



HAL
open science

Ciblage de vecteurs non viraux de thérapie génique

Marie Carrière

► **To cite this version:**

Marie Carrière. Ciblage de vecteurs non viraux de thérapie génique. Autre [q-bio.OT]. INAPG (AgroParisTech), 2002. Français. NNT: . tel-00005659

HAL Id: tel-00005659

<https://pastel.hal.science/tel-00005659>

Submitted on 5 Apr 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Présentée et soutenue publiquement
par

Marie CARRIERE

Ingénieur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Le 20 février 2002

Titre :

**Ciblage de vecteurs non viraux
de thérapie génique**

Directeur de thèse

Dr D. Scherman

JURY

M. Jacques Barbet, Directeur de recherche CNRS, rapporteur

M. Claude Gaillardin, Professeur de l'INA P-G, examinateur

M. Pierre Lehn, Maître de conférence des universités, rapporteur

M. Claude Monneret, Directeur de recherche CNRS, examinateur

M. Daniel Scherman, Directeur de recherche CNRS, examinateur

Ciblage de vecteurs non viraux de thérapie génique

RESUME

L'efficacité du transfert de gènes non viral est limitée par les barrières physiologiques qui entravent le cheminement de l'ADN jusqu'au noyau des cellules cibles.

Ce travail a permis de concevoir et d'étudier trois outils visant à améliorer cette efficacité.

Un premier volet concerne le ciblage du noyau cellulaire. Une banque de plasmides comportant une séquence aléatoire a été construite dans le but d'identifier une séquence nucléotidique permettant l'interaction du plasmide avec une protéine karyophile qui pourrait l'escorter jusqu'au noyau cellulaire. Le caractère aléatoire de la banque a été validé mais les séquences recherchées n'ont pas pu être identifiées grâce aux tests que nous avons employés.

Le peptide de localisation nucléaire IBB de l'importine α a été couplé de façon covalente au squelette d'un plasmide dans le but de promouvoir la fixation du plasmide aux protéines récepteurs d'import nucléaire. La spécificité de l'interaction entre ce plasmide-IBB et les récepteurs cellulaires n'a pas pu être démontrée, les tests employés n'ont pas permis de mettre en évidence un import nucléaire accru de ces plasmides. En revanche le peptide IBB compacte l'ADN, améliorant la lipofection par modification des caractéristiques physico-chimiques du lipoplexe.

Le deuxième volet de ce travail concerne le ciblage extracellulaire, envisagé dans le système modèle du récepteur aux asialoglycoprotéines des hépatocytes. Des liposomes cationiques à têtes de ciblage galactosylées ont permis de définir les caractéristiques structurales et physico-chimiques les plus favorables pour l'accessibilité de la tête de ciblage. L'intégration d'un espaceur polyéthylène glycol au lipide galactosylé a permis de limiter l'internalisation non spécifique des lipoplexes dans les cellules non visées, nous n'avons pas observé de ciblage des hépatocytes.

DISCIPLINE : Biologie moléculaire, cellulaire et physico-chimie.

MOTS-CLES : thérapie génique, transfert de gènes non viral, import nucléaire, séquence de localisation nucléaire, ciblage, récepteur aux asialoglycoprotéines, hépatocytes.

**UMR 7001 CNRS / ENSCP / Aventis,
13, quai Jules Guesde 94400 Vitry sur Seine.**

Targeting of non viral gene therapy vectors

SUMMARY

Non viral gene transfer efficiency is limited by physiological barriers which block the DNA in its way to the nucleus of the targeted cell.

The aim of this work was to construct and study three tools to increase this efficiency.

The first chapter deals with the intracellular targeting of the cell nucleus. A plasmid DNA library containing a random-sequence was constructed in order to identify a nucleic acid sequence interacting with a karyophilic protein which could pull the plasmid in the nucleus. This library was effectively random but sequences interacting with karyophilic proteins were not found with the tests we employed.

The nuclear localization signal IBB from importin α was covalently coupled to the plasmid backbone in order to promote its interaction with the nuclear import receptors, namely karyopherins β . The specificity of this interaction was not demonstrated and the tests we performed did not show any increased nuclear import of the plasmids. However the IBB peptide complexed plasmid DNA and increased transfection levels by improving the physico-chemical properties of the lipoplexes.

The second chapter concerns the extracellular targeting, we chose the model system of the hepatocyte asialoglycoprotein receptor. Cationic liposomes bearing a galactosylated targeting head enabled us to define the structural and physico-chemical determinants of the accessibility of the targeting head groups. Integration of a polyethyleneglycol spacer arm permitted to limit non-specific interactions between lipoplexes and non targeted cells, we did not observe any hepatocyte targeting with these tools.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de chimie bioorganique et de biotechnologie moléculaire et cellulaire, UMR 7001 CNRS / ENSCP / Aventis dirigé par le Dr. Daniel Scherman. Je souhaite lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son équipe et avoir suivi mon travail au cours des trois années que j'ai passées dans son laboratoire.

Je remercie Messieurs Jacques Barbet et Pierre Lehn pour leur lecture critique de ce manuscrit, ainsi que Claude Gaillardin et Claude Monneret pour avoir accepté de participer à la commission d'examen de cette thèse.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Virginie Escriou qui a suivi ce travail au quotidien. Sa disponibilité, ses conseils techniques, métaphysiques, sa patience et sa compréhension ont été mes meilleurs alliés pour finaliser ce travail.

Je remercie Carole Neves pour m'avoir initiée à l'import nucléaire ; Pascal Bigey pour son suivi en biologie moléculaire, son humour et sa clairvoyance ; Céline Largeau pour tout le travail qu'elle a fourni, dans la bonne humeur, sur l'approche « ciblage extracellulaire » ; Aline Savarin qui a osé se lancer dans le monde merveilleux du peptide IBB ; Florence Bussone pour son aide au « pique-clone ».

Mes dernières pensées sont pour les membres de l'UMR 7001 et toutes les personnes qui y ont travaillé pendant ces trois années - il serait difficile de tous les citer - sans que l'ambiance au laboratoire n'aurait pas été ce qu'elle a été. Merci pour vos sourires, vos conseils, les petites bouffes entre amis, tours de roller et autres chocolats chauds.

Sommaire

I. INTRODUCTION	6
A. Contexte de l'étude.....	6
B. Passage de la membrane plasmique et diffusion de l'ADN jusqu'au noyau de la cellule eucaryote	9
C. Passage du pore nucléaire.....	14
D. Ciblage extracellulaire	28
II. STRATÉGIES MISES EN ŒUVRE DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL	32
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	34
A. Techniques de biologie cellulaire	34
B. Techniques de biochimie et de biologie moléculaire	40
C. Techniques de physico-chimie.....	50
IV. STRATÉGIE D'AMÉLIORATION DU TRANSPORT DE PLASMIDES AU NOYAU CELLULAIRE	53
A. Introduction	53
B. Mise en place d'une la banque de plasmides aléatoires	54
C. Criblage de la banque de plasmides aléatoires sur cellules HeLa perméabilisées à la digitonine.....	58
D. Criblage de la banque de plasmides aléatoires par transfection.....	63
E. Discussion des résultats.....	68
V. STRATÉGIE D'AMÉLIORATION DU PASSAGE DU PORE NUCLÉAIRE : COUPLAGE D'UNE SÉQUENCE DE LOCALISATION NUCLÉAIRE SUR LE PLASMIDE	70
A. Choix de la séquence peptidique et stratégie du couplage.....	70
B. Couplage covalent du peptide IBB sur le plasmide et étude de l'import nucléaire du plasmide-IBB	73
C. Complexation du peptide IBB avec un plasmide et étude des propriétés du complexe plasmide / IBB.....	83

D. Discussion des résultats.....	89
VI. CIBLAGE EXTRACELLULAIRE : LE SYSTÈME MODÈLE DU CIBLAGE DU RÉCEPTEUR AUX ASIALOGLYCOPROTÉINES DES HÉPATOCTES	91
A. Introduction et stratégie	91
B. Formulation et caractérisation de liposomes et de lipoplexes à têtes de ciblage galactosylées linéaires ou biantennées	93
C. Têtes de ciblage triantennées : analyse du rôle d'un espaceur polyéthylèneglycol (PEG).....	107
VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	117
BIBLIOGRAPHIE.....	120
ANNEXES.....	130

Abréviations et symboles

ADN	acide désoxyribonucléique
Amp	ampicilline
ARN	acide ribonucléique
BEt	bromure d'éthidium
BSA	albumine bovine sérique
CDTA	trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-acide tétraacétique
CEA	ester de cellulose asymétrique
CMV	cytomégalovirus
CPS	coups par seconde
Da	dalton
dATP	désoxyadénosine 5'-triphosphate
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
dCTP	désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	désoxyguanosine 5'-triphosphate
DH5 α	<i>E. Coli</i> de génotype <i>supE44ΔlacU169(ϕ80lacZΔM15) hsdR17recA1endA1gyrA96thi-1relA1</i>
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DOPC	dioléoylphosphatidylcholine
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOTAP	dioléoyltriméthylamonium propane
DTT	DL-dithiothréitol
dTTP	désoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA	éthylènediamine acide tétraacétique
EGTA	éthylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther)
EPC	phosphatidylcholine d'œuf (egg phosphatidylcholine)
FITC	fluoréscéine isothiocyanate
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GFP	protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)
GST	Glutathion S-transférase
GTP	guanosine 5'-triphosphate
HEPES	N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonic acid]
HIV	Virus de l'immunodéficience acquise
LB	Luria Bertani
MES	2-[N-Morpholino]éthanesulfonic acide
MWCO	poids moléculaire seuil de coupure (molecular weight cut off)
pb, kpb	paire de bases, kilo paires de bases
PBS	solution saline tamponnée au phosphate (phosphate saline buffer)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
PEG	polyéthylèneglycol
PFA	Paraformaldéhyde
PNK	polynucléotide kinase
RCA	Agglutine de Ricin (<i>Ricinus communis</i>)
RT-PCR	réverse transcription puis réaction de polymérisation en chaîne
(SCID)-X1	immunodéficience sévère combinée de type X1 (severe combined immunodeficiency)

SDS	sodium dodécyl sulfate
SSC	tampon salin de citrate de sodium (saline sodium citrate buffer)
TBE	Tris base 50mM Acide borique 50mM EDTA 1mM, pH8,3
TFPAM-6	N-(4-azido-2,3,5,6 tétrafluorobenzyl)-6-maléimidyl hexanamide
WGA	Agglutinine de germe de blé (wheat germ agglutinin)
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

I. Introduction

A. Contexte de l'étude

1. Définition de la thérapie génique

La thérapie génique est une approche thérapeutique qui utilise un fragment d'acides nucléiques (ADN ou ARN) comme médicament.

Une première stratégie consiste à remplacer un gène déficient par son homologue fonctionnel. Le gène est réparé et la correction de l'anomalie est durable. Cette stratégie implique que la maladie à traiter soit due à une anomalie de faible ampleur sur un seul chromosome, qu'on soit capable de cibler ce gène muté à l'aide du gène réparateur et que le gène réparateur puisse s'insérer dans le génome de nombreuses cellules. Cette stratégie n'est pas envisageable dans l'état actuel des connaissances.

La seconde stratégie consiste à ajouter un gène au génome de la cellule. Ce gène reste épichromosomal ou s'insère au hasard dans le génome et permet la production d'une protéine thérapeutique capable de corriger l'anomalie de la cellule productrice ou d'être exportée de cette cellule pour corriger des anomalies disséminées dans l'organisme. Dans cette stratégie le gène est un médicament ou un vaccin.

2. Les pathologies visées par la thérapie génique

Parmi les essais cliniques de thérapie génique actuellement en cours (chiffres du 1er février 2001, issus du site internet <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>), 62% des essais actuels concernent le traitement des cancers, 13% les maladies monogéniques, 7% les maladies infectieuses et 7% les maladies cardiovasculaires.

Historiquement, les maladies visées par les traitements de thérapie génique étaient les maladies génétiques monogéniques telles que les déficiences immunitaires, les myopathies et la mucoviscidose.

Actuellement, le spectre des maladies visées s'est élargi, constitué par l'ensemble des « affections dont le mécanisme est une perte de fonction qu'il s'agit de compenser par l'apport d'une construction génétique commandant la synthèse de la protéine déficiente » (A. Kahn). Les maladies monogéniques sont toujours des cibles potentielles de la thérapie génique, mais s'y ajoutent des maladies acquises incurables, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, infectieuses et inflammatoires.

Les seules cellules traitées sont les cellules somatiques, et on n'envisage une thérapie génique que dans les cas où il n'existe pas de thérapeutique « classique » efficace.

De nombreux essais en cours sont prospectifs, dans ces derniers le gène utilisé est un gène rapporteur, à partir duquel est produite une protéine facilement dosable ou localisable, et non un gène thérapeutique

3. Les vecteurs de thérapie génique

L'ADN est une macromolécule anionique et les membranes cellulaires sont globalement chargées négativement. Les répulsions électrostatiques limitent donc les contacts de l'ADN avec les membranes plasmiques en l'absence de pressions extérieures (pression mécanique ou osmotique) qui forceraient l'ADN contre les membranes cellulaires et lui permettraient de pénétrer dans la cellule.

L'ADN thérapeutique, injecté au patient par voie intraveineuse ou intra-organique est susceptible d'être dégradé par le système de défense du patient.

Un moyen de protéger l'ADN de l'action des nucléases et de promouvoir son interaction avec les membranes des cellules est d'utiliser un vecteur pour l'escorter.

Deux types de vecteurs sont actuellement utilisés en thérapie génique. Ce sont soit des vecteurs viraux, utilisant la capacité des virus à pénétrer dans les cellules hôtes et y injecter leur génome, soit des vecteurs non-viraux, dans ce cas le vecteur est conçu de manière à reproduire les fonctions d'un virus : permettre la pénétration cellulaire, la diffusion jusqu'au noyau, le passage de l'enveloppe nucléaire et l'expression de l'ADN vectorisé.

Actuellement 38% des essais cliniques sont menés avec des vecteurs rétroviraux, 25% avec des adénovirus, 13% avec des vecteurs lipidiques ou lipofectants et 9% avec de l'ADN « nu ». L'utilisation de virus comme vecteurs de gènes pour la thérapie génique a été largement décrite (1) et reste actuellement la solution de choix pour un transfert de gènes efficace.

Les **rétrovirus** ont été les premiers virus utilisés, et sont toujours utilisés dans le cadre de stratégies *ex vivo*. Ces stratégies consistent à prélever des cellules d'un organe malade, à les traiter, à sélectionner les cellules effectivement traitées et à les réimplanter dans l'organisme. Les rétrovirus sont intégratifs, c'est à dire qu'ils ont la propriété d'insérer la séquence nucléotidique qu'ils transportent dans le génome de la cellule hôte. Le phénotype « malade » des cellules est corrigé, mais l'insertion du gène s'effectue au hasard dans le génome et peut inactiver un gène fonctionnel ou activer des oncogènes, rendant la cellule cancéreuse. La plupart des rétrovirus n'infectent pas les cellules quiescentes car leur génome ne traverse pas l'enveloppe nucléaire, ce qui limite leur utilisation à des pathologies concernant des cellules en division. Ils sont actuellement utilisés dans le traitement des lymphocytes ou des cellules souches hématopoïétiques, et ont conduit au premier traitement efficace par thérapie génique dans le cas de l'immunodéficiência sévère (SCID)-X1 dans le laboratoire du professeur Fischer à l'hôpital Necker (2). Parmi les rétrovirus, les **lentivirus**, dérivés de HIV-1 ont la capacité d'infecter les cellules quiescentes. Ils sont eux aussi utilisés dans des stratégies *ex vivo* et représentent un espoir dans le traitement des pathologies des cellules souches hématopoïétiques comme la β -thalassémie. Les lentivirus utilisés *in vivo* transfèrent des gènes efficacement dans les neurones ou les cellules gliales, conduisant à une expression stable et de longue durée d'un gène rapporteur, ces essais restent prospectifs et il n'existe pas actuellement d'essai clinique utilisant ce type de vecteurs.

Les **adénovirus** ont longtemps constitué un réel espoir et sont encore très étudiés malgré leur considérable immunogénicité quand ils sont injectés à forte dose ou lors d'administrations répétées. Cette immunogénicité a conduit à un accident majeur lors d'un essai clinique en septembre 1999. Ces virus sont non intégratifs, le phénotype de la cellule hôte n'est corrigé que transitoirement, cependant ils ont la capacité d'infecter des cellules quiescentes. Leur utilisation a été envisagée pour le traitement de la mucoviscidose, sans résultat convaincant, et ils sont actuellement utilisés dans des pathologies telles que le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Administrés par injection intraveineuse, la majeure partie des particules virales s'accumule dans le foie et les poumons ; le cœur, les muscles, le cerveau, le pancréas et les tissus tumoraux sont infectés dans une moindre mesure.

Le développement du transfert de gènes par les **virus associés aux adénovirus** est récent. Les souches sauvages de ces virus ont la capacité d'intégrer leur génome en un site spécifique du génome de la cellule hôte. Aucune toxicité et aucune réponse immunitaire induite n'ont été rapportées après administration *in vivo* de ces virus, ils infectent les cellules quiescentes mais se sont révélés être non intégratifs. Des essais cliniques utilisant ces vecteurs sont en cours pour le traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie et des myopathies.

Les vecteurs viraux ont l'avantage de posséder la capacité d'infecter naturellement les cellules. Les inconvénients de leur utilisation, outre leur potentielle intégration dans le génome des cellules hôte et leur immunogénicité, comprennent la faible taille du gène

thérapeutique qu'ils peuvent véhiculer : 4,5kb pour les virus associés aux adénovirus, 8kb pour les rétrovirus, 7,5kb dans le cas des vecteurs adénoviraux de première génération. Le génome viral est en partie ou totalement éliminé et remplacé par un ou plusieurs gènes thérapeutiques.

D'autre part les technologies de production de ces virus font intervenir des lignées cellulaires dites d'emballage, qui produisent les protéines virales permettant l'assemblage de la particule virale fonctionnelle et le bon déroulement du cycle infectieux. Cette technologie n'est cependant pas parfaite puisqu'elle n'exclut pas une éventuelle recombinaison entre l'ADN du virus modifié et le génome de la lignée d'emballage, le virus retrouve alors un génotype « sauvage », potentiellement infectieux et dangereux pour le patient traité.

Les **vecteurs non-viraux**, développés plus récemment, permettent de s'affranchir des limites de taille de gènes thérapeutiques et des problèmes de toxicité. Bien qu'ils soient légèrement immunogènes, la réponse immunitaire qu'ils déclenchent a pour conséquence de les éliminer ou d'éliminer les cellules les ayant intégrés, mais n'est pas toxique pour l'organisme. Ce sont des molécules naturelles ou synthétiques, polymères cationiques (3) ou protéines (4) formant avec l'ADN des particules appelées polyplexes, ou lipides cationiques (5), formant avec l'ADN des particules appelées lipoplexes.

Les premiers polymères cationiques utilisés dès 1987 pour le transfert de gènes ont été le diéthylaminoéthyl-dextran (DEAE-dextran), la polylysine (PLL) puis les polyéthylènimines (PEI) (6). Plus récemment se sont développés des systèmes tels que les méthacrylates (1996) et le chitosan (1998) (7).

Les propriétés physico-chimiques des polyplexes formés par complexation d'ADN avec ces polymères cationiques sont actuellement largement étudiées. Leur efficacité de transfert de gènes dépend étroitement de la taille et de la charge de surface des polyplexes, c'est à dire du rapport de charges positives apportées par les polymères par rapport aux charges négatives apportées par l'ADN.

Les lipides cationiques peuvent être formulés sous la forme de liposomes ou de micelles. Les **liposomes cationiques** présentent une cavité interne hydrophile, séparée du milieu aqueux par une double couche de lipides, hydrophobes. L'ADN, hydrophile, pourrait s'accumuler dans cette cavité. Il semble toutefois que l'ADN s'intercale plutôt dans la double couche lipidique. De même, l'ADN forme des complexes organisés (8) quand il est complexé avec les **micelles cationiques**, particules lipidiques ne présentant pas de cavité interne. De la même manière que dans le cas des polyplexes, la quantité relative de lipide cationique par rapport à la quantité d'ADN définit les propriétés physico-chimiques et l'efficacité de transfert de gènes du complexe.

Les vecteurs non-viraux sont plus faciles à produire que les vecteurs viraux, leur qualité de production est plus constante. En revanche l'obtention de complexes ADN/vecteur colloïdalement stables et dont les caractéristiques physico-chimiques sont constantes est difficile. L'inconvénient majeur de l'utilisation de ce type de vecteurs reste toutefois leur faible efficacité de transfert de gènes.

Le contexte de ce travail est l'optimisation des vecteurs non-viraux de transfert de gènes. Les principales barrières au transfert de gènes non-viral ont été déterminées, pour certaines d'entre elles nous avons envisagé la construction d'un outil permettant d'améliorer l'efficacité du transfert de gène. Nous avons étudié les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de ces outils, ainsi que leurs capacités à améliorer le transfert de gènes non-viral.

Schématiquement, l'organisme est constitué de cellules qui sont regroupées en organes ayant des spécificités propres. Les différents organes communiquent entre eux au moyen de messagers, qui circulent d'un organe à l'autre principalement par la voie sanguine. L'organisme est protégé contre les attaques extérieures par un système de défense complexe, chargé d'éliminer toute molécule ou particule reconnue comme étant étrangère à l'organisme. Lors du transfert de gènes non-viral, le complexe ADN/vecteur, injecté dans l'organisme, doit circuler sans être dégradé jusqu'aux cellules cibles. Arrivé à proximité des cellules, il doit sortir du compartiment sanguin et entrer en contact avec les membranes des cellules cibles. Les cellules eucaryotes sont compartimentées, permettant d'optimiser l'efficacité des processus cellulaires : l'information génétique est enfermée dans le noyau cellulaire, compartiment dédié à la transcription de l'ADN en ARN, le cytoplasme est le compartiment dédié à la traduction des ARN en protéines. La communication entre le noyau et le cytoplasme est nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire. Par exemple les facteurs de transcription sont produits dans le cytoplasme et agissent dans le noyau cellulaire, les ARN sont transcrits dans le noyau et fonctionnels dans le cytoplasme. Lors d'un traitement par thérapie génique, le complexe ADN/vecteur doit interagir avec les membranes cellulaires, l'ADN doit pénétrer la cellule, diffuser dans le cytoplasme cellulaire sans y être dégradé, traverser l'enveloppe nucléaire et s'exprimer (9, 10). Ces étapes constituent des obstacles limitant l'efficacité du transfert de gènes. Ce travail de thèse présente trois stratégies mises en oeuvre pour permettre à l'ADN de passer ces barrières et d'agir efficacement sur un type cellulaire précis.

B. Passage de la membrane plasmique et diffusion de l'ADN jusqu'au noyau de la cellule eucaryote

1. Devenir de l'ADN dans les cellules lors du transfert de gènes non-viral

a) L'ADN n'entre pas dans les cellules sans vecteur

L'ADN est un polyanion qui ne peut pas interagir avec les membranes cellulaires, globalement chargées négativement. Toutefois l'ADN peut entrer dans certains types cellulaires comme les cellules musculaires, puisque l'injection intramusculaire de plasmide entraîne une expression du gène rapporteur (11). De même l'injection de plasmide nu dans l'espace interstitiel du foie, du cœur, du cerveau entraîne un transfert de gènes dans ces tissus. Les mécanismes impliqués dans l'entrée de l'ADN dans ces cellules musculaires sont mal connus, il semble toutefois que ce processus soit peu efficace et limité aux cellules adjacentes de la zone où a été injecté l'ADN (12).

Il a été rapporté que l'injection intraveineuse rapide d'un grand volume d'une solution d'ADN (5µg de plasmide dans 1,6ml d'une solution saline injectée dans une souris de 20g, ce volume correspond au volume total de sang de cette souris) entraîne un transfert de gènes efficace dans les cellules du poumons, de la rate, du cœur, du rein, et surtout du foie (13, 14). Il semblerait que la pression hydrostatique appliquée par ce grand volume force l'ADN à entrer dans les tissus situés à proximité des veines, en particulier le foie. De même un grand volume d'ADN injecté dans la veine porte quand la veine hépatique est obstruée pour augmenter la pression osmotique et la pression hydrostatique entraîne une expression du gène rapporteur dans 1% des hépatocytes (15). La même équipe a observé une augmentation de l'expression du gène rapporteur d'au moins 40 fois quand l'ADN est injecté dans un volume de 9,5ml en 10 secondes dans l'artère fémorale, alors que tous les vaisseaux partant et allant au hindlimb étaient ligaturés.

