



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Capture par le foie de rat et cheminement intracellulaire d'ADN plasmidique complexé avec la poly-D-lysine et le DOTAP : effet de la taille des complexes

VAN ASSCHE, Veronique

Award date:
1999

Awarding institution:
Universite de Namur

[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.



Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Capture par le foie de rat et cheminement intracellulaire d'ADN
plasmidique complexé avec la poly-D-lysine et le DOTAP : effet de
la taille des complexes.**

VAN ASSCHE Véronique

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de licencié en sciences
biologiques.

-Juin 1999-

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Capture par le foie de rat et cheminement intracellulaire d'ADN plasmidique complexé avec la poly-D-lysine et le DOTAP: effet de la taille des complexes.

VAN ASSCHE Véronique

Résumé

L'efficacité de la transfection est probablement dépendante du taux de dégradation intracellulaire d'ADN plasmidique. Dans ce mémoire, nous montrons que la taille de complexes ADN-polycations influence le trafic intracellulaire après leur capture par le foie de rat. Deux sortes de complexes d'ADN(³⁵S) avec la poly-D-lysine ou le DOTAP ont été fabriqués. Ces complexes sont caractérisés par des coefficients de sédimentation moyens, mesurés dans le glucose 5%, différents d'au moins un facteur 10. Des expériences de dégradation de ces complexes ont été réalisées *in vitro* en présence de lysosomes purifiés de foie de rat. Suivant des temps croissants après injection intra-veineuse des complexes, la radioactivité présente dans le foie a été déterminée et sa distribution intracellulaire a été établie par des techniques de centrifugation différentielle et isopycniq.

Les résultats de dégradation des acides nucléiques *in vitro* montrent que les petits complexes sont plus sensibles à l'action des nucléases lysosomales que les gros complexes. Les deux types de complexes sont captés de façon similaire par le foie, mais la dégradation intracellulaire des acides nucléiques *in vivo* est plus rapide pour les petits complexes, ce qui est en accord avec les résultats obtenus *in vitro*. De plus, les résultats de centrifugation suggèrent que les petits complexes sont plus rapidement transférés aux lysosomes, ce qui favorise également leur dégradation par rapport à celle des gros complexes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 1999

Promoteur: Professeur S. Wattiaux - De Coninck.

Co-promoteur: Professeur M. Jadot.

Au terme de ces quelques mois passés dans le laboratoire de chimie physiologique, je suis maintenant enfin capable de comprendre ce qu'est la vie de labo ! Cela m'a permis de voir combien une telle vie est parfois difficile, mais à côté de cela, la satisfaction d'obtenir des résultats et d'envisager que ceux-ci puissent un jour apporter quelque chose est incomparable. Je suis très heureuse d'avoir eu la chance de travailler dans un département aussi accueillant et de rencontrer des personnes inoubliables qui m'ont permis de réaliser ce mémoire.

J'adresse toute ma gratitude à Monsieur le professeur Wattiaux pour m'avoir suivie pendant ces six mois et qui par sa combinaison de rigueur et d'humour a été un élément essentiel à l'élaboration de mon mémoire.

Ensuite, j'exprime toute ma reconnaissance envers Madame le professeur Wattiaux-De Coninck qui m'a dès notre première rencontre encouragée à entreprendre ce mémoire et qui m'a toujours soutenue à tout point de vue.

Pour son aide précieuse et sa spontanéité, je remercie vivement Madame Marie-Thérèse Warnier-Pirotte.

Un grand merci aussi à Nathanael Laurent pour ses nombreux conseils et de m'avoir si bien aiguillée dans mes recherches.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Anne Gilbert et Isabelle Hamer de m'avoir fait part de leurs connaissances et expériences dans le domaine scientifique. La chaleur de leur accueil m'a profondément touchée.

Merci aussi à toutes les personnes que j'ai côtoyées chaque jour dans le laboratoire de chimie physiologique, et que je n'ai pas encore citées, pour m'avoir conseillée et aidée. Je pense particulièrement à Monsieur Dubois, Monsieur Savels et Monsieur le professeur Jadot.

Je n'oublie pas Michèle Lecocq pour son amitié sincère de longue date et pour les moments inoubliables passés avec elle.

Enfin, je remercie ma famille et mes proches pour leur soutien moral et leurs encouragements.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont fait l'objet partiel d'une communication

- à la Société Belge de Biochimie, Namur, le 08 mai 1999 et

- au 2nd Annual Meeting de l'American Society of Gene Therapy-

Washington, D.C., 9-13 juin 1999.

Laurent, N., Van Assche, V., Warnier-Pirotte, M-T., Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck, S. and Jadot, M. Uptake by rat liver and intracellular fate of plasmid DNA complexed with polycations : effect of the complexes size.

Plan du mémoire

I.-INTRODUCTION	1
1.- Le foie	1
1.1.- Les cellules du foie.....	1
1.2.- Vascularisation hépatique et système biliaire.....	3
1.3.- Les principales fonctions physiologiques du foie.....	3
1.4.- Physiopathologie et maladies du foie.....	4
2.- Endocytose et trafic intracellulaire	5
1.- Introduction.....	5
2.- L'endocytose.....	5
2.1.- La phagocytose.....	6
2.2.- L'endocytose-pinocytose.....	7
2.2.1.- Classification fonctionnelle.....	7
.....1.- L'endocytose fluide.....	7
.....2.- L'endocytose adsorbitive.....	8
.....3.- L'endocytose médiée par récepteurs.....	8
2.2.2.- Classification morphologique.....	8
.... 1.- L'endocytose associée à la clathrine.....	8
.... 2.- L' endocytose clathrine indépendante.....	9
.... 3.- Caveolae et potocytose.....	9
.... 4.- La macropinocytose.....	9
2.2.3.- Sort des ligands-récepteurs internalisés.....	10
2.2.4.- Cheminement du matériel endocyté vers les lysosomes.....	10
2.2.5.- Relations endosomes précoces & endosomes tardifs.....	11
3.- La thérapie génique	12
1.- Introduction.....	12
2.- La transfection.....	13
....21.- Les vecteurs viraux.....	13
....2.2.- Les vecteurs non viraux.....	15
....2.2.1.- Méthodes basées sur la capture d'ADN non complexé.....	16
.....a.- In vitro.....	16

.....b.- In vivo.....	17
...2.2.2.- Méthodes basées sur la capture de complexes ADN/liposomes.....	18
.....a.- Les liposomes.....	18
.....b.- Les lipides cationiques.....	19
.....b.1.- Mécanismes d'action des lipides cationiques.....	19
.....b.2.- Divers types de lipides cationiques.....	19
.....b.3.- Structure de ces composés.....	19
.....b.4.- Interactions ADN/lipides cationiques.....	20
.....b.5.- Choix de l'agent lipofectant.....	20
...2.2.3.- Méthodes basées sur la capture des complexes ADN/polypeptides.....	21
...2.2.4.- Méthodes basées sur la capture des complexes ADN/polymères synthétiques.....	21
...2.2.5.- Principaux problèmes rencontrés lors d'une administration <i>in vivo</i> des systèmes non viraux.....	22
4.- But du mémoire.....	23
 II.-MATERIEL ET METHODES.....	24
1.- Marquage radioactif d'ADN plasmidique par nick translation.....	24
2.- Préparation des complexes ADN/vecteurs cationiques.....	26
3.- Technique de fractionnement.....	26
3.1.- Préparation de l'homogénat.....	26
3.2.- Centrifugation différentielle.....	27
3.3.- Centrifugation isopycnique.....	28
3.4.- Méthodes de dosages d'enzymes de références.....	29
4.- Courbe de sédimentation.....	30
5.- Expérience de capture des complexes ADN/vecteurs cationiques.....	30
6.- Expérience de dégradation des complexes ADN/vecteurs.....	31
7.- L'effet du Triton sur les lysosomes.....	32
8.- Répartition des complexes dans les différentes cellules hépatiques.....	32
 III.-RESULTATS.....	34
1.- Complexes poly-D-lysine- ADN³⁵S.....	34
1.1.- Sédimentation des complexes poly-D-lysine- ADN ³⁵ S.....	34
1.2.- Capture et dégradation de GC et PC par le foie.....	35
1.3.- Dégradation de GC et de PC « in vitro » par les lysosomes.....	35

1.4.- Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.....	35
1.5.- Distribution de la radioactivité après centrifugation isopycniq.	36
1.6.- Effet du Triton WR 1339.....	36
1.7.- Distribution cellulaire.....	37
2.- Complexes DOTAP-ADN³⁵S.....	38
2.1.- Capture et dégradation de GCD et PCD par le foie.....	38
2.2.- Dégradation de GCD et de PCD « in vitro » par les lysosomes.....	38
2.3.- Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.....	38
2.4.- Distribution de la radioactivité après centrifugation isopycniq.	39
2.5.- Effet du Triton WR 1339.....	39
IV.- DISCUSSION et CONCLUSION.....	41
1.- Complexes poly-D-lysine.....	41
- La susceptibilité aux nucléases lysosomales dépend de la taille du complexe.....	41
- <i>In vivo</i> , la dégradation de l'ADN mais non sa capture par le foie dépend de la taille du complexe.....	42
- Le cheminement intracellulaire de l'ADN capté le conduit aux lysosomes mais la vitesse à laquelle les molécules d'acide nucléique atteignent ces organites est beaucoup plus élevée pour les complexes de grande taille.....	42
- Comment expliquer le retard de transfert aux lysosomes ?.....	43
2.- Complexes DOTAP-ADN³⁵S.....	44
3.- Sort intracellulaire de l'ADN plasmidique et efficacité de transfection.....	45
V.- REFERENCES.....	46

I.- INTRODUCTION

I.-Introduction

1.-Le Foie

Le foie est une glande annexe du système digestif constituée principalement de cellules parenchymateuses (hépatocytes); il renferme aussi des cellules non parenchymateuses (cellules endothéliales, cellules de Kupffer , *fat storing cells* et *pits cells*).

D'un point de vue macroscopique, il est composé d'un certain nombre de lobes, et au niveau microscopique, les hépatocytes se regroupent en lobules formant des feuillettes (verticaux) de cellules. Un lobule est une structure hexagonale centrée sur une veine (la veine centrolobulaire) et délimitée par des espaces portes (veine porte, artère hépatique et canalicule biliaire). Les lobules sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif dense irrégulier. La circulation sanguine se fait dans le sens espace porte - veine centrolobulaire. Un réseau de fibres réticuliniques soutient les différentes cellules et se prolonge par la capsule de Glisson (capsule collagénique très résistante).

1.1-Les cellules du foie.

Les Hépatocytes

Les hépatocytes forment des lames aplaties, anastomosées d'une épaisseur d'une cellule et disposées d'une façon radiaire. Ils ont une grande taille (30-40 μ m de diamètre).

En microscopie optique, leur cytoplasme laisse apparaître des organites, des inclusions lipidiques et quelques amas de glycogène. Le noyau est gros, la chromatine dispersée à la périphérie et le nucléole bien visible.

En microscopie électronique, on distingue dans les cellules polarisées un domaine vasculaire face aux sinusoides, un domaine intercellulaire et un domaine biliaire. L'espace de Disse se trouve entre les cellules bordant les sinusoides et les hépatocytes. A cet endroit la surface des hépatocytes présente des villosités permettant un grand contact avec le sang. Entre les villosités, on observe des régions où la membrane est plus épaisse et s'incurve pour former des vésicules recouvertes de clathrine.

Les cellules endothéliales (EC)

Représentant la majorité des cellules non parenchymateuses (NPC), les cellules endothéliales bordent les capillaires sinusoides.

Ces cellules forment des plaques criblées [1] dues à la présence de fenêtres ouvertes placées sur les projections cytoplasmiques. Cela permet une continuité entre l'espace de Disse et la lumière des sinusoides. Les cellules endothéliales contribuent à l'hémostase sanguine par l'endocytose de macromolécules circulant dans le sang . Elles possèdent de nombreux récepteurs à leur surface et un appareil lysosomal important.

Les cellules de Kupffer (KC)

Les cellules de Kupffer sont des cellules phagocytaires de la famille du système de défense des monocytes – macrophages. Dans le foie, elles appartiennent au système réticulo-endothelial et entrent directement en contact avec les EC en bordure des sinusoides. Elles possèdent les caractéristiques typiques des macrophages, avec notamment un appareil lysosomal bien développé.

Leur fonction est de débarrasser le foie des bactéries, des globules rouges âgés et de toute sorte de débris. Elles exercent la phagocytose, certaines réactions immunes, l'internalisation et le catabolisme de certaines biomolécules ainsi que la sécrétion de certaines substances.

Les fat storing cells ou cellules de Ito

De forme étoilée, ces cellules de Ito sont localisées dans l'espace de Disse ou coincées entre deux hépatocytes. Elles peuvent accumuler la vitamine A dans des gouttelettes lipidiques. Le rôle de ces cellules dans le métabolisme de la vitamine A et son transport n'est pas encore connu. Ces cellules joueraient un rôle dans la production de protéines de la matrice extracellulaire et interviendraient dans le développement de fibroses et de cirrhoses hépatiques [2].

Les Pits cells

On classe ces cellules parmi les Natural Killer mais leurs diverses fonctions ne sont actuellement pas élucidées.

1.2.- Vascularisation hépatique et système biliaire

La plupart des produits alimentaires (excepté les lipides) passent directement de l'intestin grêle au foie par l'intermédiaire de la veine porte hépatique. L'oxygène nécessaire au métabolisme est fourni par l'artère hépatique. Le foie possède donc un double apport sanguin, artériel et veineux. Le sang circule entre les travées hépatiques dans les sinusoides qui convergent vers la veine centrolobulaire. Plusieurs veines de ce type se rejoignent pour former la veine sus-hépatique qui se jette dans la veine cave inférieure.

Les hépatocytes sécrètent la bile dans un réseau de canalicules biliaires situé entre les membranes plasmiques d'hépatocytes adjacents. Ces canalicules se jettent dans un système de canaux biliaires au niveau de l'espace porte et forment ensuite la voie biliaire principale se terminant dans le duodénum.

1.3.- Les principales fonctions physiologiques du foie

Le foie est tout d'abord ce que l'on peut appeler un carrefour métabolique pour les glucides, les lipides et les protéines.

En effet, il permet la synthèse de protéines plasmatiques (par exemple les facteurs de la coagulation) à partir des acides aminés arrivant par la veine porte.

Les triacylglycérols, les phospholipides, le cholestérol et ses esters sont transportés par le plasma sanguin en association avec des protéines sous forme de lipoprotéines. On classe ces lipoprotéines suivant leur densité en HDL (lipoprotéine de haute densité), LDL (lipoprotéine de faible densité), VLDL (lipoprotéine de très faible densité) et chylomicrons. Les sels biliaires ainsi que les HDL et VLDL sont synthétisés par le foie lors du métabolisme lipidique.

Enfin, il effectue des fonctions métaboliques à partir du glucose pris par les hépatocytes, par exemple : synthèse et stockage du glycogène.

Cette glande est aussi le lieu de sécrétion de la bile. La bile étant à la fois un mélange aqueux des produits terminaux de la digestion, un produit d'excrétion et une sécrétion exocrine.

Certaines molécules exogènes telles que des aliments ou des polluants subissent une détoxification et une inactivation lorsqu'elles pénètrent dans le foie. Ceci a lieu par des réactions d'oxydation, de méthylation et de conjugaison.

Enfin, une fonction immunitaire est assurée par les cellules de Kupffer, cellules qui procèdent aussi à la destruction des globules rouges âgés (avec la rate).

Il faut signaler que les cellules du foie se régénèrent après une ablation partielle ou une intoxication hépatique.

1.4.- Physiopathologie et maladies du foie

Vu l'importance de cet organe dans l'organisme, les pathologies qui affectent le foie révèlent le plus souvent un caractère grave.

La structure du foie peut être altérée dans le cas d'une cirrhose, ou bien une ou plusieurs de ces fonctions métaboliques peuvent manquer ou être déficientes.

Le foie constitue un organe cible pour la thérapie génique [3] d'une part à cause du rôle central dans le métabolisme et la production de protéines sériques et d'autre part on peut se servir de cet organe pour produire une molécule à fonction thérapeutique. Il existe plusieurs maladies métaboliques congénitales qui résultent d'un manque ou d'une déficience de produits génétiques dérivés du foie. Citons en quelques-unes : l'hypercholestérolémie, l'hémophilie, la déficience de conjugaison de la bilirubine, la tyrosinémie...

Les progrès en thérapie génique en ce qui concerne le foie ou d'autres organes dépendent en grande partie du développement de vecteurs qui introduisent d'une manière efficace les gènes à l'intérieur des cellules.

2.- Endocytose et trafic intracellulaire

1.- Introduction

La membrane plasmique est une frontière semi-perméable entre la cellule et le milieu environnant [4]. Cette perméabilité sélective permet aux molécules indispensables comme le sucre, les acides aminés et les lipides d'accéder facilement à la cellule, aux métabolites intermédiaires de ne pas s'en échapper et aux déchets métaboliques de la quitter. C'est donc grâce à cette perméabilité sélective au niveau des échanges à travers la membrane plasmique que la cellule peut maintenir l'équilibre de son propre milieu intérieur.

- Les petites molécules telles que l'éthanol et les gaz (O_2 et CO_2) diffusent à travers les bicouches phospholipidiques par un processus de transport appelé diffusion passive (selon le gradient de concentration).
- Le flux de molécules telles l'urée est accéléré lors de la diffusion facilitée par des perméases qui leur permettent de franchir des membranes en s'opposant à leur gradient de concentration. Il existe 2 types de perméases : les protéines *carrier* ou transporteurs et les protéines *channel* ou tunnel ionique.
- Le transport actif donne la possibilité à certains ions ou molécules de pénétrer dans les cellules contre le gradient de concentration.

Ceci est réalisé d'une part grâce aux pompes ioniques ATP-dépendantes et d'autre part par la présence de symports et d'antiports.

L'entrée de macromolécules et de microparticules dans les cellules se déroule grâce à l'endocytose.

2.- L'endocytose

L'endocytose au sens large est un processus au cours duquel une petite zone de membrane plasmique s'invagine pour former une nouvelle vésicule intracellulaire bordée de membrane dont le diamètre varie de 0.05 à 1 μm .

On classe l'endocytose selon les deux catégories suivantes :

- La phagocytose permet la capture de particules telles que des microorganismes ou des débris cellulaires par de grandes vésicules dénommées phagosomes.
- La pinocytose ou endocytose au sens strict consiste en l'ingestion de molécules de taille restreinte : fluide, solutés, macromolécules, particules colloïdales, virus ou petites particules exogènes pour former des petites vésicules dont la taille ne dépasse pas 150 nm.

Notons cependant que lors de la macropinocytose, on distingue des vésicules d'une taille comprise entre 0.25 et 5 μm .

2.1.- La phagocytose [5].

La phagocytose est une forme spécialisée d'endocytose qui concerne l'ingestion de matériel ayant un diamètre supérieur à 250 nm et ceci, contrairement à la macropinocytose, via un mécanisme dépendant de récepteurs.

Les phagocytes professionnels tels que les macrophages et les neutrophiles exercent la phagocytose en ingérant les microorganismes présents dans le sang et ainsi, protègent l'organisme des infections. Les macrophages effectuent aussi un « nettoyage » de cellules vieilles et abîmées ainsi que des débris cellulaires.

Le diamètre d'un phagocyte varie en fonction de la taille du matériel ingéré.

Une fois que l'intrus (ex : une bactérie opsonisée par des anticorps) est fixé aux récepteurs spécifiques (ex : récepteurs aux fragment Fc des anticorps) présents en surface des cellules phagocytaires, des signaux sont transmis à l'intérieur de cette cellule pour initier le processus d'invagination. La cellule étend alors des pseudopodes qui englobent la bactérie et joignent leurs bords pour former un phagosome. Ce mode de capture est qualifié de modèle d'interaction à fermeture - éclair ou *zipper model* [6] à cause de l'interaction ligand-récepteur.

Les phagosomes forment une partie intégrale de la voie d'endocytose menant aux lysosomes [7]. Une fois formés, ils interagissent avec les endosomes précoces. Lorsqu'ils sont matures, ils fusionnent avec les lysosomes pour délivrer la particule dans un phagolysosome.

Deux hypothèses expliquent le processus de maturation des phagosomes.

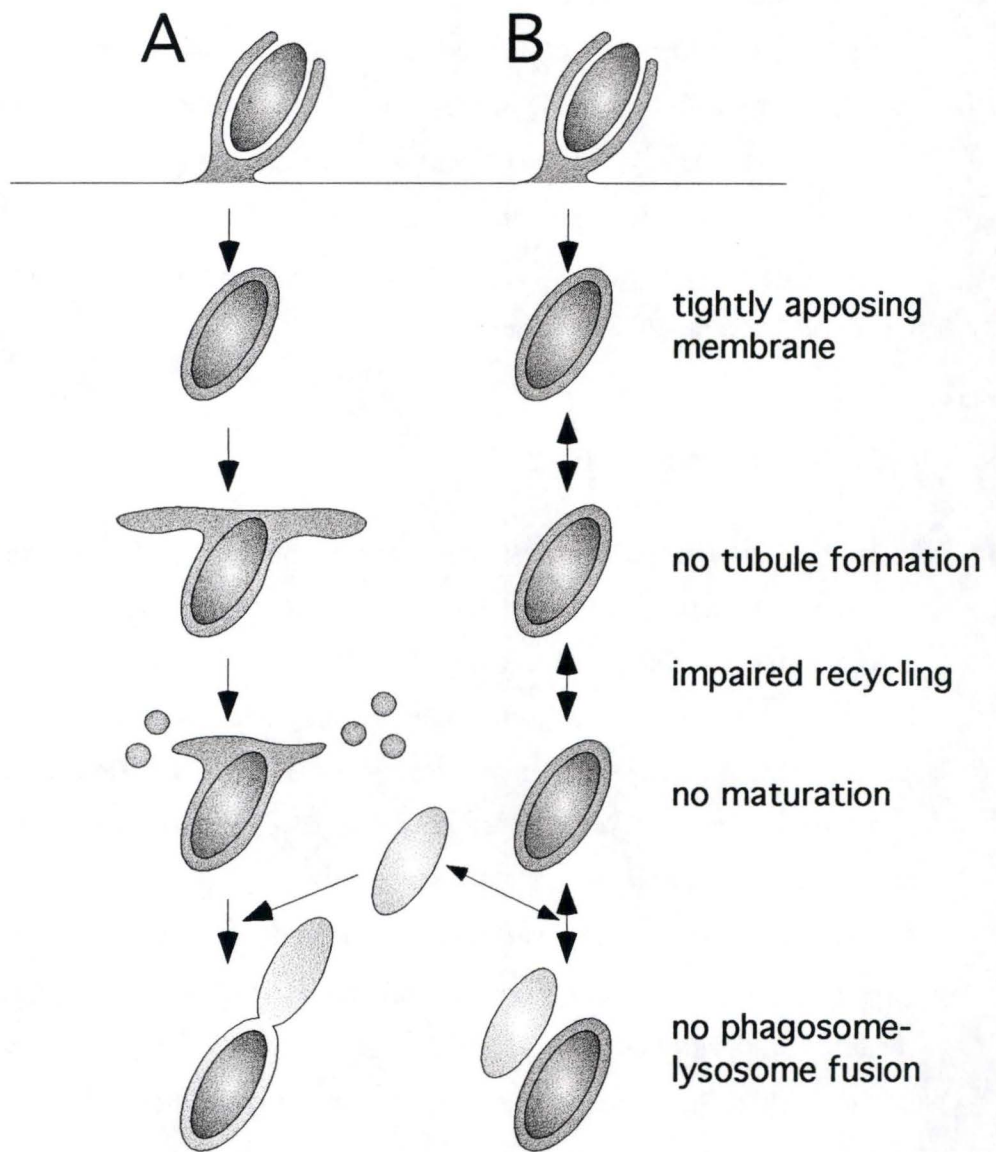


Figure 1 [7]: Mécanisme hypothétique montrant :
 - en A, les étapes nécessaires à la maturation des phagosomes et à leur fusion avec les lysosomes.
 - en B, les étapes empêchant la maturation des phagosomes et leur fusion avec les lysosomes.

La première consiste en un changement graduel dans la composition du contenu et de la membrane des phagosomes qui deviendraient, en mûrissant, des phagolysosomes [8].

