohn. (1980). Phagosome-lysosome fusion. Characterization of intracellular membrane fusion in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* **85**, 754-765.
- Kornfeld, S., and I. Mellman. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell*

*Biol. 5*, 483-525.

Legendre, J.Y., and Szoka, F.C. Jr. (1992). Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm. Res.* **9**, 1235-1242.

Le-Poole-IC, van-den-Wijngaard-RM, Westerhof-W, Verkruijsen-RP, Dutrieux-RP, Dingemans-KP, Das-PK. (1993). Phagocytosis by normal human melanocytes in vitro. *Exp-Cell-Res.* **205(2)**, 388-395.

Leventis, R., and Silvius, J. R. (1990). Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochem. Biophys. Acta* **1023**, 124-132.

Lombardi, D., T. Soldati, M.A. Riederer, Y. Goda, M. Zerial, and S.R. Pfeffer. (1993). Rab 9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **12**, 677-682.

Loyter, A., Scangos, G. A., and Ruddle, F.H. (1982a). Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* **79**, 422-426.

Loyter, A., Scangos, G., Juricek, D., Keene, D. and Ruddle, F.H. (1982b). Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp. Cell. Res.* **139**, 223-234.

Mayorga, L.S., F; Bertini, P.D. Stahl. (1991): Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell free system. *J. Biol. Chem.* **266**, 6511-6517.

Mellman, I., R. Fuchs, A. Helenius. (1986): Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 663-700.

Miller, A. D. (1992) Human gene therapy comes of age. *Nature* **357**, 455-460

Mishima-Y. (1994). Molecular and biological control of melanogenesis through tyrosinase genes and intrinsic and extrinsic regulatory factors. *Pigment-Cell-Res.* **7(6)**: 376-387.



- Muller, W.A., Steinman R.M., and Cohn Z.A., (1980). The membrane proteins of the vacuolar system. I. Analysis by a novel method of intralysosomal iodination. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. *J. Cell Biol.* **86**, 292-313.
- Mulligan, R.C., Howard BH., Breg-P. (1979) Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV 40 beta-globin recombinant genome. *Nature*, **11**, 277 (5692): 108-114.
- Nayar-R, Schroit-AJ. (1985). Generation of pH-sensitive liposomes: use of large unilamellar vesicles containing N-succinyldioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry.* **8**, 24 (21), 5967-5971.
- Pearse, BM., and Robinson, M.S. (1996). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 151-171.
- Pfeffer, S.R. (1992). GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends Cell Biol.* **2**, 41-46.
- Pinnaduwege, P., Schmitt, L., and Huang, L. (1989) Use of a quaternary ammonium detergent in liposome mediated DNA transfection of mouse L-cells. *Biochim. Biophys. Acta* **985**, 33-37
- Pitt, A., Mayorga, L. S., Schwartz, A. L., and Stahl, P. D. (1992) Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *J. Biol. Chem.* **267**, 126-132
- Rabinowitz, S., Horstmann, H., Gordon, S., and Griffiths, G. (1992) Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J. Cell Biol.* **116**, 95-112
- Salzman, N.H., and F.R. Maxfield. (1988). Intracellular fusion of sequentially formed endocytic compartments. *J. Cell Biol.* **106**, 1083-1091.
- Salzman, N.H., and F.R. Maxfield. (1989). Fusion-accessibility of endocytic compartments along the recycling and lysosomal endocytic pathways in intact cells. *J. Cell Biol.* **109**, 1097-2104.
- Schraermeyer-U. (1994). Fine structure of melanogenesis in the ink sac of *Sepia officinalis*. *Pigment-Cell-Res.* **7**(1), 52-60.

- Schraermeyer-U., Stieve-H.(1994). A newly discovered pathway of melanin formation in cultured retinal pigment epithelium of cattle. *Cell-Tissue-Res.* **276(2)**, 273-279.
- Schraermeyer-U. (1995). Transport of endocytosed material into melanin granules in cultured choroidal melanocytes of cattle-new insights into the relationship of melanosomes with lysosomes. *Pigment-Cell-Res.* **8 (5)**: 209-214.
- Silverstein, S.C., S. Greenberg, F. Di Virgilio, and T.H. Steinberg. (1989). Phagocytosis. *In Fundamental Immunology*. W.E. Paul, editor. Raven Press Ltd, New York. 703-719.
- Smith, J.G., Rosemary L., Walzem and J. Bruce German. Liposomes as agents of DNA transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1154**, 327-340.
- Stoorvogel, W., Geuze, H.J., Griffith, J.M., Schwartz, A.L., and Strous, G.J. (1989) Relations between the intracellular pathways of the receptors for transferrin, asialoglycoprotein, and mannose 6-phosphate in human heptoma cells. *J. Cell. Biol.* **108**, 2137-2148.
- Stoorvogel, W., Strous, G. J., Geuze, H. J., Oorschot, V., and Schwartz, A. L. (1991) Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* **65**, 417-427
- Thilo, L., E. Sroud, and T. Haylett (1995): Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. *J. Cell Sci.* **108**, 1791-1803.
- Thompson, T.A., Gould, M.N., Burkholder, J.K., and Yang, N.S. (1993). Transient promoter activity in primary rat mammary epithelial cells evaluated using particle bombardment gene transfer. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **29A**, 165-170.
- van der Sluijs, P., M. Hull, L.A. Huber, P. Mâle, B. Goud, and I. Mellman. (1992). Reversible phosphorylation-dephosphorylation determines the localization of rab 4 during the cell cycle. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **11**,4379-4389.
- Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., and Birnstiel, M.L. (1990). Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3410-3414.



- Walker, S., Sofia, M. J., Kakarla, R., Kogan, N. A., Wierichs, L., Longley, C. B., Bruker, K., Axelrod, H. R., Midha, S., Babu, S., and Kahne, D. (1996) Cationic facial amphiphiles: a promising class of transfection agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 1585-1590
- Wattiaux, R., Jadot, M., Dubois, F., Misquith, S., and Wattiaux-De Coninck, S. (1995) Uptake of exogenous DNA by rat liver: Effect of cationic lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 81-87
- Wattiaux, R., Jadot, M., Dubois, F., and Wattiaux-De Coninck, S. (1996a) Phagocytosis by rat liver: relationships between phagosomes and lysosomes *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 596-574.
- Wattiaux, R., Jadot, M., Laurent, N., Dubois, F., and Wattiaux-De Coninck, S. (1996b) Cationic lipids delay the transfer of plasmid DNA to lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 448-454
- Wrobel, I., Collins, D. (1995) Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 296-304
- Wu, G.Y., and Wu, C.H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4429-4432.
- Wu, G.Y., and Wu, C.H. (1988a). Evidence for targeted gene delivery to hepG2 hepatoma cells in vitro. *Biochemistry.* **27**, 887-892.
- Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., and McCabe, D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9568-9572.
- Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., and Welsh, M. J. (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 18997-19007
- Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H., and Birnstiel, M.L. (1990). Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3655-3659.

Zerial, M., and H. Stenmark. (1993). Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**; IN press.

Zhou, X., and Huang, L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine; characterization and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* **1189**, 195-203.