L'expression d'un gène rapporteur peut être augmentée quand le flux de circulation du sang dans lequel a été injecté de l'ADN nu est ralenti : l'équipe de L. Huang (16) a montré l'expression dans le foie d'un plasmide codant la luciférase quand ce dernier était injecté par voie intraveineuse dans la veine de la queue de souris et que le flux sanguin dans les veines porte et cave et l'artère hépatique était stoppé. De même, le plasmide codant la dystrophine injecté en intraveineuse dans des souris mdx s'exprime dans les cellules musculaires du diaphragme quand le flux sanguin est stoppé à proximité de ce muscle (Liu et al., données non publiées, 2001).

Bien que ces techniques permettent d'augmenter l'expression du gène rapporteur il est difficile d'envisager de les mettre en place dans un protocole de thérapie génique sur l'homme.

Une étude mentionne que l'ADN pourrait entrer dans les hépatocytes par une voie faisant intervenir des récepteurs (17).

Ces résultats sont résumés dans la revue (18).

b) L'ADN diffuse lentement dans la cellule

La diffusion d'une molécule d'ADN dans le cytoplasme et le noyau cellulaire dépend de sa taille (19). Un fragment d'ADN linéaire simple brin de 100pb microinjecté dans le cytoplasme d'une cellule diffuse à travers le cytosquelette et s'accumule dans le noyau. La vitesse de diffusion d'un fragment d'ADN linéaire double brin diminue quand sa taille augmente, jusqu'à la taille limite de 2000pb à partir de laquelle le fragment reste immobile dans le cytoplasme au niveau du site d'injection (19). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'encombrement du cytoplasme, dont 10 à 15% du volume est occupé par des macromolécules constituant le cytosquelette et les organites cellulaires. Les fragments d'ADN, du fait de leur structure et de leur charge, se lient ou entrent en collision avec les macromolécules du cytoplasme, qui ralentissent leur diffusion.

De même lors d'études de microinjection de plasmides fluorescents dans le cytoplasme de cellules CV1, la fluorescence reste localisée au niveau du site d'injection et disparaît progressivement dans les 6 heures suivant l'injection (20).

c) L'ADN libre dans le cytoplasme est dégradé par des nucléases

Lorsque 1000 à 2000 copies d'un plasmide sont co-injectées avec du dextran-TRITC dans le cytoplasme de cellules HeLa, les plasmides ne diffusent pas de leur site d'injection et la fluorescence disparaît avec une $\frac{1}{2}$ vie de 90mn alors que le dextran-TRITC diffuse dans le cytoplasme et sa fluorescence reste stable (21). L'ADN ne semble pas exocyté de la cellule, par contre la diminution de la température et l'élimination des composés solubles du cytosol limitent la dégradation, laissant présager un processus enzymatique (21). Pollard et al. ont étudié ce mécanisme enzymatique, qui semble mettre en oeuvre des nucléases cytosoliques sensibles au calcium (22).

Lors d'une infection virale, le virus injecte le matériel génétique et la capsidie dans le cytoplasme de la cellule. La capsidie a un rôle protecteur pour le génome viral : sa charge est réduite, de ce fait les interactions non spécifiques entre le génome viral et les macromolécules cytoplasmiques sont limitées, et il est protégé de l'action des nucléases cytoplasmiques.

Lors d'un transfert de gènes non-viral, l'ADN entre dans la cellule sous la forme d'un complexe avec son vecteur, puis ce complexe se dissocie et l'ADN est libéré dans le cytoplasme cellulaire et diffuse vers le noyau. Dès lors qu'il est séparé de son vecteur, l'ADN est la cible des nucléases cellulaires qui le dégradent rapidement. Il semble donc essentiel que le vecteur escorte l'ADN dans le cytoplasme jusqu'à la proximité du noyau.

2. Rôle du vecteur non-viral de transfert de gènes

a) Augmentation de la durée de circulation de l'ADN dans l'organisme

Après injection intraveineuse, les complexes ADN/vecteur non viral ont une durée de vie dans la circulation très faible : en 5 à 10mn la plupart des particules sont éliminées de la circulation (23). Ces formulations, bien que peu immunogènes, activent le système du complément, ayant pour conséquence la formation d'un complexe multiprotéique qui est éliminé par le système réticulo-endothélial (23). Cette activation est en grande partie due à la charge des complexes ADN/vecteur : les complexes anioniques activent le complément par la voie classique, les complexes cationiques l'activent par la voie alternative. Une des stratégies pour limiter l'activation du système du complément consiste à recouvrir les particules ADN/vecteur de polymères neutres, tels que le polyéthylène glycol (PEG) ou les PROCOPs (protective copolymers) obtenus par dérivation de PEGs avec des acides aminés ou des peptides (24). Les complexes ainsi formés ont une durée de vie allongée dans la circulation sanguine (23) et dans des conditions *in vitro* reconstituant les conditions du sérum (24).

b) Passage de la membrane cellulaire

L'endocytose et l'exocytose sont des processus naturels qui permettent aux cellules d'échanger des molécules ou des particules avec le milieu extracellulaire. Dans des conditions normales l'endocytose de grosses particules (1 à 2 μm) ou **phagocytose** ne peut avoir lieu que dans les phagocytes, cellules spécialisées dans l'élimination des déchets de grande taille. L'**endocytose** de macromolécules ou particules de petite taille est un processus ubiquitaire, qui a lieu dans toutes les cellules à une fréquence élevée. Les macromolécules s'accumulent dans des puits mantelés de clathrine, invaginations de la membrane cellulaire, avant d'être internalisées. Du fait de la structure de la clathrine, la taille maximale des vésicules d'endocytose est comprise entre 100 et 200 nm. Dans le cas particulier de macromolécules ou particules se liant spécifiquement à un récepteur présent sur la membrane cellulaire, l'endocytose est dite **endocytose à récepteur** ou endocytose récepteur-médiée. D'autres voies, telles que la **pinocytose** ou l'**endocytose adsorptive** ne font pas intervenir de structures particulières de la membrane plasmique et permettent l'internalisation rapide de molécules présentes à proximité de la cellule dans la matrice extracellulaire.

Les mécanismes d'entrée du complexe ADN plasmidique/vecteur sont peu connus, mais plusieurs observations tendent à démontrer que les complexes entrent dans la cellule par endocytose (25), ces observations n'excluant pas qu'une partie des complexes puisse entrer directement par passage à travers la membrane plasmique. Par ailleurs, même si la majorité des complexes entrent dans la cellule par endocytose, il n'est pas prouvé que l'ADN qui s'exprime dans la cellule ne provienne pas de la fraction des complexes qui sont entrés par passage direct travers la membrane.

Si les complexes entrent dans la cellule par endocytose, leur taille est limitée à 100 ou 200 nm. Cependant nous avons remarqué que, lors de tests *in vitro* de transfection avec un plasmide fluorescent, on observe des vésicules fluorescentes de grande taille et aux contours bien délimités dans le cytoplasme de la cellule. Il n'est pas prouvé que ces vésicules soient des endosomes, mais l'ADN n'est pas libre dans le cytoplasme (le marquage serait diffus) et une comparaison de ces vésicules avec des billes fluorescentes calibrées nous a permis de déduire que la taille des vésicules est supérieure à 200 nm. La cellule serait donc en mesure de mettre en place une sorte de phagocytose dans les conditions extrêmes imposées par le test de transfection.

Le vecteur de thérapie génique a donc les multiples rôles de compacter la molécule d'ADN pour lui permettre d'entrer dans la cellule par endocytose, d'en neutraliser la charge pour lui

permettre d'interagir avec la membrane plasmique et il comporte éventuellement un ligand, spécifique d'un récepteur présent sur un type cellulaire précis pour permettre un traitement ciblé.

c) Rupture des endosomes

Les **endosomes** sont les organites cellulaires résultants de l'endocytose, ils sont séparés du cytoplasme par une double membrane lipidique de composition légèrement différente de la membrane plasmique. L'évolution des endosomes n'est pas totalement élucidée, mais ils passent d'une forme **endosomes précoces** à une forme **endosomes tardifs**, pour finalement évoluer en **lysosomes**, dans lesquels sont concentrées des enzymes lytiques qui dégradent les composés emprisonnés. Les lysosomes diffèrent des endosomes par leur pH interne, proche de 5 alors que le pH interne des endosomes est proche du pH physiologique de 7,4.

Si les complexes ADN/vecteur qui ont été internalisés dans la cellule par endocytose et piégés dans les endosomes ne sont pas rapidement libérés dans le cytoplasme, ils sont dégradés dans les lysosomes.

De nombreuses stratégies visent à accélérer la rupture de la membrane des endosomes ou à retarder l'évolution des endosomes en lysosomes : des composés **fusogènes** ou **lysosomotropiques** de type adénovirus (26, 27) ou peptides dérivés des adénovirus (28) ont été utilisés dans la formulation des vecteurs de type polylysine. La **chloroquine** ou l'extrémité N-terminale du peptide **HA2** de l'adénovirus permettent d'augmenter de façon significative le niveau d'expression des gènes transférés aux cellules. La chloroquine est une base faible, non chargée à pH neutre mais chargée à pH acide. Dans sa forme non chargée, elle est capable de traverser les membranes plasmiques et de s'accumuler dans les endosomes dans lesquels elle se charge en protons. Sous sa forme protonée elle ne peut plus traverser les membranes plasmiques et se trouve piégée dans les endosomes. La chloroquine permettrait donc de ralentir l'acidification des endosomes et d'empêcher leur maturation en lysosomes, retardant de ce fait la dégradation de l'ADN dans le compartiment lysosomal (10). Pour certains auteurs elle créerait une surpression osmotique dans les endosomes en s'y accumulant, conduisant à leur rupture et à la libération de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule. Cette molécule ne peut pas être utilisée lors d'essais *in vivo* du fait de sa toxicité, mais elle est couramment utilisée lors de tests *in vitro* de transfert de gènes.

Le phospholipide dioléoylphosphatidyléthanolamine (**DOPE**) est un lipide neutre connu pour stabiliser les liposomes cationiques. Les complexes contenant le lipide neutre DOPE sont très efficaces dans des tests de transfection, alors que les complexes contenant de la DOPC, son homologue, sont peu efficaces. Ce lipide affecte la structure des complexes ADN/vecteur : alors que les complexes formulés avec l'association DOTAP/DOPC ont une structure lamellaire (29), les complexes DOTAP/DOPE ont une structure en phase hexagonale inversée (8). Observé en microscopie de fluorescence, l'ADN fluorescent complexé avec des vecteurs DOTAP/DOPE est réparti uniformément et sous forme diffuse dans le cytoplasme des cellules après transfection, alors que l'ADN complexé avec le vecteur DOTAP/DOPC forme des taches fluorescentes bien délimitées, il semble que les complexes restent piégés dans les endosomes ou les lysosomes (30). La DOPE permettrait la fusion entre les lipides des complexes et les membranes des endosomes, conduisant à la libération de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule (30) (31) (32).

d) Dissociation ADN / vecteur

Pour (33), la dissociation entre le plasmide et le vecteur aurait lieu dans le noyau, l'ADN génomique déplacerait l'ADN plasmidique du vecteur (liposome cationique). Cependant d'autres auteurs s'accordent sur le fait que la libération de l'ADN de son vecteur a plutôt lieu au moment de la sortie des endosomes.

Xu et al. ont proposé un modèle selon lequel, après internalisation dans des endosomes des complexes ADN/lipides cationiques, le complexe initie la déstabilisation de la membrane de l'endosome, qui résulte en un flip-flop des lipides anioniques présents sur la face interne des membranes des endosomes. Ces lipides anioniques diffusent dans le complexe, et forment des paires d'ions avec les lipides cationiques. Cette neutralisation de la charge des lipides cationiques entraînerait un déplacement des plasmides et permettrait leur relargage dans le cytoplasme de la cellule (figure 1).

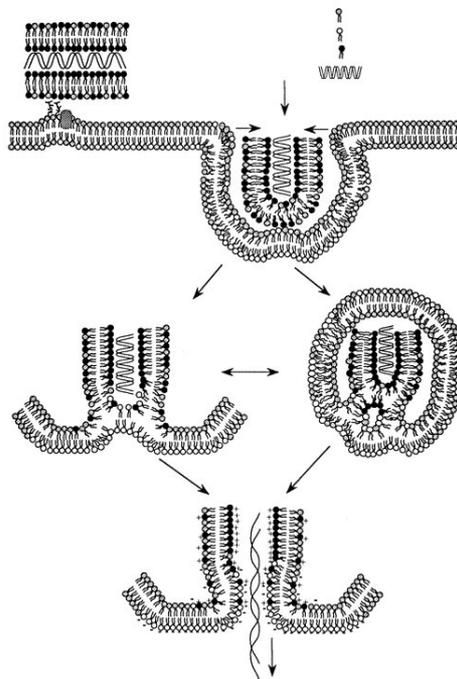


Figure 1 Mécanisme de l'entrée du complexe ADN / vecteur cationique dans la cellule et du relargage de l'ADN dans le cytoplasme cellulaire. Etape 1 : entrée du complexe par endocytose, étape 2 : déstabilisation de la membrane des endosomes entraînant le flip-flop des lipides anioniques, étape 3 : les lipides anioniques diffusent dans le complexe et forment des paires d'ions neutres avec les lipides cationiques, étape 4 : l'ADN est dissocié du complexe et libéré dans le cytoplasme. D'après (34).

Soutenant ce modèle (35) précisent que la fusion entre les membranes des endosomes et les liposomes cationiques aurait lieu préférentiellement quand les endosomes sont acidifiés, à un pH avoisinant 5. La DOPE pourrait donc avoir un rôle dans ce phénomène puisque l'acidification des endosomes favorise le changement de conformation de cette dernière.

C. Passage du pore nucléaire

L'enveloppe nucléaire est considérée comme une barrière majeure à l'efficacité du transfert de gènes non viral (36) (37). Semi-perméable, elle permet de définir deux compartiments cellulaires distincts par leur structure, leur composition et leur fonction, et de ce fait d'augmenter l'efficacité des métabolismes cellulaires.

1. Les mécanismes d'import nucléaire des macromolécules

a) Les déterminants communs des mécanismes d'import nucléaire

(1) L'import nucléaire fait intervenir des protéines cytoplasmiques

Les macromolécules sont importées dans le noyau cellulaire par l'intermédiaire d'un **récepteur**, membre de la famille des **karyophérines β** , auxquelles elles se lient dans le cytoplasme pour former un complexe ciblant le pore nucléaire (PTAC pour « pore targeting complex »). Ce complexe interagit par l'intermédiaire de la karyophérine β avec les protéines du pore nucléaire. La traversée proprement dite du pore nucléaire ne nécessite pas d'apport d'énergie (38). Par abus de langage, on désigne souvent les karyophérines β par le nom de leur principale composante : l'importine β .

Au niveau de la face nucléaire du pore, **RanGTP** se lie à la karyophérine β , induisant un changement de conformation du récepteur et la libération de la macromolécule dans le noyau. Le complexe karyophérine β -RanGTP est immédiatement réexporté du noyau par le même mécanisme. Au niveau de la face cytoplasmique du pore nucléaire, **RanBP1** (ou **RanBP2**) se lie à RanGTP qui change de conformation et perd son affinité pour la karyophérine β . La karyophérine β est libérée dans le cytoplasme et est disponible pour un nouveau cycle d'import / export nucléaire. En séquestrant l'extrémité C-terminale de RanGTP, RanBP1 permet l'accès de **RanGAP1** à RanGTP, qui active la fonction GTPase de Ran, conduisant à la conversion de RanGTP en RanGDP (39). RanGDP est importé dans le noyau cellulaire par un mécanisme faisant intervenir **NTF2** (40, 41), dont il se détache dès l'arrivée sur la partie nucléaire du pore : **RCC1** convertit RanGDP ayant une forte affinité pour NTF2 en RanGTP qui n'a qu'une faible affinité pour NTF2. Cette étape nécessite l'apport d'énergie sous la forme d'un GTP.

La figure 2 résume les étapes du cycle d'import nucléaire d'une protéine possédant une séquence NLS (des détails sur ce mécanisme sont donnés dans le paragraphe C 1 b 1).

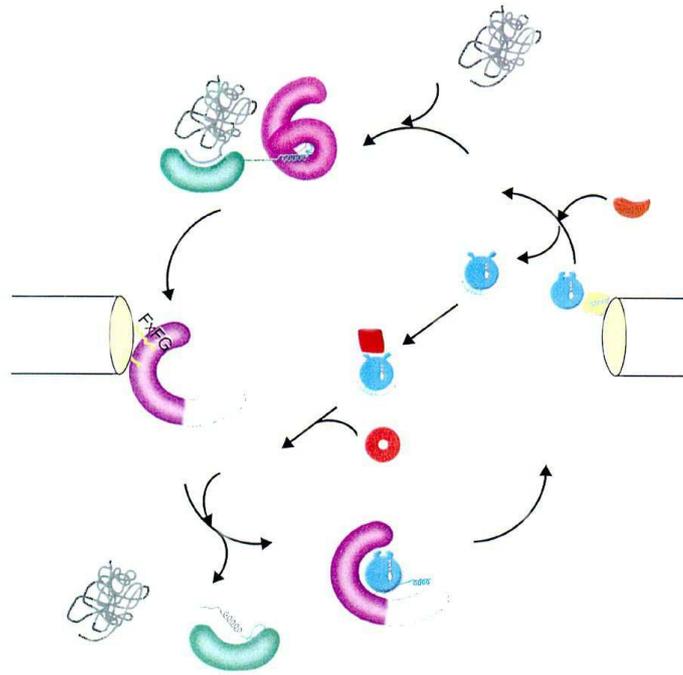


Figure 2 Le cycle d'import d'une protéine NLS. D'après (42). Imp : importine. (a) prise en charge de la protéine à importer par le complexe importine α / importine β ; (b) accrochage et translocation du complexe à travers le pore nucléaire ; (c) libération de la protéine dans le noyau par l'intervention de RanGTP ; (d) accrochage et translocation du complexe importine β / RanGTP à travers le pore nucléaire et recyclage de l'importine α par CAS (non représenté) ; (e) recyclage du récepteur ; (f) recyclage de RanGDP ; (g) conversion de RanGDP en RanGTP par RCC1 dans le noyau.

(2) Le maintien du gradient de concentration de RanGTP entre le noyau et le cytoplasme cellulaire

Le transport des macromolécules vers le noyau cellulaire s'établit contre le gradient de concentration de ces macromolécules, soulignant la nécessité d'un apport d'énergie. Ce transport a longtemps été qualifié de transport actif, l'opinion actuelle le qualifie plutôt de diffusion facilitée, lors de laquelle l'apport d'énergie n'est nécessaire qu'au maintien du gradient de concentration des formes GTP et GDP de Ran et au recyclage des récepteurs d'import.

Les karyophérines β interagissent avec RanGTP et les nucléoporines, ces interactions sont mutuellement exclusives car elles induisent des changements de conformation de l'importine β , réduisant son affinité pour l'un ou pour l'autre des partenaires. Ainsi la faible concentration de RanGTP dans le cytoplasme permet à l'importine β d'interagir avec son substrat et de former le complexe à importer. La forte concentration de RanGTP dans le noyau cellulaire induit la dissociation des complexes importés.

Le gradient de concentration de RanGTP est maintenu grâce à la localisation des régulateurs de l'activité GTPase de Ran : RanGAP (Ran GTPase activating protein) et RanGEF ou RCC1 (Ran guanosine nucleotide exchange factor). RCC1, catalyseur de la conversion de RanGDP en RanGTP est principalement localisé dans le noyau des cellules eucaryotes, associé avec la chromatine. Au contraire, RanGAP1, la seule RanGTPase décrite chez les mammifères est préférentiellement située dans le cytoplasme des cellules. RanGAP1 fonctionne grâce à deux aides et dans deux états : soit RanGAP1 est libre dans le cytoplasme et elle fonctionne à l'aide de RanBP1, cytoplasmique, soit elle est complexée à SUMO1 et elle agit à l'aide de RanBP2,

élément du pore nucléaire (43). Il semble que, complexée à SUMO et RanBP2, l'activation de la fonction GTPase de Ran par RanGAP1 soit beaucoup plus efficace.

(3) Le pore nucléaire est la voie de passage de toutes les molécules transitant entre le cytoplasme et le noyau

Les pores nucléaires (NPC pour « nuclear pore complex ») constituent la seule voie de communication entre le cytoplasme et le noyau cellulaire de cellules quiescentes.

Les NPC sont des structures protéiques dont la taille varie de 60MDa chez *S. Cerevisiae* à 125MDa dans les cellules de mammifères. Ils sont constitués d'un canal central ou transporteur central entouré de 8 canaux périphériques de petite taille. Ces canaux sont encadrés par un anneau nucléaire d'où partent 8 filaments (120nm) liés par un anneau protéique (30-50nm de diamètre) définissant une structure en panier et un anneau cytoplasmique d'où partent 8 courts filaments (50 nm). Le NPC permet la diffusion de petites molécules, jusqu'à 9 nm, à travers ses canaux périphériques. A partir de 30kDa, seules les molécules présentant un signal de ciblage nucléaire (séquence NLS pour nuclear localization signal) sont reconnues et aiguillées vers le canal central par lequel elles traversent l'enveloppe nucléaire par diffusion facilitée. Des particules d'or jusqu'à 26nm auxquelles ont été attachées des séquences de localisation nucléaire peuvent ainsi entrer dans le noyau, ce résultat n'excluant pas que des particules plus grosses puissent entrer, jusqu'à la taille limite de 100 nm, diamètre externe du pore (44).

On estime que le NPC des vertébrés est constitué d'environ 30 à 50 protéines différentes appelées nucléoporines, chacune de ces protéines étant présentes en 8 ou 16 copies par pore. La répartition des nucléoporines et leur différence d'affinité pour le complexe à importer permettent d'assurer la direction du transport (45). Le complexe migrerait par une série d'associations/dissociations avec des répétitions conservées de type FxFG (F : phénylalanine, x : sérine, alanine ou glycine G : glycine) des nucléoporines ayant une affinité croissante pour le récepteur d'import.

Des études s'attachent à cartographier les NPC et à définir les interactions des nucléoporines entre elles et avec les récepteurs d'import (46) (47) (48) (45). Un modèle de répartition des nucléoporines dans le pore nucléaire de vertébré est présenté dans la figure 3. Les nucléoporines s'associeraient en sous-complexes qui interagiraient préférentiellement avec certains récepteurs d'import ou d'export (47).

Nup50, nucléoporine des filaments nucléaire du NPC de cellules de vertébrés, ne se lie qu'au récepteur d'export CRM1 et intervient spécifiquement dans l'export des macromolécules présentant un signal d'export nucléaire riche en leucine (49). Il semble donc exister plusieurs chemins d'import et d'export dans le pore nucléaire.

Les nucléoporines ne sont pas toutes statiques : alors que certaines d'entre elles n'ont qu'un rôle dans le maintien de la structure du pore, d'autres, telles que Nup153 (50) escortent les complexes exportés, Nup98, Nsp1p interviennent directement dans le mécanisme de transport et migrent avec le complexe transporté d'une face à l'autre du NPC.

Figure 3 Structure hypothétique du complexe du pore nucléaire de vertébré. Complexe Nup62 : Nup62, Nup58, Nup54 et Nup45. Complexe Nup160 : au moins Nup160, Nup133, Nup107, Nup96, sec13. Les traits doubles représentent des liaisons démontrées entre les nucléoporines, les traits simples des liaisons supposées. Cases grises : Nup155. D'après (46).

Le pore nucléaire est une structure dynamique : le diamètre de l'anneau nucléaire du pore diminue quand la concentration en Ca^{2+} augmente (51), en présence d'un excès de RanGTP, les filaments cytoplasmiques se déploient à l'intérieur du pore et en réduisent le diamètre interne (52) alors qu'ils restent cytoplasmiques et globulaires en l'absence de RanGTP. Le pore se refermerait comme un iris pour bloquer le passage de ces molécules.

b) A chaque macromolécule sa voie de diffusion facilitée

Il est difficile de dissocier les mécanismes d'import et d'export nucléaire, étroitement impliqués.

(1) Premier exemple : import nucléaire des protéines présentant une séquence de localisation nucléaire

Les protéines destinées au noyau cellulaire présentent une séquence NLS qui permet à la machinerie cellulaire de les reconnaître et de les diriger vers le noyau. Une partie de ces protéines sont pré-complexées dans le cytoplasme avec un adaptateur de la famille des importines α qui se lie avec l'importine β , récepteur de la famille des karyophérines β .

Les **séquences NLS** ne répondent pas à un consensus défini, mais leur couplage sur une protéine non karyophile entraîne l'import nucléaire de cette protéine. Les premières décrites, dites NLS « classiques » sont constituées d'une ou deux séries d'acides aminés basiques et sont habituellement représentées par la séquence NLS de l'antigène T de SV40 (NLS monopartite : PKKKRKV) et celle de la nucléoplasmine (NLS bipartite : KRPAAIKKAGAKKKK).