La seconde suggère une fusion entre les phagosomes matures et les lysosomes préexistants pour générer ces phagolysosomes [7].

Comme présenté en *figure 1*, on remarque que un certain nombre de conditions sont requises pour permettre la maturation et la fusion des phagosomes avec les lysosomes [7]:

- Un accollement relativement faible entre les membranes internes du phagosome et la surface de la particule.
- La formation de tubules dans la cellule (pour le transport de vésicules).
- Un recyclage efficace au niveau des membranes et des protéines membranaires.
- Une maturation possible grâce aux interactions avec des endosomes précoces (acidification et apport d'hydrolases).
- Une fusion phago-lysosomale.

2.2.- L'endocytose-pinocytose [4]

La pinocytose ou endocytose au sens strict est la capture de macromolécules ou de solutés par une cellule à l'intérieur de petites vésicules qui se détachent de la membrane plasmique.

2.2.1.- Classification fonctionnelle.

On distingue trois types d'endocytose suivant la spécificité avec laquelle le matériel extracellulaire est intériorisé.

1.- L'endocytose fluide

L'endocytose fluide permet l'encerclement de petites gouttelettes de liquide extracellulaire avec les solutés qu'il contient pour former des petites vésicules. Le taux de capture dépend directement de la concentration du soluté dans le milieu extracellulaire et ce processus a lieu dans la plupart des cellules.

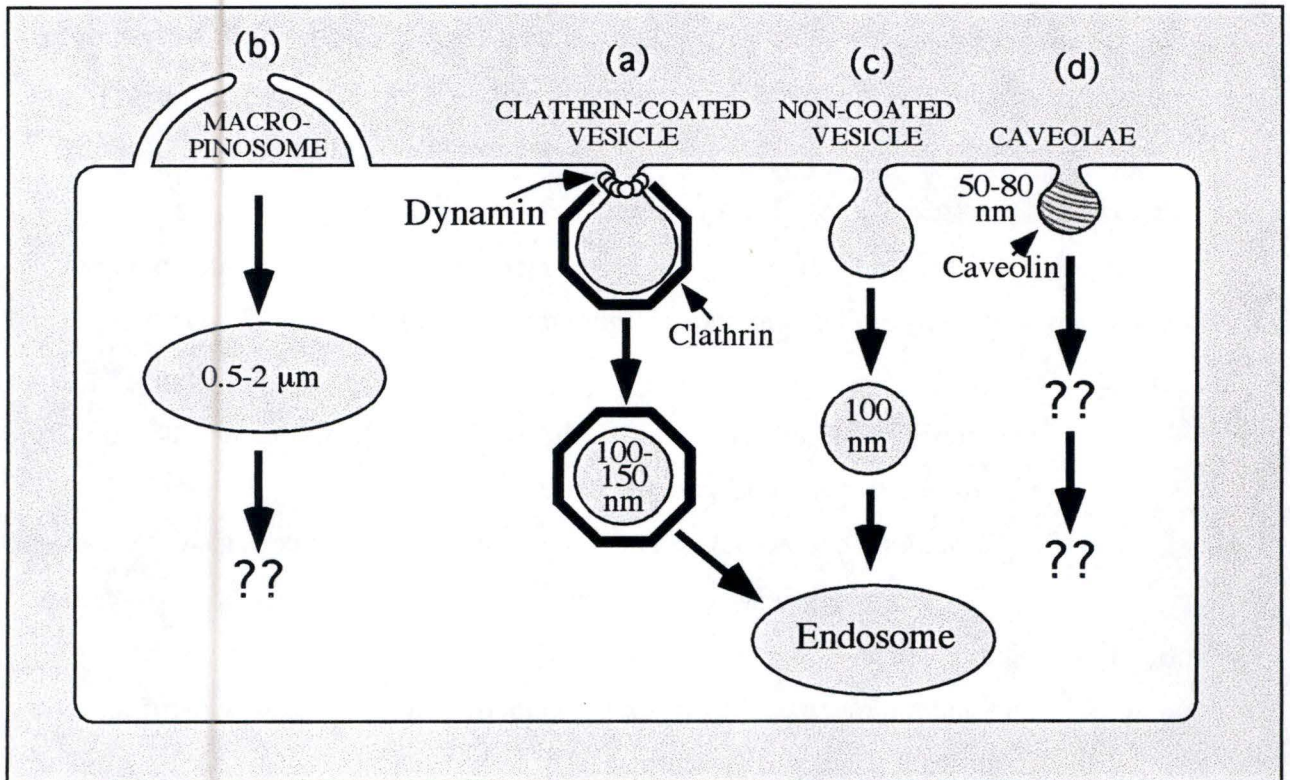


Figure 2 [9]: Selon la classification morphologique, l'endocytose est subdivisée en quatre classes différentes :

- en (a), l'endocytose associée à la clathrine
- en (b), la macropinocytose
- en (c), l'endocytose indépendante de clathrine
- en (d), la potocytose.

2.- L'endocytose adsorptive

Au cours de celle-ci, le substrat se lie à la membrane de manière peu spécifique via des interactions de charges ou via des lectines. Cela influence l'internalisation du soluté de manière plus ou moins efficace en fonction de son avidité pour la membrane plasmique.

3.- L'endocytose médiée par des récepteurs

Cette dernière fonctionne comme la précédente grâce à une liaison au niveau de la membrane cellulaire. Par contre dans ce cas-ci, on observe une liaison spécifique des molécules aux récepteurs. En effet, un récepteur particulier reconnaît une molécule extracellulaire (le ligand) et s'y attache pour former un complexe ligand-récepteur de haute affinité. Ce dernier subit l'endocytose dont la vitesse varie en fonction de la quantité de récepteurs disponibles

2.2.2.- Classification morphologique [9].

L'intervention de l'aspect morphologique des vésicules (taille et composition du manteau) et de certaines techniques biochimiques (marqueurs, gels...) ont abouti à cette seconde classification. Elle subdivise l'endocytose en quatre voies différentes (*figure 2*).

1.- L'endocytose associée à la clathrine

Le mécanisme d'endocytose médiée par récepteurs, le plus étudié et le mieux connu, met en jeu des puits et des vésicules tapissées de clathrine. Cette voie commence au niveau de régions spécialisées de la membrane plasmique : puits tapissés qui occupent en général 2% de la surface totale des cellules.

Un certain nombre de récepteurs sont continuellement internalisés (ex : récepteur aux LDL) grâce à leur présence au niveau des puits tapissés. Les autres, tels que le récepteur à l'EGF ou à l'insuline, migrent dans cette région après fixation de leur ligand. Du côté cytoplasmique, les puits sont bordés par un réseau polygonal de protéines de clathrine constituant un manteau .

La molécule de clathrine a la forme d'un trépied ou triskèlion. Elle est constituée de trois chaînes légères de 40 kD associées à trois chaînes lourdes de 180 kD. D'autres

protéines comme la dynamine, les adaptines [10] ou l'Eps 15 [11] sont indispensables à la formation des vésicules de clathrine.

Les ligands se lient à leurs récepteurs spécifiques qui peuvent souvent être mélangés au sein d'un même puits (ex : la particule LDL et la transferrine).

Le temps de vie du puits est assez court. En effet, une minute après sa formation il s'invagine dans la cellule et se détache de la membrane plasmique pour former une vésicule tapissée d'un diamètre compris entre 80 et 160 nm. Ces dernières sont entourées d'un réseau fibreux formé de 12 pentagones et d'un nombre variable d'hexagones de clathrine. La dislocation du manteau de clathrine est accomplie relativement rapidement grâce à un mécanisme dépendant de l'ATP. Ensuite, les petites vésicules délivrent leur contenu aux endosomes précoces.

Il est à noter que ce mécanisme d'endocytose associée à la clathrine augmente de plus de 1000 fois l'efficacité d'internalisation d'un ligand et ceci grâce à la concentration des récepteurs à la surface des puits de clathrine.

2.- L'endocytose clathrine-indépendante

Cette seconde voie d'endocytose contribue à une pinocytose constitutive de certaines particules et peut être mise en évidence par des traitements pharmacologiques provoquant une interruption de l'endocytose rapide liée aux récepteurs. Des vésicules plus petites (± 100 nm) se forment par un mécanisme encore peu connu actuellement.

3.- Caveolae et potocytose

Les caveolae sont des invaginations membranaires de ± 50 à 100 nm. Elle sont recouvertes sur leur face cytoplasmique d'un manteau spiralé formé par l'assemblage d'au moins une protéine identifiée : la cavéoline. On retrouve cette petite protéine de 21 kD dans les domaines riches en protéines ancrées par GPI. On ignore si ces cavéoles sont réellement impliquées dans les phénomènes d'internalisation.

4.- La macropinocytose

La macropinocytose permet la capture de grosses quantités de fluide et de solutés. Les macropinosomes sont des vacuoles de taille très variable allant de 250 nm à

5 μm de diamètre. Ils résultent du repli de larges protubérances lamellaires (*ruffles*) de la membrane plasmique. La plupart se forment en réponse à des facteurs de croissance ou des esters de phorbol et contribuent à l'apport de fluide dans les cellules. Certains macropinosomes régurgitent leur contenu.

Les connaissances à propos de leurs interactions avec les autres vésicules endocytaires restent encore limitées.

2.2.3.- Sort des ligands-récepteurs internalisés

Les vésicules recouvertes de clathrine internalisent les ligands liés aux récepteurs en se détachant de la membrane plasmique. Ensuite, on assiste au démantèlement de l'enveloppe de clathrine pour permettre la fusion des vésicules avec des endosomes précoces ou la fusion des vésicules entre elles pour former des endosomes précoces. La voie d'endocytose indépendante de clathrine converge aussi rapidement vers la formation d'endosomes précoces [12]. Les endosomes précoces sont atteints les premiers (± 5 min) par le matériel endocyté, ils agissent comme le lieu principal de triage des voies endocytaires. On rencontre quatre cheminements différents en fonction de la destination des récepteurs et de leurs ligands dans la cellule [13] :

- Le complexe ligand - récepteur est dirigé vers les lysosomes pour être dégradé. Ex : EGF.
- Le ligand se dissocie du récepteur et est dégradé dans le lysosome tandis que le récepteur est recyclé vers la membrane plasmique. Ex : récepteur aux LDL et récepteur aux asialoglycoprotéines.

Ce découplage a lieu grâce à l'environnement acide des endosomes précoces aussi appelés CURL pour *compartment of uncoupling receptor and ligand* [14].

- La transcytose transporte le complexe ligand - récepteur du côté opposé de la cellule. Ex : IgG maternel
- Lors de la rétroendocytose, le ligand retourne vers la membrane avec son récepteur. Ex : La transferrine.

2.2.4.- Cheminement du matériel endocyté vers les lysosomes

Les compartiments endosomaux sont vus en microscopie électronique comme un ensemble complexe de grandes vésicules lisses et de structures plus ou moins tubulaires

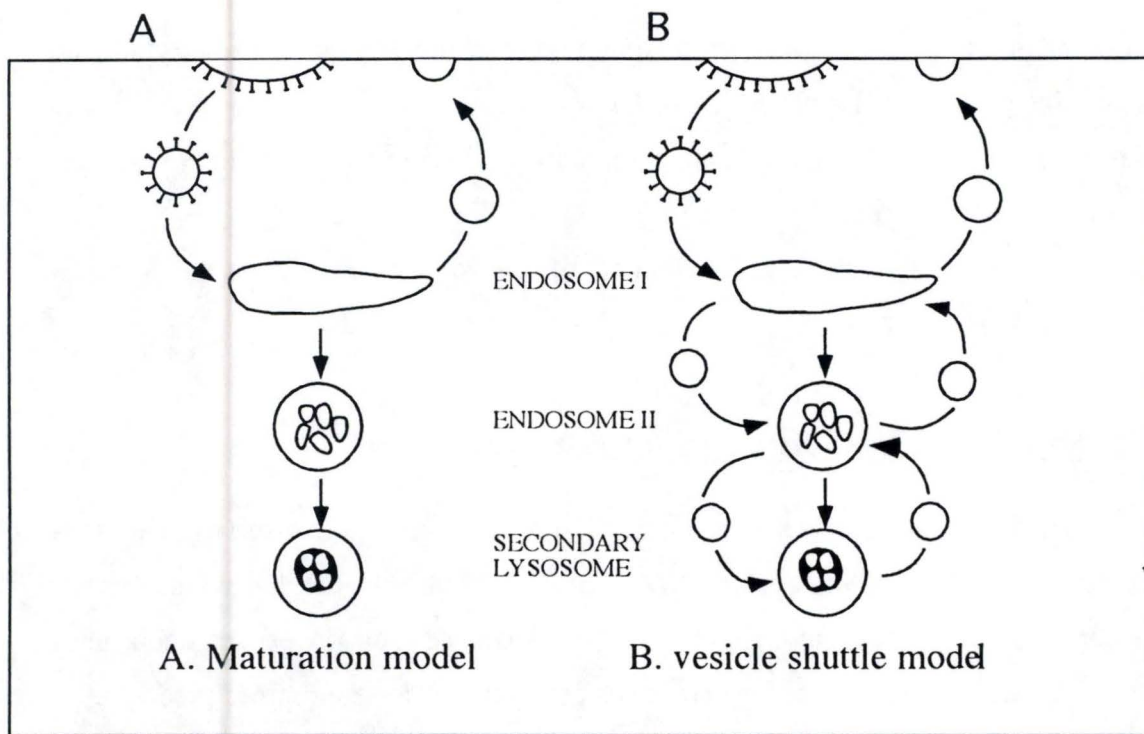


Figure 3 : Le transport du contenu des endosomes vers les lysosomes peut se faire par deux mécanismes différents.
 A : selon le modèle de maturation
 B : selon le modèle de transport vésiculaire

s'étendant de la périphérie cellulaire à la région périnucléaire. On distingue en général deux populations d'endosomes, les endosomes précoces et les endosomes tardifs [15].

Les endosomes précoces sont localisés juste en dessous de la membrane plasmique et se chargent rapidement du matériel endocyté. Ils transfèrent leur contenu aux endosomes tardifs qui se situent dans une région plus centrale de la cellule, tout près du Golgi et des lysosomes. Ces endosomes forment des corps multivésiculaires (MVB) et on y trouve des ligands, des récepteurs, des enzymes lysosomiaux et d'autres solutés (destinés à la dégradation). Malgré la présence d'hydrolases acides au niveau des endosomes tardifs, la plus grande partie de la digestion des substrats endosomaux prend place seulement après leur transfert aux lysosomes (où les enzymes deviennent pleinement actives).

Le pH des compartiments endosomaux est acide grâce au fonctionnement d'une pompe à protons ATP - dépendante. En général, les endosomes tardifs sont plus acides (pH 5.5-6.0) que les endosomes précoces (pH 6.0-6.2).

Le lysosome [5] est un organite subcellulaire entouré d'une membrane, il contient une quarantaine d'enzymes hydrolytiques : protéases, nucléases, glycosidases,... Toutes ces hydrolases acides fonctionnent de manière optimale à un pH proche de 5 qui est maintenu dans les lysosomes par une pompe à protons. Les lysosomes sont des organites très hétérogènes d'un point de vue morphologique. Cette diversité reflète la grande variété des fonctions digestives catalysées par les enzymes lysosomiaux :

- digestion des débris intra. et extracellulaires
- digestion des microorganismes phagocytés
- nutrition cellulaire.

2.2.5.- Relations endosomes précoces & endosomes tardifs

Actuellement, deux modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme par lequel le matériel endocyté est transporté d'un compartiment endosomal à l'autre pour aboutir au niveau des lysosomes (*figure 3*).

- Le modèle de transport vésiculaire [16] ou « vesicle shuttle model » propose l'existence d'une série d'organites stables et distincts (endosomes, lysosomes) qui communiquent via des vésicules de transport spécifiques. Lors de ce système, un ensemble de protéines est collecté dans une vésicule bourgeonnant d'un compartiment

pour fusionner d'une manière très spécifique avec le compartiment suivant de la voie d'endocytose.

- Selon le modèle de maturation [17,18], les différents organites impliqués dans l'endocytose seraient formés par la maturation des endosomes précoces. Des éléments recyclables quitteraient les endosomes par bourgeonnement de vésicules et de nouveaux composés comme les enzymes lysosomiaux et des glycoprotéines lysosomiales entreraient dans ces vésicules par une fusion avec les endosomes en maturation.

Un modèle alternatif de maturation des endosomes [19] a été proposé par Hopkins en 1990. Celui-ci suggère que les vésicules de transport soient transportées le long d'un réseau de tubules (continus) de manière centripète à partir de la périphérie des cellules. Ces mouvements ont été observés en microscopie confocale grâce à l'utilisation de certains marqueurs fluorescents.

Il est évident que l'endocytose présente en réalité des éléments issus de ces deux modèles mais qui varient en fonction de différents paramètres.

3.- La thérapie génique

1.- Introduction

Le premier concept associé à la notion de thérapie génique était celui de la réparation des gènes dont l'altération est responsable de maladies. Ensuite, apparut le concept de gène- médicament (*A Kahn*) [20] qui implique l'apport d'un gène fonctionnel dans les cellules dont le gène homologue n'est pas fonctionnel.

En effet, l'identification de gènes responsables de maladies génétiques permet d'envisager le transfert d'ADN- médicament à certaines populations de cellules d'un individu atteint.

La thérapie génique peut se réaliser suivant 2 approches. Le protocole *ex-vivo* consiste à prélever des cellules de l'individu malade, d'y introduire le gène désiré et de les réinsérer dans les tissus du patient. Lors de l'approche *in vivo*, un gène est introduit directement dans l'organisme. Pour réaliser la thérapie génique, on utilise des vecteurs qui sont soit des virus recombinés (adénovirus, rétrovirus...) dont on a éliminé

les gènes de virulence, soit des vecteurs non-viraux contenant le gène cloné dans un plasmide. On parle alors respectivement d'infection et de transfection.

Le gène introduit est la forme corrigée du gène déficient identifié chez le patient. Les premiers essais cliniques de thérapie génique ont eu lieu en 1990, avec le transfert du gène de l'adénosine désaminase (*ADA*) dans le cas d'une immunodéficience combinée sévère (*SCID*). Depuis, plusieurs essais ont été menés sur d'autres maladies [21].

Ces essais ont démontré la faisabilité et l'innocuité du transfert de gènes chez l'homme, mais néanmoins nous sommes encore très loin d'une thérapie complète et définitive. De nombreux problèmes subsistent :

- absence fréquente de modèles animal
- faible activité biologique des gènes transférés
- spécificité et maintien de l'expression
- faible tolérance par le système immunitaire (pour les vecteurs viraux)
- faible efficacité de la transfection
- ignorance du trafic intracellulaire des vecteurs non viraux.

On se rend compte qu'actuellement, la thérapie génique aurait plus d'avenir dans le traitement de maladies acquises telles que le sida ou le cancer. Dans ce cas, les gènes transférés codent pour des molécules destinées à stimuler le système immunitaire (cytokines ou antigènes du CMH) ou pour des protéines toxiques ou anti-oncogènes.

Cette nouvelle thérapie ouvre aussi des portes dans le cadre de la vaccination [22]. Ceci peut s'envisager par exemple au moyen d'ADN nu injecté de façon intramusculaire [23].

2.- La Transfection

La transfection est un processus au cours duquel une molécule d'ADN exogène est introduite dans une cellule via un processus physique ou biochimique. Elle nécessite l'utilisation d'un plasmide qui conduit à une expression transitoire du gène d'intérêt ou bien une expression stable dans le cas où le gène s'insérerait dans le génome de la cellule cible.

Un des aspects essentiels du transfert de gènes à visée thérapeutique est la vectorisation de l'ADN grâce à un transporteur qui le conduit jusqu'à la cellule cible. En effet, l'ADN est une molécule anionique hydrophile et de masse moléculaire très

élevée (par ex : 3.000.000 kDaltons pour un plasmide de 5 kbases). Il n'est donc pas apte au passage à travers les membranes biologiques. C'est pourquoi, dans la plupart des cas, l'ADN doit être introduit dans la cellule soit à l'aide d'une technique physique fragilisant les membranes cellulaires (choc thermique ou électrique), soit combiné à un vecteur.

Deux types de vecteurs sont actuellement utilisés : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux ou synthétiques.

2.1.- Les vecteurs viraux

Les virus ont un cycle de vie naturel dont on peut tirer parti pour transférer durant l'infection (on parle ici d'infection et non de transfection) un matériel exogène au sein de cellules. L'infection se déroule comme suit :

- liaison de la particule virale sur la surface cellulaire (spécifique ou non)
- entrée dans le cytoplasme cellulaire soit par fusion directe avec la membrane plasmique, soit après rupture des vésicules intracellulaires (endosomes, lysosomes)
- arrivée au noyau où les gènes s'insèrent ou non dans le chromosome de la cellule hôte.

Les virus ont appris au cours de l'évolution à surmonter les différentes barrières cellulaires pour transférer efficacement leurs gènes à l'intérieur des cellules. De ce fait, les adénovirus, les rétrovirus, les virus associés aux adénovirus (AAV) et les herpes virus constituent des vecteurs de choix. Ils sont utilisés dans une grande partie des essais cliniques de thérapie génique.

Les rétrovirus

Ils intègrent leurs gènes dans les chromosomes hôtes, ce qui permet d'obtenir une expression stable. Malheureusement, cette intégration est aléatoire et peut perturber l'organisation du génome hôte (mutations...). La plupart n'infectent que les cellules en cours de division.

Les adénovirus

Les adénovirus peuvent infecter de nombreux types de tissus humains. En contrepartie, les gènes ne sont actifs que transitoirement car il n'y a pas d'intégration dans le génome. Ils peuvent infecter les cellules non mitotiques.

Les AAV

Malgré quelques publications optimistes, ce vecteur reste très difficile à obtenir à un titre élevé. De plus, il n'est efficace qu'associé à des virus auxiliaires réplicatifs : adénovirus ou herpès virus.

Les Herpès virus

Ces virus semblent efficaces dans le traitement de maladies neurologiques.

On appelle **virus défectifs**, les virus au sein desquels un ou plusieurs gènes thérapeutiques remplacent des gènes de réplication virale. Théoriquement, un virus modifié de cette manière transférerait les gènes dans les cellules sans s'y répliquer ni induire de virulence.

Les vecteurs viraux ont des avantages énormes lors du transfert de gène, à savoir leur efficacité vis à vis d'un grand nombre de cellules cibles. Il existe cependant un certain nombre d'inconvénients à l'utilisation de ce type de vecteurs :

- effets toxiques de type inflammatoire et réactions immunitaires
- difficulté de produire les virus à des titres élevés
- taille réduite des inserts pouvant prendre place dans leur génôme
- possibilité d'activation de séquences oncogènes par insertion dans des régions indéfinies du génome hôte
- réacquisition des gènes de virulence.

Pour ces raisons et parallèlement à la mise en place de nouveaux vecteurs viraux, les recherches pour le développement de vecteurs synthétiques non viraux s'intensifient.

2.2.- Les vecteurs non-viraux [24]

Les vecteurs non-viraux représentent une classe prometteuse de vecteurs pouvant être utilisés lors de la thérapie génique. En effet, ces vecteurs ne possèdent qu'un faible caractère immunogène et de plus, les gènes dont ils assurent le transport ne s'insèrent que très rarement dans le génome hôte. Lorsqu'ils ne sont pas conjugués à un ligand cellulaire spécifique, le mécanisme d'interaction avec les cellules n'est apparemment pas médié par des récepteurs. Seule une liaison par adsorption médiée par interaction de charge (vecteur positif et surface cellulaire négative) assure leur affinité

pour les cellules. Les vecteurs synthétiques du fait de leur mode d'interaction simple avec l'ADN ne posent pas de limites quant à la taille du gène qu'ils transportent. Les constructions plasmidiques peuvent être plus grandes et sont plus facilement produites que celles utilisées avec des vecteurs viraux.

Bien entendu, ces vecteurs comportent également certains inconconvénients. Le plus grand problème actuellement est l'**efficacité de la transfection** qui demeure assez faible particulièrement *in vivo*.

Il faut rappeler que le plasmide est une molécule de grande taille, chargée négativement de ± 80 nm de long (sous forme super enroulée) et que la membrane cellulaire est aussi négative. Dans l'optique d'une transfection efficace, une fois que la membrane cellulaire est traversée (probablement par endocytose), l'ADN devrait échapper à la voie endocyttaire classique pour ne pas être dégradé dans les lysosomes et atteindre le noyau. Cette dernière étape se déroule grâce au passage de l'ADN par les pores nucléaires et pourrait être déclenchée par l'ajout d'une séquence de localisation nucléaire, de protéines virales ou chromosomales.

Plusieurs méthodes chimiques ont été développées pour délivrer l'ADN à l'intérieur des cellules. Ces systèmes comprennent :

- le plasmide d'ADN non complexé
- les complexes ADN/liposomes et lipides cationiques
- les complexes ADN/polypeptides
- les complexes ADN/polymères synthétiques.

2.2.1- Méthodes basées sur la capture d'ADN non complexé

a.- In vitro

Des techniques permettant la transfection des cellules *in vitro* sont développées depuis environ 30 ans [25].

Fin des années 60, on découvrit que l'obstacle principal à la transfection était de type électrique : dans un milieu aqueux, tel le fluide extracellulaire de l'organisme, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Il existe de ce fait une répulsion par les membranes cellulaires de même charge électrique.

Pour faciliter le mécanisme de capture, l'ADN était associé à un polymère organique chargé positivement et neutralisant les charges positives de l'ADN : le **DEAE-dextran** [26].

En 1973, est apparue la technique de coprécipitation au **phosphate de calcium** ($\text{Ca}^3(\text{PO}_4)^2$) suivie d'un choc thermique [27,28].

A partir de 1980, sont apparues les **méthodes physiques d'incorporation de l'ADN** :

- La microinjection d'ADN dans le cytoplasme ou le noyau de cellules en culture mène à l'expression et l'intégration occasionnelle de gènes recombinant dans les chromosomes des cellules cibles [29]. Cette méthode est principalement utilisée pour former des animaux transgéniques.

- L'électroporation consiste à faire subir des chocs électriques aux cellules de manière à augmenter l'efficacité de la capture d'ADN via la formation de pores transitoires dans les membranes plasmiques [30].

- Le bombardement de particules implique une précipitation de l'ADN dans des microparticules qui sont projetées dans les cellules en utilisant une méthode comparable à celle de la balistique [31].

Malgré ces progrès, certaines lignées cellulaires restent encore actuellement difficilement transfectables. De plus, il existe souvent une variabilité importante concernant l'efficacité de la transfection pour une même méthode entre différents types cellulaires.

b.- In vivo

L'**injection simple** d'ADN purifié non complexé est possible pour certains types de tissus et organes comme les muscles squelettiques ou cardiaques, le foie [32], la peau [33],... Les gènes sont ainsi captés et exprimés mais l'efficacité est assez faible et la localisation de l'expression génique est située principalement autour des sites d'injection.

La technique de **bombardement** de particules emploie des microparticules liées à l'ADN et projetées dans les tissus (*gene gun*). Elle a été utilisée pour transférer des gènes dans certains organes tels que la peau, les muscles et le foie [34,35]. Le seul

problème réside dans le fait que les gènes n'atteignent que les couches cellulaires superficielles des tissus visés.

Une troisième méthode applicable *in vivo* porte le nom d'injection « *needle-free* ». Elle consiste à projeter sous pression des gouttes de liquide à l'intérieur des tissus. De bons résultats ont été obtenus au niveau des muscles [36].

2.2.2.- Méthodes basées sur la capture de complexes ADN/liposomes.

Les méthodes qui vont être décrites ci-après sont applicables aussi bien *in vitro* que *in vivo*. *In vitro*, les complexes sont mis en présence des cellules par simple introduction dans le milieu de culture. *In vivo*, on procède par injection intraveineuse, intrapéritonéale, intratissulaire ou encore intratrachéale (pour le traitement de maladies telles que la mucoviscidose). En ce qui concerne le traitement contre le cancer, on pratique le plus souvent l'injection des complexes directement dans les tumeurs.

a.- Les liposomes [37].

Les liposomes sont des vésicules de bicouches lipidiques formées par auto-assemblage de molécules amphiphiles. Ils peuvent véhiculer par encapsulation divers principes actifs et sont développés depuis 25 ans comme vecteurs de médicaments et en cosmétique. Ces vésicules sont naturelles ou synthétiques. On les trouve sous trois formes structurales possibles:

- les MLV ou multilamellar vesicles (100-5000 μ m)
- les LUV ou large unilamellar vesicles (60-3000 μ m)
- et les SUV ou small unilamellar vesicles (20-50 μ m)

Leur structure est fonction de la composition lipidique et du processus de fabrication. De plus, certaines protéines ou d'autres molécules non lipidiques peuvent être incorporées dans leur membrane lipidique.

Les liposomes peuvent être classés selon leur charge qui dépend de leur composition en lipides anioniques, cationiques et neutres.

Du fait de leur faible toxicité et de leurs propriétés d'encapsulation de composés de masse moléculaire élevée, les liposomes ont été utilisés comme vecteurs de thérapie génique dès la fin des années 70.

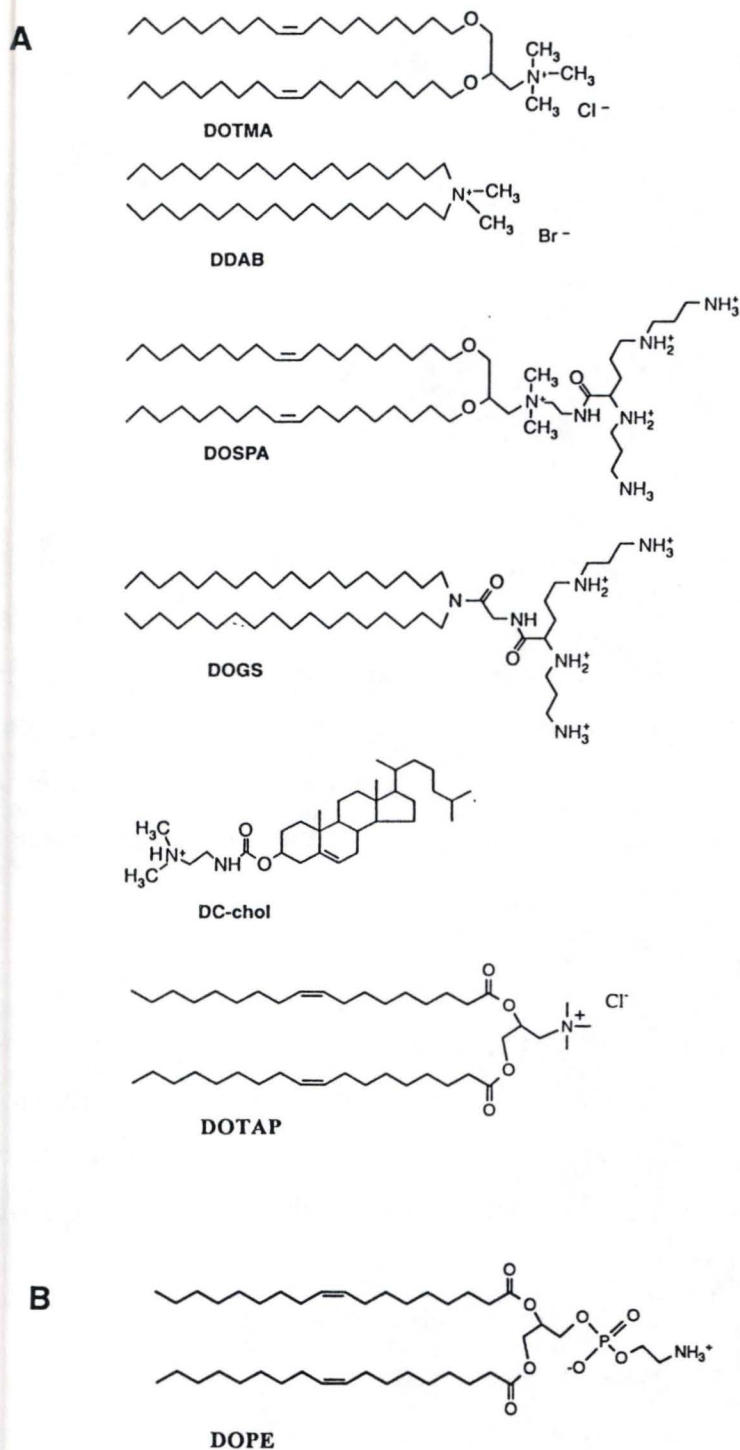


Figure 4 A: Structure de différents lipides cationiques utilisés comme vecteurs de la transfection.

DOTMA: N-{1-(2,3-dioleoyloxy)propyl}-N,N,N-triméthylammonium

DDAB: bromure de diméthyl dioctadécyl ammonium

DOSPA: trifluoroacétate de dioléoyl-N-(2-sperminocarboxamide)éthyl-N,N diméthyl-1-propanaminium

DOGS: dioctadécylamidoglycylspermine

DC-chol: diméthylaminoéthane carbamoyl cholestérol

DOTAP: 1,2-dioleoyloxypropyl-N,N,N-triméthylammonium chloride.

Figure 4 B: Structure du dioléoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE)

b.- Les lipides cationiques

En 1987, Feldner [38] utilisa le premier un lipide cationique (le DOTMA) qui sous forme liposomale interagit spontanément avec l'ADN plasmidique pour former des complexes ayant une grande affinité pour les membranes cellulaires. Très vite, apparurent d'autres lipides chargés positivement comme par exemple les lipopolyamines dont le DOGS ou bien le DOTAP [39]. En principe, les lipides cationiques sont commercialisés sous une forme liposomale.

b.1- Mécanismes d'action des lipides cationiques.

Chargés positivement, ces vecteurs interagissent avec les groupements phosphates de l'ADN. Les complexes ADN/lipides cationiques se forment grâce à de simples interactions électrostatiques lors du mélange des deux composés à température ambiante. Le complexe ADN/lipide dans cette formulation n'est pas à proprement parler un liposome car il ne contient pas de phase aqueuse interne.

Ces structures entrent en interaction avec la membrane cellulaire et y pénètrent dans les cellules par une endocytose adsorptive, comme il le fut démontré au début des années 90 [40].

b.2- Divers types de lipides cationiques [41]

L'efficacité des lipides cationiques en tant que vecteurs de transfection a été d'abord démontrée sur des cellules en culture. Depuis lors, un nombre croissant de lipides de ce type ont été fabriqués et utilisés pour le transfert de gènes *in vitro* (figure 4). Très vite, l'ajout d'un lipide neutre tel que le DOPE fut associé aux lipides cationique dans la composition des liposomes [42]. Un tel phospholipide a en effet comme propriété de pouvoir déstabiliser les membranes biologiques et de promouvoir la fusion membranaire. Cela permet une certaine augmentation au niveau de l'efficacité de la transfection.

b.3- Structure de ces composés

Les lipides cationiques sont formés généralement de trois parties [37] :

- une tête polaire cationique aminée interagissant avec l'ADN

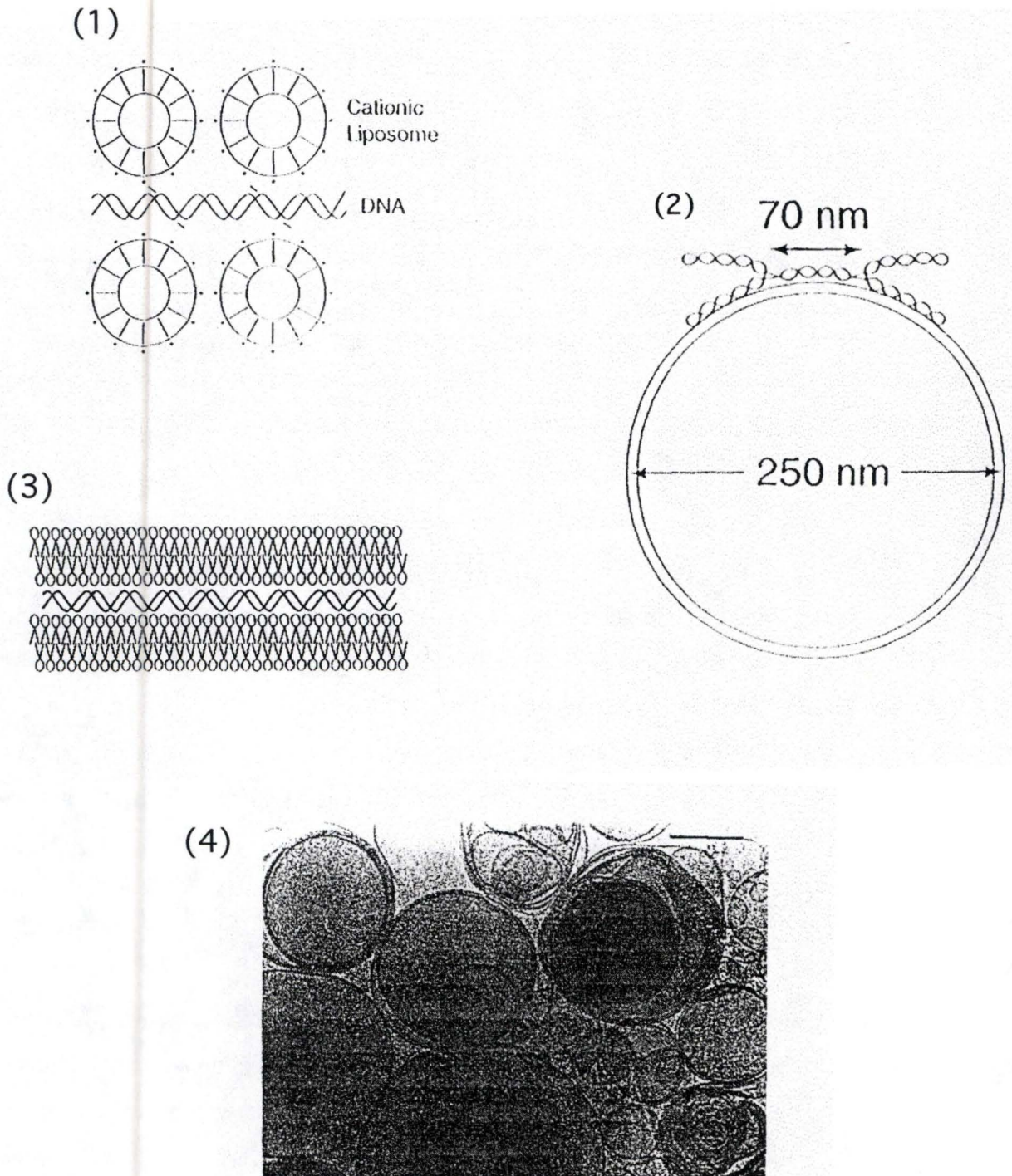


Figure 5: Modèles d'interaction entre l'ADN et les lipides cationiques [37].
 (1): modèle basé sur les interactions de type électrostatiques (Felgner),
 (2): modèle montrant un plasmide d'ADN super enroulé qui s'associe avec la surface externe d'un liposome cationique,
 (3): le troisième modèle présente les acides nucléiques entourés par une paire de bicouches lipidiques,
 (4): modèle multilamellaire présentant des couches alternatives d'ADN et de bicouches lipidiques [44].

- une partie hydrophobe constituée soit de deux chaînes aliphatiques d'au moins 12 carbones et souvent insaturées, soit d'un cholestérol
- un bras espaceur qui sert de liaison entre la tête hydrophile et la queue hydrophobe. Cette troisième partie joue un rôle déterminant dans la biodégradabilité du lipide. Par exemple, le DOTAP présente un lien ester à cet endroit (contrairement au DOTMA qui y comporte un lien éther) ce qui permet aux estérases de le cliver.

On distingue trois types de lipides cationiques [43] : les dérivés monocationiques (ex : DOTMA), polycationiques (ex : DOGS) et les dérivés du cholestérol (ex : DC-chol).

b.4- Interactions ADN/lipides cationiques

Quatre modèles sont avancés pour expliquer les types d'interaction entre l'ADN et les lipides cationiques (*figure 5*).

- Le premier, basé sur les forces électrostatiques, nous montre l'ADN entouré par plusieurs vésicules lipidiques [37], en moyenne, 2 à 4 vésicules lipidiques pour un plasmide de 3 à 5 kb.
- Le second, présente l'ADN dans une configuration superenroulée qui lui-même entoure les lipides [37].
- Le troisième, donne l'ADN entouré par une bicouche lipidique qui formerait comme un ruban avec l'acide nucléique [37].
- Et enfin, selon le modèle multilamellaire, il existerait des couches alternatives d'ADN et de bicouches lipidiques [44].

b.5.- Choix de l'agent lipofectant

L'efficacité de la transfection est influencée par les paramètres suivants :

- la structure du lipide cationique
- le rapport entre la quantité d'ADN et de lipide cationique
- le type cellulaire
- l'ajout et le choix de lipides neutres
- la taille du complexe DNA/lipide.

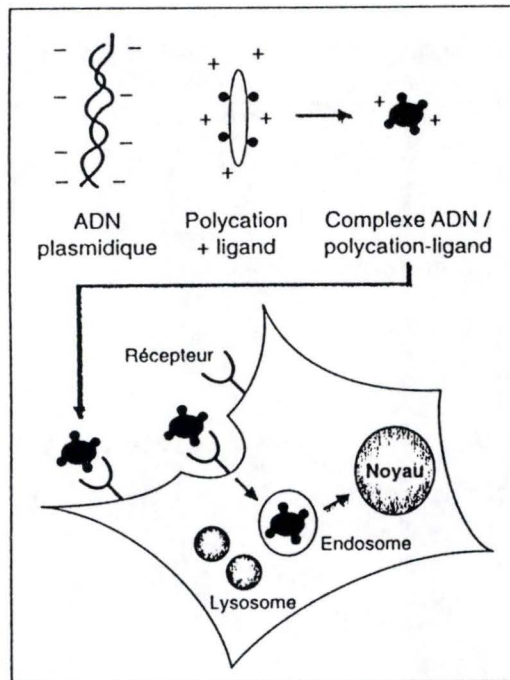


Figure 6 : Principe de transfert de gènes par système ciblé. L'ADN plasmidique forme un complexe avec des polycations couplés à des récepteurs spécifiques d'un type cellulaire vers lequel l'ADN est ciblé. Les complexes ADN-polycation-ligand sont internalisés dans ces cellules par endocytose [41].

2.2.3.- Méthodes basées sur la capture des complexes ADN/polypeptides

Les polypeptides tels que la polylysine ont la particularité de condenser l'ADN. Certains acides aminés sont chargés positivement à pH physiologique et ont de ce fait un caractère basique. Ces acides aminés peuvent être utilisés pour la fabrication de polypeptides cationiques (polylysine, polyarginine, polyornithine) et sont également présents en grande quantité dans des protéines naturelles dont la fonction est de condenser l'ADN génomique des cellules (histones).

En fonction de la conformation spatiale des atomes entourant le C α , on distingue les lysine D (droit) des lysines L (gauche). La poly-L-lysine (PLL) peut être hydrolysée par des peptidases cellulaires contrairement à son stéréoisomère la poly-D-lysine (PDL) qui y résiste. De ce fait, il fut démontré [45] que un plasmide pris par le foie est plus rapidement transféré aux lysosomes et dégradé lorsqu'il est complexé avec la PLL qu'avec la PDL.

En général, les complexes ADN/polypeptides sont couplés à des ligands capables de se lier à un récepteur spécifique à la surface des cellules cibles. La liaison du ligand à son récepteur permet alors l'endocytose du complexe ADN/polypeptide-ligand, conduisant à l'introduction plus efficace de l'ADN dans la cellule cible (*figure 6*). Par exemple, une asialoglycoprotéine peut servir de ligand pour le ciblage et la transfection d'hépatocytes [46].

2.2.4.- Méthodes basées sur la capture des complexes ADN/polymères synthétiques.

L'utilisation des dendrimères polyamidoaminés ou de la polyéthylèneimine (*figure 7*) s'est avérée être efficace lors du processus de transfection.

Une hypothèse intéressante fut proposée par Behr 1996 [47]. Elle se base sur le fait qu'à pH physiologique, dans le cas d'une polyamine comme le PEI, 70 % des amines sont chargées positivement. Lors de l'endocytose, les complexes ADN/polycations se retrouvent dans des vésicules acides (endosomes, lysosomes). Les amines primaires se protonnent grâce à la concentration croissante en H⁺ dans les vésicules et des ions Cl⁻ pénètrent dans ces dernières afin d'y rétablir la neutralité. Ce phénomène se traduit par une augmentation importante de la concentration ionique vésiculaire, un gonflement du

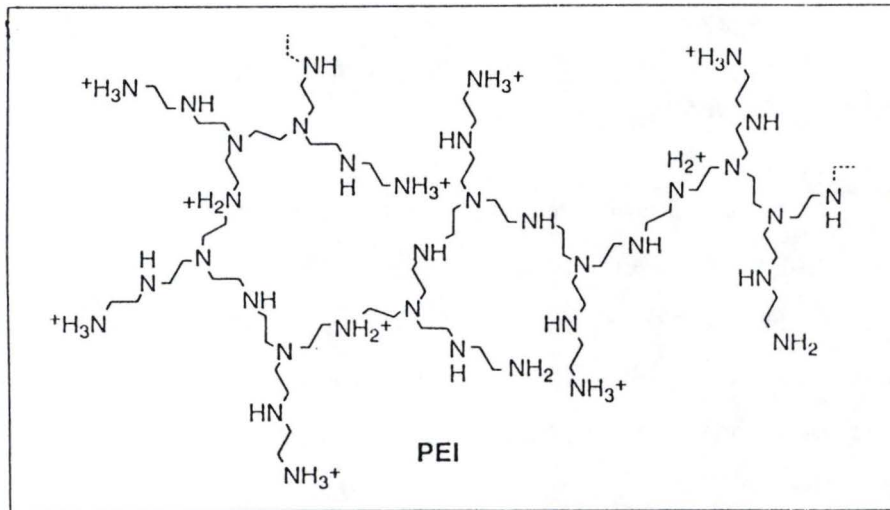


Figure 7 : Structure de la polyéthylèneimine à pH neutre.

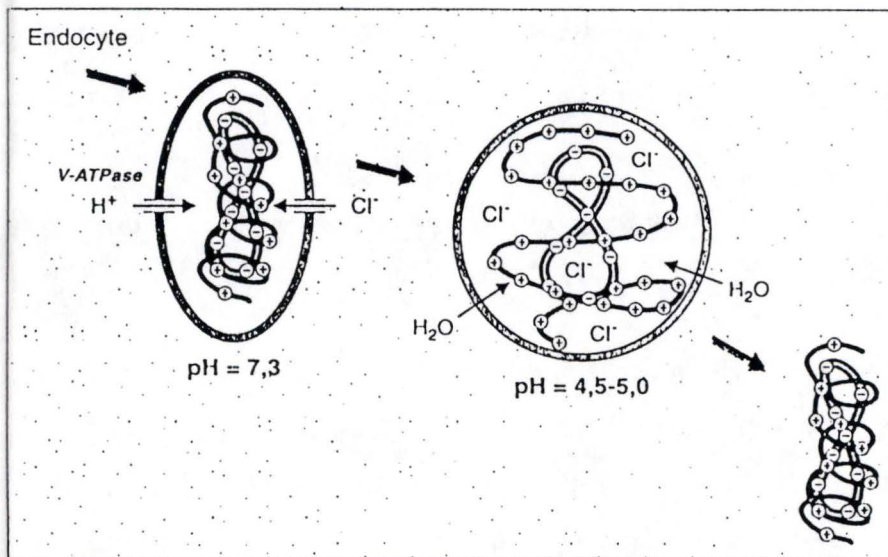


Figure 8 : Représentation schématique de la rupture d'un endosome par l'éponge moléculaire. L'accumulation des ions H^+ et Cl^- provoque le gonflement du polymère et la lyse osmotique de la vésicule [47].

polymère par répulsion interne de charge et la lyse osmotique de la vésicule (*figure 8*). Le terme « d'éponge à protons » a été proposé pour ce modèle qui est aussi applicable dans le cas de certaines autres molécules polycationiques telles que le DOGS (ou transfectan).

Les polymères synthétiques constituent par conséquent une classe de vecteurs très prometteurs dans le cadre de la thérapie génique et une structure de base idéale pour la conception de vecteurs incorporant des fonctions supplémentaires.

2.2.5.- Principaux problèmes rencontrés lors d'une administration in vivo des systèmes non viraux.