Des études structurales ont permis de définir des modèles de structures des complexes d'import. Ces études montrent que **l'importine α** possède deux sites de liaison à des séquences NLS monopartites, un site principal et un site secondaire, et que ces deux sites permettent l'interaction avec une séquence NLS bipartite (53-55). Ces sites sont disposés dans la partie centrale et C-terminale de l'importine α , constituées de 10 répétitions armadillo en tandem (résidus 70 à 496 chez la souris) qui définissent une superhélice droite à l'intérieur de laquelle les séquences NLS peuvent se fixer par une série de liaisons hydrogène, d'interactions hydrophobes et de liaison de type Van der Waals (figure 4).



Figure 4 Structure de l'importine α complexée à deux séquences NLS. A : Deux séquences NLS monopartites de l'antigène T de SV40 ; B : une séquence NLS bipartite de la nucléoplasmine. L'importine α est représentée en rouge, les séquences NLS en bleu et vert. D'après (56).

L'intervention d'un adaptateur est un mécanisme de contrôle de l'import nucléaire supplémentaire pour la cellule : alors que l'expression des récepteurs d'import ne dépend pas du type cellulaire, l'expression des adaptateurs est modulée suivant le type cellulaire (57, 58).

L'importine β est constituée de 19 répétitions HEAT en tandem, chaque répétition étant constituée de deux hélices A et B reliées entre elles par un court filament, déterminant une superhélice droite dont la partie convexe est constituée par les hélices A, à l'extérieur de la superhélice et la partie concave est constituée par les hélices B, à l'intérieur de la superhélice.

La partie N-terminale de l'importine α , contenant la séquence **IBB** (importin beta binding), permet la formation d'un **complexe importine α / importine β** .

L'importine β , flexible, s'enroule autour de l'IBB, donnant une forme globulaire au complexe (figure 5). L'IBB interagit en deux sites de la surface interne de l'importine β induisant des changements de conformation des deux molécules : l'importine β adopte une conformation plus fermée (59) et la séquence IBB de l'importine α devient hélicoïdale (60).

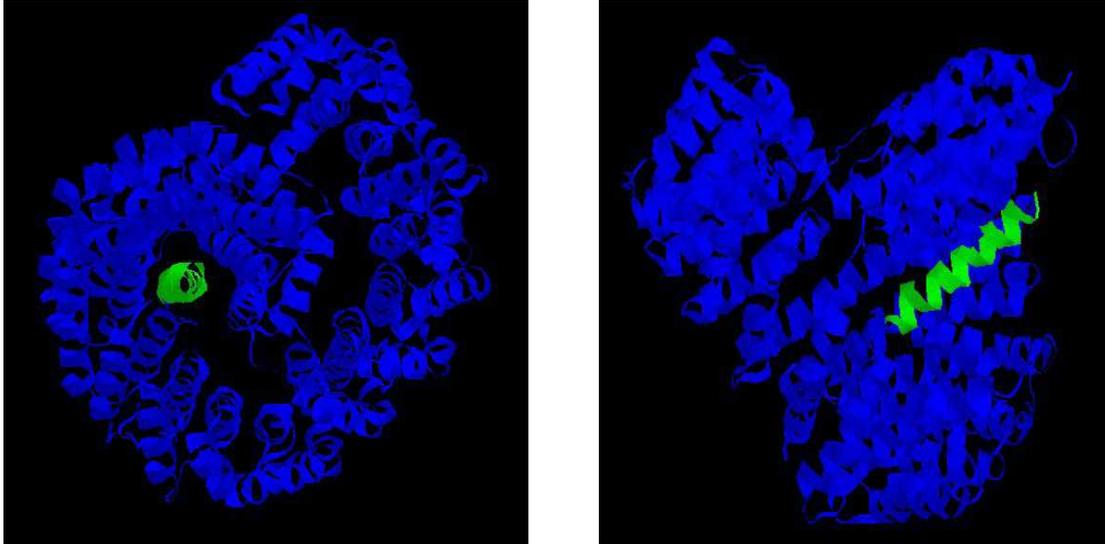


Figure 5 Structure de l'importine β complexée avec le domaine IBB de l'importine α . A : vue dans le prolongement de l'hélice de l'importine β ; B : coupe longitudinale de l'hélice de l'importine β . L'importine β est représentée en bleu et l'IBB en vert. D'après (59).

La partie N-terminale de l'importine α (IBB et quelques résidus supplémentaires) contient un domaine riche en acides aminés basiques ayant les propriétés d'une séquence NLS interne (résidus 49 à 53 chez la souris). En l'absence d'importine β , cette séquence semble se replier sur la partie centrale de l'importine α et interagir avec le site principal de fixation des séquences NLS (55). En présence d'importine β , la partie N-terminale (domaine IBB) de l'importine α est piégée et libère le site de fixation des séquences NLS. Ce mécanisme d'autoinhibition permet à l'importine α de passer d'une forme ayant une faible affinité pour les séquences NLS (sans importine β , dans le noyau) à une forme ayant une forte affinité pour les séquences NLS (liée à l'importine β , dans le cytoplasme) (55).

Les **nucléoporines** interagissent avec la partie convexe de l'importine β en deux sites : les hélices A des répétitions HEAT 5 et 6 et un site entre HEAT 6 et HEAT 7 (figure 6). L'importine β peut donc se lier à la fois au domaine IBB de l'importine α et aux nucléoporines (61).

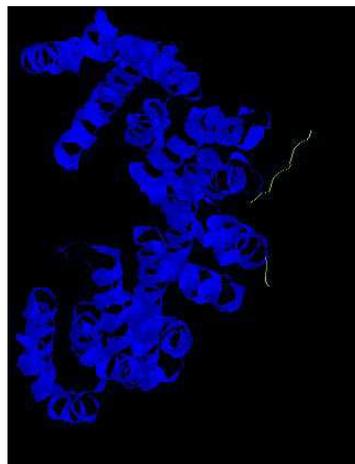


Figure 6 Structure de l'importine β complexée avec une répétition FxFG de la nucléoporine Nsp1p. L'importine β est représentée en bleu et la répétition FxFG de la nucléoporine en jaune. D'après (61).

RanGTP interagit avec la partie concave de l'importine β , en deux sites localisés au niveau des répétitions HEAT 1 à 3 et HEAT 8 (figure 7) (62). Le site de liaison de RanGTP et des nucléoporines sur l'importine β ne se recouvrent pas. Le mécanisme de libération de l'importine β des nucléoporines ne fait donc pas intervenir une compétition pour un même site, mais plutôt un changement de conformation de l'importine β , qui induit une perte d'affinité pour les nucléoporines (61). En particulier l'hélice A de HEAT 5 change de position par rapport à HEAT 6.

Quant à RanGTP, sa région switch II interagit avec l'importine β , les régions switch I et C-terminale n'intervenant que dans la régulation de l'interaction.

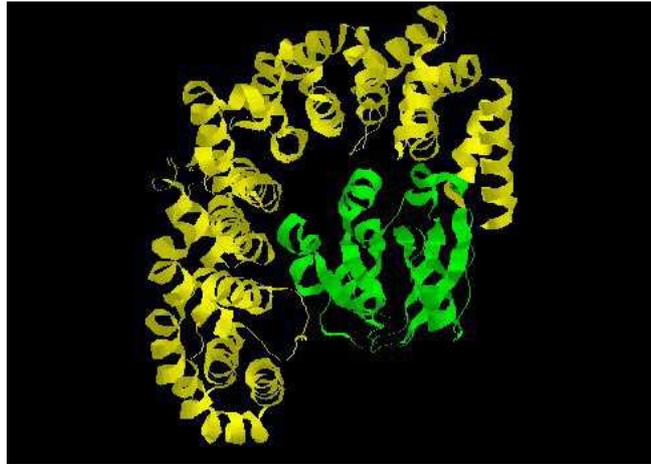


Figure 7 Structure de l'importine β complexée avec RanGTP. D'après (62). L'importine β est représentée en jaune et RanGTP en vert.

L'importine α et l'importine β présentent des homologies structurales importantes représentées dans la figure 8.

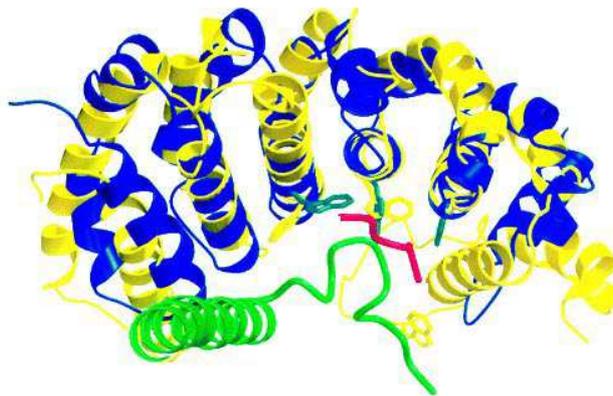


Figure 8 Comparaison des structures de l'importine α et de l'importine β . Les répétitions armadillo 1 à 6 de l'importine α sont représentées en bleu et les répétitions HEAT 8 à 13 de l'importine β en jaune. Le domaine IBB de l'importine α est représenté en vert, un peptide NLS en rouge. D'après (59).

(2) Deuxième exemple : import nucléaire des ribosomes et des histones

Lors de la mitose la cellule doit reconstituer un stock de 10 millions de ribosomes. Les protéines ribosomales (PR) sont produites dans le cytoplasme et importées dans le noyau cellulaire où elles procèdent à l'empaquetage de l'ARN ribosomal. Les ribosomes sont réexportés dans le cytoplasme pour permettre la traduction de l'ARN messager en protéines. Pour traverser l'enveloppe nucléaire, les PR se lient dans le cytoplasme directement à un récepteur d'import nucléaire membre de la famille des **karyophérines β** qui peut être l'**importine β** , la **transportine**, **RanBP5** et **RanBP7** (63). Les PR se lient à l'importine β par l'intermédiaire d'un domaine **BIB**, de composition différente du domaine **IBB** de l'importine α .

Les histones **H2A** et **H2B** forment des hétérodimères dans le cytoplasme cellulaire. Ces protéines sont suffisamment petites pour traverser l'enveloppe nucléaire, mais peuvent aussi entrer dans le noyau par diffusion facilitée quand un apport massif dans le noyau est nécessaire, en particulier lors de la mitose. *In vitro*, la karyophérine **Kap114p**, membre de la famille des karyophérines β , interagit directement avec les deux séquences NLS de ces histones et permet l'import nucléaire de l'hétérodimère lié à sa protéine chaperonne Nap1p (64). Les karyophérines **Kap123p**, **Kap121p** qui interagissent préférentiellement avec H2B et **Kap95p** qui interagit plutôt avec H2A permettent l'import nucléaire du dimère dans une moindre mesure. Quant à l'histone **H1**, il est importé dans le noyau par le dimère **importine β / importine 7** par diffusion facilitée bien qu'il soit suffisamment petit pour pouvoir traverser le pore nucléaire par simple diffusion (65).

Dans ces mécanismes d'import, les protéines interagissent sans adaptateur avec leur récepteur d'import, isolé ou sous forme de dimère de récepteurs. Ces protéines peuvent être transportées par plusieurs types de récepteurs, permettant à la cellule un import nucléaire rapide et massif lors de la mitose.

(3) Troisième exemple : import nucléaire des UsnRNP

Les petites particules nucléaires riboprotéiques riches en uridine (UsnRNP, uridin-rich small nuclear ribonucleoprotein) sont des assemblages de petits ARN, de taille inférieure à 250 nucléotides, riches en uridine, avec des protéines dont 7 protéines de type Sm. Ces petites particules sont des constituants du complexe nucléaire impliqué dans l'épissage des introns des ARN pré-messagers (66).

Les pré-UsnRNA sont transcrits dans le noyau, exportés dans le cytoplasme dans lequel ils sont associés aux protéines et maturés pour former des particules fonctionnelles prêtes à être réimportées dans le noyau (66).

L'import nucléaire des snRNPs U1, U2, U4 et U5 dans les cellules eucaryotes fait intervenir la **snurportine 1**, membre de la famille des importines α qui reconnaît la coiffe guanosine triméthylée (m3G cap) des UsnRNA. La snurportine 1 interagit avec l'importine β (67) par l'intermédiaire de son domaine **IBB** (importin beta binding). Les séquences NLS des protéines du Sm semblent être aussi impliquées dans la reconnaissance des UsnRNP par la snurportine 1.

Dans ce mécanisme les particules sont importées par le dimère adaptateur/récepteur. La séquence permettant l'identification des UsnRNP comme particules à importer est à la fois **protéique** (NLS des protéines Sm) et **nucléotidique** (m3G cap). Le mécanisme d'import du complexe UsnRNP–snurportine est le même que celui des protéines ribosomales mais nécessite cette fois l'apport de **deux GTP**, pour le recyclage de l'importine β , exportée du noyau complexée à RanGTP et le recyclage de la snurportine 1 (68).

(4) Diversité des mécanismes d'import

L'import nucléaire des macromolécules fait intervenir un récepteur d'import, membre de la famille des karyophérines β , et un apport d'énergie nécessaire au maintien du gradient de concentration de RanGTP. Il s'effectue à travers le complexe du pore nucléaire par un mécanisme de diffusion facilitée.

La macromolécule interagit avec la karyophérine β soit directement, soit par l'intermédiaire d'un adaptateur, membre de la famille des karyophérines α (importine α , snurportine). La karyophérine β interagit directement avec les nucléoporines du complexe du pore nucléaire.

La diversité des mécanismes d'import découle de la diversité des karyophérines : actuellement 21 karyophérines β ont été décrites, dont la séquence est fortement conservée.

La famille des karyophérines β est constituée des récepteurs d'import (importines) et des récepteurs d'export (exportines). Parmi les 22 karyophérines β humaines décrites, 5 sont des importines : l'importine β , la transportine, la transportine SR, l'importine 5 et l'importine 7. Les fonctions de 13 d'entre elles n'ont pas été identifiées.

L'importine β est un récepteur **polyvalent** : il peut importer différents substrats, et possède des sites multiples d'interaction avec ces substrats : c'est entre autres le récepteur direct des protéines ribosomales, de la cycline B1, de Smad, des protéines virales de HIV Rev et Tat, mais aussi le récepteur des complexes macromolécule à importer / adaptateur (Kap β 1 est la seule kap β qui interagit avec kap α). Les sites de l'importine β permettant l'interaction avec le domaine BIB des protéines ribosomales et le domaine IBB des karyophérines α sont strictement séparés.

Un même substrat peut être importé par plusieurs récepteurs : les protéines ribosomales peuvent être importées non seulement par l'importine β , mais aussi par la transportine 1, l'importine 5 et l'importine 7, ces récepteurs interagissent avec le domaine BIB des protéines ribosomales.

Tous ces mécanismes ont été mis en œuvre par les cellules pour permettre un import nucléaire rapide et efficace de la machinerie cellulaire, en particulier pour rétablir des concentrations physiologiques des protéines nucléaires après la mitose.

c) Import nucléaire et division cellulaire

(1) *Rôle des facteurs d'import nucléaire dans la mise en place des fuseaux mitotiques*

En 1999, plusieurs études ont montré que RanGTP injecté dans des extraits d'œuf de *Xenopus* induit la formation d'asters. Des publications plus récentes (2001), révèlent que l'action de RanGTP dans la formation d'asters est indirecte : l'importine β complexerait les protéines telles que NuMA (69) (70) et TPX2 (71) par l'intermédiaire de l'importine α . NuMa et TPX2 sont des protéines associées aux microtubules (MAPs pour microtubule associated proteins) qui ont une activité dite APA pour aster microtubule activity. Ces protéines, complexées à l'importine α ou au complexe importine α /importine β , sont inactives. En se liant à l'importine β , RanGTP en changerait la conformation, provoquant la libération de NuMA ou TPX2 qui pourraient alors agir en induisant la formation d'asters ou la polymérisation des microtubules.

Dans la cellule mitotique l'enveloppe nucléaire est disjointe, empêchant le maintien du gradient de concentration de RanGTP. Cependant si RCC1 est lié à la chromatine dans les cellules mitotiques comme il l'est dans les cellules interphasiques, il crée une élévation de la concentration de RanGTP à proximité des chromosomes, permettant la libération des facteurs NuMA et TPX2 de leur complexe avec l'importine β et la formation d'asters de microtubules à proximité de la chromatine.

Ces hypothèses demandent néanmoins à être vérifiées, puisqu'il est controversé que RCC1 soit encore lié à la chromatine dans la cellule mitotique (2). D'autre part la polymérisation des microtubules fait très certainement intervenir d'autres facteurs. Ces études sont résumées dans les revues (72) (73) (74).

(2) Reconstitution de l'enveloppe et des pores nucléaires

Les mécanismes gouvernant l'assemblage des enveloppes nucléaires ont été principalement étudiés sur des modèles acellulaires, comme celui des pronucléi mâles après fécondation. Les étapes de l'assemblage comprennent la décondensation de l'ADN. Chez le xénope, cette décondensation est médiée par la nucléoplasmine. Puis des vésicules membranaires sont attirées et se lient à la chromatine, indépendamment de l'apport d'énergie ou d'éléments cytosoliques. Ces vésicules fusionnent pour former l'enveloppe nucléaire grâce à l'hydrolyse de GTP et GDP, impliquant l'intervention d'une GTPase cytosolique. Les pores nucléaires s'insèrent dans l'enveloppe, la taille du noyau augmente simultanément à une décondensation plus poussée de la chromatine. Plusieurs études soulignent l'implication de Ran dans l'assemblage des enveloppes nucléaires (75-77).

Dans le modèle acellulaire des extraits d'œuf de xénope, Ran-GDP lié à des billes de glutathion-sépharose entraîne l'accumulation de vésicules membranaires autour des billes, et la conversion de GDP en GTP par RCC1 sur Ran accélère la fusion des vésicules pour former une enveloppe nucléaire (76). Deux étapes semblent nécessaires à l'assemblage des pseudo-nucléi : la conversion de GDP en GTP sur Ran par RCC1, suivie de l'hydrolyse de GTP en GDP par Ran, stimulée par RanGAP1. Ces pseudo-nucléi contiennent des pores nucléaires actifs pour l'import nucléaire de protéines karyophiles (76). Ces résultats ont été confirmés par une série de déplétion et d'études sur l'effet des formes mutées de Ran déficientes pour l'hydrolyse de GTP en GDP dans le modèle des extraits d'œufs de xénope (75).

Dans le modèle acellulaire des extraits de cellules HeLa dont le cycle cellulaire a été arrêté en phase de mitose, la protéine Ran recombinante, sous sa forme GTP ou GDP, liée à des billes de sépharose induit l'accumulation de vésicules membranaires qui fusionnent pour former des enveloppes nucléaires (77). C'est uniquement sous sa forme GTP que Ran provoque l'accumulation de vésicules lipidiques autour des billes. Si Ran est sous la forme GDP, il doit être transformé en Ran-GTP par RCC1 pour que les vésicules s'accumulent. Cependant l'accumulation des vésicules ne nécessite pas d'apport d'énergie, ni d'intervention de protéines solubles du cytosol. Par contre l'hydrolyse de GTP en GDP par Ran, stimulée par Ran-GAP1, est nécessaire à la fusion des vésicules pour former les enveloppes nucléaires (77). Les pseudo-nucléi formés contiennent des nucléoporines, assemblées en pores nucléaires actifs pour l'import et l'export nucléaire (77).

(3) Restauration du gradient de concentration de RanGTP entre le noyau et le cytoplasme

RCC1 est localisé sur la chromatine des cellules interphasiques. Une récente étude montre que la liaison de RCC1 à la chromatine nécessite la présence des histones H2A et H2B, sous forme d'hétérodimères dans les noyaux cellulaires. D'autre part, la liaison de RCC1 avec l'hétérodimère H2A/H2B stimule l'activité catalytique de RCC1, suggérant que H2A/H2B sont des cofacteurs de RCC1 lié à la chromatine (78).

Si RCC1 reste lié à la chromatine lors de la mitose, son activité catalytique peut permettre la restauration d'une forte concentration locale de RanGTP à proximité des chromosomes, jusqu'à la reconstruction d'une enveloppe nucléaire.

Les pores nucléaires semblent s'insérer dans l'enveloppe rapidement après sa formation. Or RanBP2 est lié aux nucléoporines et semble avoir une action sur l'activation de la fonction

RanGTPase par RanGAP1 très rapide. RanBP2 permettrait de restaurer rapidement la concentration physiologique de RanGDP dans le cytoplasme.

(4) La place centrale de Ran dans le fonctionnement du noyau

Ran a de multiples rôles dans le noyau, permettant à certains auteurs de le qualifier de marqueur biochimique de l'ADN à travers le cycle cellulaire (79). Durant l'interphase Ran a une place centrale dans les mécanismes de transport entre le noyau et le cytoplasme de la cellule. Ses formes GDP et GTP définissent un gradient, RanGTP étant principalement localisé dans le noyau et RanGDP dans le cytoplasme. Cette localisation est induite par deux facteurs, RanGAP (GTPase activating protein) localisé dans le cytoplasme, et RanGEF (RCC1) associé à la chromatine.

En phase de mitose, lorsque l'enveloppe nucléaire est disjointe, un gradient local des formes GTP et GDP de Ran s'instaure puisque RCC1 est lié à la chromatine. La concentration de RanGTP est élevée à proximité de RCC1, donc de la chromatine, induisant la formation d'asters de microtubules à proximité de l'ADN. L'hydrolyse de GTP en GDP par Ran, stimulée par RanGAP1 est certainement impliquée dans la mise en place du fuseau mitotique. D'autre part l'activité GTPase de Ran permet la fusion des vésicules membranaires, aboutissant à la formation de l'enveloppe nucléaire. Il est possible que Ran soit aussi impliqué dans l'insertion des pores dans l'enveloppe nucléaire et le maintien de la structure de la chromatine.

Lorsque l'enveloppe nucléaire est formée et fonctionnelle, le gradient des formes GTP et GDP de Ran est rapidement rétabli par RanGAP1, recrutée par RanBP2/SUMO1.

Même si le rôle de Ran dans ces étapes du cycle cellulaire a été mis en évidence, il reste à définir si son rôle est direct ou indirect et quels sont ses partenaires dans le cas d'un rôle indirect.

2. Import nucléaire d'ADN

a) La taille et la structure des plasmides ne favorisent pas leur import nucléaire

Le diamètre théorique d'un ADN plasmidique est d'environ 200nm si celui-ci est globulaire (80), l'épaisseur d'un brin d'ADN plasmidique n'excède pas 50nm et sa longueur 500nm, même quand celui-ci est superenroulé. Le diamètre théorique du pore nucléaire étant de 10 à 40nm selon l'état de la cellule, le plasmide doit théoriquement pouvoir passer à travers le pore nucléaire, mais la probabilité de ce passage reste faible (figure 9).

Figure 9 Schéma théorique de l'import nucléaire de l'AN plasmidique

Un des moyens qui pourraient permettre de faire pénétrer plus facilement le plasmide dans le noyau consisterait à le condenser, avec des agents de condensation tels que les protéines histones.

b) Le génome viral atteint le noyau de la cellule hôte lors de l'infection

De nombreux virus, pour accomplir leur cycle infectieux, font parvenir leur ADN ou ARN jusqu'au noyau de la cellule hôte par co-transport du génome avec des protéines de la capsid (81, 82).

C'est le cas du virus **Herpes Simplex de type 1**. Ce virus est un virus recouvert, composé d'un génome ADN, d'une capsid icosaédrique de 125nm de diamètre, recouverte d'un tégument et d'une enveloppe protéiques. La capsid est essentiellement constituée de la protéine VP5. Le tégument est constitué des protéines VP1-3, VP11/12, VP13/14, VP16, VP18,8, VP22. Lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte par fusion de la capsid avec la membrane plasmique, la capsid, VP11/12 et VP18,8 sont perdues. L'ADN viral est transporté dans le cytoplasme vers le noyau le long des microtubules, certainement par interaction avec les protéines du tégument recouvrant l'ADN. Sans ces protéines, en particulier sans la protéine VP1-3, l'ADN viral ne se lie pas aux pores nucléaires et n'est pas importé dans le noyau.

c) Les facteurs de transcription escortent de l'ADN jusqu'au noyau cellulaire

Les **facteurs de transcription** ont non seulement une séquence NLS leur permettant d'interagir avec les récepteurs cytoplasmiques de l'import nucléaire, mais aussi des séquences leur permettant l'interaction avec les séquences promoteur et/ou enhancer de l'ADN. Ces facteurs sont importés dans le noyau cellulaire selon la voie classique d'import des protéines-NLS. Au sein de la famille des facteurs de transcription, il existe des facteurs ubiquitaires, présents dans la majorité des cellules, c'est entre autres le cas de AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, NF- κ B, Oct-1, SP1. D'autres facteurs de transcription sont spécifiques de certains types cellulaires, c'est le cas de SRF qui se lie au domaine CArg/SRE du promoteur SMGA (smooth muscle gamma-actin) spécifique des cellules musculaires lisses.