De grandes différences existent entre la transfection *in vitro* et *in vivo*. En effet, les cellules isolées *in vitro* présentent des propriétés caractéristiques au point de vue de la disponibilité des surfaces cellulaires et de la capacité à endocyter. Plusieurs facteurs biologiques affectent la destinée de l'ADN *in vivo* et par conséquent l'efficacité de la transfection.

Les cellules *in vivo*, sont entourées d'une matrice interstitielle, elles sont parfois polarisées et couplées à des cellules adjacentes.

L'ADN doit entrer en contact physique avec la surface des cellules cibles et cette biodisponibilité est en partie fonction de la taille des complexes et de leur charge. Dans ce cadre, on peut améliorer l'efficacité de la transfection par l'ajout d'un lipide neutre tel que le DOPE.

Lorsque l'ADN est injecté par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou intratrachéale, il peut rencontrer différentes barrières physiologiques avant d'atteindre les cellules cibles. Par voie intraveineuse (intracardiaque, intraportale...) un certain ciblage cellulaire est réalisé.

L'ADN est rapidement éliminé de la circulation après une administration intraveineuse grâce à un processus impliquant d'une part la dégradation (digestion par des nucléases) et d'autre part la capture par les cellules du système réticulo-endothélial du foie (cellules de Kupffer) et de la rate.

Pour diminuer ce phénomène et augmenter le taux de transfection *in vivo*, on couple l'ADN à un ligand qui permet une capture plus spécifique et plus rapide.

D'autres problèmes surgissent lors d'une injection de composés ADN/vecteurs dans la circulation générale :

- la déstabilisation des complexes par les protéines endogènes
- l'activation du système du complément par les particules cationiques
- la modification des paramètres de l'hémostase et la toxicité
- l'immunogénicité possible des complexes peptidiques.

Pour éviter cela, les systèmes non viraux peuvent être utilisés par voie locale, c'est à dire via une administration *in situ* dans l'organe.

Grâce à cela, on observe une expression des gènes après administration intraveineuse dans les poumons, le foie et aussi dans une moindre mesure dans la rate et le cœur.

A l'avenir, diverses formulations devront être développées dans le but d'un ciblage spécifique de l'ADN vers les cellules cibles et d'une meilleure efficacité de la transfection.

4.- But du mémoire

Notre travail entre dans le contexte de recherches du laboratoire de chimie physiologique, visant à préciser le sort de l'ADN plasmidique utilisé lors de transfections de cellules *in vivo* et *in vitro*. Jusqu'à présent, on n'a pas une connaissance précise du mécanisme de capture et du cheminement intracellulaire de cet ADN. En particulier, la façon dont une telle macromolécule atteint le noyau cellulaire est encore obscure. Dans notre mémoire, nous nous sommes intéressé à un facteur qui pourrait affecter ces processus : la taille des complexes ADN/vecteur cationique. Certaines données de la littérature, parfois contradictoires, indiquent en effet que l'efficacité de la transfection pourrait être liée à cette propriété des complexes.

II.- MATERIEL & METHODES

II.-Matériel et méthodes

1.- Marquage radioactif d'ADN plasmidique par nick translation

L'ADN est marqué par la réaction de *nick translation* en présence de dATP³⁵S. Le plasmide pCMV-luc qui fut utilisé [48], permet l'expression du gène de la luciférase sous le contrôle du fort promoteur du cytomégalovirus. Ce plasmide est préparé à partir d'une culture de bactéries E. Coli XL1 - blue et purifié d'après la méthode décrite dans le kit Qiagen [49]. Le marquage est réalisé grâce à un kit d'Amersham (Buckinghamshire, U.K.) selon le protocole fourni par la firme, excepté l'utilisation d'une quantité dix fois plus importante d'ADN plasmidique et l'ajout de 2 µl supplémentaires de DNA polymérase I (Boehringer, Mannheim, Germany).

Pour une réaction de 100µl, on mélange :

- 10 µl d'une mixture dNTP (moins le dATP marqué au soufre³⁵) d'une concentration de 1 mM (chaque nucléotide).
- 10 µl de tampon 10 x (0.5 M Tris HCl pH 7.5, 0.1 M MgSO₄, 1 mM de DTT, 500 µg/µl BSA)
- 10 µg d'ADN dans 71 µl d'H₂O
- 2 µl d'une mixture enzymatique (10 pg/µl de DNase I dans du Tris/HCl pH 7.5, MgCl₂, glycérol, BSA et 0.5 unités/µl de DNA polymérase I)
- 2 µl de DNA polymérase (soit 10 unités enzymatiques)
- 5 µl de dATP³⁵S soit 0.05 mCi (1000 Ci/ mMol).

La réaction se déroule pendant 2 heures dans un bain maintenu à 15°C.

La DNase effectue des *nick* (trous) à divers endroits du duplex d'ADN. L'ADN polymérase par son activité de polymérase rebouche les trous en ajoutant séquentiellement des nucléotides à la terminaison 3'. Cette enzyme ADN polymérase possède également une activité d'exonucléase, ce qui lui permet d'extraire des nucléotides de la terminaison 5'.

On arrête la réaction en ajoutant 4µl d'EDTA 0.5M pH 8 et l'ADN est précipité à l'éthanol (100 µl acétate d'ammonium AcNH₄ pH 4.5/4 M et 800 µl d'EtOH 100% glacé). La précipitation se déroule pendant au moins 30 minutes à -70°C et ensuite, on centrifuge les

échantillons en chambre froide pendant 15 minutes à 13000 rpm. On retire le surnageant avec précaution et on lave le culot avec :

- 800 µl d'AcNH₄ 0.67M/pH 4.5 contenant 67% d'éthanol et on centrifuge 10 minutes.
- Après avoir retiré le surnageant, on ajoute 800 µl d'EtOH 90% glacé et on centrifuge 5 à 10 minutes.

Après cela, on sèche le culot 1 à 2 fois 2 minutes et on resuspend le culot dans 200 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4 ou 8). Cela donne une concentration finale de **1 µg/20 µl**.

Des ces échantillons, on prélève 2 µl auxquels on ajoute de l'aqualuma pour le comptage de la radioactivité. Cela donne en général 300-600000 cpm pour 100 ng d'ADN marqué.

La migration de l'ADN plasmidique marqué sur un gel d'agarose 1% est utilisée comme second contrôle de la réaction de nick translation. Le gel est préparé par un mélange d'agarose (1%) dans du tampon TAE (TAE 50 x : Tris base 242 µg/l, acide acétique glacial 57.1 ml/l, EDTA 0.5M pH 8 100ml/l). Ce mélange est chauffé jusqu'à ébullition, on ajoute ensuite une faible quantité de bromure d'éthidium (0.2µg/ml). Ce composé s'insère entre les bases d'ADN et émet une lumière fluorescente orange sous U.V. Le gel terminé est coulé dans une cuvette et 30 minutes après, il est polymérisé et les puits sont formés. C'est dans ces puits situés au sommet du gel que l'on dépose délicatement les échantillons suivants :

- un étalon (le phage lambda digéré par Hind3 et EcoR1 sert de marqueur) permettant d'estimer la taille et la concentration de l'ADN plasmidique marqué.
- l'ADN CMV/luc de départ
- l'ADN CMV/luc(³⁵S) de l'expérience.

L'étalon et les échantillons sont dilués dans du tampon TE et on ajoute 2-3µl de bleu de bromophénol (colorant). La migration des échantillons dans le gel d'agarose donne sous UV des bandes caractéristiques de la conformation de l'ADN : *super coiled*, *linear* ou *open circular*. La suite de l'expérience consiste à sécher le gel sous vide et à procéder à une autoradiographie dans une cassette spéciale pendant 2 à 4 jours. Au terme de ces journées, la radioactivité du gel a impressionné avec le film autoradiographique et après révélation en chambre noire, donne des bandes noires spécifiques. On peut alors comparer les bandes du film autoradiographique avec celles de la photo prise lors de la révélation aux U.V.

2.- Préparation des complexes ADN/vecteurs cationiques

Lors de ce travail, nous avons préparé des complexes entre l'ADN plasmidique marqué et 2 vecteurs cationiques : la poly-D-lysine et le DOTAP. En variant les conditions expérimentales lors de la formation de ces complexes, nous avons réalisé ce que l'on a appelé des « gros » et des « petits » complexes. Lors d'expériences de sédimentation, les gros complexes ont un coefficient de sédimentation au moins 10 fois plus élevé que les petits complexes.

Le tableau présenté ci-dessous donne les conditions nécessaires à la préparation des complexes de grande et de petite taille pour la poly-D-lysine ou le DOTAP. L'ADN nu a aussi été utilisé lors de certaines expériences.

Remarques : 1- La poly-D-lysine (75 kD, Sigma) est préparée dans du glucose 5 % (1µg/1µl).

2- La concentration de l'ADN(³⁵S) est de 1 µg/20µl.

3- Dans la fabrication des complexes ADN/vecteur cationique, on respecte un rapport de poids de 1:5. Ce rapport est souvent utilisé lors d'expériences de transfection [56].

Vecteurs	Gros complexes	Petits complexes
ADN nu	200µl de glucose 5% / 5 µl d'ADN.	
Polylysine D	20µl ADN +5µl PLD Attendre 10 minutes Ajouter 1000µl glucose 5%	20µl ADN dans 500µl glucose 5% 5µl PLD dans 500µl glucose 5% Mélanger et attendre 10 minutes.
DOTAP	20µl ADN +5µl DOTAP Attendre 10 minutes Ajouter 1000µl NaCL 0,9%	20µl ADN dans 500µl glucose 5% 5µl DOTAP dans 500µl glucose 5% Mélanger et attendre 10 minutes.

3.- Technique de fractionnement.

3.1.- Préparation de l'homogénat.

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles Wistar, à jeûn et d'un poids compris entre 300 et 350 Kg. Une certaine quantité de la préparation des complexes ADN/vecteur cationique (0.5 à 0.8 ml) est injectée dans la veine fémorale de l'animal légèrement anesthésié à l'éther. Selon l'expérience, le sacrifice a lieu 10 min, 2 heures ou 6 heures après l'administration des complexes. Le sang du rat est récolté pour une analyse de la

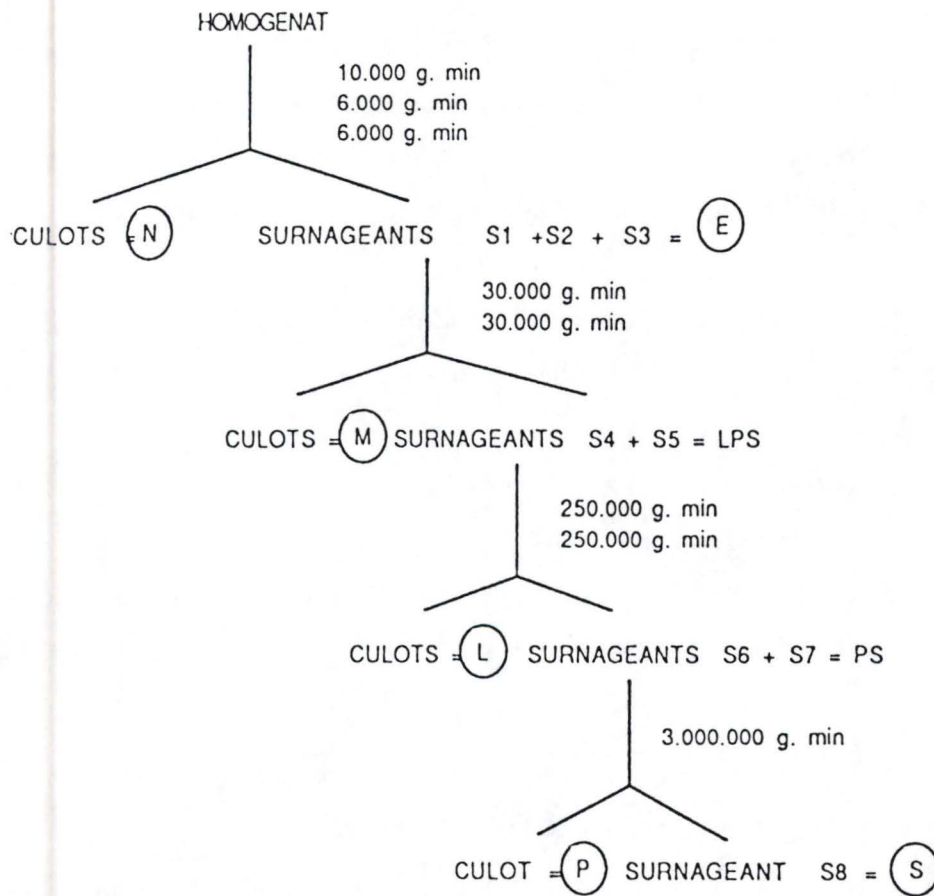


Figure 1 : Schéma de fractionnement subcellulaire du foie en centrifugation différentielle d'après de Duve et al 1955 [49].

radioactivité subséquente. On procède ensuite à une perfusion du foie par du chlorure de sodium (NaCl) 0.9% glacé entrant dans la circulation au niveau de l'aorte. Le foie est assez rapidement vidé de son sang, à ce moment on le prélève et on le pèse dans un berlin rempli d'une solution isotonique de saccharose 0.25 M glacé. L'organe est découpé en petits morceaux et broyé dans un homogénéisateur coaxial de Potter. Cette étape permet d'obtenir l'**homogénat** contenant des organites et composants subcellulaires des cellules hépatiques.

3.2.- Centrifugation différentielle

La vitesse de sédimentation d'une particule sphérique se calcule par l'équation suivante : $v = 2 r^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x / 9\phi$. Elle varie en fonction des paramètres utilisés, notamment en fonction du type de rotor, de la vitesse angulaire et de la distance radiale.

La centrifugation différentielle est réalisée en milieu isotonique (saccharose 0.25M). Elle a pour but de récupérer au départ d'un extrait cytoplasmique, petit à petit des granules de coefficient de sédimentation décroissant. Le coefficient de sédimentation d'une particule (s) est défini par : $s = 2 r^2 (\rho_p - \rho_m) / 9\phi$. Il est habituellement exprimé en Svedberg ($s = 10^{-13}$ secondes.).

Le facteur déterminant lors d'une centrifugation différentielle est la **taille** des particules. Un schéma (figure 1) illustre les centrifugations successives nécessaires pour un fractionnement selon la méthode de *Duve et al* (1955) [51]. Cela se déroule dans un rotor 50 Ti, Beckman ($R_{av} = 59.1\text{mm}$)

Au terme du fractionnement, on obtient 5 fractions hétérogènes mais enrichies en certains types d'organites :

- la fraction **N** contient des noyaux mais aussi des débris cellulaires et quelques cellules intactes
- la fraction **M**, appelée aussi mitochondriale lourde est enrichie en mitochondries mais on y retrouve aussi des lysosomes et des peroxysomes
- la fraction **L**, appelé aussi mitochondriale légère est formée principalement de lysosomes et de peroxysomes, mais contient aussi des mitochondries ainsi que des microsomes
- la fraction **P**, microsomale comprend des petites vésicules du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi
- la fraction **S** ou surnageant est composée de tous les éléments cellulaires non sédimentables (cytoplasme).

On peut analyser ces différentes fractions par des techniques de microscopie jouant sur la morphologie des organites ou en employant différents marqueurs biochimiques.

Un enzyme de référence est localisées spécifiquement dans un type de particule et est utilisé comme marqueur biochimique de cet organite. Le contenu en enzymes de référence dans une fraction indique la proportion des différents types d'organites retrouvés dans celle-ci.

Un histogramme permet l'illustration de la distribution d'enzymes de référence ou de la radioactivité après la centrifugation différentielle d'un homogénat de foie de rat. Cet histogramme comporte 5 rectangles représentant les 5 fractions : N, M, L, P et S. L'abscisse donne le pourcentage de protéines dans chaque fraction et l'ordonnée correspond à l'activité spécifique relative ou ASR. L'ASR d'un enzyme dans une fraction donnée est le % d'activité de cet enzyme dans la fraction considérée divisé par le % de protéines dans cette fraction. En d'autres termes, la hauteur des rectangles montre le degré de purification d'une structure par rapport à l'homogénat et leur surface représente le pourcentage d'activité dans la fraction.

Le calcul de la récupération est effectué en faisant la somme des activités enzymatiques trouvées dans les fractions N, M, L, P et S rapportée à l'activité de l'homogénat (H) qui équivaut à E+N

3.3.- Centrifugation isopycnique

La centrifugation isopycnique fournit une analyse plus fine de la fraction mitochondriale totale ML (500µl de la fraction M+500µl de la fraction L) obtenue par centrifugation différentielle.

Cette technique permet aux particules de migrer dans un gradient de saccharose. Les tubes Quick Seal de Beckman sont rempli de 0.5 ml de MaxidensTM à une densité de 1.9 g/ml (nécessaire lors de l'utilisation d'un rotor vertical) avant d'y ajouter goutte à goutte le saccharose dont la densité est comprise entre 1.35 et 1.09 g/ml. La centrifugation se déroule dans un rotor Beckman VTI 65 à une vitesse de 40000 rpm pendant 2H30 selon la méthode de *Beaufay et al* [52]. On dépose 0.5 ml de la fraction ML au sommet du gradient. Au cours de la migration, la différence de densité entre la particule et le milieu s'amenuise jusqu'à devenir nulle quand la particule atteint une zone de densité égale à la sienne. Dans ces conditions et selon la loi de Svedberg : $v = 2 r^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x / 9\phi$; la vitesse de migration devient nulle.

Le facteur déterminant est par conséquent la **densité** de la particule et non sa taille.

Une fois que la centrifugeuse s'arrête, on découpe le tube contenant le gradient en plusieurs tranches (généralement 13) de ± 3 mm de haut. Ceci dans le but de séparer des fractions de densités croissantes en vue d'analyses ultérieures. Sur chacune des fractions, on calcule :

- le volume recueilli
- la hauteur de la coupe
- le volume réel ($1.14 \text{ cm}^2 \times \text{hauteur}$)
- la dilution primaire (volume réel/poids du foie)
- la dilution secondaire
- la dilution totale
- la densité du saccharose (avec un réfractomètre)
- l'incrément de densité ($\Delta\rho$).

Un histogramme (*Beaufay et al 1964*) [52] est réalisé dans le but de visualiser la distribution de la radioactivité ainsi que celle de certains enzymes de référence dans les différentes fractions. Cette représentation graphique donne en abscisse les densités limites de chaque fractions et en ordonnée, la fréquence (le pourcentage d'activité divisé par l'incrément de densité) de l'enzyme ou de la radioactivité dans chaque fraction. Dans ce cas, la surface des différents rectangles équivaut au pourcentage d'activité retrouvée dans la fraction.

La récupération donne le rapport entre la somme des activités des fractions et l'activité retrouvée dans la fraction ML.

Le densité médiane fournit une densité à gauche et à droite de laquelle on trouve 50 % de l'activité enzymatique.

3.4.- Méthode de dosages d'enzymes de références

Nous avons mesuré l'activité enzymatique de deux enzymes marqueurs associés spécifiquement aux lysosomes. Ceci permet de suivre les lysosomes en centrifugation différentielle et isopycnique. Le tableau présenté ci-dessous donne un aperçu général des conditions expérimentales utilisées pour mesurer l'activité enzymatique de la cathepsine c et de l'arylsulfatase .

Enzyme de référence	Substrat	Concentration	pH	Méthode de mesure	Référence
Cathepsine c	glycyl-L-Arginine B-Naphtylamide	0,25 mM	5	Fluorimétrie B-naphtylamide	Jadot et al (1984) [53]
Arylsulfatase	p-Nitrocatéchol Sulfate	0,20 mM	5	Colorimétrie du nitrocatéchol	Bowers et al (1967) [54]

Lors du dosage de l'activité enzymatique, on distingue l'activité libre, l'activité totale et l'activité soluble d'un enzyme.

Dans ce travail, nous avons mesuré l'activité totale de la cathepsine c et de l'arylsulfatase. Pour cela, nous avons utilisé du Triton X-100 (2 %), un détergent rompant les membranes des organites et offrant ainsi au substrat un accès quasiment total aux enzymes.

Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de *Lowry et al* [55].

4.- Courbe de sédimentation

Lors des expériences de sédimentation, 300µl de la préparation des différents complexes sont centrifugés dans un rotor TLA 120,1 Beckman selon des vitesses de rotation (ω) et des temps (t) croissants. La radioactivité est mesurée sur 200 µl de surnageant.

Un graphe représente la sédimentation des complexes, il donne l'accélération centrifuge ($\omega^2 t$ ou W) en abscisse et en ordonnée, le % de radioactivité retrouvée dans le culot (c) après la sédimentation des complexes.

5.- Expérience de capture des complexes ADN/vecteurs cationiques

Le rat reçoit une injection de complexes ADN/vecteurs cationiques (d'un rapport poids/poids de 1 :5) dans la veine fémorale. Après anesthésie à l'éther, on prélève des petits morceaux de foie à des temps croissants après l'injection. Ces fragments de foie sont pesés dans du saccharose 0.25 M glacial et broyés dans un homogénéisateur coaxial de Potter.

Un comptage de radioactivité est effectué sur 200 µl de l'homogénat. Cela permet d'obtenir par simple calcul, le nombre de cpm par g de foie.

La radioactivité acido-soluble est estimée par la réaction de 300 µl de l'homogénat avec un volume équivalent d'acide perchlorique 10%. Suite à cette réaction et à une centrifugation, l'ADN plasmidique entier précipite dans le culot tandis que l'ADN dégradé se retrouve dans le surnageant. On mesure alors la radioactivité dans 200 µl de surnageant.

La courbe de capture représente l'évolution temporelle de la radioactivité totale, les valeurs correspondent au pourcentage de la dose injectée par g de foie. Une seconde courbe donne l'évolution du pourcentage de radioactivité acido-soluble, les valeurs correspondent à des pourcentages de la radioactivité totale.

Les résultats nécessaires à l'élaboration de ces courbes ne sont pas entièrement fournis par les expériences décrites ci-dessus. En effet, il est aussi possible de tracer de telles courbes en récoltant les données relatives aux différentes expériences de fractionnement.

6.- Expérience de dégradation des complexes ADN/vecteurs

L'expérience de dégradation consiste à incuber des complexes ADN/vecteurs cationiques pendant des temps croissants, dans un milieu contenant du tampon acétate 0.05 M pH 5 et des lysosomes purifiés de foie de rat.

Elle se déroule dans un volume total de 1 ml et à 37°C, selon le protocole suivant :

- 0.5 ml de tampon acétate 0.05 M pH 5
- 0.3 ml d'H₂O
- 100 µl des complexes ADN/vecteurs cationiques (préparés comme décrit au point 2)
- 100 µl des lysosomes (dilués 0.5 x et contenant 25 µg de protéines).

La purification des lysosomes de foie de rat est réalisée selon la méthode de Wattiaux et al [56].

La courbe de dégradation représente le pourcentage d'ADN plasmidique dégradé en fonction du temps. Pour connaître le pourcentage d'ADN dégradé par les enzymes lysosomiaux au cours du temps, on prélève tout d'abord 100 µl du mélange effectué précédemment. On y ajoute 50 µl d'ADN de thymus de veau pour permettre aux plasmides non dégradés de précipiter lors d'une centrifugation à 13000 rpm après l'ajout de 500 µl d'acide perchlorique 10 %.

La mesure de la dégradation du plasmide radiomarqué s'effectue en calculant l'évolution temporelle du pourcentage de radioactivité acido-soluble (dans le surnageant) par rapport à la quantité de radioactivité totale.

7.-L'effet du triton sur les lysosomes

Le Triton WR1339 est un détergent synthétique non ionique. Lorsqu'il est injecté par voie intrapéritonéale 4 jours avant l'expérience, il provoque une chute de densité des lysosomes par accumulation sélective dans ces organites. Il est donc possible de modifier simultanément et sélectivement les hydrolases acides associées à ces organites.

D'un point de vue morphologique, on observe une dilatation importante des lysosomes dont le volume moyen a décuplé quatre jours après l'injection.

8.- Répartition des complexes dans les différentes cellules hépatiques.

Cette expérience est réalisée dans le but de connaître la localisation intra-hépatique des gros et des petits complexes ADN/vecteurs cationiques. L'injection des complexes a lieu au niveau de la veine fémorale ; une heure plus tard, le rat est sacrifié.