(1) La séquence promoteur / enhancer précoce de SV40

L'équipe de D. A. Dean a montré que l'ADN de SV40 se localise dans le noyau cellulaire en 6 à 8h via le pore nucléaire après microinjection dans le cytoplasme de cellules TC7, CHO, HeLa, HepG2 et Vero. Le plasmide dans lequel ont été clonés l'origine de réplication et la majorité des promoteurs précoces et tardifs de SV40 se localise dans le noyau cellulaire après microinjection cytoplasmique, indiquant que cette séquence semble permettre l'import nucléaire du plasmide (83) : le plasmide interagirait avec des facteurs de transcription ubiquitaires par l'intermédiaire de la séquence de SV40, ces facteurs escorteraient le plasmide dans le cytoplasme et permettraient son import nucléaire grâce à leurs séquences NLS.

Des études complémentaires confirment ces résultats, puisqu'un plasmide couplé avec un PNA fluorescent contenant l'origine de réplication et la séquence promoteur/enhancer précoce de SV40 est importé dans les noyaux cellulaires dans le modèle des cellules perméabilisées à la digitonine contrairement au plasmide témoin. Cet import nucléaire fait non seulement intervenir les importines α et β et Ran, mais aussi un ou plusieurs facteurs contenus dans des extraits nucléaires de cellules HeLa. En l'absence d'un système de régénération de l'énergie ou en présence de la lectine WGA, la fluorescence reste localisée dans le fantôme de cytoplasme, indiquant que l'entrée du plasmide suit la voie d'import nucléaire classique des protéines-NLS par le pore nucléaire (84).

La séquence nucléotidique optimale intervenant dans l'import nucléaire de ces plasmides (85) semble être une des répétitions de 72 nucléotides de la séquence enhancer de l'ADN de SV40. Quand une de ces répétitions est clonée dans le plasmide pBR322, 55 à 60% du plasmide est importé dans le noyau cellulaire. Les promoteurs/enhancer du cytomégalovirus et du virus du sarcome de Rous ont été testés de la même façon, mais ne présentent pas les mêmes propriétés de co-transport de plasmides jusqu'au noyau cellulaire (85).

In vivo, les plasmides contenant une répétition du motif de 72pb enhancer précoce de SV40 injectés dans le muscle tibial cranial de souris permettent une augmentation significative de l'expression du gène rapporteur (SeAP) sous la dépendance du promoteur du CMV par rapport au plasmide sans la séquence de SV40, 7 jours après l'injection. Cette augmentation est aussi observée quand le gène rapporteur (luciférase) est sous la dépendance du promoteur SkA, que la séquence de SV40 soit insérée en sens direct ou en sens inverse. Si le muscle est électroporé après injection, l'expression de la luciférase, de la SeAP et de l'interleukine 2 sont augmentées seulement deux fois (86).

Nous avons tenté de reproduire ces résultats, sans succès : la séquence décrite par l'équipe de D. A. Dean a été clonée dans des plasmides codant les gènes rapporteurs luciférase, β -galactosidase et GFP. L'import nucléaire de ces plasmides a été testé par transfection, microinjection cytoplasmique et injection *in vivo* par voie intramusculaire sur des souris. Dans aucun de ces tests nous n'avons observé une expression du transgène accrue par la présence de la séquence étudiée.

(2) La séquence du promoteur SMGA, spécifique des cellules musculaires lisses

Le promoteur SMGA (smooth muscle cell gamma actin) est régulé par une série de facteurs de transcription dont SRF (serum response factor) qui se lie sur les séquences CARG/SRE du promoteur. Seules les cellules musculaires lisses expriment SRF, rendant le promoteur SMGA spécifique des cellules musculaires lisses.

Des plasmides codant la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) ou la luciférase (luc) contenant la totalité ou une fraction du promoteur SMGA ont été construits (87). Dans le cytoplasme des cellules, ces plasmides peuvent interagir avec SRF, qui contient une séquence de localisation nucléaire et peut les escorter jusqu'au noyau. Or seules les cellules musculaires lisses expriment le facteur SRF (87) donc seules ces cellules peuvent importer les constructions plasmidiques contenant le promoteur SMGA dans leur noyau.

Ces hypothèses ont été démontrées par (87), puisque la microinjection de ces constructions dans le cytoplasme de cellules musculaires lisses primaires humaines et de poulet conduit à l'expression du gène rapporteur, alors qu'ils ne détectent pas d'expression dans les cellules CV1 ou des fibroblastes d'embryons de souris. Par contre les plasmides contenant la séquence promoteur/enhancer de SV40, similaires aux plasmides construits par l'équipe de D A Dean sont importés dans le noyau des CV1, des fibroblastes d'embryon de poulet et des cellules musculaires lisses (87).

L'effet du facteur de transcription SRF sur cet import nucléaire est mis en évidence puisque sur une lignée CV1 transformée exprimant SFR de façon stable, les constructions contenant le promoteur SMGA sont importées dans le noyau, alors qu'elles ne le sont pas dans les cellules CV1 non transformées (87).

(3) La séquence *oriP* du virus Epstein-Barr (EBV)

La séquence origine de réplication *oriP* du virus Epstein-Barr (EBV) a été clonée dans un plasmide codant la luciférase (88). L'expression du plasmide après transfection de lignées stables 293-EBNA1 (facteur de transcription Epstein-Barr nuclear antigen 1) augmente d'un facteur 100 quand le plasmide contient la séquence *oriP* (88). Ce même plasmide,

microinjecté dans le cytoplasme de cellules 293-EBNA1 conduit à une augmentation de l'expression de la luciférase d'un facteur 100, alors que l'expression n'augmente que d'un facteur 17 quand le plasmide est injecté dans les noyaux. Les co-transfection et co-microinjection d'un plasmide codant la luciférase et possédant la séquence *oriP* avec un plasmide codant EBNA1 dans des cellules 293 ne produit pas le même effet : le facteur d'augmentation de l'expression du plasmide n'est plus que de 16 ou 17 (88).

La séquence *oriP* a non seulement un effet enhancer de l'expression du plasmide, mais aussi un effet d'augmentation de l'import nucléaire du plasmide quand EBNA1 préexiste dans le cytoplasme cellulaire. EBNA1 pourrait se lier à *oriP* et induire l'import nucléaire du plasmide via son domaine NLS (88).

(4) *Le site de liaison de NFκB*

Cinq sites de liaison pour le facteur de transcription κB (NFκB pour « nuclear factor κB »), facteur ubiquitaire qui est rapidement importé dans le noyau cellulaire en présence d'activateurs tels que TNF-α ou des esters de phorbol, ont été clonés dans un plasmide codant la luciférase (89).

Quand ces sites de liaison sont clonés en aval du gène de la luciférase (plasmide κB-pGL3), ils n'ont pas d'effet sur la transcription du gène. L'expression de la luciférase dans des tests de transfection sur différentes lignées cellulaires, après activation par TNF-α, est augmentée d'un facteur 35 après 18h de transfection par rapport au plasmide contrôle sans les sites de liaison (plasmide pGL3). Si ces plasmides sont marqués en fluorescence, un marquage diffus du noyau est observé après transfection et activation par TNF-α, avec le plasmide contenant les sites de liaison (89).

Quand les sites de liaison sont fusionnés avec un promoteur minimal (plasmide pNFκB-luc), en amont du gène de la luciférase, ils ont non seulement un effet sur l'import du plasmide dans le noyau, mais aussi un effet activateur sur la transcription. L'expression de la luciférase dans des tests de transfection après activation par TNF-α est augmentée d'un facteur 19 par rapport au plasmide sans sites de liaison, après 48h de transfection (les cellules ont subi deux mitoses, l'accumulation nucléaire des plasmides avec ou sans sites de liaison pour NFκB sont similaires). Après 7h de transfection, le niveau d'expression du plasmide κB-pGL3 est augmenté d'un facteur 10 et le niveau d'expression du plasmide pNFκB-luc est augmenté d'un facteur 100 par rapport au niveau d'expression du plasmide témoin pGL3 (89).

d) Couplage de séquences peptidiques de localisation nucléaire aux plasmides en vue du ciblage nucléaire

Plusieurs équipes ont tenté de coupler une ou plusieurs séquences NLS à des plasmides, de façon covalente ou par simple interaction électrostatique.

Un grand nombre de peptides couplés de façon covalente à un plasmide abolit presque totalement l'expression du transgène (90). L'expression du transgène est maintenue si un seul (91) ou un faible nombre (92) de peptides NLS sont couplés au plasmide, mais on n'observe pas d'augmentation significative du niveau d'expression, quel que soit le mode de couplage des peptides NLS. Une seule équipe décrit une augmentation significative du niveau de transfection par un plasmide linéarisé auquel a été couplé un unique peptide NLS (93), mais la construction utilisée reste difficile à produire et il n'est pas envisageable de l'utiliser à des fins thérapeutiques.

Cependant le peptide NLS couplé au plasmide reconnaît son récepteur cellulaire, puisque les tests d'interaction des plasmides-NLS avec de l'importine β couplée à des billes de sépharose se sont révélés positifs. La quantité de plasmide-NLS interagissant avec les billes-importine β augmente de façon linéaire avec le nombre de peptides NLS couplés au plasmide (90).

La plupart des études menées jusqu'à présent concernent le peptide NLS de l'antigène T de SV40. Une équipe a complexé le peptide M9 de hnRNP A1 rendu cationique par liaison à un peptide fortement cationique (acides aminés du peptide NLS de l'antigène T de SV40 liés dans le désordre) avec un plasmide codant la β -galactosidase (94). Cette construction permet d'observer une augmentation du niveau d'expression de la β -galactosidase après transfection sur des cellules endothéliales aortiques de bœuf (BAEC). Les BAEC étant des cellules se divisant peu, on peut envisager que l'augmentation du niveau de transfection provient d'une augmentation du nombre de plasmides ayant pénétré dans le noyau. Le test d'import de cette construction sur le modèle des cellules BAECs perméabilisées à la digitonine ne permet pas de détecter de plasmide fluorescent dans les noyaux.

D. Ciblage extracellulaire

1. Notion de ciblage

Les protocoles actuels de thérapie génique consistent à administrer les vecteurs soit *ex vivo*, soit par injection dans l'organe à traiter ou dans la circulation. Choisir et sélectionner les cellules traitées permet d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes : dans la stratégie *ex vivo*, les cellules devant être traitées sont extraites, mises en culture, traitées et réimplantées. L'injection systémique de complexes ADN/vecteur pourrait être plus efficace si le vecteur était capable d'atteindre le type cellulaire à traiter.

Le ciblage d'un type cellulaire peut être envisagé par liaison covalente ou électrostatique sur le vecteur de ligands reconnaissant des récepteurs spécifiques des membranes plasmiques des cellules à traiter. Dans ce cas le complexe ADN/vecteur n'interagit qu'avec les membranes plasmiques de ces cellules. Alternativement, des promoteurs spécifiques d'un type cellulaire peuvent être utilisés : le complexe ADN/vecteur atteint toutes les cellules de l'organisme mais l'ADN ne s'exprime que dans les cellules ciblées.

2. Les vecteurs non-viraux ciblés

a) Composants des vecteurs non-viraux ciblés

Les systèmes non viraux de ciblage cellulaire développés actuellement sont des systèmes composés d'un élément cationique qui interagit avec l'ADN par des interactions électrostatiques, le condense en particules de 50 à 200nm de diamètre et le protège contre l'action des nucléases. A cet élément cationique est associé une tête de ciblage.

Dans la plupart des systèmes l'élément cationique est la polylysine (95-99) ou le PEI (100). Il existe quelques systèmes de ciblage cellulaire utilisant des lipides ou liposomes cationiques (101).

Parmi les têtes de ciblage utilisées, on peut citer la transferrine, le galactose qui interagit avec le récepteur aux asialoglycoprotéines des cellules hépatiques, l'insuline, des peptides contenant la séquence RGD interagissant avec les intégrines des cellules endothéliales activées lors d'une inflammation ou dans les tissus tumoraux, le folate.

b) Trafic cellulaire des particules non-virales ciblées

Pour envisager le ciblage d'un type cellulaire par interaction du complexe ADN/vecteur avec un type précis de récepteurs cellulaires, il convient de limiter l'endocytose adsorptive et de favoriser l'endocytose à récepteur, ce qui est possible en limitant la charge positive des complexes et en couplant au vecteur un ligand ayant une forte affinité pour le récepteur.

Selon le type de récepteur, les particules endocytées ont des tailles limitées, les récepteurs aux intégrines limitent la taille à 900nm à 1µm, par contre les récepteurs aux asialoglycoprotéines limitent la taille des particules à 100 ou 200nm (102).

La particule doit effectivement interagir avec son récepteur, et être capable de sortir de l'endosome par lequel elle est entrée dans la cellule (103). On peut par exemple ajouter de la DOPE à la formulation d'un vecteur lipidique, ou un composé lysosomotropique.

3. Ciblage des hépatocytes

a) Pathologies associées aux déficiences des hépatocytes

Les déficits de fonctions des hépatocytes sont la cause de nombreuses maladies métaboliques. C'est le cas de l'hypercholestérolémie familiale, de maladies autosomales liées à une déficience en récepteurs aux LDL (lipoprotéines de faible densité) qui conduisent au développement prématuré de lésions athéromateuses, du déficit de production ou de sécrétion de protéines par le foie, telles que les facteurs de coagulation VIII et IX dont le déficit est responsable du développement des hémophilies A et B (« La thérapie génique », Odile Cohen Haguenaer, éditions TEC&DOC).

Le traitement de ces pathologies par thérapie génique nécessite une expression stable et durable du transgène. Le vecteur adénoviral est immunogène et toxique quand il est injecté dans le foie à des titres élevés et peut conduire au développement d'hépatites. Le vecteur de choix pour le traitement de ces pathologies est plutôt le vecteur rétroviral, conduisant à une intégration du transgène dans le génome et donc à une expression stable et durable. Cependant le traitement par un vecteur rétroviral n'est efficace que si les cellules traitées sont en division, introduisant une contrainte supplémentaire : la division des cellules hépatiques est stimulée par une hépatectomie de 70% du volume du foie ou l'injection de substances toxiques telles que le tétrachlorure de carbone.

Les vecteurs non viraux, non toxiques et peu immunogènes, pourraient constituer une alternative pour le traitement de ces pathologies par thérapie génique.

b) Le récepteur aux asialoglycoprotéines

Les hépatocytes ou cellules parenchymales hépatiques, représentent 70 à 80% du volume total du foie. Les hépatocytes ont la caractéristique d'être en contact avec la circulation sanguine par des jonctions fenestrées, qui permettent l'extravasation de particules de taille inférieure à 100 à 200nm.

Une des caractéristiques des hépatocytes est la présence à leur surface du récepteur aux asialoglycoprotéines ou ASGP-R. Ce récepteur a été largement étudié et décrit (104-107). Il est composé de deux à trois sous-unités selon les espèces. Dans toutes les espèces, ces sous-unités sont des lectines de type C trans-membranaires d'environ 300 acides aminés (aa), de type II : elles sont composées d'un court domaine -NH₂ terminal cytoplasmique (40aa), d'un signal d'ancrage membranaire interne (20aa), d'une extrémité -COOH extracellulaire (220aa) contenant le domaine de reconnaissance des carbohydrates (« carbohydrate recognition domain » ou CRD) qui fixe le galactose et le N-acétylgalactosamine, cette liaison étant dépendante du Ca²⁺.

Chez l'homme, deux sous-unités (HH1 et HH2) sont associées en tétramères pour que le récepteur soit fonctionnel, sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères. La sous-unité majoritaire (HH1, 41kDa) est 7 fois plus abondante que la sous-unité mineure (HH2, 50kDa). Les récepteurs se localisent majoritairement au niveau de la surface basolatérale (sinusoïdale, zone constituée de micro villosités) des hépatocytes, en contact avec la circulation sanguine. Ces récepteurs permettent l'endocytose des glycoprotéines désialylées du sérum, présentant un galactose terminal, mais reconnaissent aussi les glycoprotéines présentant des N-

acétylgalactosamines terminaux. Leur étude a permis, dans la fin des années 1980, de déterminer les mécanismes de l'endocytose à récepteur (102, 106).

Un modèle de la structure tridimensionnelle des domaines extracellulaires des deux sous-unités du récepteur aux asialoglycoprotéines humain a été récemment proposé (108).

Le récepteur fonctionnel des **hépatocytes** du rat est constitué de trois sous-unités : RHL-1 (41.5kDa), RHL-2 (49kDa) et RHL-3 (54kDa) complexées sous la forme d'un hexamère. La sous-unité majeure est RHL-1 (70-80% de la masse totale de récepteur), RHL-2 et 3 ne diffèrent que par la présence de structures carbonées différentes sur un squelette d'acides aminés commun. Des récepteurs aux asialoglycoprotéines ont aussi été repérés à la surface des **macrophages**, dans ce cas ils ne sont composés que d'un type de sous-unités (42kDa) formant des homo-oligomères. Ces deux types de récepteurs ont des substrats préférentiels différents : dans le cas des récepteurs hépatiques, l'affinité pour le N-acétylgalactosamine est très supérieure à celle pour le galactose, dans le cas des récepteurs des macrophages l'affinité est la même pour les deux substrats (109).

Outre les récepteurs aux asialoglycoprotéines des hépatocytes (**ASGP-R**), des récepteurs du même type, appelés récepteurs aux particules galactosylées (**GP-R**) ont été détectés sur les macrophages du foie (cellules de Kupffer, (110) (111)), les macrophages péritonéaux (112). Les caractéristiques de ces récepteurs sont différentes, par exemple les récepteurs GP-R ont une affinité pour les particules galactosylées qui augmente quand la taille des particules augmente (l'affinité augmente d'un facteur 3000 quand la taille des particules passe de 5 à 15nm), alors que l'affinité des récepteurs ASGP-R ne dépend pas de la taille du ligand (113).

Le récepteur aux asialoglycoprotéines humain a aussi été détecté dans des lignées cellulaires, telles que la lignée Jurkat de cellules T, par hybridation avec un anticorps spécifique à la sous-unité HH1 et analyse des cellules en microscopie confocale et par FACS (114).

L'affinité du récepteur aux asialoglycoprotéines humain pour les vecteurs galactosylés dépend de la densité de résidus galactose accessibles à leur surface (115) et de la longueur de l'espaceur qui projette le ligand galactose à l'extérieur du vecteur (116). Ainsi les vecteurs triantennés présentant trois galactoses terminaux, dont la structure est proche de la structure des ligands naturels de ce type de récepteur, ont une meilleure affinité pour le récepteur que les vecteurs biantennés, qui ont une meilleure affinité que les vecteurs linéaires mono-galactose. Les résidus galactose se fixent à plusieurs CRD du même récepteur. Il existe une densité optimale de sucres pour que l'éloignement entre les résidus soit optimal.

c) Les vecteurs ciblés vers les hépatocytes

On parle de ciblage des hépatocytes par un vecteur d'ADN si le vecteur dispense l'ADN préférentiellement aux hépatocytes. Plus précisément dans cette étude, notre but est de faire pénétrer l'ADN dans la cellule par endocytose à récepteur, via le récepteur aux asialoglycoprotéines. Dans ce cas, le transfert de gènes est inhibé par l'ajout d'un excès de ligand libre (galactose ou asialofétuine) dans le milieu de culture des cellules présentant le récepteur.

Le récepteur aux asialoglycoprotéines ne permet l'endocytose que de composés d'une taille maximale de 100 à 200 nm (102). En amont du récepteur et avant d'atteindre les hépatocytes, les complexes ADN/vecteur doivent passer les jonctions fenestrées, dont la taille dépasse rarement 200nm, pour accéder aux hépatocytes.

Le vecteur idéal ciblant les hépatocytes comporte donc un ligand du récepteur aux asialoglycoprotéines et est capable de compacter l'ADN pour en faire une particule de taille inférieure à 200nm de diamètre. Le vecteur doit de surcroît réduire la charge de l'ADN pour éviter que le complexe ne soit pris en charge par le système réticulo-endothélial.

De nombreux vecteurs ciblant les hépatocytes ont été synthétisés et testés depuis la première étude de Wu et al. (117), qui mettait en œuvre une polylysine greffée par

l'asialoorosomucoïde. Cette construction (PLL-AsOR) permettait de complexer l'ADN et de détecter une expression du gène rapporteur (CAT) sur les cellules HepG2, présentant le récepteur, et non sur les cellules SK-Hep1, ne présentant pas le récepteur.

Parmi ces vecteurs les lipides, formulés en liposomes ou en micelles, ont donné des résultats intéressants *in vitro* sur des cultures cellulaires (118, 119) ou *in vivo* lors d'études de biodistribution après injection intraveineuse (120) (121) ou intraportale (122) sur des souris. Cependant ce n'est que récemment que dans ces études sont comparées les tailles et les propriétés physico-chimiques des complexes ADN/liposomes ciblés aux propriétés des complexes ADN/liposomes témoins. En particulier l'ajout d'une tête de ciblage est susceptible de modifier la charge du complexe, qui conditionne l'efficacité de transfection. D'autre part lors des études *in vivo* il convient de différencier l'expression du gène rapporteur dans les cellules non parenchymateuses du foie (cellules de Kupffer ou macrophages du foie) et dans les cellules parenchymateuses (hépatocytes) (121).

Les vecteurs utilisés actuellement sont plutôt des vecteurs polymériques (123-128) substitués avec des résidus galactose et divers facteurs pouvant améliorer la sortie de l'ADN des endosomes (124) ou réduisant la charge de surface du complexe (128). L'avantage de ces formulations est qu'un nombre variable de têtes de ciblage peuvent être greffées au polymère. En particulier le PEI a été substitué avec des résidus galactose (129) ou arabinogalactan. Les propriétés physico-chimiques des complexes ne varient pas avec l'ajout de la tête de ciblage, et le gène rapporteur est transféré préférentiellement à des lignées cellulaires présentant le récepteur.

Les polylysines sont toujours des vecteurs de choix pour le greffage de composés galactosylés, cependant leur efficacité de transfection est plus faible que les nouveaux vecteurs polymériques, et dépend étroitement de l'ajout à la formulation de composés endosomolytiques (130). Une étude détaillée des propriétés physico-chimiques de ces composés a été publiée en 1999 (131).

II. Stratégies mises en œuvre dans le cadre de ce travail

L'objectif de cette thèse, était de mettre en place des outils permettant d'améliorer l'efficacité de transfert de gènes par des vecteurs non-viraux lipidiques.

Le **premier volet** de cette étude concerne le **ciblage d'un compartiment intracellulaire**. Nous avons cherché à recruter un partenaire cellulaire qui pourrait guider le gène thérapeutique à travers le cytoplasme jusqu'au noyau. Deux stratégies ont été développées, décrites dans la figure 10.

Figure 10 Stratégies d'amélioration de l'efficacité du transfert de gènes non-viral par ciblage nucléaire. Ces stratégies sont inspirées de l'import nucléaire des protéines présentant une séquence NLS. La première stratégie consiste à introduire dans un plasmide une séquence nucléotidique permettant de recruter une protéine cytoplasmique karyophile, qui se lie au récepteur d'import et escorte le plasmide dans le cytoplasme et à travers le pore nucléaire. La deuxième stratégie consiste à coupler un peptide de localisation nucléaire, le peptide IBB, au plasmide. Ce peptide interagit directement avec le récepteur d'import et pénètre dans le noyau.

Le **deuxième volet** de ce travail concerne le **ciblage extracellulaire** (figure 11) du récepteur aux asialoglycoprotéines, spécifique des hépatocytes.

A l'aide de lipides galactosylés nous avons préparé des liposomes cationiques présentant des têtes de ciblage galactose, reconnues par le récepteur aux asialoglycoprotéines et étudié les propriétés de ciblage de tels vecteurs d'ADN.

Figure 11 Stratégie de ciblage d'un type cellulaire par un liposome présentant une tête de ciblage spécifique d'un récepteur. Le liposome cationique, complexé à l'ADN et présentant une tête de ciblage accessible, se fixe sur le récepteur cellulaire (1). Le complexe liposome/récepteur est internalisé par endocytose à récepteur (2). L'endosome évolue en lysosome (3) ou libère son contenu dans le cytoplasme cellulaire (4). L'ADN libre dans le cytoplasme diffuse jusqu'au noyau cellulaire (5) dans lequel il pénètre et s'exprime. Les cellules ne présentant pas le récepteur n'internalisent pas le complexe ADN/liposome ciblé.

III. Matériel et méthodes

A. Techniques de biologie cellulaire

1. Entretien et préparations de cellules eucaryotes

a) Culture des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires que nous utilisons sont adhérentes, cultivées dans des flacons de culture de 75cm², maintenues dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂. Chaque type cellulaire est cultivé dans un milieu spécifique (tableau 1) :

Type cellulaire	Description - origine	Milieu de culture
HeLa	Carcinome épithéloïde de l'utérus humain – ATCC CCL-2	MEM + 10%SVF + 1% glutamine 0,2M + 1% ATB
CV1	Fibroblastes de reins de singe – fournies par S. Kontuzov, INSERM U25	MEM + 10% SVF + 1% glutamine 0,2M + 1% ATB
NIH 3T3	Fibroblaste de souris. (Embryo, contact-inhibited, NIH swiss) – ATCC CRL-1656	DMEM + 10% SV + 1% glutamine 0,2M + 1% ATB
AoSMC	Cellules musculaires lisses d'aorte humaine Clonetics CC-2571	SmBm + 5% SVF + 1% hEGF 0,5µm/ml + 1% insuline 5mg/ml + 2% hFGF 1µg/ml + 1% gentamycine (50mg/ml) amphotericineB (50µg/ml)
HepG2	Carcinome hépatocyte humain – ECACC HB-8065	MEM + 10% SVF + 1% glutamine 0,2M + 1% ATB + 1% AANE + 1% pyruvate
SK Hep1	Adénocarcinome de foie humain – ATCC HTB-52	MEM + 10% SVF + 1% glutamine 0,2M + 1% ATB + 1% AANE + 1% pyruvate

Tableau 1 Description des types cellulaires utilisés. MEM : minimum essential medium, DMEM : Dulbecco's modified essential medium, SmBm : smooth muscle cell basal medium, SVF : sérum de veau foetal, ATB : antibiotiques (pénicilline 5000u/ml et streptomycine 5000µg/ml), AANE : acides aminés non essentiels, hEGF : facteur de croissance de l'endothélium, humain, hFGF : facteur de croissance des fibroblastes, humain.

Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 à 4 jours. Les cellules se multiplient et envahissent leur support jusqu'à qu'elles le recouvrent complètement, on dit qu'elles sont à confluence. Quand les cellules atteignent 80% de confluence, le tapis cellulaire est décollé par action de 2ml de trypsine / EDTA 5mn à 37°C. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 2ml de milieu de culture et une fraction des cellules en suspension sont mises en culture dans un flacon neuf contenant 25ml de milieu de culture.

b) Congélation et décongélation

Les cellules sont décongelées par passage de l'azote liquide à un bain-marie à 37°C. Dès que le glaçon de cellules se décolle de l'ampoule, il est transvasé dans un flacon de culture contenant 25ml de milieu préalablement équilibré à 37°C et 5% de CO₂.

Les cellules sont congelées dans du milieu de culture supplémenté par 10% de DMSO et 10% de sérum (la concentration finale en sérum est donc de 20%) par diminution progressive en température, dans un dispositif NICOOL LM10 (CFPO, tour Winterthur, « la défense » 92800 Puteaux, France), 25mn sur la position 3 et 10mn sur la position 10, puis placées dans un container d'azote liquide où elles sont stockées plusieurs années.

c) Perméabilisation à la digitonine

La méthode de perméabilisation est inspirée du protocole de Adam et Gerace, 1990. Nous avons appliqué ce protocole à des cellules adhérentes, qui sont dites « perméabilisées sur

lamelles », et à des cellules décollées de leur support par action de trypsine, elles sont dites « perméabilisées en suspension ».

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et deux fois avec du tampon d'import à 4°C (HEPES 20mM pH 7,3 ; acétate de potassium 110mM ; acétate de magnésium 2mM ; acétate de sodium 5mM ; DTT 2mM ; EGTA 0,5mM ; aprotinine, leupeptine, pepstatine 1µg/ml), puis placées sur de la glace. Les cellules sont mises en incubation 5mn sur la glace avec une solution de digitonine (solution stock à 50mg/ml dans du DMSO) à 50µg/ml dans du tampon d'import (dans le cas des cellules en suspension, on suspend le culot de cellules dans cette solution, à raison de 1ml de solution pour 10⁶ cellules), puis lavées deux fois avec du tampon d'import à 4°C.

L'état des noyaux des cellules est vérifié avant la congélation en réalisant un test d'import avec de la BSA-NLS (témoin positif d'import nucléaire) et de la BSA-NLSrev (témoin négatif d'import nucléaire). Dans les deux cas les noyaux sont marqués au DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole à 0,1µg/ml dans du PBS) pour vérifier leur forme, qui doit être sphérique.

On utilise 100 000 cellules en suspension par test d'import nucléaire.

Dans le cas des cellules adhérentes, le test d'import est réalisé immédiatement après la perméabilisation. Dans le cas des cellules en suspension, elles peuvent être congelées 30mn à -20°C puis stockées six mois à -80°C dans du tampon d'import supplémenté avec 5% de DMSO (vol/vol), à une densité de 10⁷ cellules/ml.

d) Préparation d'extraits de cytosol de cellules HeLa

Les extraits de cytosol sont utilisés lors des tests d'import nucléaire, ils apportent aux cellules perméabilisées les protéines nécessaires à l'import nucléaire telles que les importines, Ran, et NTF2. Ils sont préparés à partir de cellules HeLa cultivées en suspension à l'Institut Curie. Les cellules sont lavées 2 fois au PBS (4x10⁹ cellules dans 2x50ml de PBS) et placées à 4°C. Le culot de cellules est mis en suspension dans 2ml de tampon de lyse (HEPES 5mM pH 7,4 ; acétate de potassium 5mM pH7,4 ; acétate de magnésium 2mM ; EGTA 1mM ; DTT 2mM ; aprotinine, pepstatine, leupeptine et péfaboc 1µg/ml) qu'on laisse agir 10mn à 4°C. Le cytoplasme des cellules se charge de tampon de lyse, puis on casse mécaniquement 80% des cellules au potter : si la fraction de cellules cassées est plus importante l'extrait de cytosol peut être contaminé par des protéines et de l'ADN provenant du noyau cellulaire, si elle est moins importante la concentration en protéines de l'extrait obtenu n'est pas suffisante. Le volume V de cellules cassées est dilué dans 0,1V de tampon d'import concentré 10 fois (décrit dans le paragraphe précédent), puis l'extrait cellulaire est purifié par centrifugation 30mn à 40000g (4°C) puis 1 h à 100000 g. La concentration protéique de l'extrait est dosée à l'aide du kit BCA (Pierce), elle est comprise entre 13 et 15mg/ml. L'extrait est aliquoté dans des tubes refroidis et congelé à l'azote liquide, puis conservé 6 mois à -80°C.

Une alternative consiste à utiliser des lysats de réticulocytes de Lapin commerciaux (PROMEGA) dont la concentration en protéines atteint 60 mg / ml. Dans ce cas on dialyse le lysat 3 à 4h dans une cassette de dialyse Pierce de seuil de coupure 10kDa contre du tampon d'import à 4°C, on centrifuge le lysat 30mn à 100000g, 4°C et on évalue la concentration en protéines de l'extrait à l'aide du kit BCA (Pierce).

2. Tests cellulaires

a) Test de transfection

(1) *Introduction*

La transfection consiste à introduire de l'ADN exogène dans des cellules procaryotes (on parle plutôt de transformation bactérienne) ou eucaryotes, de manière à ce que l'ADN

s'exprime. Si l'ADN exogène s'est intégré dans le génome on obtient une lignée stable. Beaucoup plus fréquemment, l'ADN exogène reste épichromosomal et l'expression du gène est transitoire. Différentes techniques de transfection ont été décrites, les plus couramment utilisées étant la coprécipitation de l'ADN et du phosphate de calcium, la transfection avec des vecteurs de type DEAE-dextran ou liposomes cationiques (lipofection) et l'électroporation. Dans notre laboratoire, nous utilisons habituellement une lipopolyamine comme lipofectant, le RPR120535 dont la structure est donnée dans le paragraphe VI B 1 a (132), sous forme de micelles. Les propriétés physico-chimiques des complexes ADN / RPR120535 ont été largement décrites par Pitard et al (133) (134). On appelle diagramme de phases (figure 12) d'un complexe la courbe représentant le diamètre des particules en fonction du rapport de charges : moles de charges + / moles de charges -. Ce type de diagramme varie entre autres en fonction des conditions salines et du pH du milieu (135).

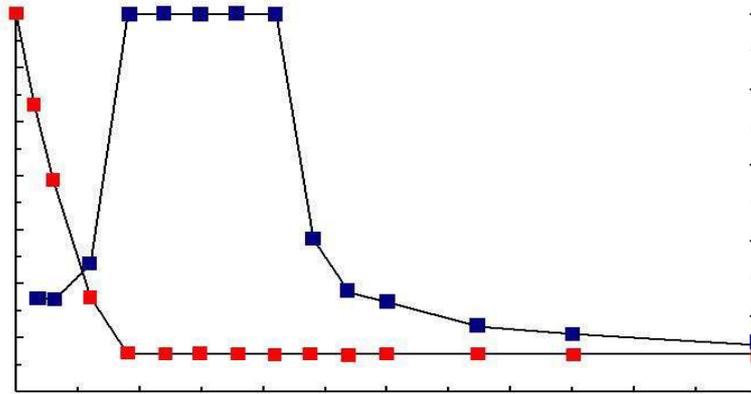


Figure 12 Diagramme de phase d'une lipopolyamine. La taille des particules varie en fonction du rapport nmole de lipopolyamine/ μ g d'ADN, plus simplement appelé rapport de charge. Ces tailles permettent de définir trois zones : zone A : petites particules anioniques, zone B : particules neutres de grande taille, zone C : petites particules cationiques.

Dans le cas du lipide RPR120535, le rapport de charges équivaut à 3/2 du rapport molaire de RPR120535 / plasmide et le diagramme de phases du complexe peut être découpé en trois zones : dans la **zone A** (rapports de charge entre 0 et 1) les complexes sont sous forme de petites particules (diamètre moyen 180nm) chargées négativement, des clichés de microscopie électronique montrent que l'ADN n'est pas totalement compacté par le lipide. Dans la **zone B** (rapport de charges entre 1 à 2) les particules sont globalement neutres, les complexes s'agrègent du fait de la diminution des interactions électrostatiques. Dans les diagrammes de phase, la courbe représentant la taille des particules en fonction du rapport de charge est coupée à 1000nm : les tailles des particules sont hétérogènes et trop importantes, l'appareil utilisé ne permet pas de les mesurer avec précision. Dans la **zone C** (rapport de charges > 2) les complexes sont sous forme de petites particules cationiques (diamètre autour de 80nm) et le plasmide est totalement compacté par le lipide. (134) (135).

La taille du plasmide utilisé n'affecte pas la structure des particules, si le rapport de charges est conservé.

Un protocole de lipofection comporte trois étapes. Dans un premier temps le plasmide peut être pré-compacté par un peptide ou une molécule cationique. Cette étape est facultative, le RPR120535 ayant lui-même la capacité de compacter le plasmide. Puis les complexes ADN / lipofectant sont formés par mélange volume à volume des deux composés, les complexes se stabilisent en 15mn. Selon le cas le tampon de complexation est du NaCl 150mM ou une

solution de NaCl 150mM / NaHCO₃ 20mM, cette solution est appelée solution de carbonate. Enfin les complexes obtenus sont dilués dans du milieu de culture avec ou sans sérum.

Il existe une corrélation entre la taille des complexes ADN / RPR120535 et l'efficacité de transfection. Quelle que soit leur formulation, les complexes de zone A ne sont pas efficaces. Les complexes de zone B sont efficaces *in vitro* quelle que soit leur formulation, mais leur grande taille interdit leur injection *in vivo*. Dans le cas des complexes de zone C formulés dans du NaCl 150mM, ils ne sont efficaces que quand ils sont dilués dans du milieu de culture sans sérum : les particules s'agrègent du fait de la force ionique du milieu de culture, mais les protéines du sérum modifient les interactions entre les particules et empêchent leur agrégation. Si les complexes sont formulés dans la solution de carbonate, le pH de la solution est voisin de 9. Dans ce cas les particules s'agrègent avant d'être diluées dans du milieu de culture avec ou sans sérum, on est en fait en présence de complexes de zone B et la transfection est efficace.

En résumé les conditions de transfection efficaces sont les conditions permettant l'agrégation des complexes : soit dans du milieu sans sérum, dans ce cas les complexes sont préparés dans une solution de NaCl 150mM et on ajoute 10% de sérum dans le milieu 2h après avoir déposé les complexes sur les cellules, soit dans du milieu avec sérum, dans ce cas les complexes sont préparés dans une solution de NaCl 150mM / NaHCO₃ 20mM.

Un agent endosomolytique peut être ajouté au milieu de culture dans lequel on dilue les complexes. Cet agent aura pour effet de déstabiliser la membrane de l'endosome et de permettre la libération du complexe dans le cytoplasme. C'est le cas de la chloroquine, ajoutée à une concentration de 150µM.

(2) Préparation des cellules

L'efficacité de transfection dépend du type cellulaire et de l'état des cellules. Les plasmides sont des macromolécules qui entrent dans les noyaux cellulaires majoritairement lors de la mitose, étape du cycle cellulaire où l'enveloppe nucléaire est disjointe. Il arrive que des plasmides pénètrent le noyau de cellules quiescentes mais ce phénomène est rare et négligeable par rapport à l'entrée massive lors de la division cellulaire.

Le test de transfection sera d'autant plus efficace que la fréquence de division des cellules sera grande, l'efficacité de transfection est très faible sur des cellules à confluence.

(3) Evaluation des résultats

Les résultats du test de transfection sont évalués 24 heures après le dépôt des complexes sur les cellules.

(a) Dosage de la luciférase

Le substrat du kit « Luciferase Assay System » (Promega) contient de la luciférine, qui est oxydée par la luciférase produite après transfection. Cette réaction d'oxydation s'accompagne d'émission de lumière pendant un temps très court. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et lysées 5mn à température ambiante sous l'action de 200µl d'un tampon de lyse commercial (Promega, 25mM Tris pH7,8 ; 2mM CDTA ; 2mM DTT ; 10% glycérol, 1% Triton X-100), le tapis cellulaire est gratté et centrifugé 5mn à 12000g. L'émission de lumière, reflet de l'activité de la luciférase, est quantifiée dans une plaque noire 96 puits sur 10µl du surnageant immédiatement après l'injection automatique de 50µl de substrat, grâce à un luminomètre Wallac Victor².

(b) Dosage de l'activité β-galactosidase

Le substrat galacton-star du kit « luminescent β-galactosidase detection kit » (Clontech) est clivé par la β-galactosidase en un anion dioxétane, qui se dégrade en produisant de la lumière.

Cette émission est amplifiée par le Sapphire II contenu dans le substrat. Le tampon de réaction contient un inhibiteur de l'activité β -galactosidase eucaryote endogène. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et lysées 5mn à température ambiante sous l'action de 250 μ l du tampon de lyse 100mM de tampon phosphate pH8, 1mM DTT, 0,2% triton X-100, le tapis cellulaire est gratté et centrifugé 2mn à 12000g. La luminescence de la β -galactosidase est quantifiée pendant 5s sur 30 μ l du surnageant de la lyse après incubation 1h à température ambiante avec 200 μ l du substrat du kit Clontech luminescent β -galactosidase detection kit.

Les quantifications sont normalisées par rapport à la concentration de protéines par puits, relief du nombre de cellules. La concentration en protéines est dosée sur 10 μ l de surnageant de la lyse des cellules dans une plaque transparente 96 puits : l'échantillon est réduit 30mn à 37°C par l'action de 10 μ l d'iodoacétamide 100mM dans un tampon Tris 100mM pH 8,2, car le DTT présent dans le tampon de lyse interagit avec le kit de dosage des protéines, puis dosé à l'aide du kit BCA (Pierce).

(c) Localisation du plasmide dans la cellule

Si on souhaite localiser de l'ADN plasmidique fluorescent après transfection, des lamelles ont été déposées dans les puits avant l'ensemencement des cellules. Après transfection, on lave les cellules deux fois avec du PBS, puis elles sont fixées sur les lamelles par action de paraformaldéhyde 3% (dans du PBS, pH 7,5), 15mn à température ambiante. Après deux lavages au PBS le noyau des cellules est marqué au DAPI (4, 6-diamidino-2-phénylindole à 0,1 μ g/ml) 15mn à température ambiante. Les lamelles sont lavées deux fois au PBS et une fois à l'eau puis montées sur des lames à l'aide de Mowiol (Hoechst). La fluorescence est visualisée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot.

b) Test d'import nucléaire sur cellules perméabilisées à la digitonine

Ce type de test peut être réalisé sur des cellules perméabilisées en suspension ou sur des lamelles. Dans le cas des **cellules en suspension**, on met en incubation 30mn à 30°C 100000 cellules avec 0,4 μ g de BSA-NLS dans du tampon d'import, en présence de 1 μ l de mélange énergétique (100mM ATP ; 100mM GTP ; 0,5M créatine phosphate ; 400u/ml créatine phosphokinase) et de 50% en volume d'extraits de cytosol de cellules HeLa ou de lysats de réticulocytes de lapin (RRL pour rabbit reticulocyte lysate). La fluorescence des cellules est visualisée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot, avec l'objectif X40 ou X100.

Dans le cas où on réalise un test d'import sur des **cellules perméabilisées sur lames**, on dépose la lamelle, cellules sur la face supérieure, sur un parafilm placé dans une boîte hermétique. On dépose la goutte (50 μ l) de BSA-NLS ou de plasmide fluorescent (5 μ g) préparés dans du tampon d'import supplémenté en énergie et extraits de cytosol ou LRL sur les cellules et on place la boîte dans un bain-marie à 30°C pendant 30mn. Puis la lamelle est lavée avec du PBS, les cellules sont fixées au PFA, les noyaux sont marqués au DAPI (0,1 μ g/ml). Pour monter les lamelles sur des lames, on utilise du glycérol à 50% (v/v) dilué dans du PBS auquel on a rajouté 2,5% (m/v) de DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, Sigma) pour limiter l'extinction de fluorescence. Dans ce cas le Mowiol n'est pas utilisé pour monter les lames car il endommage les noyaux des cellules perméabilisées.

Ce protocole a été modifié pour le **criblage de la banque** de plasmides aléatoires. Chaque groupe de plasmide est testé sur 1000000 de cellules, prétraitées 5mn à 30°C, avec 2mg d'ADN compétiteur (ADN de sperme de hareng) dans 1ml de tampon d'import. Les cellules sont récoltées par centrifugation 5mn à 210g, puis mises en incubation 30mn à 30°C avec 1 μ g d'un des groupes de plasmides de la banque, en présence de 2mg d'ADN compétiteur, de 10 μ l du système régénérateur d'énergie, de 30% du volume d'extraits de cytosol de cellules

HeLa. Les cellules sont lavées trois fois avec 5ml de tampon d'import contenant 5mg d'ADN compétiteur et décomptées.

Un nombre maximal de noyaux est lysé 30mn à 37°C par action de 75µl du tampon de lyse des noyaux pour 40000 cellules (tampon de lyse des noyaux : SDS 1,5% ; protéinase K 1,5mg/ml; 50µM EDTA ; 300mM NaCl dans du tampon Tris 50mM pH7,5). Les plasmides sont extraits par deux extractions phénol-chloroforme et précipités à l'éthanol puis les culots d'ADN sont mis en suspension dans 20µl d'eau. 100µl de bactéries DH5α compétentes sont transformées avec une fraction de cet extrait nucléaire.

c) Transfection par électroporation

Les impulsions électriques ont été délivrées par le générateur BIORAD gene pulser II.

Les cellules sont décollées de leur flacon de culture et comptées, puis centrifugées 5mn à 300g. Le culot est repris dans du milieu de culture supplémenté avec 15mM de tampon HEPES pH 7,5, à raison de 25000 cellules par µl de milieu (soit 5 millions de cellules par condition d'électroporation, dans 200µl de milieu). On place 200µl de cellules dans une cuvette d'électroporation avec électrode de 0,4cm, et on ajoute 50µl de solution d'ADN (5 à 10µg d'ADN dans 210mM de NaCl, avec 30µg d'ADN non codant de type ADN de sperme de saumon, qui sert « d'accompagnateur » du plasmide jusqu'au noyau cellulaire). La solution est homogénéisée et soumise à une impulsion électrique de 240V, 950µFD (ce qui correspond, dans ces conditions salines, à une impulsion de 0,4ms), puis très rapidement transférée dans 5ml de milieu supplémenté en HEPES. Les cellules sont centrifugées 5mn à 300g et remises en suspension avec 4ml de milieu complet, dont on dépose 2ml par puits d'une plaque 6 puits contenant des lamelles. Après 24h d'incubation, les cellules sont fixées au PFA et les lamelles sont montées sur des lames et observées au microscope.

Par cette technique, 60 à 80% des cellules expriment la GFP, mais on estime à 50% la perte de cellules durant l'impulsion électrique.

B. Techniques de biochimie et de biologie moléculaire

1. Etude des protéines

a) Dosage par le kit BCA

Le kit BCA (Pierce) s'appuie sur la méthode de dosage des protéines à l'acide bicinchoninique.

Les protéines réduisent les ions Cu^{2+} en ions Cu^+ en milieu alcalin (réaction de biuret), et l'acide bicinchoninique est chélaté par les ions Cu^+ . Le complexe obtenu absorbe fortement à 562nm, et cette absorbance est linéaire en fonction de la concentration de protéines, dans une gamme de 20 $\mu\text{g/ml}$ et 2000 $\mu\text{g/ml}$.

La réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^+ peut être entravée par la présence de DTT ou d'autres agents réducteurs. Dans le cas des dosages d'un volume V (en général 10 μl) de lysats cellulaire, on fait agir 30mn à 37°C un volume V d'iodoacétamide 100mM (préparé dans du tampon Tris 100mM pH 8,2) sur la gamme de protéines (en général c'est une gamme de BSA) et les échantillons. Cette étape permet de réduire le DTT pour qu'il n'interfère plus avec les substrats du kit. Puis on fait agir 30mn à 37°C 200 μl de réactif BCA et l'absorbance est mesurée à 562nm sur le spectrofluorimètre Wallac Victor². Les dosages sont effectués dans des plaques transparentes 96 puits.

b) Electrophorèse sur gel NuPAGE

Les gels NuPAGE (NOVEX) sont commercialisés par Invitrogen, le protocole d'utilisation est décrit par le fournisseur :

L'échantillon est dénaturé dans un tampon d'échantillon (tampon 4 X : sucrose 40% (p/v) ; 0,1M EDTA ; 0,5% SDS) 10mn à 70°C. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel et migrent 35mn (resp. 1h) à 200V (tampon de migration MES-SDS : 20X : 1M MES ; 1M Tris-base ; 69,3mM SDS ; 20,5mM EDTA, le pH du tampon 1X est ajusté à 7,3).

Les protéines sont détectées par coloration 30mn au bleu de Coomassie (0,1 % (p/v) bleu brillant R-250 Coomassie ; 20% méthanol ; 0,5% acide acétique) puis décoloration 2h à température ambiante (Ethanol 30%, acide acétique 5%).

Pour plus de sensibilité de détection, on peut colorer les gels au nitrate d'argent (136) :

Solution de coloration : ajouter goutte à goutte la solution A (0,6g de nitrate d'argent dans 4ml d'eau) à la solution B (0,19ml NaOH 10N + 1,8ml NH_4OH pur) avec agitation.

Solution de révélation : 52 μl d'acide citrique 2,3M + 0,25ml de formaldéhyde 38%.

Le gel est fixé 1h dans une solution de 50% de méthanol, puis coloré 15mn dans la solution de coloration. Après deux lavages de 5mn, les bandes de protéines sont révélées instantanément dans la solution de révélation. Le gel est rincé à l'eau et la révélation des bandes est stoppée dans une solution à 50% de méthanol.

Après avoir été assouplis 1h dans une solution à 7% d'acide acétique, 5% de méthanol et 1% de glycérol, les gels sont séchés 2h à 80°C dans un gel dryer 543, Biorad.

La taille des protéines est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille, soit le marqueur 12 (Novex), soit le marqueur SeeBlue Plus 2 (Invitrogen).

c) Analyse par chromatographie

La colonne utilisée pour l'analyse de peptides par chromatographie est une colonne de silice greffée en C18 monomérique de type VYDAC 238TP54.

Le seul peptide analysé par chromatographie est le peptide IBB. Il est retenu sur la colonne par des interactions hydrophobes, et élué par un gradient d'acétonitrile + 0,1% (v/v) TFA (acide trifluoroacétique). Le gradient d'éluion est le suivant (tableau 2) :

Temps (mn)	0	10	40	40, 1	45	45, 1	60
% A (eau + 0,08% TFA)	90	90	40	0	0	10	10
% B (MeCN + 0,1% TFA)	10	10	60	100	100	90	90

Tableau 2 Description du gradient d'élution du peptide IBB sur colonne de chromatographie de silice greffée en C18 monomérique. TFA : acide trifluoroacétique.

Le débit de tampons d'élution est de 1ml/mn, les peptides élués sont détectés par leur absorbance à 220nm, longueur d'onde à laquelle les liaisons peptidiques absorbent.

d) Test d'interaction protéine / protéine

Nous disposons au laboratoire de protéines hybrides importine α glutathion S-transférase (importine α -GST) et importine β glutathion S-transférase (importine β -GST). La partie GST de ces importines peut être couplée à une résine glutathion-Sépharose (Glutathione Sepharose 4B, Pharmacia Biotech).