La séparation des différents types cellulaires se déroule en plusieurs étapes :

- 1.- perfusion du foie avec la collagénase (Seglen [57])
- 2.- centrifugation différentielle pour séparer les hépatocytes (PC) des cellules non parenchymateuses (NPC) [58]
- 3.- gradient de Percoll (pour les hépatocytes) [59] ou de Nycodenz (pour les NPC) dans le but de séparer les cellules vivantes des cellules mortes
- 4.- élutriation en deux étapes pour séparer les différents types de NPC [60].

Ensuite, on procède au comptage de la radioactivité présente au niveau des cellules parenchymateuses (PC), des cellules endothéliales (EC) et des cellules de Kupffer (KC). Pour cela, on compte la quantité de cpm présente dans 10^6 de cellules, en connaissant le nombre de chacune des cellules dans le foie [61] :

- $125 \cdot 10^6$ PC/g de foie

- $65 \cdot 10^6$ EC/g de foie

- $20 \cdot 10^6$ KC/g de foie.

N.B : Abréviations utilisées

BSA : Bovine Serum Albumine

CMV : Cytomégalovirus.

DTT : Dithiotréitol.

EDTA : Ethylèneiminetétraacétique acide, disodium salt, dihydrate.

TAE 50 : Tris base 242 μ g/l, acide acétique glacial 57.1 ml/l, EDTA 0.5 pH 8 100 ml/l.

TE : Tris 10 mM/ EDTA 1 mM.

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminométhane.

Dans la formule : $v = 2 r^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x / 9\eta$.

→ v : vitesse de sédimentation (cm/sec)

→ r : rayon de la particule (cm)

→ ρ_p : densité de la particule (g/cm^3)

→ ρ_m : densité du milieu (g/cm^3)

→ ω : vitesse angulaire (rad/sec)

→ x : distance radiale (cm)

→ η : viscosité du milieu (poises)

→ t : temps (sec)

s : coefficient de sédimentation (Svedberg)

III.- RESULTATS

Poly-D-lysine

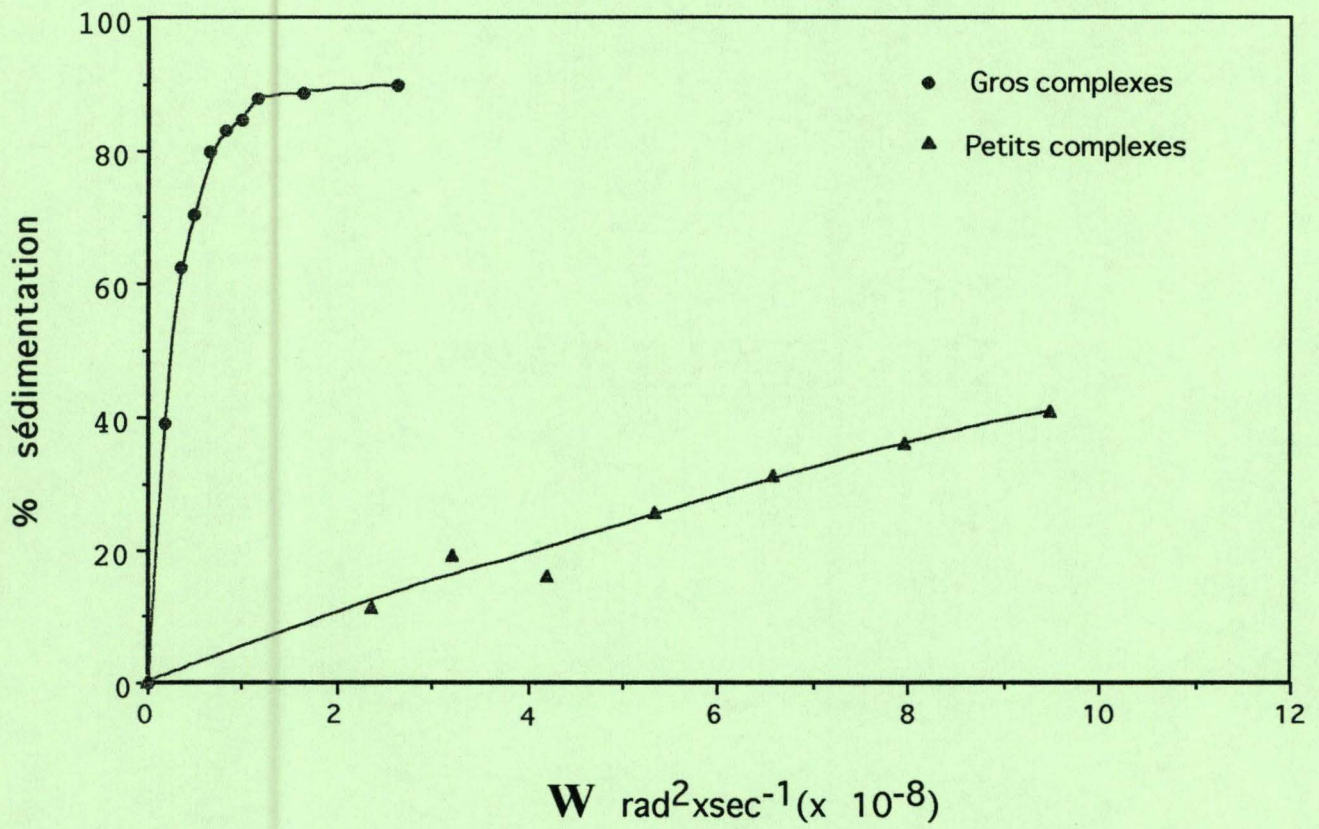


Figure 1: Sédimentation des complexes ADN(³⁵S)/poly-D-lysine. Les courbes représentent le pourcentage de radioactivité retrouvé dans le culot en fonction du produit du carré de la vitesse angulaire par le temps (W).

III.-Résultats

1.- Complexes poly-D-lysine-ADN³⁵S

1.1.- Sédimentation des complexes poly-D-lysine-ADN³⁵S.

La taille des deux types de complexes que nous avons utilisés a été estimée en nous basant sur la sédimentation de la radioactivité lorsque les complexes sont soumis à des champs centrifuges de valeurs croissantes. La figure 1 représente le pourcentage de radioactivité retrouvé dans le culot de centrifugation à différentes valeurs de W , le produit du carré de la vitesse angulaire (ω) et du temps (t). Manifestement, les deux types de complexes utilisés se comportent différemment, l'un sédimente beaucoup plus rapidement que l'autre. Dans la suite de notre mémoire, nous appellerons le complexe sédimentant le plus rapidement (le plus gros) GC et l'autre complexe, plus petit, PC. Un calcul du coefficient moyen de sédimentation donne $4 \cdot 10^4$ Svedberg pour PC et 10^3 Svedberg pour GC.

1.2.- Capture et dégradation de GC et PC par le foie.

Comme l'illustre la figure 2A, GC et PC sont captés de façon similaire par le foie, après leur injection intraveineuse. Un maximum de radioactivité correspondant à 4 à 5 % de la dose injectée par g de foie est observé environ une heure après l'injection. Après ce temps, le taux de radioactivité provenant de PC diminue, alors qu'il reste presque inchangé lorsque GC est injecté. La figure 2B rapporte l'évolution de la radioactivité acido-soluble en fonction du temps après l'injection. Elle devient de plus en plus élevée au cours du temps lorsque PC est administré mais non après injection de GC. Cela indique une dégradation beaucoup plus élevée de PC au cours du temps.

Poly-D-Lysine

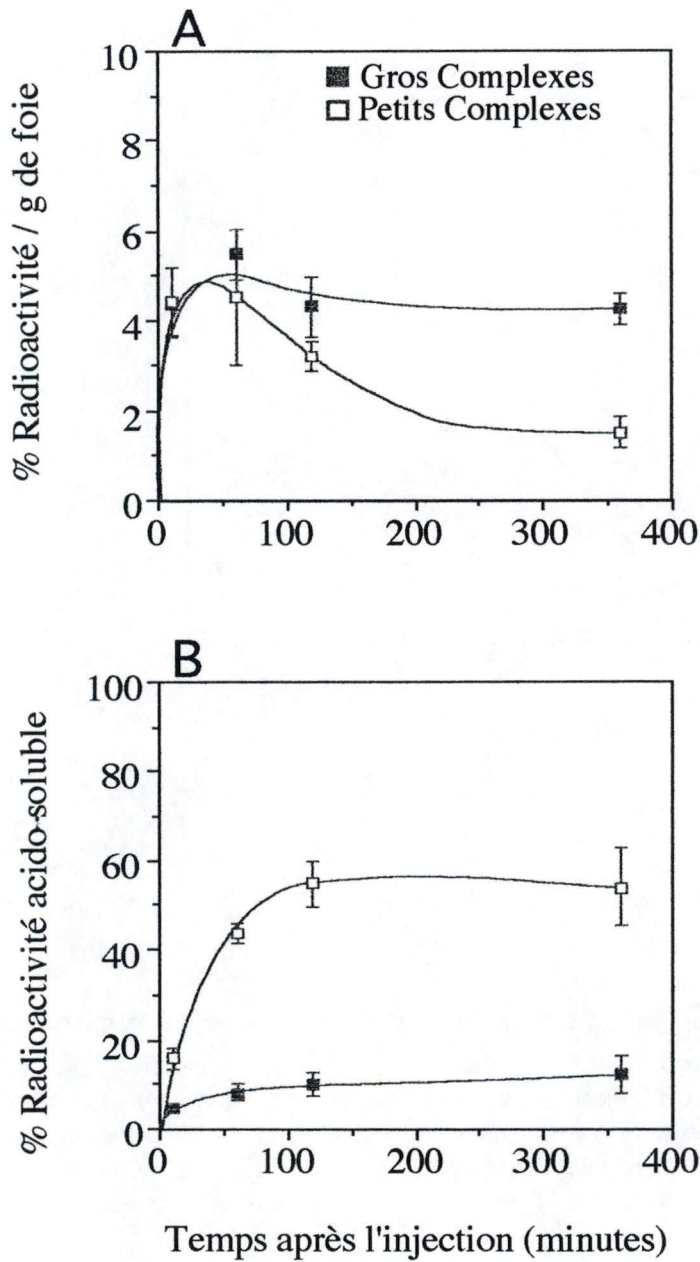


Figure 2: Capture d'ADN(^{35}S) par le foie de rat. La radioactivité est mesurée dans des homogénats de foie de rat à des temps croissants après l'injection de gros et de petits complexes ADN(^{35}S)/poly-D-lysine. A: Radioactivité totale, les valeurs (+/- SD) correspondent au pourcentage de la dose injectée par g de foie. B: Radioactivité acido-soluble, les valeurs correspondent à des pourcentages de la radioactivité totale. Les mesures ont été réalisées sur au moins 3 animaux.

Poly-D-Lysine

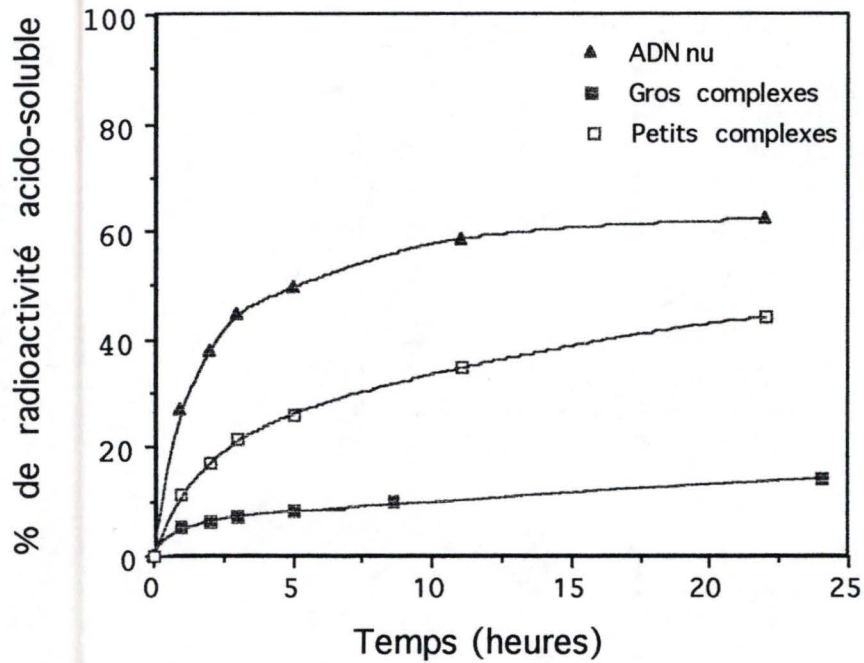


Figure 3: Dégradation de l'ADN(^{35}S) par des lysosomes purifiés. 100 μl de gros et de petits complexes ADN(^{35}S)/poly-D-lysine sont incubés pendant des temps croissants dans un milieu contenant du tampon acétate 0,05 M pH 5 et des lysosomes purifiés de foie de rat, dans un volume total de 1 ml. La réaction est arrêtée avec de l'acide perchlorique 10 %. La radioactivité acido-soluble correspond au pourcentage de la radioactivité totale présente dans le milieu d'incubation. Plusieurs expériences de dégradation ont été réalisées, en voici un résultat représentatif.

1.3.- Dégradation de GC et de PC *in vitro* par les lysosomes.

GC et PC ont été incubés à pH 5 pendant des temps croissants en présence de lysosomes purifiés traités aux ultra-sons pour détruire leur membrane. La dégradation de l'ADN plasmidique a été appréciée en déterminant la proportion de radioactivité devenue acido-soluble pendant l'incubation (figure 3). Il est manifeste que PC est plus sensible à l'action des nucléases lysosomales que GC.

1.4.- Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.

Des homogénats de foie ont été soumis à un fractionnement par centrifugation différentielle suivant la méthode de *de Duve et al* [51]. Ils provenaient d'animaux sacrifiés à des temps croissants après l'injection de PC ou de GC. Les résultats sont présentés à la figure 4 suivant la méthode proposée par ces auteurs. Le contenu en radioactivité acido-soluble de chaque fraction est également donné en pourcent de la radioactivité totale qui y est associée. De plus une distribution exemplative d'une hydrolase lysosomale, l'arylsulfatase, est illustrée à titre de comparaison.

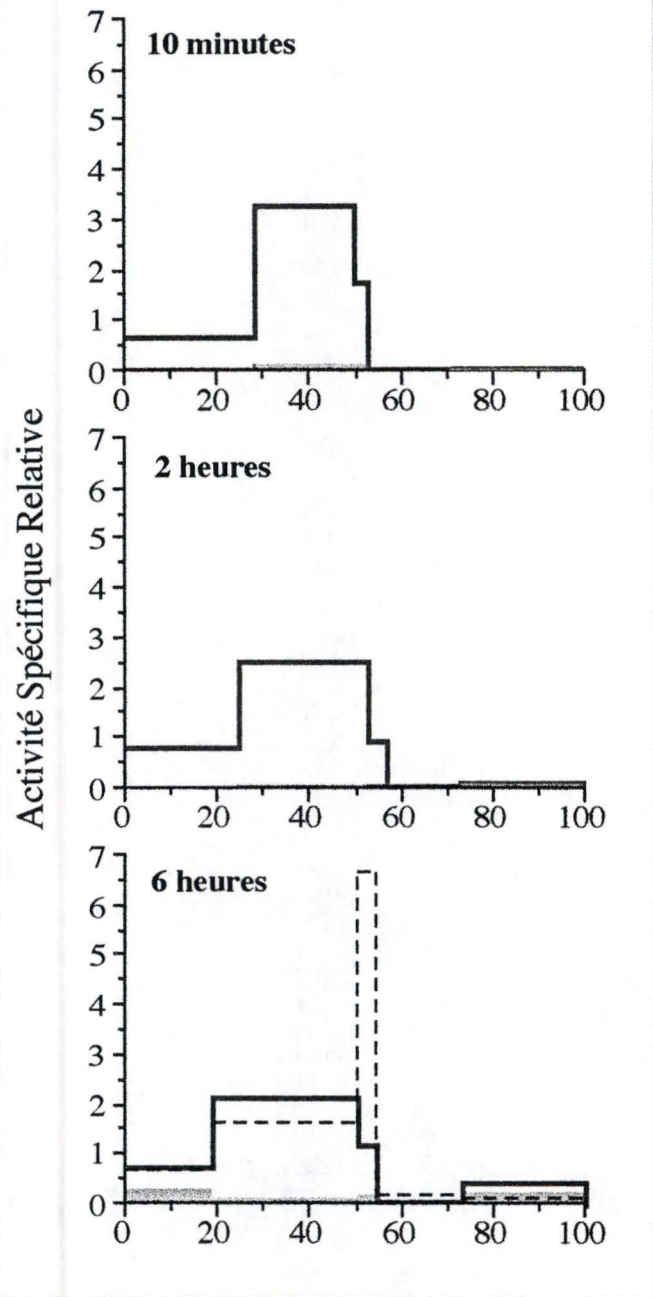
Il est manifeste que les distributions de la radioactivité sont différentes suivant que celles-ci provient de PC ou de GC.

Après l'injection de PC, la majeure partie de la radioactivité est associée aux fractions mitochondriales M et L avec un pic d'activité spécifique relative (ASR) dans la fraction mitochondriale légère L. Une telle distribution ressemble à la distribution des lysosomes comme l'illustre la distribution de l'arylsulfatase. Toutefois, avec le temps, une proportion croissante de la radioactivité se retrouve dans la fraction non sédimentable S où elle est essentiellement sous forme acido-soluble.

Après administration de GC, la radioactivité totale est principalement localisée dans la fraction mitochondriale lourde M et ce jusqu'à au moins 6 heures après le traitement. La radioactivité acido-soluble est constamment très faible.

Poly-D-Lysine

A. Gros Complexes



B. Petits Complexes

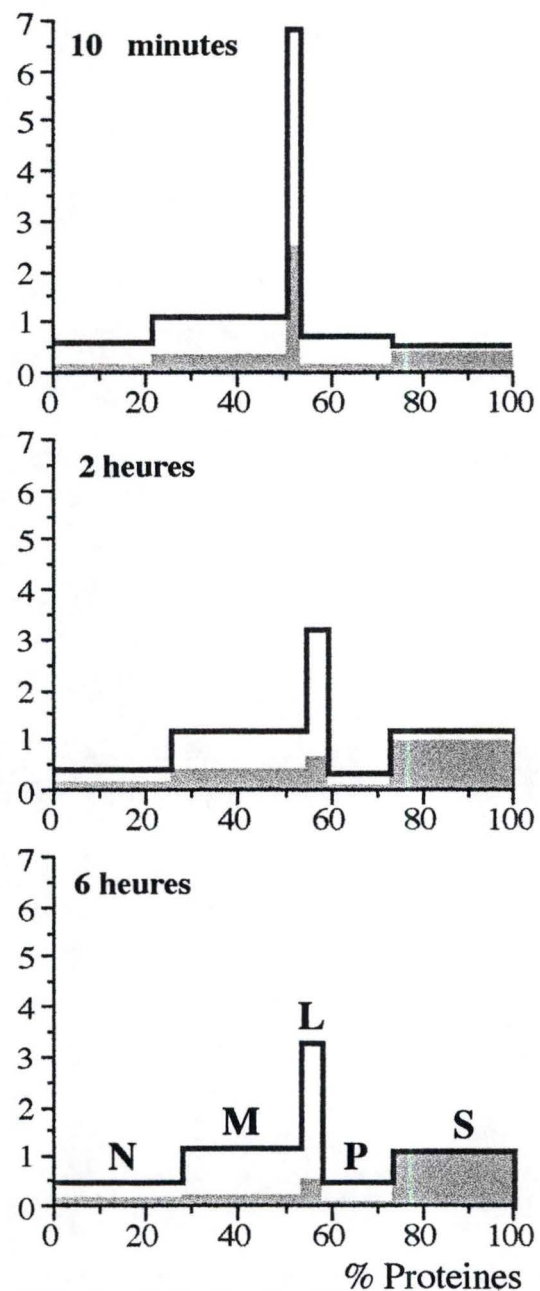


Figure 4: Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle. Les distributions de la radioactivité sont obtenues avec des foies de rats tués à des temps croissants après l'injection de GC (A) ou de PC (B). Les complexes entre l'ADN(^{35}S) et la poly-D-lysine sont préparés comme il a été décrit précédemment. Ordonnée: radioactivité spécifique relative des fractions (pourcentage de la radioactivité totale / pourcentage des protéines totales). Abscisse: contenu relatif en protéines des fractions N, fraction nucléaire; M, fraction mitochondriale lourde; L, fraction mitochondriale légère; P, fraction microsomale et S, fraction soluble. Les surfaces sombres représentent le pourcentage de radioactivité acido-soluble retrouvé dans les fractions. En pointillés, une distribution caractéristique de l'arylsulfatase un marqueur des lysosomes.

Poly-D-Lysine

A. Gros Complexes

B. Petits Complexes

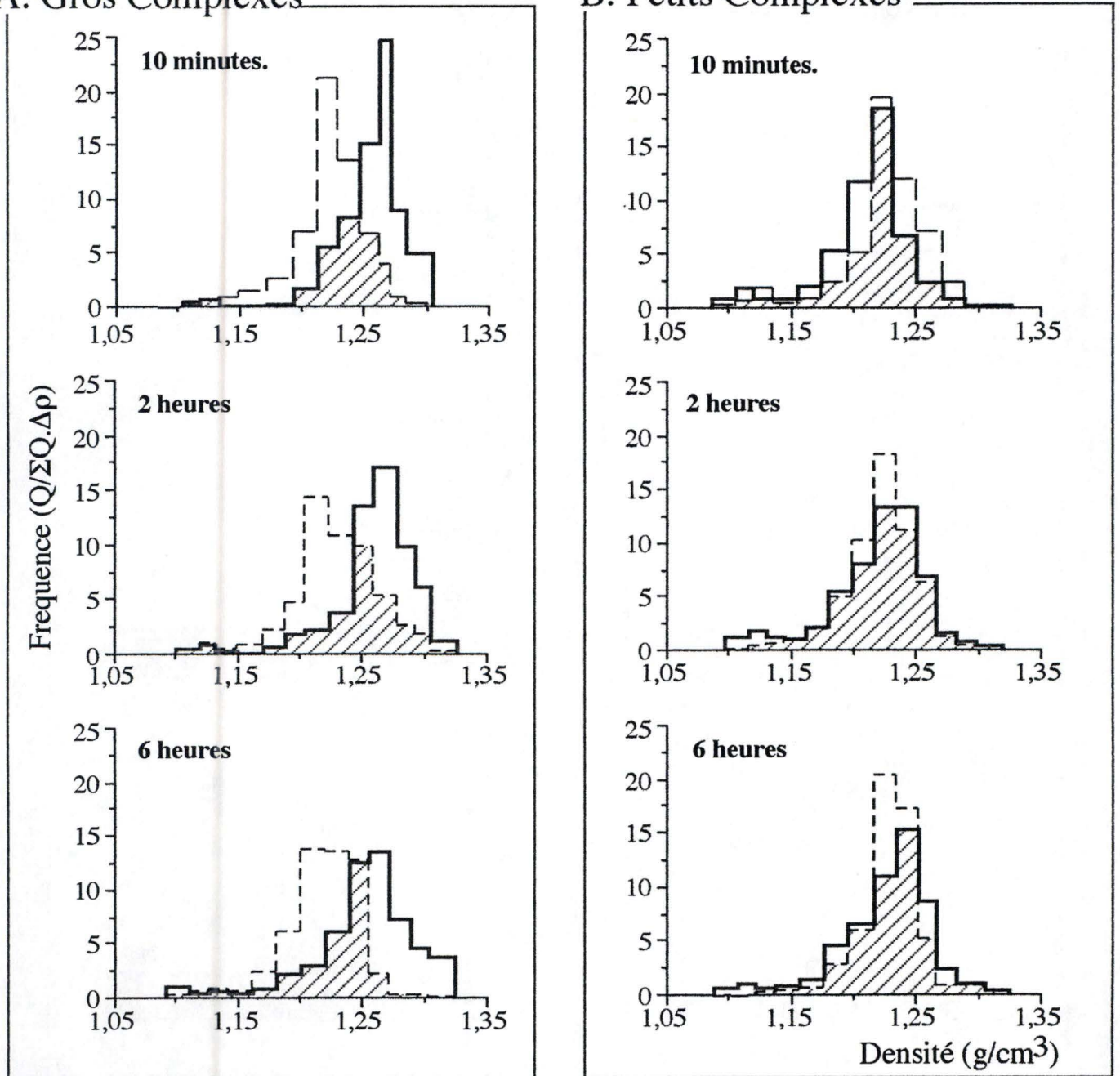


Figure 5: Histogramme de distribution de densité de la radioactivité. Les distributions de la radioactivité (lignes continues) et de l'arylsulfatase (lignes discontinues) sont représentées après centrifugation isopycnique d'une fraction mitochondriale totale (M+L) dans un gradient de saccharose. Les préparations de granules sont isolées à des temps croissants après l'injection de gros (A) ou de petits complexes (B) ADN(³⁵S)/poly-D-lysine. Les centrifugations se déroulent pendant 180 minutes dans un rotor Beckman VTI à 240000 X g. Le gradient de densité est compris entre 1,09 et 1,34 g/cm³. Ordonnée: fréquence (Q/ΣQ.Δρ) ou Q représente l'activité trouvée dans la fraction, Σ Q l'activité totale retrouvée dans la somme des fractions et Δρ l'incrément de densité des fractions.

1.5.- Distribution de la radioactivité après centrifugation isopycnique.

Les résultats de la centrifugation différentielle suggèrent que PC aboutit rapidement aux lysosomes alors que GC reste localisé dans un autre type d'organite. Pour obtenir plus de renseignements à ce sujet nous avons utilisé un autre type de centrifugation, la centrifugation isopycnique, pour analyser la localisation subcellulaire de la radioactivité provenant de ces complexes. Les expériences d'équilibration de densité ont été réalisées en utilisant des gradients de saccharose, la somme des fractions M+L servant de source de granules.

Les résultats sont illustrés à la figure 5.

On constate que dès 10 minutes après l'injection de PC, la distribution de la radioactivité coïncide avec la distribution de l'hydrolase lysosomale, cette coïncidence persistant à des temps plus longs.

Par contre la courbe de distribution de la radioactivité après injection de GC est à n'importe quel temps significativement différente de celle de l'arylsulfatase, elle se situe dans des régions plus denses du gradient, les densités médianes d'équilibration étant nettement plus élevées pour la radioactivité que pour l'hydrolase.

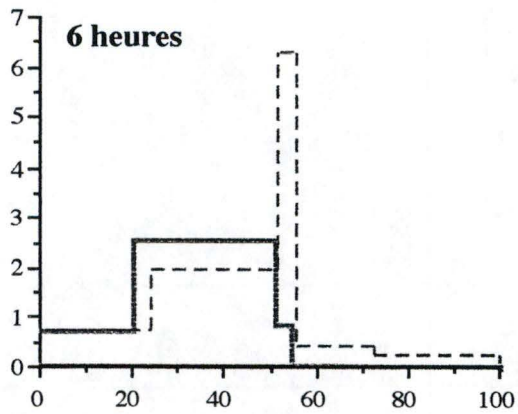
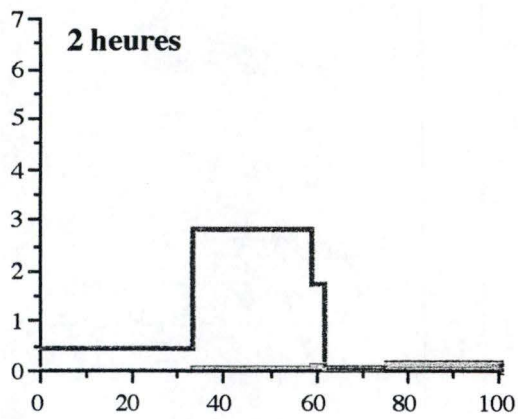
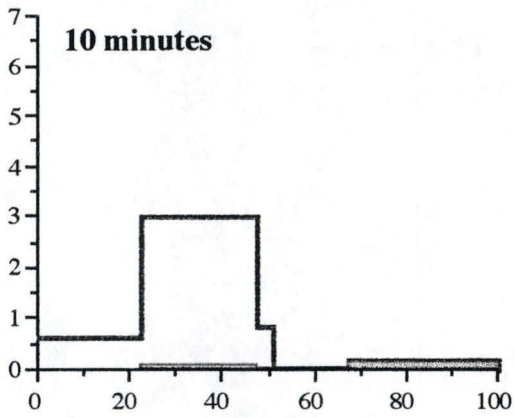
1.6.- Effet du Triton WR 1339.

Lorsque l'on suspecte que la localisation subcellulaire d'un composé endocyté par le foie est lysosomale, un moyen intéressant de s'en assurer est d'utiliser des animaux qui ont reçu une injection d'un détergent non ionique non toxique, le Triton WR 1339. Cette substance est captée par le foie par endocytose et aboutit aux lysosomes. Ne pouvant être dégradée par les hydrolases lysosomales, elle s'accumule dans ces organites. Il en résulte une diminution considérable de leur densité que l'on peut facilement mettre en évidence par centrifugation isopycnique [62].

Après injection de Triton WR 1339, la courbe de distribution des hydrolases lysosomales après centrifugation isopycnique est nettement déplacée vers les zones de faibles densités du gradient [63]. Dès lors, si un composé est présent dans les lysosomes, sa courbe de distribution après centrifugation isopycnique subira un même glissement vers les zones de faibles densités du gradient.

Poly-D-Lysine

A. Gros Complexes



B. Petits Complexes

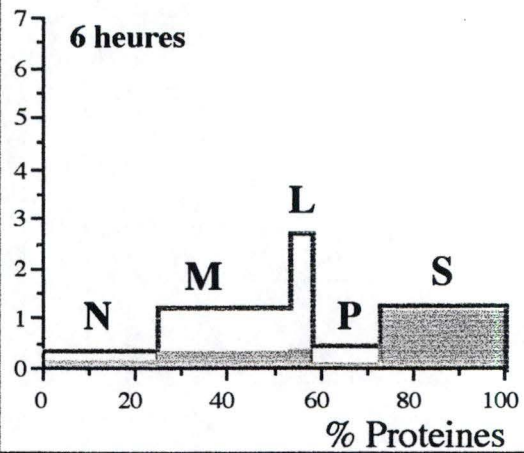
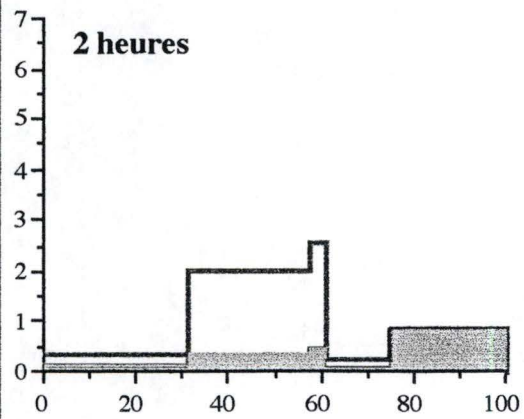
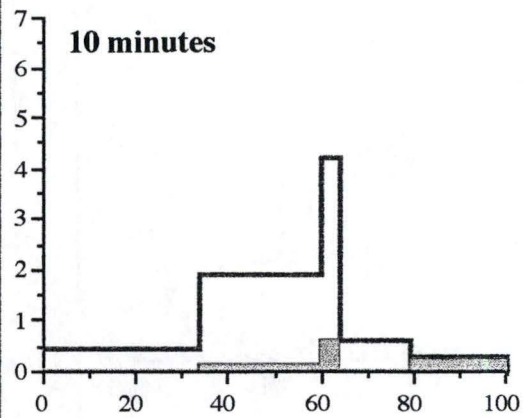
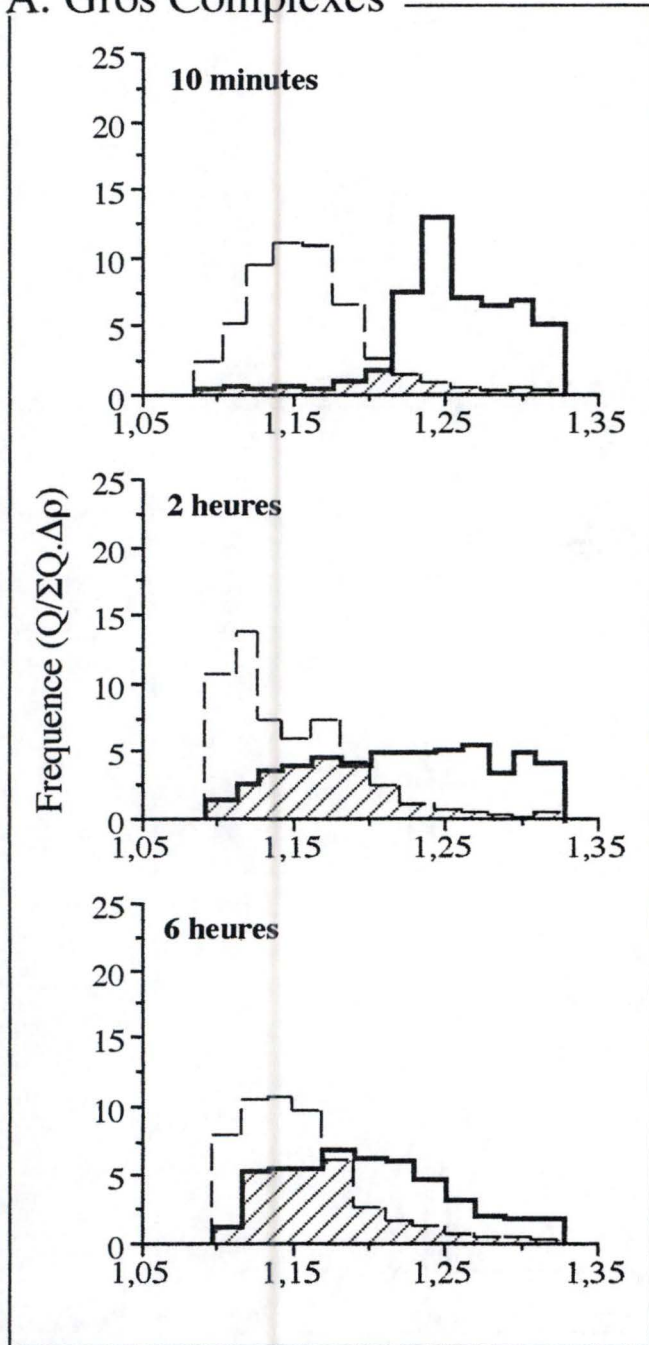


Figure 6: Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle: effet du Triton WR 1339. Les expériences sont réalisées comme décrit à la figure 4, à partir de foie de rat ayant reçu une injection de Triton WR 1339 4 jours avant l'expérience. Les surfaces pleines représentent le pourcentage de radioactivité acido-soluble retrouvé dans les différentes fractions. En pointillés se trouve une distribution caractéristique de l'arylsulfatase, un marqueur des lysosomes.

Poly-D-lysine

A. Gros Complexes



B. Petits Complexes

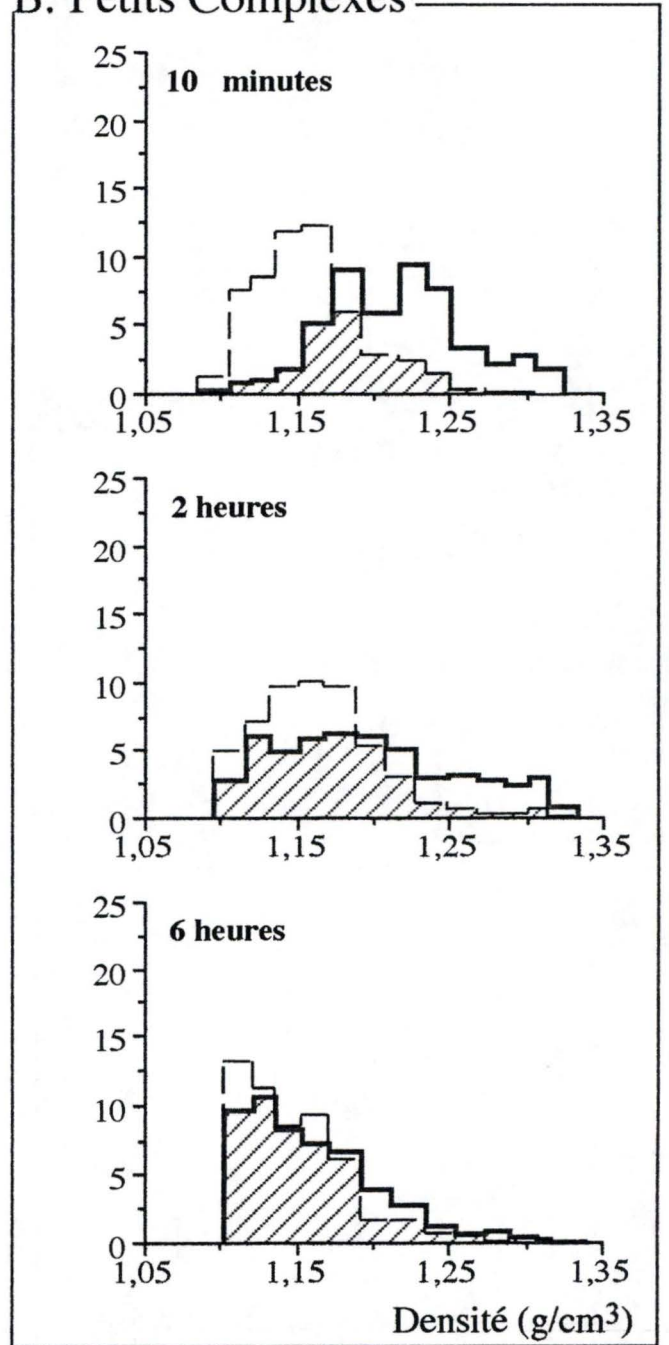


Figure 7: Histogramme de distribution de densité de la radioactivité (lignes continues) et de l'arylsulfatase (pointillés) après centrifugation isopycnique d'une fraction mitochondriale totale (M+L) dans un gradient de saccharose. Effet du Triton WR 1339. Les expériences sont réalisées comme décrit à la figure 5, avec des rats ayant reçu une injection de Triton WR 1339 4 jours avant l'expérience.

Nous avons employé cette méthode pour préciser d'avantage la localisation subcellulaire de la radioactivité provenant de PC et de GC.

Comme le montre la figure 6, l'injection de Triton WR 1339 avant l'injection de PC ou de GC ne modifie pas la distribution de la radioactivité ni de l'arylsulfatase après centrifugation différentielle. Il n'en est pas de même pour les distributions après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose (figure 7) ; l'injection du détergent provoque comme prévu un déplacement de la courbe de distribution de l'arylsulfatase vers les zones légères.

10 minutes après l'injection de PC, la courbe de distribution de la radioactivité a déjà subi un glissement vers les densités plus faibles, le phénomène est encore accentué après 2 heures. Après 6 heures, les distributions de la radioactivité et de l'enzyme lysosomale se confondent. Ces résultats confirment bien que PC aboutit aux lysosomes.

Dans le cas de GC, les courbes de distributions de la radioactivité et de l'arylsulfatase sont tout à fait distinctes 10 minutes après l'administration des complexes. Cela indique qu'à ce moment la radioactivité n'est pas localisée dans les lysosomes. Plus tard, on observe un étalement de la courbe de distribution de la radioactivité vers les zones de faibles densités montrant que les produits marqués se localisent progressivement dans les lysosomes. En fait, tout se passe comme si PC et GC aboutissaient aux lysosomes mais que le transfert depuis le compartiment prélysosomal à ces organites était beaucoup plus lent pour GC.

1.7.- Distribution cellulaire.

Trois types principaux de cellules sont présents dans le foie : les hépatocytes, les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer. Nous avons recherché si la répartition dans ces cellules était la même pour PC et pour GC. Comme l'illustre la figure 8, la plus grande partie de la radioactivité est localisée dans les cellules de Kupffer qu'elle provienne de PC ou de GC. Les différences de distribution que nous avons décrites ne proviennent donc pas d'une capture de ces complexes par des types cellulaires différents.

Poly-D-lysine

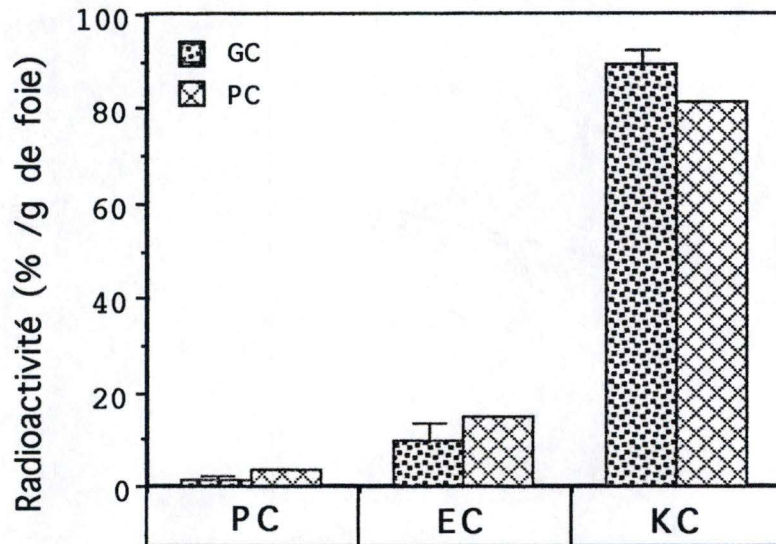


Figure 8: Distribution de la radioactivité dans les cellules du foie de rat. Les distributions de radioactivité sont obtenues à partir de foie de rat tué 1 heure après l'injection de gros (points) ou de petits complexes (lignes) ADN(^{35}S)/ poly-D-lysine. Les valeurs sont données en pourcentage de la radioactivité totale du foie. PC: cellules parenchymateuses, EC: cellules endothéliales, KC: cellules de Kupffer.

DOTAP

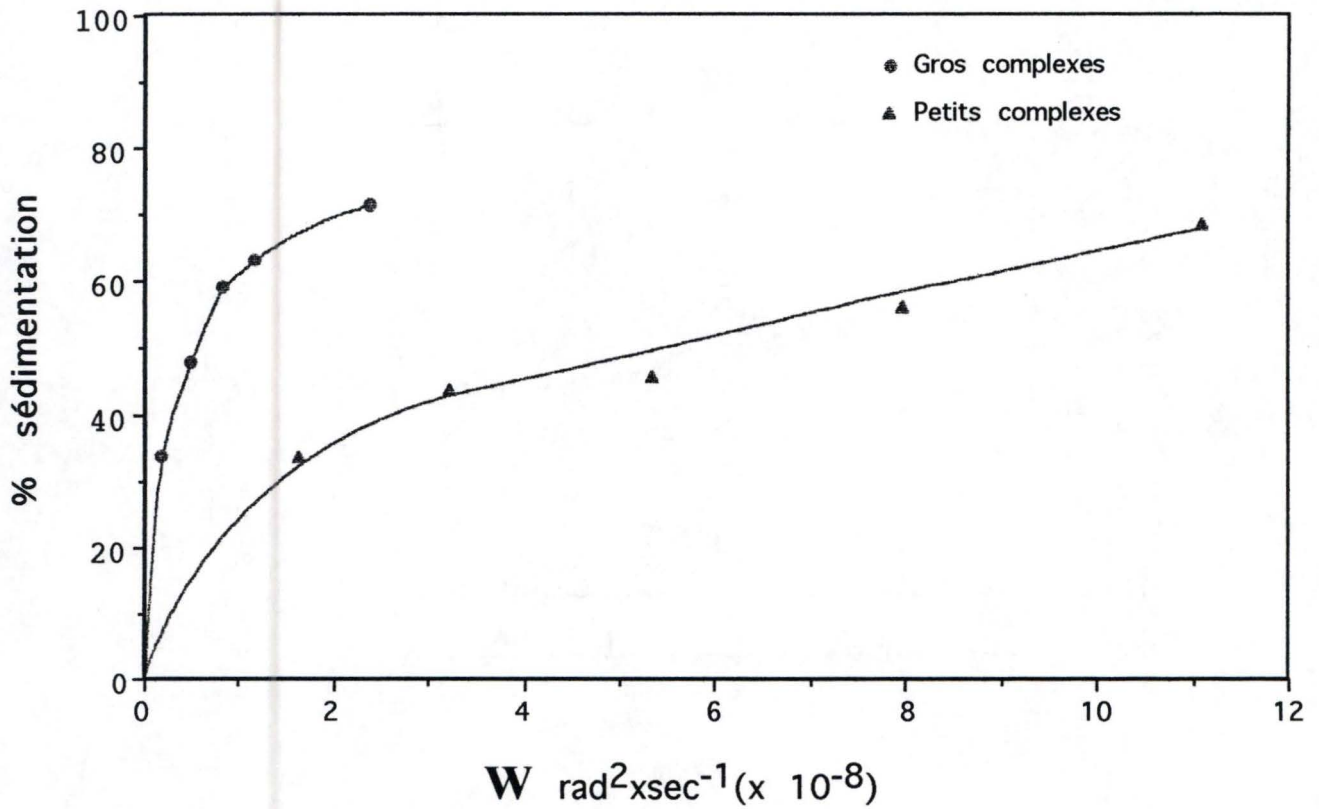


Figure 9: Sédimentation des petits et des gros complexes ADN(^{35}S)/DOTAP. Les courbes représentent le pourcentage de radioactivité retrouvé dans le culot de centrifugation pour différentes valeurs de W (w^2t).

2.- Complexes DOTAP-ADN ³⁵S

Nous avons réalisé des expériences du même type mais en nombre plus limité, avec un lipide cationique utilisé très fréquemment dans les transfections : le N-(1(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N,-triméthylammonium-méthyl-sulfate appelé communément DOTAP. Comme l'illustre la figure 9, il est également possible de fabriquer des complexes de tailles différentes avec ce vecteur ; nous les appellerons GCD (gros complexes DOTAP) et PCD (petits complexes DOTAP). Un calcul du coefficient moyen de sédimentation donne $3.5 \cdot 10^4$ Svedberg pour GCD et $5 \cdot 10^3$ Svedberg pour PC.

2.1.- Capture et dégradation de GCD et PCD par le foie.

Les résultats sont présentés à la figure 10. Les deux types de complexes sont captés dans une même mesure mais la dégradation est nettement plus rapide pour PCD.

2.2.- Dégradation de GC et de PC *in vitro* par les lysosomes.

Comme représenté à la figure 11, il est manifeste que PCD est plus sensible à l'action des nucléases lysosomales que GCD. L'ADN³⁵S associé aux petits complexes, subit une dégradation très rapide et comparable à celle de l'ADN nu.

2.3.- Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.

Comme le montre la figure 12, 10 minutes après l'injection, les distributions sont comparables pour les gros et les petits complexes. La majeure partie de la radioactivité est récupérée dans les fractions mitochondriales M et L. Toutefois, on observe déjà une différence significative dans les proportions trouvées dans S et dans le pourcentage de radioactivité acido-soluble, elles sont significativement plus élevées dans le cas de PCD. Cette différence s'accroît lorsque le temps après l'injection augmente.