On désigne par « résine sèche » la fraction solide de la résine.

La résine est disposée dans un tube Ependorff (30 à 45 μ l de résine sèche), et lavée deux fois avec 5 volumes (de résine) de PBS, puis une fois avec 3 volumes de tampon de fixation (HEPES 20mM, acétate de potassium 150mM, acétate de magnésium 2mM, DTT 2mM et casaminoacides 0,1%), et remise en suspension avec 1 volume de tampon de fixation.

On couple 1 μ g d'importine-GST pour 10 μ l de résine sèche par incubation 30mn à température ambiante avec agitation douce (vortex à 1000rpm). Après 5 lavages avec 5 volumes de tampon de fixation et centrifugation 2mn à 1000g, la résine est remise en suspension avec 1 volume de tampon de fixation. Le peptide ou la protéine dont on veut étudier l'interaction avec les importines est ajouté à cette suspension de résine, et mis en incubation 1h à température ambiante avec agitation. La résine est lavée avec 5 fois avec 5 volumes de tampon de fixation et le peptide interagissant avec les importines est élué par action 15mn à 80°C de 15 μ l à 30 μ l de tampon d'élution (SDS 0,1% ; 0,1M EDTA pH8) ou de tampon de charge pour gel NuPAGE.

e) Marquage d'un peptide avec le fluorophore FITC

Le fluorophore FITC (fluorescéine isothiocyanate) est commercialisé par Molecular Probes. Il se lie aux amines primaires des protéines, essentiellement sur les résidus lysine. La fluorescéine excitée à 488nm émet à 530nm.

Le protocole de marquage du peptide IBB est inspiré du protocole de marquage des anticorps au FITC.

Le FITC est dissout à 10mg/ml dans une solution de DMSO (la solution obtenue n'est pas stable et doit être utilisée immédiatement), que l'on dilue 50 fois dans une solution de bicarbonate (NaHCO₃) 10mM pH9. On ajoute cette solution de FITC goutte à goutte à la solution d'IBB sous agitation constante. L'essentiel du FITC réagit instantanément avec l'IBB, on laisse incuber 1h à température ambiante à l'obscurité puis on dialyse (membrane Spectra-Por CEA MWCO 2kDa, Spectrum) contre du tampon Hepes 50mM pH7,5. Le peptide marqué est dosé à l'aide du kit BCA, et la fluorescence de l'IBB-FITC est évaluée par rapport à une gamme de fluorescence de FITC non couplé, dilué dans le tampon Hepes 50mM pH7,5.

Après 7h de dialyse, les dosages indiquent que 4,3 moles de FITC sont fixées sur 1 mole d'IBB pour un excès initial de 18 moles de FITC par mole d'IBB. Il y a 9 lysines par IBB, on a donc fixé un FITC pour deux résidus lysine, il y a un FITC tous les 16 acides aminés.

2. Etude de l'ADN

a) Extraction phénol / chloroforme

Par cette technique, on élimine les protéines et les solvants organiques qui contaminent une solution de plasmide. Les protéines sont dénaturées par le phénol et se placent à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse.

On ajoute à un volume V de solution d'ADN le même volume V de la phase inférieure d'une solution de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25:4:1, saturé avec 10mM Tris pH8 ; 1mM EDTA) on vortexe et on centrifuge 3mn à 12000rpm, on récupère la phase supérieure, aqueuse. Alors que les deux phases sont claires, l'interface est trouble, elle contient toutes les protéines précipitées.

b) Précipitation à l'éthanol

On mélange un volume V d'une solution d'ADN avec V/10 d'acétate de sodium 3M pH3,9 et 2,5V d'éthanol pur à -20°C , on place ce mélange à -20°C une heure ou -80°C 30mn. L'ADN précipité est recueilli par centrifugation 10mn à 12000rpm. Le culot est dessalé par rinçage à l'éthanol 70% puis séché.

c) Dosage de l'ADN

(1) Dosage par absorbance à 260nm

Les noyaux aromatiques de la molécule d'ADN absorbent à 260nm. On estime qu'une densité optique de 1 correspond à une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin ou 30 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN simple brin. Cette méthode dose aussi la présence d'ARN et de protéines, la concentration d'ADN obtenue est donc surestimée. La pureté de l'ADN dosé est estimée par le rapport absorbance à 260nm / absorbance à 280nm : les protéines absorbent à 280nm et l'ADN à 260nm, si le ratio est proche de 1,8 l'ADN est pur. Si le ratio est plus faible c'est que la préparation est contaminée par des protéines.

(2) Dosage par l'intercalant Picogreen (Molecular Probes)

Le Picogreen s'intercale entre les bases de l'ADN, et émet de la fluorescence à 535nm après excitation à 485nm. Quand le Picogreen est intercalé dans de l'ADN double brin, il émet une fluorescence 1000 fois plus importante que la fluorescence obtenue quand il est intercalé entre les bases d'ADN simple brin ou d'ARN. La méthode de dosage par l'intercalant Picogreen permet d'obtenir la concentration d'ADN double brin en solution. Pour une même solution d'ADN, on obtient une valeur de la concentration plus forte par la méthode de l'absorbance à 260 nm que par la méthode de l'intercalant Picogreen.

La solution d'ADN est déposée dans le puits d'une plaque noire 384 puits, à raison de 15 μl par puits. On ajoute à chaque puits 15 μl de réactif Picogreen, dilué 200 fois dans du tampon Tris-EDTA (ou tampon TE : Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH8). L'émission de fluorescence à 535nm (excitation à 485nm, énergie de la lampe 11620) est mesurée 5mn après avoir ajouté le réactif, pendant 0,1s. La valeur mesurée est comparée à la fluorescence émise par une gamme de solutions d'ADN, de concentrations allant de 10 à 1000ng/ml. Cette technique, beaucoup plus sensible que la technique de la mesure de l'absorbance à 260nm, permet de doser de petites quantités d'ADN très diluées. En revanche la valeur de la fluorescence de l'échantillon doit être comparée avec les valeurs des fluorescences d'une gamme d'ADN de concentration connue. Nous disposons d'un plasmide témoin, pXL3031, qui a été dosé par chromatographie liquide haute performance par le service d'analyse d'Aventis pharma.

d) Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour séparer des fragments d'ADN et déterminer leur taille par comparaison avec des marqueurs appropriés.

Pour la séparation des plasmides, on utilise un gel d'agarose à 0,8% d'agarose (p/v) dans du tampon TBE (Tris base 50mM ; acide borique 50mM ; EDTA 1mM ; pH 8,3 ; Gibco BRL). Les échantillons sont préparés dans un tampon de charge pour gels d'agarose (40% (p/v) saccharose ; 0,1M EDTA pH8 ; 0,1% (p/v) SDS ; 0,05% (m/v) bleu de bromophénol) et déposés dans les puits du gel. Le gel est placé dans du tampon TBE dans une cuve d'électrophorèse à laquelle on applique une différence de potentiel de 70 à 100V pendant 15 à 30mn ; les fragments d'ADN migrent en fonction de leur taille et de leur conformation.

Le gel est coloré par immersion dans une solution de bromure d'éthidium 0,5µg/ml dilué dans du tampon TBE, et l'ADN est détecté sur une plaque UV : le BEt s'intercale entre les bases de l'ADN, l'ADN absorbe les rayonnements à 254nm et transmet l'énergie absorbée au BEt. De son côté, le BEt absorbe à 302 et 366nm, et émet toute l'énergie absorbée à 590nm, c'est à dire dans la région rouge / orange du spectre visible.

3. Préparation et modification de plasmides

a) Les plasmides utilisés

Les plasmides utilisés codent des gènes rapporteurs différents. Si on souhaite quantifier l'expression, on utilise un gène rapporteur qui code une protéine pouvant être dosée grâce à des méthodes biochimiques, c'est le cas de la luciférase ou de la β -galactosidase. Si on souhaite visualiser la protéine codée par le gène rapporteur on utilise plutôt le gène de la GFP (pour green fluorescent protein) détectable directement en fluorescence ou le gène de la β -galactosidase qui peut être détectée grâce à une méthode biochimique de coloration. Les différents plasmides utilisés au cours de cette thèse sont décrits dans le tableau 3.

Nom du plasmide	Gène rapporteur	Promoteur	Résistance à un antibiotique	Source (purification)
pXL3031	Luciférase (luc+)	CMV	Non	Aventis Pharma (chromatographie)
pXL2652	β -galactosidase	CMV	Ampicilline	C. Ciolina, Qiagen (megaprep)
pEGFP	Green fluorescent protein	CMV	Néomycine	Clontech

Tableau 3 Description des différents plasmides utilisés. CMV : cytomégalovirus.

Les plasmides utilisés en transfert de gènes non-viral sont constitués d'une cassette d'expression contenant le gène rapporteur et les séquences nécessaires à leur expression (promoteur, enhancer, polyA...). Ils contiennent un gène de résistance à un antibiotique, permettant que les bactéries qui le contiennent se multiplient sur un milieu sélectif contenant cet antibiotique, et une origine de répllication procaryote.

Les plasmides pCOR (plasmid with conditional origin of replication) sont issus d'une technologie développée par Aventis Pharma (137) pour réduire l'immunogénicité et les risques de dissémination des plasmides présentant un gène de résistance à un antibiotique. Le squelette de ces plasmides est constitué de trois éléments bactériens : l'origine de répllication conditionnelle R6K γ (*ori γ* ; 0,4kb), un gène codant un ARN de transfert suppresseur de codon stop (*sup Phe* ; 0,2kb), et un site de résolution des multimères de type *cer* (ColE1 resolution ; 0,4kb). Leur répllication n'est initiée qu'en présence de la protéine initiateur π de RK6, codée par le gène *pir*. La souche permettant la multiplication des plasmides de type

pCOR a été transformée par le gène *pir*. D'autre part cette souche présente une mutation ponctuelle de type ambre dans le gène *argE* impliqué dans la chaîne de biosynthèse de l'arginine, et ne peut pas se multiplier dans du milieu minimum sans arginine. Cette mutation peut être corrigée par l'ARN de transfert suppresseur codé par les plasmides pCOR, qui introduit une phénylalanine à la place du codon stop de la mutation ambre. Cette transformation conduit à l'expression de la protéine fonctionnelle présentant une mutation Tyr-Phe. La multiplication des bactéries contenant le plasmide pCOR est donc possible sur milieu minimum. Grâce à ce système les plasmides pCOR ne présentent pas de gène de résistance à un antibiotique, ne se multiplient pas dans une autre souche que la souche transformée par *pir*, qui elle ne se multiplie pas sans plasmides possédant le gène *sup Phe*. Le plasmide pXL3031, pCOR codant la luciférase (luc+), a été purifié par chromatographie par le service de développement d'Aventis Pharma et nous a été fourni sous forme lyophilisée, sa qualité est optimale (absence d'endotoxines, plasmides en grande majorité superenroulé).

b) Production et purification de plasmides

Ces méthodes de production et de purification ne concernent pas les plasmides de type pCOR, le plasmide pCOR luc+ (pXL3031) que nous avons utilisé a été produit et purifié par le service de production de plasmides d'Aventis Pharma.

Les bactéries dérivant de *E. coli* sont cultivées en aérobiose à 37°C, soit en milieu liquide avec agitation rotative (300rpm), soit en milieu solide. Le milieu Luria Bertani ou LB (1% (p/v) tryptone ; 0,5 % (p/v) extrait de levure ; 1% (p/v) NaCl ; pH7,5) et le milieu SOC (2% (p/v) tryptone ; 0,5% (p/v) extrait de levure ; 0,05% (p/v) NaCl ; 2,5mM KCl, pH7) sont commercialisés sous forme de poudre (Gibco BRL) qui est dissoute dans de l'eau et autoclavée. Pour obtenir le milieu solide, 15g/l de bacto-agar (Gibco BRL) est ajouté au milieu LB liquide.

Les plasmides présentent un gène conférant la résistance à un antibiotique à la souche dans laquelle ils se multiplient. On ajoute cet antibiotique au milieu de culture autoclavé (50µg/ml, solution stock à 50mg/ml dans de l'eau) pour sélectionner les clones possédant le plasmide. Dans le cas de plasmides codant la β -galactosidase, le réactif X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) est ajouté au milieu de culture (40µg/ml, solution stock à 40 mg/ml dans de la DMF), les clones possédant le plasmide sont reconnus par leur coloration bleue.

Les souches bactériennes sont stockées à -80°C dans leur milieu de culture supplémenté avec 20% (p/v) de glycérol.

Pour la production de plasmides, on réalise une pré-culture de la souche contenant le plasmide dans 10ml de milieu LB contenant les additifs appropriés (milieu LB complet). En trois à quatre heures à 37°C dans un agitateur rotatif, la pré-culture est saturée de bactéries, on prélève alors 1ml que l'on dilue dans 1 litre de milieu LB complet dans un flacon de culture de trois litres à bouchon respirant. Le flacon est mis en culture une nuit.

Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 1400g pendant 10mn et traitées avec le kit Promega Wizard Plus Megaprep DNA Purification System (PROMEGA) selon les recommandations du fournisseur : les bactéries sont remises en suspension puis soumises à une lyse alcaline. Le lysat est neutralisé et le précipité formé (constitué des débris cellulaires et des protéines) est éliminé par centrifugation. Le surnageant est purifié sur la résine Wizard Megaprep Purification Resin (PROMEGA).

La solution d'ADN obtenue est dosée par absorbance à 260nm et stockée à -20°C.

Pour préparer de petites quantités de plasmide, on utilise le kit Promega Wizard Plus Miniprep DNA Purification System dont le principe est le même que le kit Promega Wizard Plus Megaprep DNA Purification System.

Selon le protocole du fournisseur 3 à 5ml de bactéries sont recueillis par centrifugation 10mn à 1400g et lysées grâce à une solution de NaOH 0,2M, SDS 1%. Le lysat est déposé sur une

résine sur laquelle les plasmides restent fixés. La résine est lavée puis les plasmides sont élués avec de l'eau ou du tampon TE.

c) Transformation de bactéries

On appelle transformation bactérienne l'insertion d'ADN exogène dans des bactéries. Selon les recommandations du fournisseur, 100µl de bactéries « DH5α ultracompetentes » commerciales (Gibco BRL) sont placées dans un tube de culture bactérienne en présence d'une quantité de plasmide comprise entre 1 et 10ng. Ce mélange est mis en incubation 30mn sur de la glace, puis soumis à un choc thermique de 45s à 42°C. On ajoute alors 1ml de milieu de culture S.O.C (2g bactotryptone ; 0,55g extraits de levure ; 1mM NaCl ; 1ml KCl 1M dans 2ml d'eau ; ajouter 1ml du mélange MgCl₂ 1M et MgSO₄ 1M et 1ml de glucose 2M ; pH7 ; Gibco BRL) aux bactéries transformées, et on met en culture à 37°C dans un agitateur rotatif. Après une heure de culture, les bactéries sont étalées sur des boîtes de pétri de milieu LB-agar contenant des antibiotiques et / ou du X-gal selon le type de plasmide avec lequel on a transformé les bactéries. Seules les bactéries ayant intégré le plasmide se reproduisent sur ce milieu sélectif.

d) Marquage de plasmides à la rhodamine par photoactivation

Nous disposons au laboratoire d'une molécule associant la rhodamine à un tétrafluoroazoture, appelée **photoRed**. Par photoactivation 15 à 20mn à 365nm, l'azoture est activé en nitrène qui s'associe avec les groupements nucléophiles présents dans la solution (138).

On prépare une solution à 0,4mM de ce composé dans de la DMF et on le mélange avec un plasmide, au rapport de 1/1000 (mole de plasmide/mole de photoRed). On dépose ce mélange 50µl par puits dans une plaque transparente 96 puits que l'on place sur un bac de glace. On dépose la lampe UV sur la plaque et on photoactive 15 à 20mn à 365nm.

Le plasmide ainsi marqué, appelé plasmide-photoRed est purifié sur des colonnes Qiagen PCR Purification Kit pour éliminer le photoRed libre, selon le protocole du fournisseur : 1 volume de plasmide-PhotoRed est dilué avec 5 volumes de tampon PB et déposé sur les colonnes (10µg de plasmide par colonne au maximum). La colonne est lavée avec 750µl de tampon PE puis le plasmide est élué avec 50µl d'eau par colonne. Après récupération de tous les éluats des colonnes, le plasmide est précipité à l'éthanol et le culot est repris avec un volume d'eau assurant une concentration finale de plasmide de 1 à 2µg/µl. Le rendement de cette réaction est habituellement compris entre 75 et 100%.

Le plasmide photoRed obtenu est dosé par la méthode picogreen, et la fluorescence du plasmide est évaluée par rapport à une gamme de photoRed qui a subi la même photoactivation que le plasmide photoRed.

Le plasmide photoRed est stocké quelques semaines à -20°C.

e) Couplage d'un peptide à un plasmide

La réaction de couplage du peptide IBB à un plasmide est réalisée en deux étapes. Dans la première étape le peptide est couplé au TFPAM-6 grâce au thiol libre que présente la cystéine à son extrémité C-terminale.

La réaction entre le thiol libre et la partie maléimide du TFPAM-6 est spontanée à température ambiante et si le pH est compris entre 7 et 8.

Si le pH est inférieur à 7, la réaction n'a pas lieu, si le pH est supérieur à 8 le maléimide peut réagir avec d'autres groupes fonctionnels d'acides aminés de l'IBB. Le milieu réactionnel est tamponné à pH 7,5 : l'IBB est dilué à 100ng/µl dans du tampon HEPES 50mM pH7,5. Le TFPAM-6 est dissout dans du méthanol, et ajouté à la solution tamponnée d'IBB, au rapport molaire de 1 IBB / 50 TFPAM-6. Après une heure d'incubation à température ambiante, le produit de la réaction est dialysé 2h à température ambiante contre une solution d'HEPES

50mM pH7,5 sur une membrane de dialyse Spectra-Por CEA dont le seuil de coupure est 2kDa. L'IBB et l'IBB-TFPAM sont retenus par la membrane tandis que le TFPAM-6 et le méthanol sont éliminés.

Dans un second temps, l'IBB-TFPAM est couplé au plasmide. Par photoactivation la partie azoture du TFPAM-6 est activée en nitrène, qui réagit avec les groupements nucléophiles présents en solution, principalement ici les bases des nucléotides. Le plasmide et l'IBB-TFPAM sont mélangés à des ratios molaires définis, et les solutions sont disposées (50µl par puits) dans les puits d'une plaque transparente 96 puits. La plaque est déposée sur un bac de glace, de manière à éviter l'évaporation des échantillons provoquée par l'échauffement dû à la lampe. La lampe UV (365nm) est posée sur la plaque, à quelques cm des puits contenant les échantillons, la photoactivation dure 15mn.

Dans le cas où le peptide IBB interagit de façon électrostatique avec le plasmide, les expériences de retard sur gel ont été menées avec du peptide IBB et un plasmide dilués dans de l'eau, le complexe est analysé sur un gel d'agarose à 0,8% dans du TBE.

4. Construction d'une banque de plasmides aléatoires

On appelle banque de plasmides aléatoires la banque construite par insertion d'une séquence de nucléotides aléatoires dans un plasmide.

a) Synthèse et préparation de nucléotides

Les oligonucléotides suivants ont été synthétisés par un synthétiseur automatique (tableau 4) :

Nom	Rôle	séquence
11106	Oligonucléotides aléatoires	5' NNN...NNN ATCG GAATTC ATCGA 3' 1 à 35 nucléotides partie aléatoire site EcoRI partie fixe
11107	Amorce pour Klenow	5' TCGATGAATTCCGAT 3'
G3063	Sonde d'hybridation	5' ATCGGAATTCATCGAGGGTT 3'
11135	Amorce PCR (104-129 Tm 56,3)	5' GCCATTTACCGTAAGTTATGTAAACGC 3'
11136	Amorce PCR (7269-7295 Tm 53)	5' GGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC 3'

Tableau 4 Séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage de la banque de plasmides aléatoires. N : A (adénosine), T (thymidine), C (cytidine) ou G (guanosine).

(1) Purification, dosage des oligonucléotides simple brin

Les oligonucléotides sont purifiés par précipitation au butanol, et dosée par absorbance à 260nm (A_{260}). Leur concentration (en mM) est déduite selon la formule :

$$C = A_{260} / (35 \times 10,8 + 3 \times 11,7 + 3 \times 7,3 + 5 \times 15,4 + 4 \times 8,8)$$

(2) Hybridation de 11106 et 11107

On mélange 11106 et 11107 aux rapports molaires 11106 / 11107 = 1, 2 ou 3 (mol/mol), à raison de 500ng de 11106 dans 20µl final du tampon de la polymérase Klenow (tampon 10X : 500mM Tris-HCl pH7,2 ; 100mM MgCl₂ ; 1mM EDTA). Après 5mn d'incubation à 95°C, la température est diminuée progressivement : 0,2°C/mn pendant 6h30, dans un appareil à PCR. Le produit obtenu est stocké à -20°C.

(3) Synthèse du brin complémentaire aléatoire

L'oligonucléotide 11107 sert d'amorce à la polymérase Klenow, qui synthétise le brin complémentaire à la partie aléatoire de l'oligonucléotide 11106. On fait agir 30mn à 30°C 5 unités de l'enzyme (polymérase Klenow, Boehringer) pour 300ng d'oligonucléotides hybridés, en présence de 40 μ M de chacun des désoxynucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP. Pour éliminer l'enzyme et les désoxynucléotides n'ayant pas réagi et changer le tampon du milieu réactionnel, l'oligonucléotide est purifié sur une colonne de type micro-spin G25 (Pharmacia). Le résultat de l'hybridation est analysé sur gel TBE 20% (figure 13).

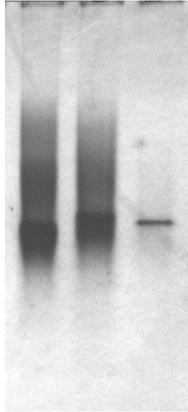


Figure 13 Analyse sur gel TBE (Novex) des oligonucléotides. Gel TBE 20%, migration 180V, 1h dans du tampon TBE, coloration à l'argent. 1 : 500 ng de 11106 ; 2 : 11106 et 11107 hybridés ; 3 : hybride 11106 / 11107 après synthèse du brin complémentaire par la polymérase Klenow et purification sur colonne microspin G25.

(4) Phosphorylation de l'oligonucléotide double brin

L'oligonucléotide double brin est phosphorylé par action 1h à 37°C de l'enzyme T4 PNK (Boehringer), à raison de 20u d'enzyme pour 450ng d'oligonucléotide en présence de 1mM d'ATP. Il est purifié par passage sur une colonne microspin G25 (Pharmacia).

b) Choix et préparation du plasmide pour le clonage

Le vecteur est le plasmide pXL2652, pCMV β -Gal AmpR (figure 14). C'est un plasmide de 7391pb, possédant un site de restriction unique pour l'enzyme SmaI (5' CCCGG 3').

Figure 14 Carte du plasmide pXL2652. pXL2652 est un plasmide codant la β -galactosidase sous dépendance du promoteur du cytomégalo virus (LacZ-polyA SV40). Il contient le gène de résistance à l'ampicilline (AmpR).

Le plasmide (20 μ g) est digéré 2h à 25°C par 1 unité pour 0,5 μ g de plasmide de l'enzyme SmaI. Le produit de la digestion est analysé sur gel d'agarose 0,8 % (figure 15) : la totalité du plasmide est linéarisé.

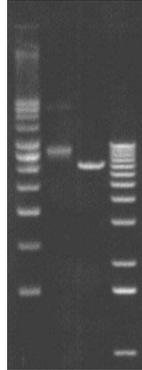


Figure 15 Analyse sur gel d'agarose de pXL2652 digéré par SmaI. Gel d'agarose 0,8%. S : marqueur d'ADN superenroulé ; 1 : pXL2652 non digéré ; 2 : pXL2652 digéré ; L : marqueur d'ADN linéaire 1kb.

Le plasmide linéarisé est déphosphorylé 30mn à 37°C par 1 unité de phosphatase alcaline de crevette.

Après chacune des étapes, le plasmide est purifié par deux extractions phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol.

L'efficacité de la déphosphorylation est analysée par ligature du plasmide sur lui-même et transformation de bactéries DH5 α compétentes avec le produit de la ligature. Selon la préparation de plasmide, aucune ou 20 à 30 bactéries poussent sur les boîtes de culture, signe que quelques plasmides se sont refermés sur eux-mêmes, la déphosphorylation n'est pas complète.

c) Ligature de l'oligonucléotide au plasmide

La ligature est réalisée par action une nuit à 16°C de 1 unité de ligase (Boehringer) pour 800ng de plasmide linéaire déphosphorylé, mis en présence de quantités croissantes d'oligonucléotide double brin (tableau 5) :

	Ligature 2	Ligature 3	Ligature 4	Ligature 5	Ligature 6
Plasmide	800g	800ng	800ng	800g	800ng
Oligonucléotide	2,5ng	5ng	10ng	25ng	100ng

Tableau 5 Description des conditions de ligature

On transforme de bactéries DH5 α compétentes (GIBCO BRL) avec 1 μ l du produit de ligature, les bactéries sont mises en culture sur boîtes de LB ampicilline X-gal. Les clones bleus qui apparaissent sur les boîtes après une nuit à 37°C ont intégré un des plasmides.