DOTAP

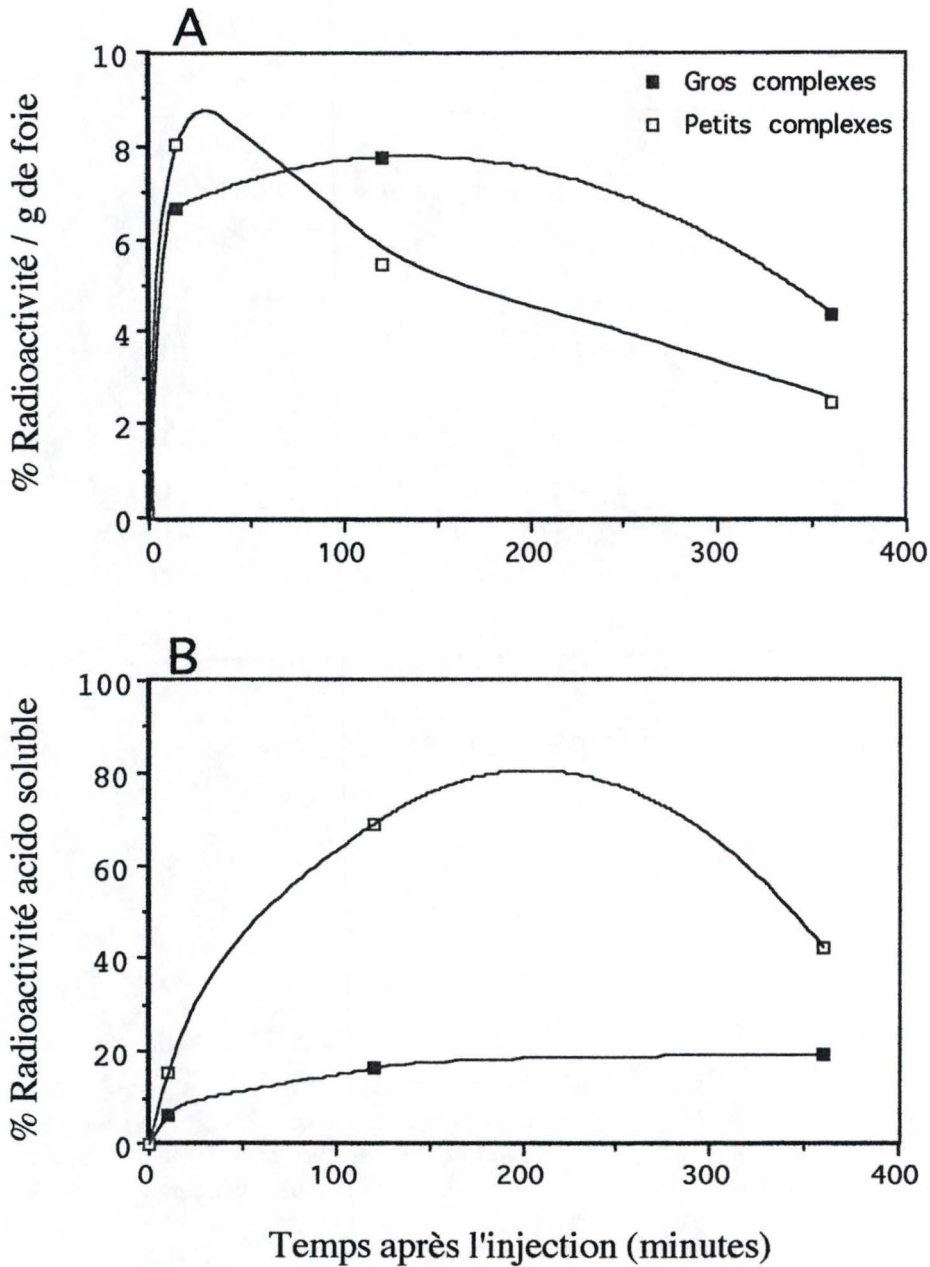


Figure 10: Capture d' ADN(³⁵S) par le foie de rat. La radioactivité est mesurée dans des homogénats de foie de rat à des temps croissants après l'injection de gros et de petits complexes ADN(³⁵S)/ DOTAP. A: Radioactivité totale, les valeurs correspondent au pourcentage de la dose injectée par g de foie. B: Radioactivité acido-soluble, les valeurs correspondent à des pourcentages de la radioactivité totale.

DOTAP

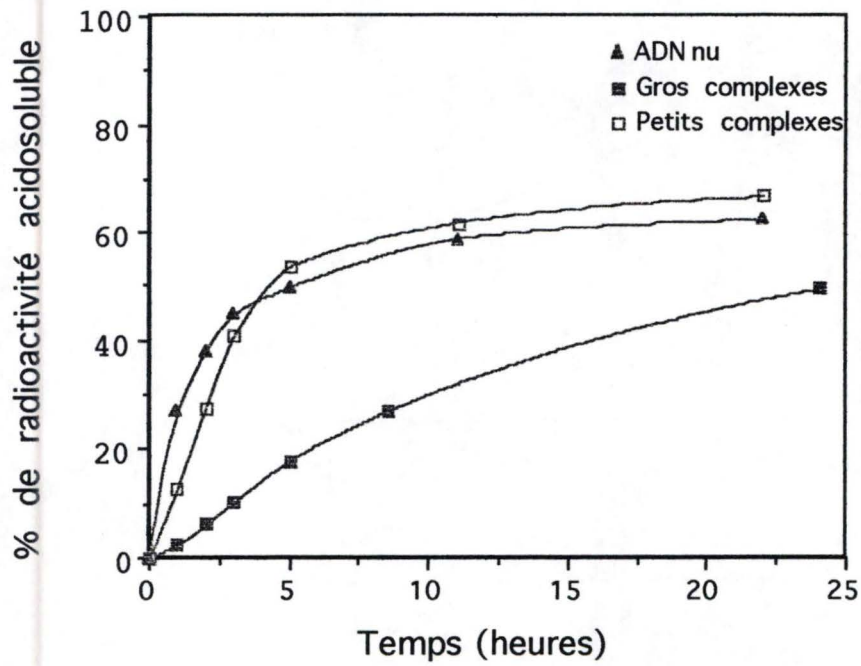


Figure 11: Dégradation de l'ADN(^{35}S) par des lysosomes purifiés. 100 μl de gros complexes et de petits complexes ADN(^{35}S)/DOTAP sont incubés pendant des temps croissants dans un milieu contenant du tampon acétate 0,05 M pH 5 et des lysosomes purifiés de foie de rat, dans un volume total de 1 ml. La réaction est arrêtée avec de l'acide perchlorique 10 %. La radioactivité acido-soluble correspond au pourcentage de la radioactivité totale présente dans le milieu d'incubation.

DOTAP

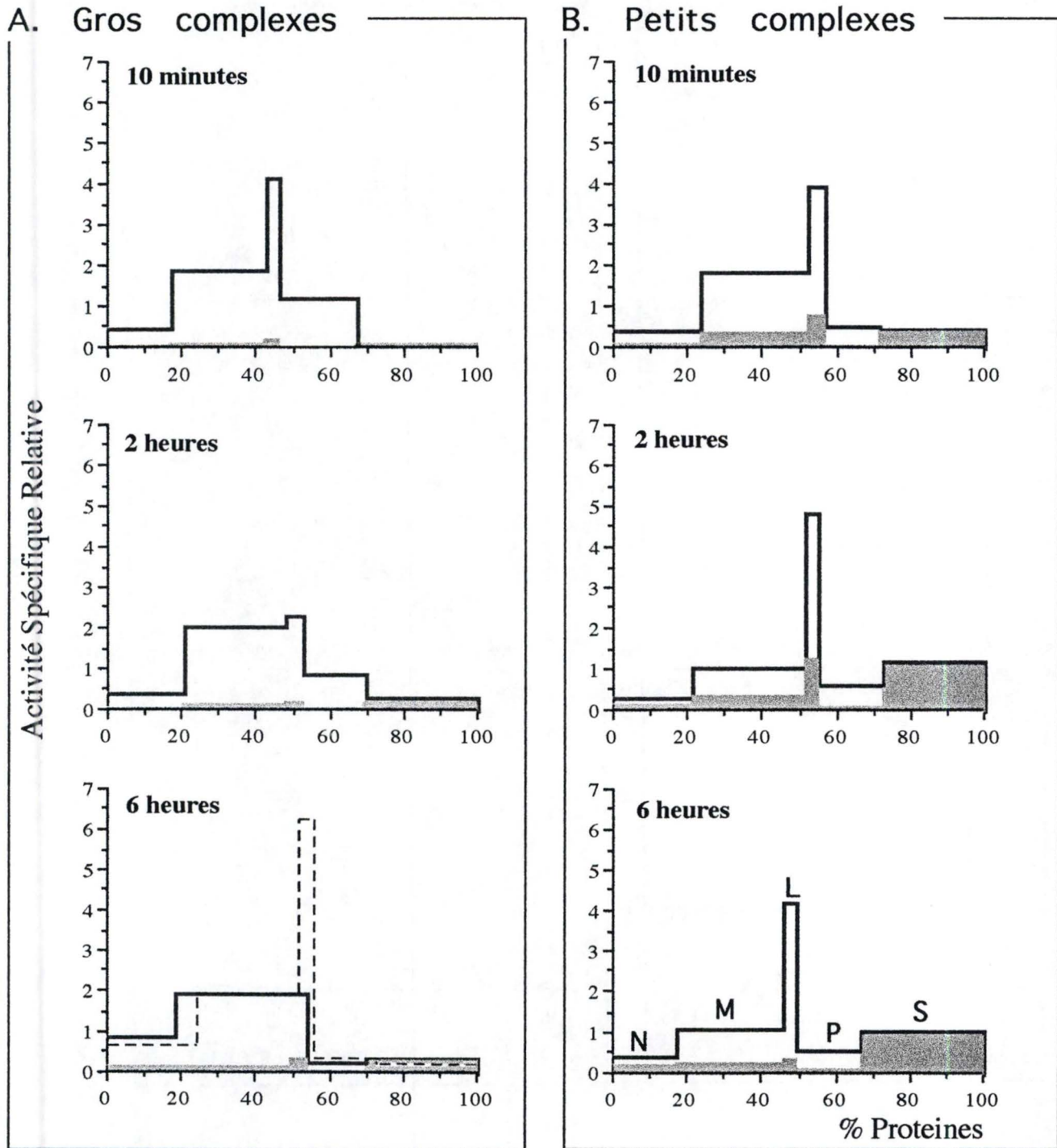
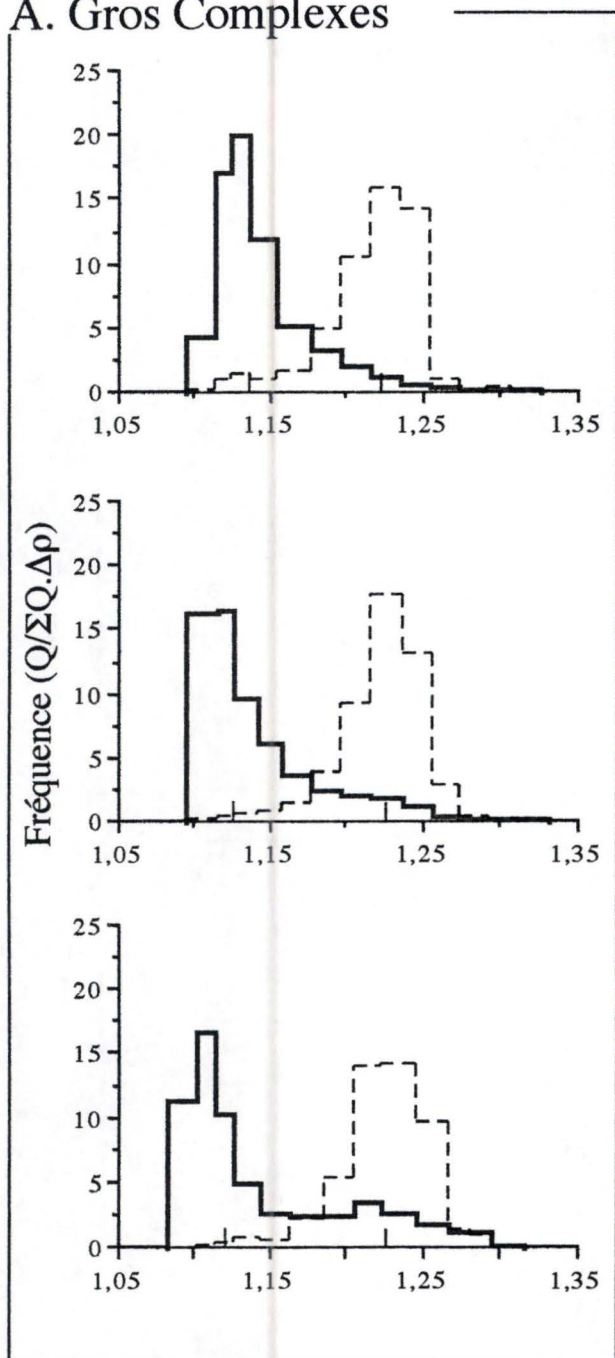


Figure 12: Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle. Les expériences sont réalisées comme décrit à la figure 4, avec des foie de rat tué à des temps croissants après l'injection de gros (A) et de petits complexes (B) ADN(³⁵S)/DOTAP. Les surfaces pleines représentent le pourcentage de radioactivité acido-soluble retrouvé dans les fractions. En pointillés, une distribution caractéristique de l'arylsulfatase, un marqueur des lysosomes.

DOTAP

A. Gros Complexes



B. Petits Complexes

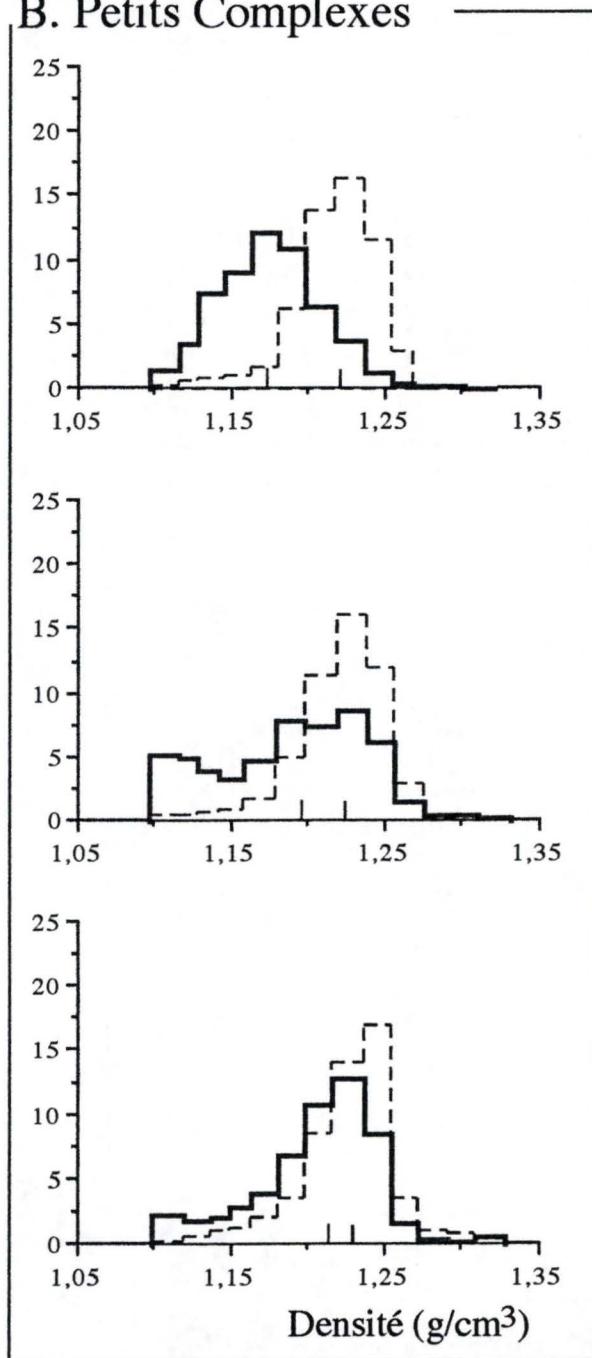


Figure 13: Histogramme de distribution de densité de la radioactivité. Les distributions de la radioactivité (lignes continues) et de l'arylsulfatase (lignes discontinues) sont représentées après centrifugation isopycnique d'une fraction mitochondriale totale (M+L) dans un gradient de saccharose selon le protocole décrit à la figure 5. Les préparations de granules sont isolées suivant des temps croissants après l'injection de gros et de petits complexes ADN(³⁵S)/DOTAP.

2.4.- Distribution de la radioactivité après centrifugation isopycnique.

Les distributions de la radioactivité après centrifugation isopycnique sont illustrées à la figure 13 et comparées à celle de l'arylsulfatase, un marqueur des lysosomes.

Aux trois temps considérés, la distribution de la radioactivité provenant de GCD est toujours bien distincte de celle de l'arylsulfatase. Les structures auxquelles elle est associée sont nettement plus légères que les lysosomes. On voit toutefois apparaître après 6 heures un petit pic dans la zone où l'arylsulfatase est localisée.

Après 10 minutes, la distribution de la radioactivité provenant de PCD diffère de celle de l'arylsulfatase tout en étant toutefois centrée sur une densité médiane plus élevée que celle de la distribution de GCD. Plus tard, la distribution devient progressivement du type lysosomal.

2.5.- Effet du Triton WR 1339.

De même que lors de nos expériences utilisant la poly-D-lysine comme vecteur cationique de l'ADN plasmidique, nous avons utilisé dans le cas du DOTAP, le Triton WR 1339. Cette substance captée par le foie permet une diminution considérable de la densité des lysosomes que l'on peut facilement mettre en évidence par centrifugation isopycnique [62]. Nous avons employé cette méthode pour préciser davantage la localisation subcellulaire de la radioactivité provenant de PC et de GC.

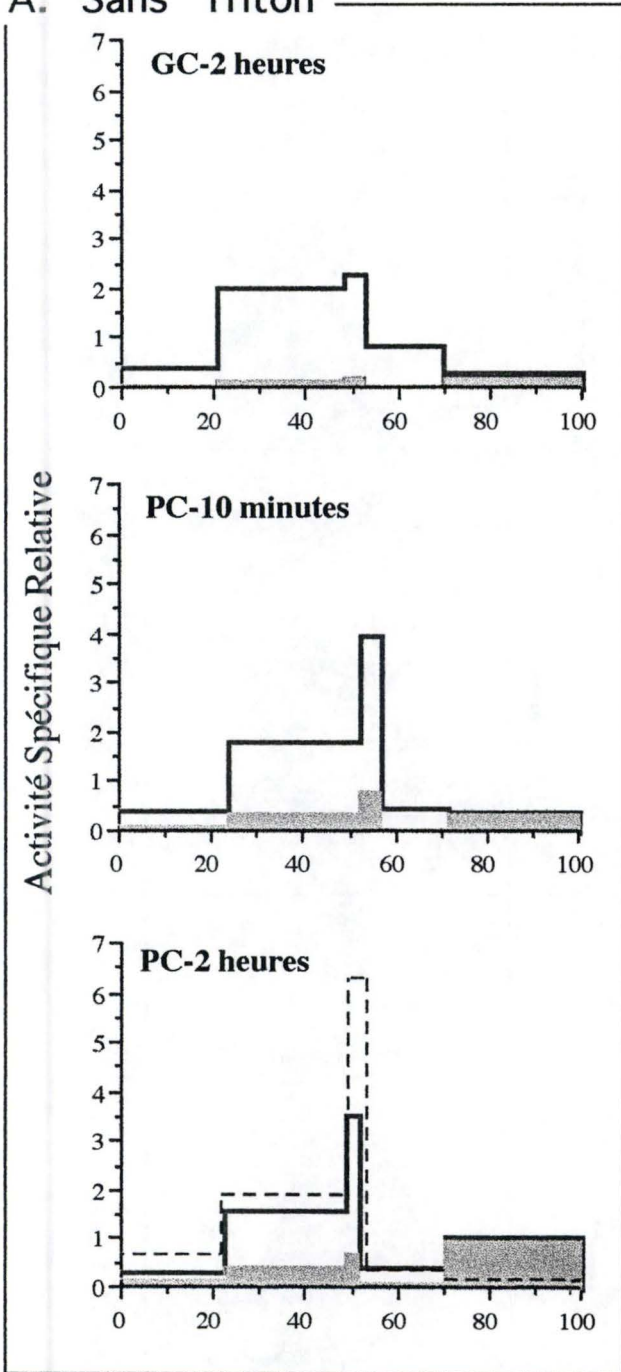
Comme le montre la figure 14, l'injection de Triton WR 1339 4 jours avant l'injection de GCD ou de PCD ne modifie pas la distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.

Il n'est pas possible de rechercher l'effet de ce détergent sur la distribution de densité de la radioactivité provenant de GCD (2 heures après l'injection), car les structures où elles est localisée sont trop légères. En effet, quand on compare les histogrammes de distribution de l'arylsulfatase et de la radioactivité avant et après injection de Triton WR 1339, on remarque un déplacement de la courbe de distribution de l'arylsulfatase vers les densités plus faibles. Par contre, la courbe de distribution de la radioactivité reste localisée dans les régions moins denses du gradient et ne subit pas de déplacement, ce qui empêche toute interprétation relative à l'effet du Triton.

Par contre, l'effet du Triton WR 1339 est très net sur les distributions de la radioactivité issue de PCD. Dès 10 minutes, un glissement de la courbe vers les faibles densités est observé. Il

DOTAP

A. Sans Triton



B. Avec Triton

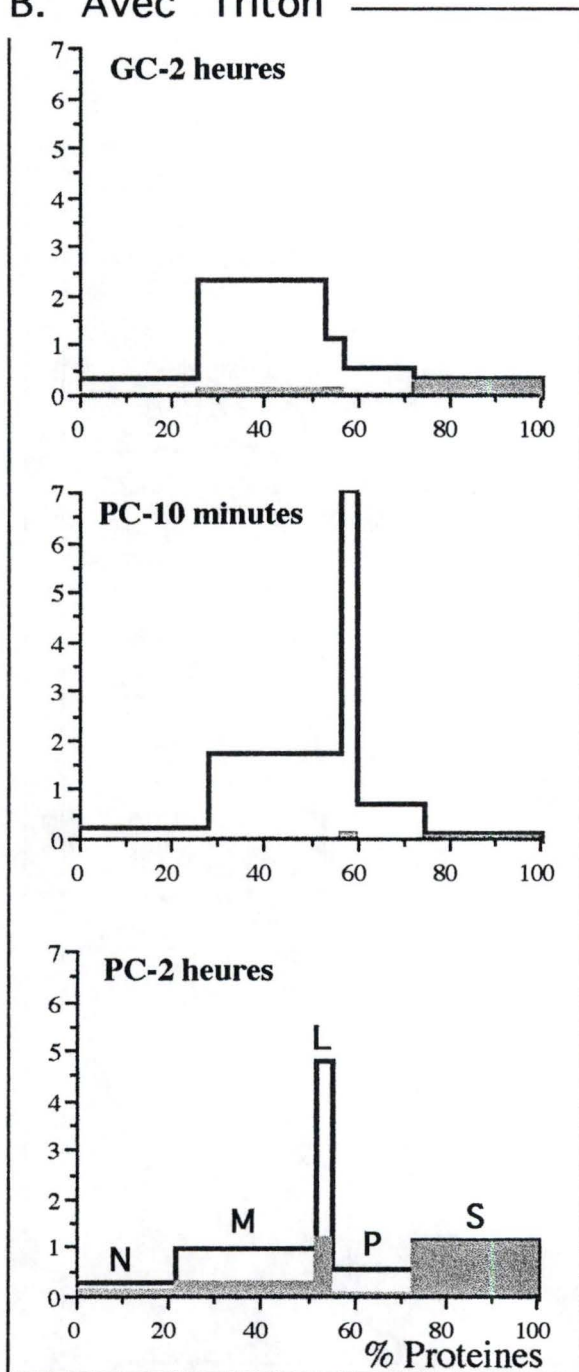


Figure 14 : Histogramme de distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle: effet du Triton WR 1339. Les expériences sont réalisées comme décrit à la figure 4, avec des foies de rats ayant (B) ou non (A) reçu une injection de Triton WR 1339. Ces rats sont tués 10 minutes ou 2 heures après l'injection des complexes. Les surfaces pleines représentent le pourcentage de radioactivité acido-soluble retrouvé dans les fractions. En pointillés, une distribution de l'arylsulfatase, un marqueur des lysosomes.