Une dizaine de clones sont analysés : le clone est piqué avec un cure-dents et les bactéries ainsi récupérées sont lysées 5mn dans 20 μ l d'eau. Une PCR est réalisée sur 10 μ l du produit de la lyse des bactéries : les amorces utilisées sont des séquences de 26 nucléotides complémentaires de séquences situées en amont et en aval du site de clonage (amorces 11135 et 11136 décrites précédemment).

La PCR est réalisée avec 1 unité de Taq Polymérase (Perkin-Elmer) en présence de 330nM de chaque amorce ; 1,25mM de MgCl₂ et 0,1mM de dATP, dCTP, dGTP et dTTP, dans un minicycler (MJ Research) avec le programme suivant (tableau 6) :

Etape	1	2	3	4	5	6	7
température	95°C	95°C	50°C	72°C	29 retours à l'étape 2	72°C	10°C
durée	5mn	15s	1mn	30s		2mn	

Tableau 6 Programme de PCR pour l'analyse des clones. La PCR est constituée de 30 cycles à la température d'hybridation de 50°C.

Le résultat est analysé sur gel d'agarose de type NuSIEVE 3%. Les fragments correspondants aux plasmides ayant intégré un oligonucléotide migrent moins que les fragments n'ayant pas intégré d'oligonucléotide (250pb).

Le produit de la PCR est purifié avec le kit PCR purification kit (Qiagen) et séquencé.

d) Production de la banque

(1) Amplification des clones bactériens

Le produit des transformations des bactéries DH5 α compétentes avec les ligatures est étalé et mis en culture une nuit sur des boîtes de LB-agar ampicilline et X-Gal.

Les clones obtenus sont piqués un à un et remis en culture sur une nouvelle boîte LB-agar ampicilline X-gal, à raison de cent clones par boîte. Cette étape permet d'obtenir un meilleur isolement des clones bactériens, limitant la sélection de faux positifs.

(2) Sélection des clones positifs

On appelle plasmide positif un plasmide ayant intégré une séquence aléatoire et clone positif un clone ayant intégré un plasmide positif.

La sonde G3063 est marquée par action 1h à 37°C de 10 unités de T4 PNK (Boehringer) en présence de 25 μ Ci de [γ^{32} P] ATP.

Une membrane de type HYBOND N+ (Amersham) est déposée sur chacune des boîtes de milieu LB-agar ampicilline X-gal sur lesquelles ont été cultivées les bactéries amplifiées. Les bactéries fixées sur la membrane sont dénaturées 15mn par l'action de la solution NaOH 0,5M / NaCl 1,5M ; la membrane est rincée et neutralisée par l'action d'une solution de Tris/HCl 0,5M pH8 / NaCl 1,5M. L'ADN est fixé sur la membrane par séchage 30mn à 37°C. Les boîtes de LB-agar ampicilline X-Gal sont remises en culture à 37°C.

La membrane est humidifiée dans l'eau et placée dans un cylindre d'hybridation contenant 3ml de rapid-Hyb buffer (Amersham), et placée 5mn à 42°C dans un four à hybridation (Staurt Scientific). La sonde G3063 marquée et l'ADN non spécifique (ADN de sperme de hareng, Sigma) sont dénaturés 5mn à 95°C et ajoutés à la solution d'hybridation dans le cylindre. L'ADN non spécifique permet d'éliminer les interactions non-spécifique entre la membrane et l'ADN bactérien. Membrane et sonde marquée sont mises en incubation 2h à 42°C dans le four à hybridation.

La membrane est lavée 2 fois à froid puis 2 fois 15mn à 42°C avec une solution de SDS 1% / SCC 6X, puis posée sur une feuille de papier Whatman, recouverte de film SARAN et placée dans une cassette de révélation (Hypercassette, Amersham) contenant un film de type Hyperfilm MP (Amersham). Après autoradiographie d'une nuit à -80°C le film est développé. Les clones révélés positifs sont piqués et mis en culture dans une plaque 96 puits contenant 100 μ l par puits de milieu LB ampicilline.

(3) *Pré-culture et stockage des bactéries positives*

Les plaques 96 puits contenant les bactéries sont mises en culture 4 heures à 37°C.

Une fraction de 10µl de ces précultures est transférée dans une plaque 384 puits contenant 50µl de LB ampicilline glycérol 50%, on ajoute 200µl de milieu LB ampicilline aux puits de la plaque 96 puits, qui est remise en culture jusqu'à saturation (au moins une nuit) à 37°C.

Des lots de clones sont constitués, les lots de plasmides sont purifiés à l'aide du kit Promega et regroupés en groupes de plasmides comme il est décrit dans le paragraphe IV B 2.

C. Techniques de physico-chimie

1. Formulations

a) Préparations de liposomes

Le RPR120535 est préparé au laboratoire selon le protocole décrit (132). Les lipides galactose sans espaceur polyéthylène glycol (PEG) nous ont été fournis par l'équipe de C. Monneret (Institut Curie) et les lipides PEG-galactose par l'équipe de F. Schuber (faculté de pharmacie de Strasbourg). La DOPE (1,2-dioléoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine) est commercialisée par Avanti Polar-Lipids.

Les lipides lyophilisés sont dissous dans du chloroforme et stockés dans des flacons hermétiques à 4°C (lipides galactosylés et lipide cationique) ou à -20°C (DOPE). Les concentrations des lipides dans les liposomes sont indiquées dans la partie résultats.

Les lipides sont mélangés dans un ballon de 10ml lavé et séché à l'azote. Le ballon est placé dans un bain-marie à 18°C et le chloroforme est évaporé lentement sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph VV2011). La pression est abaissée par paliers jusqu'à une pression légèrement supérieure à la pression d'ébullition du chloroforme, autour de 200mbar à 18°C. A cette pression le chloroforme s'évapore rapidement sans entrer en ébullition, ce qui permet que le film lipidique soit homogène et localisé dans le fond du ballon.

Pour évaporer le chloroforme, on effectue une série de diminutions de pression : on abaisse la pression de 20mbars et on attend que les vapeurs du chloroforme évaporé fassent remonter la pression jusqu'à la pression d'évaporation. Quand la pression est bien équilibrée, on réitère l'opération, et ce jusqu'à évaporation complète du chloroforme.

Les lipides forment alors un film lipidique homogène sur la paroi du ballon. Les dernières traces de chloroforme sont évaporées sous vide 30mn sur l'évaporateur rotatif, puis le ballon est transféré dans un dessiccateur, dans lequel le film lipidique est séché sous vide durant une nuit. Le film lipidique est réhydraté 24h à 4°C avec environ 400µl d'eau ppi (préparation pour injection, stérile et ne présentant pas de poussières).

On est alors en présence de grosses particules lipidiques, micelles ou liposomes multilamellaires, en suspension dans l'eau. Les liposomes unilamellaires de petite taille sont formés par apport d'énergie au système sous forme d'ultrasons (2mn à 4°C, 115V, 80W, 50-60Hz) grâce à un sonicateur G112SP1G, Laboratory Supplies Co., Hicksville, N. Y.

b) Préparation de complexes liposomes /ADN

Les complexes peuvent être préparés à différents rapports de charge, représentés par le ratio nmole de lipide cationique/µg d'ADN.

Pour les mesures de taille et de compaction de l'ADN par les liposomes (paragraphe III C 2 a et b), les complexes sont préparés à la concentration finale d'ADN de 10µg/ml dans 800µl. Les quantités de liposomes nécessaires pour former des complexes à 0,2 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8nmoles de lipide cationique/µg d'ADN sont dilués dans 400µl d'eau. 400µl de pXL3031

dilué dans une solution de NaCl 300mM sont ajoutés aux liposomes. Les complexes sont mis en incubation 1h à température ambiante.

2. Etude des caractéristiques physico-chimiques des liposomes

Ces études sont réalisées sur les liposomes seuls ou sur les complexes ADN / liposomes.

a) Mesures de taille

Les tailles des liposomes et des complexes ADN / liposomes sont mesurées par diffraction quasi-élastique de la lumière, sur un spectrophotomètre N4 Plus (Coulter). Les liposomes ou les complexes sont dilués 100 fois (8 μ l de liposomes dans 800 μ l) dans de l'eau ppi et placés dans des cuves de polystyrène de contenance 1ml. La taille des particules est mesurée 3mn aux angles de diffusion 30° (détection des particules de grande taille) et 90° (détection des particules de petite taille).

Dans le cas des complexes, on mesure la taille des particules aux rapports 0 ; 0,2 ; 0,6 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 et 8nmole de lipide cationique / μ g d'ADN, pour pouvoir tracer le diagramme de phases (taille des particules en fonction du rapport de charges).

b) Mesure de la compaction de l'ADN par expulsion du bromure d'éthidium

Après avoir mesuré leur taille, on ajoute du bromure d'éthidium concentré aux complexes ADN / liposomes à une concentration finale de 10 μ g/ml. Après avoir homogénéisé le contenu de la cuve, on mesure la fluorescence de cette solution pendant 5s à 590nm après excitation à 260nm, à l'aide d'un fluorimètre Fluoromax 2 (Jobin Yvon-Spex). La fluorescence est exprimée en pourcentage de l'émission de fluorescence d'ADN seul mesurée dans les mêmes conditions.

c) Mesures de potentiel Zêta

Le potentiel zêta est une approximation du potentiel de surface des particules. C'est une mesure de la densité de charge au niveau de la surface de frottement hydrodynamique de la particule dans le milieu (la surface au niveau de laquelle la particule, quand elle se déplace, n'entraîne plus les ions du milieu environnant, c'est à dire la surface séparant le milieu stationnaire et la particule entourée de sa couche d'ions et de solvant). Cette densité de charge est légèrement inférieure à la densité de charge à la surface de la particule. Plus le potentiel zêta est fort, plus les particules se repoussent, plus la suspension de particules est stable. Si la charge diminue, la répulsion électrostatique des particules entre elles diminue et les particules s'agrègent.

Les liposomes sont dilués au 1/20^{ème} dans une solution de NaCl 20mM. Les complexes sont dilués au 1/5^{ème} dans une solution de NaCl 150mM et 2,5ml de ces dilutions sont injectées dans un zetasizer 3000 HS_A (Malvern instruments). Le potentiel zêta de la suspension est mesuré 5 fois à 25°C pendant 20s.

3. Test de l'accessibilité des résidus galactose à la surface des liposomes et des complexes

La lectine RCA₁₂₀, agglutinine de ricin (MW 120kDa) a une affinité très forte pour le galactose, en particulier le β -galactose. En présence de liposomes galactosylés ou de complexes ADN / liposomes présentant des résidus galactose à leur surface, le complexe lectine / ADN / liposome précipite. Cette précipitation peut être suivie par mesure de l'absorbance à 450nm.

a) Préparation des liposomes et des complexes ADN / liposomes pour les tests d'agrégation

Dans le cas de la mesure de l'agrégation de la lectine par les liposomes seuls, on dilue les liposomes 10 fois dans une solution de NaCl 150mM, Hepes 5mM pH7,4.

Dans le cas de l'agrégation des complexes ADN / liposomes, les liposomes sont dilués dans de l'eau et l'ADN (plasmide pXL3031, pCOR luc+) dans une solution de NaCl 300mM, aux concentrations finales de 12,5 et 25 μ M de glycolipide, aux rapports lipide cationique/ADN :

- Zone A : 0,4nmol lipide cationique/ μ g d'ADN, 12 μ M de glycolipide
- Zone B : 1nmol lipide cationique/ μ g d'ADN, 12 μ M et 25 μ M de glycolipide
- Zone C : 6nmol lipide cationique/ μ g d'ADN, 12 μ M et 25 μ M de glycolipide

b) Agrégation de la lectine

On place 2 fois 400 μ l des complexes ADN / liposome dans les puits d'une plaque 96 puits transparente, et on ajoute 10 μ g de lectine RCA dans un des deux puits, le deuxième servant de témoin d'absorbance des complexes à 450nm. L'augmentation de l'absorbance est mesurée 10 fois, toutes les deux minutes grâce à un luminomètre Wallac Victor², et déduite de la valeur du témoin.

La réversion de l'agrégation est mesurée par ajout d'une solution aqueuse de galactose à la concentration finale de 0,1M par puits.

IV. Stratégie d'amélioration du transport de plasmides au noyau cellulaire

A. Introduction

Les plasmides, introduits dans une cellule à l'aide d'un vecteur viral ou non-viral, diffusent peu ou pas dans le cytoplasme où ils sont progressivement dégradés par les nucléases cytoplasmiques. La probabilité qu'ils traversent l'enveloppe nucléaire est très faible. Ils n'atteignent donc pas le noyau cellulaire et ne peuvent pas s'exprimer.

Les virus ont développé des techniques pour permettre à leur génome d'atteindre le noyau de la cellule hôte et de s'y exprimer : le génome viral est souvent escorté par des protéines de la capsid jusqu'à l'enveloppe nucléaire et il est admis que les séquences de localisation nucléaire de ces protéines de capsid permettent au complexe génome viral/protéine de capsid de traverser l'enveloppe nucléaire.

Certaines protéines possèdent la capacité d'entrer dans le noyau de par leur séquence de localisation nucléaire et de se fixer sur un site précis du génome. C'est le cas du facteur de transcription SRF (serum response factor) qui possède une séquence de localisation nucléaire et qui se fixe sur le domaine CA_{rg}/SRE du promoteur SMGA (smooth muscle gamma actin) dans les cellules musculaires lisses. Des études récentes ont consisté à intégrer dans le squelette du plasmide la séquence d'ADN permettant la liaison d'une de ces protéines sur l'ADN génomique et à étudier le transport du plasmide escorté par cette protéine (87, 88).

Ces études découlent de l'observation de Dean et al. pour qui la présence de la séquence promoteur/enhancer précoce de l'antigène T de SV40 permet d'augmenter l'efficacité d'import nucléaire de plasmides *in vitro* et *in vivo*. L'hypothèse permettant d'expliquer cette augmentation est que cette séquence fixe un facteur de transcription ubiquitaire dans le cytoplasme de la cellule, et que ce facteur de transcription escorte le plasmide jusqu'au noyau cellulaire (83, 85).

Nous avons cherché à identifier des séquences nucléotidiques susceptibles d'interagir avec des protéines importées dans le noyau cellulaire, aussi appelées protéines karyophiles. Ces protéines karyophiles pourraient alors escorter les plasmides contenant ces séquences nucléotidiques dans le cytoplasme jusqu'aux noyaux cellulaires.

Notre stratégie a consisté à construire une banque de plasmides présentant une séquence de 35 nucléotides aléatoires et à tester ces plasmides sur différents modèles cellulaires pour évaluer la capacité des séquences qu'ils contiennent à établir des interactions avec des protéines cytoplasmiques et à terme à diffuser dans le cytoplasme et à pénétrer plus facilement le noyau cellulaire.

B. Mise en place d'une la banque de plasmides aléatoires

1. Analyse du clonage

Le clonage a consisté à lier le plasmide pXL2652 préalablement digéré par l'enzyme SmaI juste avant la séquence du promoteur du CMV et la cassette d'expression LacZ, avec un mélange d'oligonucléotides présentant une partie fixe de 15pb, et une partie de 35pb synthétisée aléatoirement (figure 16). L'oligonucléotide n'ayant pas été purifié après sa synthèse, sa longueur est comprise entre 15 et 50 paires de bases.

Figure 16 Stratégie du clonage de la banque de plasmides aléatoires. Un oligonucléotide synthétique comprenant une partie fixe de 15 nucléotides et une partie aléatoire de 1 à 35 nucléotides est ligaturé avec le plasmide pXL2652.

a) Rendement du clonage

La densité de clones obtenus après ligature du plasmide avec l'oligonucléotide dépend de la quantité d'oligonucléotides mise en présence de 800ng de plasmide (tableau 7):

	Ligature 0	Ligature 1	Ligature 2	Ligature 3
Oligonucléotide	0	10ng	25ng	100ng
Nombre de clones	34	51	135	107

Tableau 7 Nombre de clones obtenus après transformation de E. Coli DH5 α compétentes avec le produit de la ligature. 800ng de plasmides pXL2652 sont ligaturés avec des quantités croissantes d'oligonucléotides aléatoires. Après transformation de bactéries DH5 α compétentes avec le produit de la ligature, les clones poussant sur boîte LB-agar-Xgal sont dénombrés.

Une dizaine de clones ayant poussé sur les boîtes correspondantes aux ligatures 1, 2 et 3 sont analysés par PCR avec les amorces 11235 et 11236, correspondantes aux séquences (104-129) et (7269-7295) du plasmide pXL2652 (figure 14). Si le clone contient un plasmide n'ayant pas intégré de séquence aléatoire, la taille du fragment de PCR est 250pb. Si le clone contient un plasmide ayant intégré une séquence aléatoire, la taille du fragment de PCR est supérieure à 250pb (250pb + taille de l'insert). Les produits de PCR sont analysés sur gel d'agarose de type NuSIEVE (figure 17). On appelle les clones ayant intégré un plasmide les clones « positifs ».

Le clone 6 de L1, les clones 3, 5 et 6 de L2 et les clones 9 et 10 de L3 semblent avoir intégré un oligonucléotide, puisque la taille du produit de PCR est légèrement supérieure à la taille du produit des autres PCR.

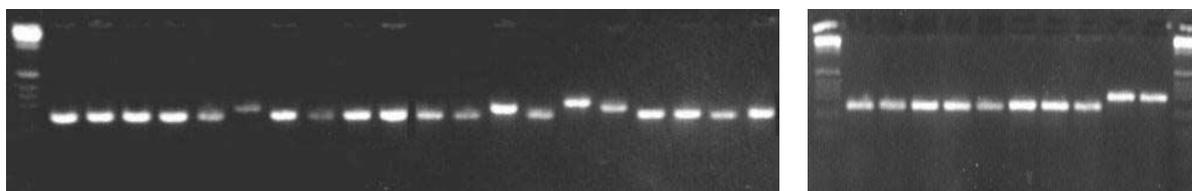


Figure 17 Analyse par PCR de 10 clones par boîte de culture. Gel d'agarose NuSIEVE 3%. L : marqueur de taille ; 1 à 10 : 10 clones analysés ; L1, L2 ou L3 : fragment obtenu après PCR des clones issus de la transformation de E.Coli DH5 α compétentes avec les produits de la ligation n°1, 2 ou 3.

Il semble que le rendement de ligation soit de l'ordre de 20 à 30% et ne dépende pas de la quantité d'oligonucléotides mis en présence du plasmide.

b) Analyse des séquences intégrées

Au total 3x96=288 clones ont été analysés par PCR et séquencés, 84 présentent un oligonucléotide aléatoire, soit environ **30 % de clones positifs**. Les détails de l'analyse des tailles des séquences intégrées sont présentés dans le tableau 8. Les oligonucléotides aléatoires ont été insérés dans les plasmides sans être purifiés, leur longueur est donc comprise entre 1 et 50pb si un seul oligonucléotide aléatoire a été intégré, plus longs si plusieurs oligonucléotides ont été intégrés.

	Nombre de clones	Pourcentage de la population
Nombre total de clones testés	288	
Clones positifs	84	29%
35 nucléotides aléatoires	35	43%
>35 nucléotides aléatoires	5	6%
<35 nucléotides aléatoires	43	51%

Tableau 8 Analyse de la taille de 3x96 clones produits par ligation d'une séquence d'oligonucléotides aléatoires dans le plasmide pXL2652. Les fragments de taille supérieure à 250pb obtenus après PCR ont été séquencés.

Parmi les clones positifs, la moyenne de longueur de la partie aléatoire de l'oligonucléotide est **25 nucléotides**. Quelques séquences sont présentées dans le tableau 9. La séquence des oligonucléotides intégrés est effectivement aléatoire.

Quelques plasmides ont intégré deux (3 plasmides sur les 84 positifs soit 4%) ou trois oligonucléotides (1 plasmide sur les 84 positifs soit 1,2%) : lors de la ligation la probabilité qu'un plasmide intègre plusieurs oligonucléotides est faible mais n'est pas nulle.

Séquence	Nombre de nucléotides
TCGATGAATTCCGATGCGCGAAAT	9
TGTGAAGCTCAACGTAGCACCGTGCACAGACCAGAAATCGGAATTCATCGA	35
TCGATGAATTCCGATCAAAACATACCTCGCAG	17
CACGTTTATGCCAGTCGGGTCTCTTGCATACGCTGATCGGAATTCATCGA	35
TCGATGAATTCCGATAACTAAAAGAGCAGGAATGCTCCTTTGC	28
TCGATGAATTCCGATGCGCTCCATTAAATTATGCACCAACAACATACCCC	35
TCGATGAATTCCGATCTGGCTGGTCTATACCATTTGCACCTTAAATATCC	35
GATTTTCGACTGATCTCTTCACTTTGTACTGCTATATCGGAATTCATCGA	35
TCGATGAATTCCGATCCACACATCCTCCCCAGTGGTTCGAGTTATCCACT	35
TCGATGAATTCCGATCCCCAATACCTTACGTACTTGAAACCCG	31
TCGATGAATTCCGATGACCGCTCATTAGGGTCTTCCA	22
TCGATGAATTCCGAT	0
TATCGAACTAAAATCGGAATTCATCGA	12
CTACTGCAATCGGAATTCATCGA	8
CGATCACGTAGTGCCGGATAGATCGGAATTCATCGA	21
TGGGGATCGGAATTCATCG	5
TCGATGAATTCCGATCCCGCACAGGCACACTCCCTTACCCCCTATTAGGG	35
CGCTCCTGTTCGAGGCGCGCACCCCAGTGTGCCATCGGAATTCATCGA	33
TCGATGAATTCCGATAAGGCGGTACGTCTATAAGTGATGCTATAAGCAAC	35
TCGATGAATTCCGATGGAGCATTCGCGCCGGTATGCTTAACACTCACAAG	35
TCGATGAATTCCGATATCTGATTAACGGGTTCCAATTGAACTCCCAATCG	35
TCGATGAATTCCGATCATTCTTACGTCTGTGACACACCAGGCCCTAGTCC	35
TCGATGAATTCCGATACTGACCCCCACAAGTCACCCAGGATAATAACATT	35
TCGATGAATTCCGATACTTGGCATGTCTCGAGTCTCGCTTGTCAACGTT	35
TCTTTTGAAGTAGGATGATATCGGAATTCATCG	19
TCGATGAATTCCGATCTCCTCAGACCCGGATATAACCGATCGTACAATCC	35
TCGATGAATTCCGATCGTAATTTGGAA	12

Tableau 9 Quelques séquences d'oligonucléotides insérés dans les plasmides. En vert ou rouge : partie fixe des oligonucléotides suivant qu'il est inséré dans le plasmide en sens direct ou inversé. En noir : partie aléatoire. A : adénosine, C : cytidine, T : thymidine, G : guanosine.

2. Préparation des « lots » et des « groupes » de plasmides

Nous avons isolé entre 8100 et 8200 clones, que nous avons répartis dans 86 plaques 96 puits notées AB et 1 à 85 (certaines plaques ne sont pas totalement remplies). La plaque 96 puits n°4 a été scindée en deux plaques : 4-C1 (plaque 4 sans la colonne 1, contenant 96-8=88 clones) et 4C1 (plaque 4, colonne 1, contenant 8 clones). Chaque puits contient un clone (éventuellement deux, l'isolement n'étant pas toujours convenable) dans 200µl de milieu de culture, la culture a été menée jusqu'à saturation.

Pour chaque plaque 96 puits, le même volume de chaque puits de la plaque sont regroupés et les plasmides contenus dans cette culture sont purifiés. Ces solutions de plasmides aléatoires sont appelées les lots de plasmides aléatoires (figure 18). La concentration en ADN de chacun des 86 lots de 96 plasmides aléatoires est déterminée par la méthode Picogreen et les lots sont stockés à 4°C. La moyenne de ces concentrations est de 270ng/µl, les valeurs étant comprises entre 70 à 600ng/µl, du fait du manque de reproductibilité dans les minipréparations des lots de plasmides.

Figure 18 Préparation des groupes de plasmides aléatoires en vue du criblage de la banque. Les clones positifs sont isolés dans des plaques 96 puits, mis en culture, puis les clones sont regroupés plaque par plaque, formant les lots de clones. Les **lots de plasmides** sont purifiés à partir de ces lots de clones. Les lots de plasmides sont regroupés par 12 pour former les **groupes de plasmides**.