DOTAP

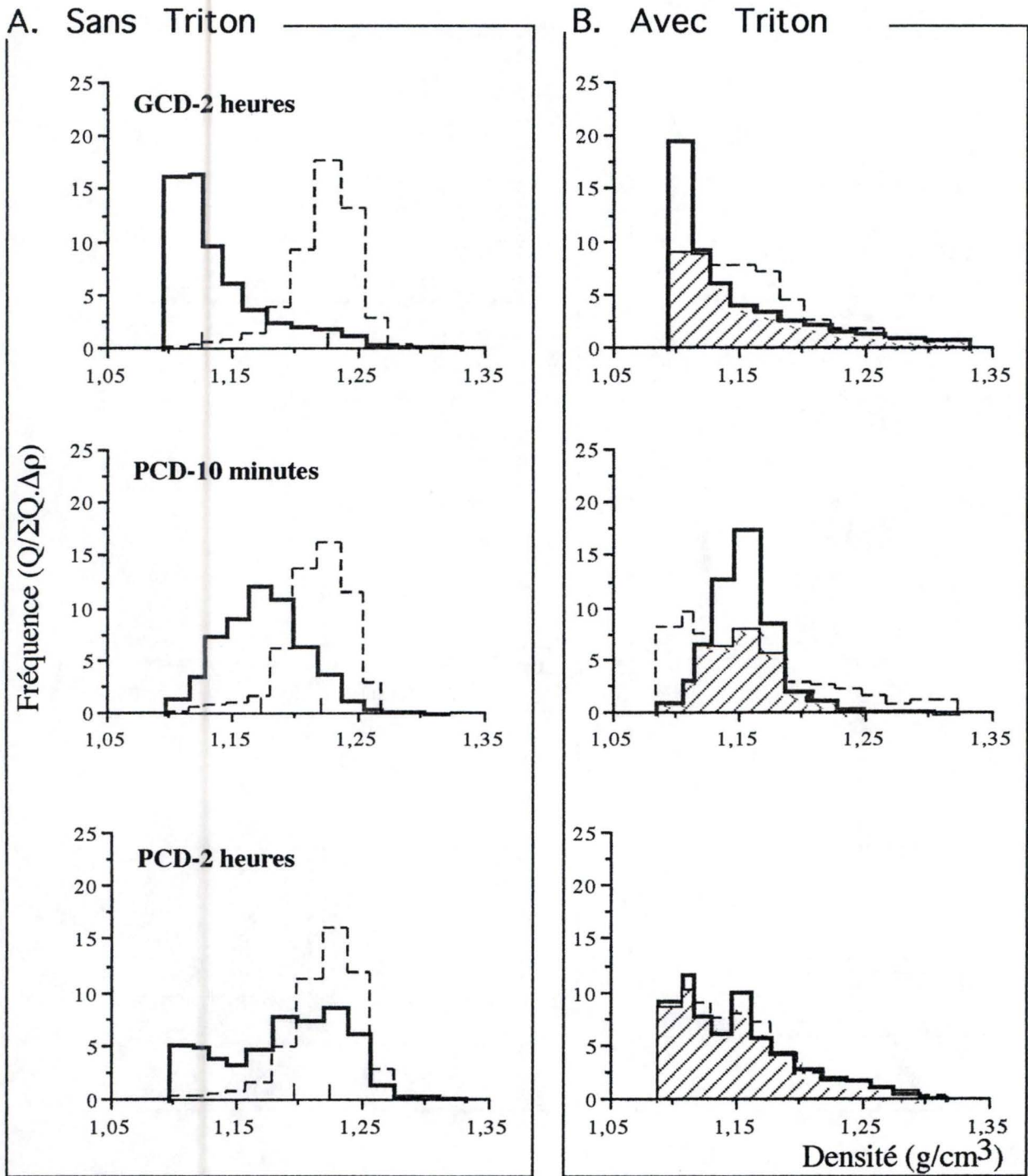


Figure 15 : Histogramme de distribution de densité de la radioactivité après centrifugation isopycnique : effet du Triton WR 1339. Les distributions de la radioactivité (lignes continues) et de l'arylsulfatase (pointillés) sont obtenues après centrifugation isopycnique d'une fraction mitochondriale totale (M+L) dans un gradient de saccharose. Les expériences sont réalisées comme décrit à la figure 5 avec des rats ayant reçu (B) ou non (A) une injection de Triton WR 1339, 4 jours avant l'expérience. Les rats sont tués 10 minutes ou 2 heures après l'injection des complexes.

est très important lorsque les granules ont été isolés 2 heures après l'injection. Ces résultats confirment bien que PCD aboutit aux lysosomes.

IV.- DISCUSSION & CONCLUSION

IV.- Discussion et conclusion

En accord avec différentes données de la littérature [50,64], nos résultats montrent que des complexes ADN-vecteurs non viraux peuvent présenter des tailles variables suivant leur mode de préparation. Cela est valable que le vecteur soit un polycation comme la poly-D-lysine ou un lipide cationique comme le DOTAP. Nous avons essayé de déterminer si la capture par le foie et le sort de l'ADN plasmidique, deux éléments déterminants pour l'efficacité de la transfection, étaient affectés par la taille des complexes. Nous discuterons tout d'abord les résultats que nous avons obtenus avec la poly-D-lysine, ensuite nos observations avec le DOTAP.

1.- Complexes poly-D-lysine-ADN ³⁵S

La susceptibilité aux nucléases lysosomales dépend de la taille du complexe.

On sait que l'ADN complexé à un vecteur non viral est protégé jusqu'à un certain point de l'action des nucléases [65]. C'est ce que nous avons vérifié pour les complexes que nous avons utilisés. Il est à noter que dans nos expériences, nous avons employé, comme source de nucléases des lysosomes purifiés et non de la Dnase pancréatique comme cela se fait d'habitude. Ce procédé nous permet de nous rapprocher davantage des conditions intracellulaires. En effet, l'ADN et ses complexes entrent dans la cellule par endocytose [66,40] et ont donc de grandes chances d'aboutir aux lysosomes : lieu principal de digestion enzymatique des particules captées.

Nous avons trouvé que les complexes de petite taille étaient plus rapidement hydrolysés que les complexes de grande taille. Il est généralement admis que les vecteurs protègent l'ADN de l'action des nucléases en diminuant l'accès de l'enzyme à son substrat. L'influence de la taille du complexe sur son hydrolyse pourrait s'expliquer par une différence de stabilité entre les deux types de complexes, liée à des caractéristiques structurales dissemblables [64]. Selon cette hypothèse, la stabilité des petits complexes serait moins grande que celle des gros

complexes et ils se dissocieraient progressivement au cours de l'incubation, libérant de l'ADN nu facilement digéré par les nucléases.

***In vivo*, la dégradation de l'ADN mais non sa capture par le foie dépendent de la taille du complexe.**

Nous avons montré que les complexes de grande taille et de petite taille étaient captés sensiblement à la même vitesse par le foie et ce, principalement par les cellules de Kupffer. Par contre, les complexes de plus petite taille sont dégradés plus rapidement *in vivo*, ce qui est en accord avec les résultats obtenus *in vitro*, discutés ci-dessus. Toutefois, comme nous allons le voir, un autre facteur intervient : la vitesse de transfert de l'ADN endocyté aux lysosomes.

Le cheminement intracellulaire de l'ADN capté le conduit aux lysosomes, mais la vitesse à laquelle les molécules d'acide nucléique atteignent ces organites est beaucoup plus élevée pour les complexes de petite taille.

Les distributions en centrifugation différentielle et en centrifugation isopycnique de la radioactivité provenant des petits complexes PC suggèrent que rapidement, elle est localisée dans les lysosomes. La localisation lysosomale est affirmée par les observations obtenues sur des animaux traités au Triton WR 1339, une substance qui modifie spécifiquement la densité des lysosomes. La diminution de densité de ces organites démontrée par la distribution d'un de leur enzyme marqueur, l'arylsulfatase, affecte rapidement les structures auxquelles la radioactivité provenant de PC est associée. Ceci qui démontre d'une façon non équivoque la nature lysosomale de ces structures. Il est à noter que parallèlement au passage de l'ADN marqué aux lysosomes, une augmentation de la radioactivité acido-soluble est observée, ce qui cadre bien avec une dégradation de l'ADN dans ces organites.

Lorsque les gros complexes GC sont injectés, les distributions de la radioactivité tant en centrifugation différentielle qu'isopycnique, sont toujours différentes des distributions de l'hydrolase lysosomale de référence ; elles sont centrées sur des valeurs de densité médiane nettement supérieures. Cela suggère qu'une proportion importante des produits marqués est localisée dans les structures non lysosomales, probablement des phagosomes [67].

La densité élevée de ce compartiment prélysosomal proviendrait de son contenu en complexes denses. Toutefois, le fait qu'un certain chevauchement des deux courbes soit apparent ne permet pas d'exclure qu'une partie de la radioactivité ne soit présente dans les lysosomes. C'est en fait ce que démontrent les résultats provenant des expériences réalisées sur les rats ayant reçu une injection de Triton WR 1339. En effet, si 10 minutes après l'injection de GC, aucun effet du Triton WR 1339 sur la distribution de la radioactivité n'est observable, après 2 heures la courbe de distribution est partiellement déplacée vers les zones de plus faible densité du gradient. En réalité, tout se passe comme si le transfert de l'ADN endocyté aux lysosomes était retardé quand le complexe est plus gros. Cependant, même lorsqu'une partie de la radioactivité provenant de GC est localisée dans les lysosomes, la proportion de radioactivité acido-soluble reste faible, ce qui n'est pas le cas, rappelons-le, lorsque des PC sont endocytés. L'explication la plus vraisemblable est que l'ADN aboutissant aux lysosomes est encore associé avec le vecteur formant un complexe suffisamment stable pour résister aux nucléases lysosomales comme cela se passe *in vitro*

Comment expliquer le retard de transfert aux lysosomes ?

Les différences de vitesse de transfert de l'ADN aux lysosomes que nous avons observées en comparant deux complexes de tailles différentes, la poly-D-lysine servant de vecteur, ressemblent à celles qui ont été mises en évidence entre les complexes de même taille mais où soit la poly-D-lysine, soit la poly-L-lysine jouait le rôle de vecteur [45]. Il a été démontré que l'ADN était beaucoup plus rapidement transféré aux lysosomes lorsque la poly-L-lysine était utilisée comme vecteur [45]. L'interprétation de ce phénomène qui a été proposée est que, après capture par la cellule, les complexes de grande taille contenant la poly-L-lysine étaient disloqués suite à une hydrolyse du polycation par une cathepsine présente dans le compartiment prélysosomal. Cette déstabilisation permettrait aux complexes ou même à l'ADN nu d'être plus facilement transférés aux lysosomes par des vésicules de transport ou par fusion de phagosomes arrivés à maturation (voir figure 1 de l'introduction) avec les lysosomes. Un tel processus ne pourrait se réaliser lorsque la poly-D-lysine est le vecteur car ce polycation n'est pas dégradé par des cathepsines.

Une interprétation similaire pourrait être proposée pour expliquer nos observations. L'ADN des petits complexes avec la poly-D-lysine serait plus facilement transféré aux lysosomes car ces complexes s'accommodent mieux de la taille des vésicules qui les véhiculent aux lysosomes

ou n'empêchent pas la maturation des phagosomes, qui peuvent ainsi fusionner avec les lysosomes. Il est aussi possible que les petits complexes soient moins stables que les gros complexes dans le compartiment prélysosomal et que l'ADN nu, plus facilement transférable aux lysosomes, soit libéré.

2.- Complexes DOTAP-ADN ³⁵S

La discussion précédente est tout à fait applicable aux résultats que nous avons obtenus en utilisant le lipide cationique DOTAP comme vecteur. Deux remarques sont toutefois à faire. Tout d'abord, nous ne pouvons ici présumer du sort du vecteur comme dans le cas de la poly-D-lysine dont nous pouvions affirmer qu'il n'était pas dégradé dans les cellules. En ce qui concerne le DOTAP, nous savons qu'il a été conçu dans le but d'une métabolisation intracellulaire facilitée [39]. En effet, contrairement à certains lipides cationiques, le DOTAP présente un lien ester au niveau du bras espaceur. Ceci lui permet d'être clivé à cet endroit par des estérases [39]. Néanmoins, il n'existe à notre connaissance aucune donnée à propos de la métabolisation éventuelle de ce vecteur cationique. Une deuxième remarque est que à l'inverse de ce qui s'observe pour les complexes avec la polylysine, la densité des structures prélysosomales qui contiennent les complexes ADN-DOTAP est plus faible que celle des lysosomes. Cela provient simplement du fait que le DOTAP est une substance de faible densité qui confère aux complexes avec l'ADN, et par conséquent aux organites qui les contiennent, une densité nettement plus faible que celle observée avec les complexes contenant la polylysine.

Nos conclusions quant à l'influence de la taille des complexes sur le cheminement intracellulaire sont renforcées par des études complémentaires. Les résultats de ces expériences ont été publiés récemment (*Ogris et al 1998 [64]*), et obtenus parallèlement dans notre laboratoire par *N.Laurent*. Ils ont montré, que dans le cas du vecteur synthétique polyéthylèneimine, seuls les complexes de grande taille étaient capables de transfecter efficacement plusieurs types de lignées cellulaires en culture.

3.- Sort intracellulaire de l'ADN plasmidique et efficacité de transfection

Deux grandes étapes peuvent être envisagées au cours de la transfection et dont dépendra son efficacité : l'une se passant en dehors du noyau, l'autre, lorsque l'ADN a atteint le noyau. Les facteurs qui sont impliqués dans ces deux étapes sont tout à fait distincts. Ils déterminent la capture et le sort intracellulaire de l'ADN dans l'étape prénucléaire, ils concernent essentiellement la transcription dans l'étape nucléaire. L'ADN nu [68] ou complexé à un vecteur entrent dans la cellule par endocytose. Tout ce qui affecte l'endocytose et le cheminement intracellulaire d'une molécule endocytée peut influencer le sort de l'ADN plasmidique et avoir des conséquences sur la transfection. Or, la destination la plus habituelle d'un composé endocyté, est le compartiment lysosomal où il est normalement dégradé par les hydrolases acides. Pour pouvoir garder son intégrité, l'ADN doit donc quitter le système endocyttaire ; endosomes et lysosomes, avant d'être hydrolysé par les enzymes lysosomales. La façon dont cette exigence est remplie est loin d'être bien connue actuellement. Nous croyons que les études telles que celles que nous avons présentées dans notre mémoire, contribueront à faire mieux comprendre l'étape prénucléaire que l'ADN accomplit. Influencer le trafic intracellulaire de l'ADN de manière plus spécifique et précise permettrait d'améliorer la transfection.

V.- REFERENCES

V.- Références.

- [1] **Arias, I.M.** (1990). The biology of hepatic endothelial cell fenestrae in « progress in liver diseases », 9 :11-26.
- [2] **Wisse, E., Knock, D.L., Decker, K.** (1989). Cells of the hepatic sinusoid. Vol 2
- [3] **Ferry, N. and Heard, J.M.** (1998). Liver directed gene transfer vectors. Hum. Gene. Ther. 9 :1975-1981.
- [4] **Lodish, Baltimore, Berg, Zijursky, Matsudaira, Darnell.** (1997) Biologie moléculaire de la cellule. De Boeck université.
- [5] **Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts and Watson.** Molecular biology of the cell. 3d edition 1994. Garland, New York and London.
- [6] **Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D.** (1990). Biologie moléculaire de la cellule. 2^{ème} édition, 556-567.
- [7] **de Chastellier, C., Thilo, L.** (1997). Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. Eur. J. Cell. Biol. 74 :49-62.
- [8] **Desjardins, M.** (1995) Biogenesis of phagolysosomes : the kiss and run hypothesis. Trends Cell. Biol. 5 :183-186.
- [9] **Lamaze, C. and Schmid, S.L.** (1995). The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. Current biology. 7 :573-580.
- [10] **Robinson, M.S.** (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. Current biology 6 :538-544.
- [11] **Benmerah, A., Lamaze, C., Bègue, B., Schmid, S.L., Dautry-Varsat, A., Cerf-Bensussan, N.** (1998). AP2/Eps 15 interaction is required for receptor-mediated endocytose. J. Cell. Biol. 140 (5) :1055-1062.

- [12] **Hansen, S.H., Sandvig, K. and Van Deurs, B.** (1993). Molecules internalized by clathrin-independent endocytose are delivered to endosomes containing transferrin receptors..J. Cell Biol. **123** :89-97.
- [13] **Berg, T., Gjoen, T. and Bakke, O.** (1995). Physiological functions of endosomal proteolysis. Biochem. Journal. **307** :313-326.
- [14] **Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Lodish, H.F. and Schwartz, A.L.**(1983). Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling : double label immunoelectron microscopy during receptor during receptor mediated endocytosis. Cell **32** : 277-287.
- [15] **Helenius, A., Mellman, I., Wall, D. and Hubbard, A.** (1983). Endosomes. Trends in Biochem. Sci. Vol **8**, n° **7** :245-250.
- [16] **Griffiths, G. and Gruenberg, J.** The arguments for pre-existing early and late endosomes. Trends Cell Biol. **1** :5-9.
- [17] **Dunn, K.W., Maxfield, F.R.** Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. J. Cell Biol. **117** :301-310.
- [18] **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.
- [19] **Hopkins, C.R., Gibson, A., Shipman, M. and Miller, K.** (1990). Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. Nature **346** :335-339 (1990).
- [20] **Kahn, A.** (1995). Thérapie génique : le temps d'un premier bilan. m/s **11** :9-12.
- [21] **French Anderson, W.** Human gene therapy. Science **256** : 808-813.
- [22] **Corr, M., Lee, D.J., Carson, D.A. and Tighe, H.** (1996). Gene vaccination with naked plasmid DNA : mechanism of CTL priming. J. Exp. Med. **184** : 1555-1560.
- [23] **Svensson, E.C., Sandeep, K.T. and Leiden, J.M.** (1996). Muscle-based gene therapy : realistic possibilities for the futur. Molecular Medicine Today, April 1996 : 166-172.

- [24] **Abdallah, B., Sachs, L., Demeneix, B.A.** (1995). Non-viral gene transfer : applications in developmental biology and gene therapy. *Biol Cell* **85** :1-7.
- [25] **Ledley, F.D.** (1995). Non-viral gene therapy :the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum. Gene Ther.* **6** :1129-1144.
- [26] **Ishikawa, Y.and Homcy, C.J.** (1992). High efficiency gene transfer into mammalian cells by a double transfection protocol. *Nucleic Acid Res.* **20** :4367.
- [27] **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.
- [28] **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 semian virus 40. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **39** :637-640.
- [29] **Capecchi, M.R.** (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22** :479-488.
- [30] **Chu, G., Hayakawa, H. and Berg, P.** (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.* **15** : 1311-1326.
- [31] **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.
- [32] **Hickman, M.A., Malone, R.W., Lehmann, K., Sih, T.R., Knoell, D., Szoka, F.C., Jr., Walzen, R., Carlson, D.M. and Powell, J.S.** (1994). Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.* **5** :1477-1483.
- [33] **Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S.H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M.A., Bairs, A.M. and Rhodes, G.H.** (1994). Intradermal gene immunization : the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** :4645-4649.

- [34] **Williams, R.S., Johnston, S.A., Riedy, M., Devit, M.J., McLligott, S.G. and Sanford, J.C.** (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** :2726-2730.
- [35] **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.
- [36] **Davis, H.L., Michel, M.L., Mancini, M., Schleef, M. and Whalen, R.G.** (1994). Direct gene transfer in skeletal muscle : plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* (in press).
- [37] **Smith, J.G., Walzen, R.L. and Berman, J.B.** (1993). Liposomes as agents of DNA transfert. *Bioch. Biophys. Acta* **1154** :327-340.
- [38] **Felgner, P.L., Tsai, Y.J., Sukhu, L., Wheeler, C.J., Manthorpe, M., Marshall, J. and Cheng, S.H.** (1995). Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Anal. N.Y. Acad. Sci.* : 126-139.
- [39]. **Leventis, R. and Silvius, J.R.** (1990). Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* **1023** : 124-132 .
- [40] **Zabner, J., Fasbender, Al.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.
- [41] **Legendre, J-P., Haensler, J., Remy, J.** Les vecteurs non-viraux de thérapie génique. *m/s* **12** :1334-1341 (1996).
- [42] **Gao, X. and Huang, L.** (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **2** :710-722.
- [43] **Behr, J-P.** Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles : prospects for gene therapy. *Bioconj. Chem.* **5** :382-389 (1994).

- [44] **Gustafsson, J., Arvidson, G., Karlsson, G., Almgren, M.** (1995). Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Bioch. Biophys. Acta.* **1235** : 305-312.
- [45] **Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S., Mihaylova, E., Leontieva, E., Warnier-Pirotte, M-T., Wattiaux, R., Jadot, M.** (1999). Uptake by rat liver and intracellular fate of plasmid DNA complexed with poly-L-lysine or poly-D-lysine. *FEBS Letters* **443** : 61-65.
- [46] **Edwards, R.J., Carpenter, D.S. and Minchin, R.F.** (1996). Uptake and intracellular trafficking of asialoglycoprotein-polylysine-DNA complexes in isolated rat hepatocytes. *Gene therapy* **3** :937-940.
- [47] **Behr, J-P.** (1996). L'éponge à protons : un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensés. *m/s* **12** :56-59.
- [48] **Sobolev A.S., Rosenkranz, A.A., Smirnova, O.A., Nikitin, V.A., Neugodova, G.L., Naroditsky, B.S., Shilov, I.N., Shatski, I.N., Ernst, L.K.** (1998). Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273** (14) :7928-7933.
- [49] Qiafilter Plasmid Maxi Kit (**Qiagen**).
- [50] **Pouton, C.W., Lucas, P., Thomas, B.J., Uduehi, A.N., Milroy, D.A., Moss, S.H.** (1998). Polycation-DNA complexes for gene delivery : a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *Journal of controled release* **53** : 289-299.
- [51] **de Duve, C, Pressman, B.C., Gianetto, P., Wattiaux, R.and Appelmans, F.**(1955). Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissues. *Biochem. J.* **60** :604-617..
- [52] **Beaufay, H., Jacques, P ; Baudhuin, P., Sellinger, O.Z., Berthet, J. and de Duve, C.** (1964). Analytical study of microsomes in isolated subcellular membranes from rat liver 1. *Biochemical methods. J. Cell. Biol.* **61** :188-200.

- [53] **Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R.** (1984). Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L phenylalanine 2 naphthylamide. *Biochem. Journal.* **219** :965-970.
- [54] **Bowers, W.E., Finkenstaedt, J.T. and de Duve, C.** (1967). Lysosomes in lymphoid tissue 1. The measurement of hydrolytic activities in whole homogenates. *J. Cell Biol.* **32** :325-337.
- [55] **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** :265-275.
- [56] **Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck, S., Ronveaux-Dupal, M.F. and Dubois, F.** (1978). Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a Metrizamide gradient. *J. Cell Biol.* **78** :349-367.
- [57] **Seglen, P.O.** (1970). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods. Cell. Biol.* **13** :29-83.
- [58] **Berg, T., Blomhoff, R.** (1983). Preparation of isolated rat-liver cells. In : *Isolated Density gradient media. A practical approach.* Mc Lean : IRL Press : 173-174.
- [59] **Smedrod, B. and Pertoft, H.** (1985). Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver means of Percoll centrifugation and selective adherence. *J. Leukoc. Bio.* **38** : 213-230.
- [60] **Blomhoff, R., Drevon, C.A., Eskild, W., Helgerud, P., Norum, K.R. and Berg, T.** (1984). Clearance of acetyl low density lipoprotein by rat liver endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **259** : 8898-8903.
- [61] **Blouin, A.** (1977). Morphometry of liver sinusoidal cells. In : *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells.* Ed. E. Wisse and D.L. Knook ; Elsevier, N.Y. : 61-71.
- [62] **Wattiaux, R.** (1976). Selective changes of cellular particles influencing sedimentation properties. *Prog. Surf. Memb. Sc.* **10** : 1-25. (Ed. Cadenhead and Danielli, Acad. Press, N.Y).
- [63] **Wattiaux, R., Wibo, M. and Baudhuin, P.** (1963). *Ciba Found. Symp.*, « Lysosomes » **176**. (de Reuck, A.V.S. et Cameron, M.P., Eds., J. et A. Churchill, Ltd., Londres).

- [64] **Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R. and Wagner, E.** (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* **5** : 1425-1433.
- [65] **Harbottle, R.P., Cooper, R.G., Hart, S.L., Ladhoff, A., McKay, T., Knight, A.M., Wagner, E., Miller, A.D. and Coutelle, C.** (1998). An RGD-Oligolysine peptide : a prototype construct for integrin-mediated gene delivery. *Hum. Gene. Ther.* **9** : 1037-1047.
- [66] **Zhou, X., Huang, L.** (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine : characterization and mechanism of action. *Bioch. Biophys. Acta.* **1189** : 195-203.
- [67] **Wattiaux, R., Jadot, M., Laurent, N., Dubois, F. and Wattiaux-De Coninck, S.** (1996). Cationic lipids delay the transfert of plasmid DNA to lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227** : 448-454.
- [68] **Wolff, J.A.** (1997). Naked DNA transport and expression in mammalian cells. *Neuromuscular Disorders* **7** : 314-318.