Les lots de plasmides sont regroupés par 12 pour former 7 **groupes de plasmides aléatoires** (figure 18) : chaque groupe contient 500ng de chacun des 12 lots de plasmides aléatoires. On dispose donc de 6µg de mélange de plasmides de chaque groupe, dans un volume variable, dont on déduit les concentrations des groupes, présentées dans le tableau 10.

	Plaques 96 puits (lots de 96 plasmides) utilisées	Nombre de plasmides	Concentration du groupe	Volume du groupe
groupe 1	Lot AB et lots 1 à 11	1152	56ng/µl	107µl
groupe 2	lots 12 à 24 (pas de lot 13)	1152	85ng/µl	71µl
groupe 3	lots 25 à 36	1152	104ng/µl	57µl
groupe 4	lots 37 à 48	1152	87ng/µl	69µl
groupe 5	lots 49 à 60	1152	111ng/µl	54µl
groupe 6	lots 61 à 73 (pas de lot 71)	1152	75ng/µl	80µl
groupe 7	lots 74 à 85	1152	110ng/µl	55µl

Tableau 10 Analyse des groupes de plasmides.

Chaque groupe contient théoriquement 1152 clones (soit 12 lots de 96 plasmides, nombre obtenu si les plaques 96 puits contenant les clones (lots de clones) sont totalement remplies). On considère que chaque clone n'a été transformé que par un plasmide. Chaque culture doit présenter approximativement le même nombre de copies de chaque plasmide, puisque les clones ont été cultivés séparément et jusqu'à saturation de la culture bactérienne. On estime donc avoir approximativement le même nombre de copies de chaque plasmide dans le lot de plasmides.

C. Criblage de la banque de plasmides aléatoires sur cellules HeLa perméabilisées à la digitonine

Le système des cellules perméabilisées à la digitonine (139) représente un modèle de noyaux sur lequel ont été étudiés les processus d'import et d'export nucléaire de protéines. Dans le cas de l'import nucléaire des plasmides de la banque aléatoire, l'étude comporte plusieurs étapes :

- Les noyaux sont mis en présence des groupes de plasmides de la banque (test d'import)
- Les noyaux sont lavés pour éliminer les plasmides collés à l'enveloppe nucléaire et au « fantôme de cytoplasme »
- L'ADN des noyaux, contenant potentiellement un des plasmides de la banque, est extrait
- Des bactéries E.Coli DH5 α compétentes sont transformées avec cet extrait nucléaire.

Le nombre de clones bleus obtenus après étalement du produit de la transformation est proportionnel au nombre de plasmides entrés dans le noyau des cellules perméabilisées.

1. Validation de la méthode de criblage

Lors de la mise en place de la méthode de criblage, le résultat s'est révélé biaisé par la présence de plasmides qui interagissent avec le « fantôme de cytoplasme » et l'enveloppe nucléaire. Le protocole de test d'import sur des cellules perméabilisées à la digitonine (139) a dû être modifié pour le criblage de la banque de plasmides aléatoires. Nous avons mis au point une méthode de lavage des enveloppes nucléaires avec un ADN compétiteur (ADN de sperme de saumon purifié simple brin, Sigma) permettant de limiter ce biais.

a) Détermination du nombre de lavages des enveloppes nucléaires

Nous avons évalué, qualitativement et quantitativement, le nombre de lavages de l'enveloppe nucléaire nécessaires pour n'observer qu'un bruit de fond minimal (figure 19). Ces tests ont été réalisés avec le plasmide pXL2652 dont on sait que la probabilité de pénétration dans le noyau cellulaire est pratiquement nulle.

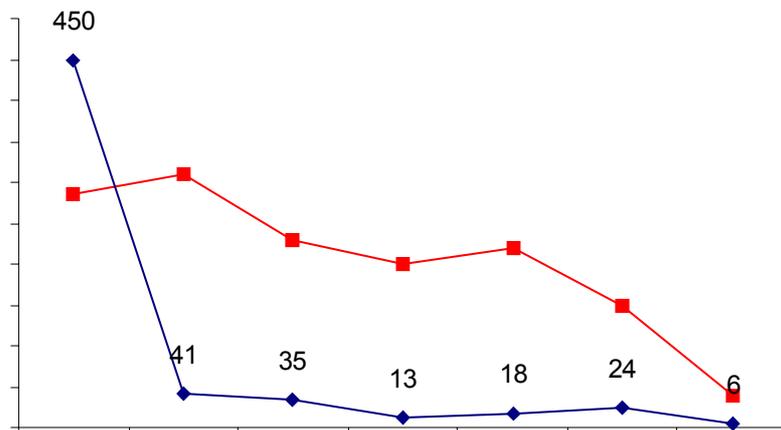


Figure 19 Evolution du nombre de cellules HeLa perméabilisées à la digitonine et du nombre de clones après transformation de E.Coli DH5 α compétentes avec le lysat des noyaux des cellules perméabilisées après test d'import, en fonction du nombre de lavages. AL : avant lavage ; Li : lavage i (i allant de 1 à 6). Carrés rouges : nombre de cellules HeLa perméabilisées à la digitonine ; losanges bleus : nombre de clones. Les chiffres en noir sur le graphique indiquent le nombre de clones.

L'incubation des cellules perméabilisées à 30°C pendant 30mn conduit à une perte importante de cellules : il ne reste que $2,9 \times 10^6$ cellules/ml avant les lavages (courbe rouge de la figure 19, colonne « AL ») au lieu des $4,8 \times 10^6$ cellules/ml avant la mise en incubation.

Entre le premier et le 6^{ème} lavage la concentration en cellules diminue de plus de la moitié : de 3×10^6 cellules/ml elle passe à $1,2 \times 10^6$ cellules/ml. La perte de cellules est équivalente si les lavages sont réalisés à 4°C plutôt qu'à température ambiante et si le test d'import est réalisé avec des lysats de réticulocytes de lapin plutôt qu'avec des extraits de cytosol de cellules HeLa, qui apportent aux cellules la machinerie cytoplasmique nécessaire à l'import nucléaire.

Le nombre de clones obtenus après transformation est fortement diminué après 1 lavage : on a éliminé la plupart des plasmides interagissant de façon non-spécifique avec les enveloppes nucléaires et les fantômes de cytoplasme. Après 2 autres lavages, le nombre de clones diminue un peu et semble se stabiliser à une valeur seuil, entre 20 et 30 clones. Davantage de lavages conduit à une perte encore plus importante de cellules.

Qualitativement, si on réalise le test avec un plasmide fluorescent marqué à la rhodamine par photoactivation (méthode décrite dans le paragraphe III B 3 d), la fluorescence des enveloppes nucléaires diminue considérablement lors des lavages. Après 5 lavages, on a éliminé presque tous les plasmides collés à l'enveloppe nucléaire (figure 20):

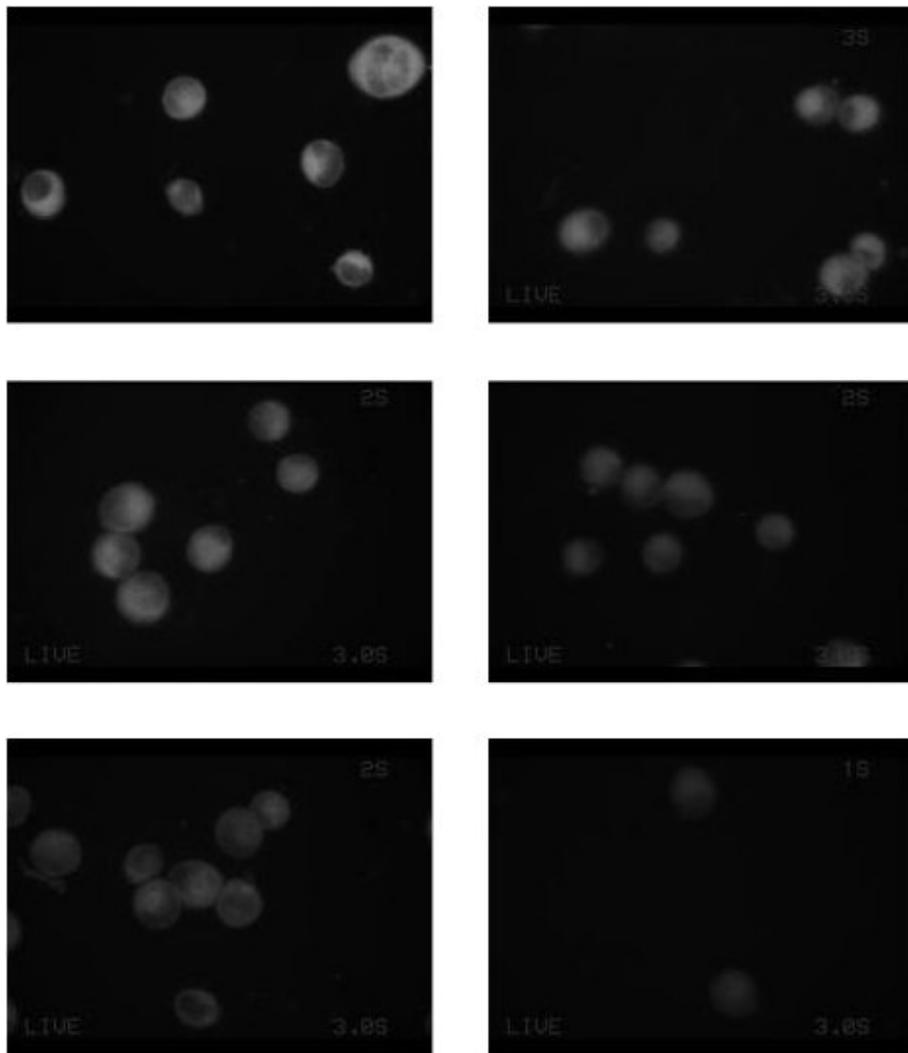


Figure 20 Evolution de la fluorescence des cellules perméabilisées en fonction du nombre de lavages avec un ADN compétiteur. Les cellules HeLa perméabilisées à la digitonine ont été mises en présence d'un plasmide fluorescent marqué par photoactivation. Après test d'import, les cellules perméabilisées sont lavées en présence d'ADN compétiteur et visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Le nombre de lavages des cellules perméabilisées après incubation est arbitrairement fixé à trois : ce nombre correspond au point pour lequel la perte de cellules est encore raisonnable, le bruit de fond du nombre de clones semble stabilisé à une valeur comprise entre 20 et 30.

Avec une telle perte de cellules, la méthode de criblage sur cellules perméabilisées à la digitonine doit s'accompagner d'un décompte systématique des cellules restantes après les lavages. L'ADN est alors extrait des noyaux d'un nombre maximal de cellules perméabilisées qui est le même quel que soit le groupe de plasmides testés.

b) Validation de la méthode d'extraction des plasmides du noyau

L'électroporation de 5 millions de cellules HeLa avec 5 μ g de plasmide pEGFP (voir matériel et méthodes) conduit à une expression de la GFP dans 50 à 70% des cellules, 24 heures après l'électroporation (figure 21). L'électroporation dans ces conditions constitue donc une méthode permettant l'entrée du plasmide dans le noyau des cellules.

Dans les témoins négatifs d'électroporation (électroporation sans ADN puis mise en contact des cellules avec 5 μ g de plasmide codant la GFP ; mise en contact de 5 μ g de plasmide avec les cellules sans électroporation) on n'observe pas d'expression de la GFP.

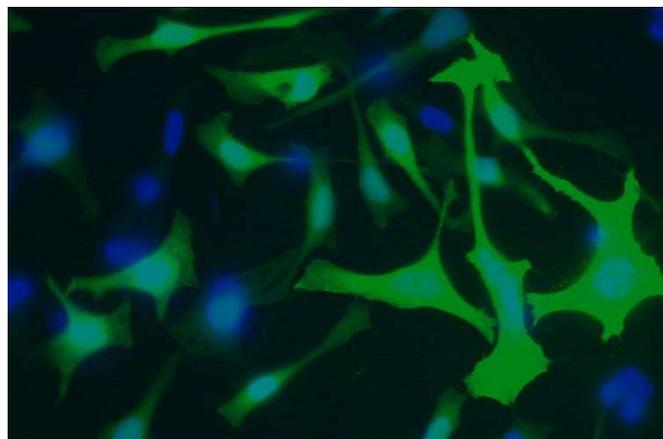


Figure 21 Expression de la GFP après électroporation de cellules HeLa. 5 millions de cellules HeLa ont été électroporées en présence de 5 μ g de plasmide pEGFP (Clontech) et mises en incubation 24h, puis visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Nous avons électroporé 5 millions de cellules HeLa en présence de 5 μ g de plasmide codant la β -galactosidase. Après 24 heures les cellules sont perméabilisées à la digitonine, les noyaux lavés en présence d'ADN compétiteur, puis l'ADN des noyaux est extrait et des bactéries DH5 α compétentes sont transformées avec cet extrait nucléaire. L'extraction des noyaux d'un million de cellules électroporées conduit à l'obtention de **670 clones** après un lavage des enveloppes nucléaires et **630 clones** après deux lavages, alors qu'on n'obtient que 10 à 20 clones à partir de cellules non électroporées.

L'électroporation a permis l'entrée des plasmides dans le noyau des cellules, ces plasmides peuvent être extraits des noyaux et conduisent à la croissance de clones sur milieu sélectif après transformation de bactéries DH5 α compétentes.

On considère que la méthode d'extraction des plasmides des noyaux des cellules HeLa permet de détecter des plasmides qui sont entrés dans le noyau cellulaire.

c) Calcul théorique : nombre de plasmides mis en contact avec chaque noyau

On dépose 1 µg de chaque groupe de plasmides sur 1 000 000 de cellules HeLa perméabilisées à la digitonine.

1 µg de plasmides de taille moyenne 7,4 kbp représente 0,2 pmole, soit $1,2 \times 10^{11}$ molécules, c'est à dire 120 000 molécules de plasmides par noyau.

Sachant qu'un groupe de plasmides contient 1152 plasmides aléatoires différents, chaque noyau est mis en contact avec **104 copies** de chacun des plasmides aléatoires.

Imaginons qu'une des séquences favorise la diffusion et l'import nucléaire des plasmides, et que 5 copies de ce plasmide (soit 5% de la quantité initiale au contact des cellules perméabilisées) entrent dans 70% des noyaux des cellules perméabilisées à la digitonine de l'essai. On a donc 3 500 000 copies de ce plasmide dans les noyaux des cellules de l'essai. Si on considère que l'extraction des plasmides des noyaux a un rendement de 50%, et que l'on extrait les plasmides de 500 000 cellules perméabilisées traitées, soit 50% du nombre de cellules initial, on récupère 875 000 copies du plasmide.

Il est admis qu'avec les bactéries DH5α ultracompetentes commerciales (que nous avons utilisées), 1500 plasmides donnent lieu à 1 transformant (1 µg de plasmide 6 kb donne lieu à 108 transformants) en respectant les recommandations du fournisseur.

Si les bactéries DH5α compétentes ont été transformées avec 1/10 de l'extrait, elles ont été mises en contact avec 87 500 copies du plasmide. Si la moitié du milieu de culture après transformation est étalé sur des boîtes de culture, on devrait avoir une trentaine de clones en plus du nombre de clones obtenu en plus du bruit de fond obtenu avec les témoins négatifs.

Si elles ont été transformées avec la moitié de l'extrait, soit 437 000 plasmides, et que 1/5 est étalé, on devrait avoir une soixantaine de clones de plus que le nombre de clones obtenus avec les témoins (série 1 : transformation avec la moitié de l'extrait, étalement du cinquième de la culture : témoin 20 clones), soit 400% du nombre de clones du témoin.

2. Tests d'import des plasmides aléatoires

Plusieurs séries de tests ont été menés avec les 7 groupes de plasmides, ce paragraphe ne présente les résultats que de trois séries de ces tests (figure 22).

Le test du plasmide témoin a été mené en triple, pour chacune des séries de tests, pour évaluer la reproductibilité des résultats.

Les résultats obtenus avec les témoins dans les essais A et C (figure 22) sont reproductibles, on obtient effectivement 20 à 30 clones dans le cas des témoins quand l'expérience est réalisée dans les mêmes conditions que lors de l'étude des meilleures conditions de criblage (données non représentées). Par contre les témoins de l'essai B sont peu reproductibles, puisque les valeurs de T1 et T3 sont comprises entre 60 et 90% de la moyenne des témoins, mais que la valeur de T2 est de 150% de la moyenne des témoins. Ce manque de reproductibilité souligne les difficultés de manipulation des cellules perméabilisées à la digitonine. Pour qu'un résultat soit significatif il faut donc que l'écart entre ce résultat et la moyenne des témoins soit de plus de 50 à 60%.

Dans l'essai A, pour lequel les témoins donnent des résultats assez reproductibles, le lot 1 et le lot 4 de plasmides donnent des résultats supérieurs à 150% des résultats des témoins. On peut imaginer que ces deux lots contiennent un ou plusieurs plasmides ayant une séquence permettant d'augmenter l'import nucléaire. Dans l'essai C, tous les lots sont légèrement supérieurs à la moyenne des témoins, en particulier les lots 4 et 5, dont le résultat est respectivement supérieur et égal à 150% de la moyenne des témoins. Dans l'essai B, les lots 1, 2, 3, 4, 6 et 7 sont très au-dessus de la moyenne des témoins, mais les résultats des témoins sont peu reproductibles. On ne peut donc pas conclure sur cette série d'essais.

Figure 22 Tests d'import des lots de plasmides de la banque de plasmides aléatoires sur cellules HeLa perméabilisées à la digitonine. A, B, C : résultats de trois séries de tests d'import réalisés indépendamment, dans des conditions différentes : transformation de bactéries DH5 α compétentes avec $\frac{1}{2}$ (A), $\frac{1}{10}$ (B et C) de l'extrait nucléaire ; étalement sur boîte LB agar amp X-gal de $\frac{1}{5}$ (A), $\frac{4}{5}$ (B) ou $\frac{1}{10}$ (C) du produit de la transformation. Résultats exprimés en pourcentage de la moyenne du nombre de clones des témoins. Les chiffres au-dessus de l'histogramme des témoins représentent le nombre de clones pour chacun des témoins.

Ces trois séries de tests ne sont que trois des essais qui ont été réalisés, et sont représentatifs de l'ensemble des résultats qui ont été obtenus lors de ces séries de tests. Les témoins ne donnent pas toujours des résultats reproductibles, et les lots dont les résultats semblent supérieurs aux résultats des témoins sont différents d'un essai à l'autre.

3. Discussion des résultats

L'ADN extrait des noyaux des cellules perméabilisées à la digitonine contient non seulement les plasmides qui sont entrés dans les noyaux mais aussi l'ADN génomique des cellules. Lors de la transformation des bactéries DH5 α compétentes, l'ADN génomique interagit avec les bactéries et diminue l'efficacité de transformation.

Les valeurs relatives du nombre de clones obtenus avec les groupes de plasmides par rapport aux témoins ne sont pas reproductibles d'une série à une autre. Le manque de reproductibilité provient en partie de la difficulté de manipulation des cellules HeLa perméabilisées à la digitonine en suspension. Ces cellules sont fragilisées par la perméabilisation, certains noyaux éclatent lors des centrifugations. Pour éviter la perte de noyaux les centrifugations sont réalisées à faible vitesse, les culots de cellules obtenus sont fragiles et l'élimination des surnageants de centrifugation conduit à l'élimination d'une partie des cellules.

D'autre part le nombre de clones obtenus avec les témoins, constituant le bruit de fond de l'expérience, est élevé. Il provient de la fixation non-spécifique des plasmides, du fait de leur charge, sur les enveloppes nucléaires. La préincubation avec de l'ADN compétiteur, même en grande quantité, n'est pas suffisante pour saturer tous les sites de fixation non spécifique des plasmides. Alternativement, les lavages des noyaux après le test d'import ne sont pas suffisants, mais des lavages supplémentaires conduiraient à une perte trop importante de

cellules. Le modèle des cellules perméabilisées à la digitonine constitue donc certainement un bon modèle de criblage de l'import nucléaire de protéines, particulièrement quand les cellules sont perméabilisées sur des lamelles et non en suspension, mais pas de l'import nucléaire de plasmides qui, de par leur charge, se fixent sur des sites non spécifiques sur les enveloppes nucléaires et les fantômes de cytoplasmes. Ce résultat n'était pas prévisible, ce n'est qu'en menant le test que nous avons pris conscience des difficultés de mise en œuvre du protocole. Finalement cette méthode de criblage comprend un grand nombre d'étapes présentant chacune un biais, et ne semble pas adaptée à la banque de plasmides aléatoires. Les résultats que nous avons obtenus dans ces séries de tests sont trop proches du bruit de fond, constitué par les plasmides collés aux enveloppes nucléaires, pour pouvoir être réellement significatifs. Une amélioration de ces essais permettant d'obtenir des résultats plus significatifs consisterait à essayer de diminuer le rapport signal / bruit de fond des essais, mais nous avons choisi de changer de méthode de criblage car nous avons jugé que la difficulté d'utilisation des cellules perméabilisées à la digitonine rendait ce modèle peu adapté à des essais semi-automatisés.

D. Criblage de la banque de plasmides aléatoires par transfection

1. Mise au point des conditions de transfection

Des tests de transfection ont été réalisés sur cellules HeLa avec des quantités croissantes du plasmide pXL2652 (figure 23) pour déterminer la quantité minimale de plasmides aléatoires permettant de détecter un niveau d'expression de la β -galactosidase suffisant car nous n'avons produit qu'une faible quantité de plasmide de chacun des 86 lots de plasmides, en utilisant la méthode automatisable des minipreps Qiagen.

Les cellules HeLa sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 80000 cellules par puits. Le test de transfection est réalisé le lendemain.

Figure 23 Détermination de la quantité minimale de pXL2652 déposé par puits lors de tests de transfection sur cellules HeLa pour que l'expression de la β -galactosidase soit détectable. Tests de transfection de 24h réalisés avec 6nmol RPR120535 / μ g d'ADN.

L'activité β -galactosidase, représentée par la valeur CPS/ μ g de protéines, décroît avec la quantité de plasmide par puits, jusqu'à la valeur de 50ng pXL2652 puits pour laquelle l'activité atteint 650 CPS/ μ g de protéines.

On choisit la quantité de 200ng de plasmide par puits pour réaliser les tests de transfection avec les lots de plasmides de la banque, cette quantité est minimale et permet d'obtenir une

activité β -galactosidase détectable. Cette quantité de plasmide est complétée à 500ng avec un plasmide codant la luciférase (pXL2774). Nous souhaitons comparer les activités β -galactosidase des groupes de plasmides, l'expression du plasmide pXL2774 interfère de la même façon sur l'expression de la β -galactosidase quel que soit le groupe de plasmide.

Le vecteur est le lipide RPR120535, les complexes sont préparés dans une solution de carbonate à 20mM/NaCl 150mM à 6nmole de RPR120535/ μ g d'ADN et dilués dans du milieu de culture contenant du sérum (voir paragraphe III A 2 a). Chaque lot de plasmides est testé en triple, sur trois puits adjacents. Après 24 heures de transfection, les cellules sont lysées et l'activité β -galactosidase est évaluée. L'activité β -galactosidase des lots de plasmides est exprimée en pourcentage de l'activité β -galactosidase moyenne des trois témoins.

2. Tests de transfection sur cellules HeLa

Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 100000 cellules par puits, elles sont à confluence au moment du test et donc ne se divisent pratiquement plus. Les plasmides n'entrant dans le noyau que lors des divisions cellulaires quand l'enveloppe nucléaire est disjointe, les cellules HeLa à confluence constituent un modèle cellulaire dans lequel les plasmides sont bloqués par la barrière « enveloppe nucléaire ».

Les résultats des tests de transfection sur cellules HeLa sont présentés dans la figure 24.

Figure 24 Tests de transfection des 86 lots de plasmides sur cellules HeLa. Résultats exprimés en pourcentage de l'activité β -galactosidase (CPS) moyenne des témoins (T). RPR : témoin de transfection lipide seul. Les chiffres au-dessus des histogrammes des témoins représentent les résultats en CPS / μ g de protéines.

Les trois témoins ont un niveau d'expression de la β -galactosidase très différent : le niveau de transfection du premier témoin n'atteint que 55% de la moyenne des niveaux de transfection des trois témoins, et les deux autres environ 120%, la transfection des cellules HeLa à confluence n'est donc pas un système reproductible.

Pour tous les lots, le niveau de transfection est situé entre 25 et 100% du niveau de transfection de la moyenne des témoins, à l'exception des lots 79 (139%), 15 (10%), 33 (11%), 57 (15%) et 64 (18%).

Le niveau de transfection du lot 79 est un peu au-dessus du niveau de transfection moyen des témoins. Pour ce lot, la concentration en protéines dans les puits est plus faible, ce qui signifie qu'il y a moins de cellules. Dans les autres puits, les cellules sont à confluence et se divisent peu. Dans cette série de puits, soit le plasmide a un effet toxique et a induit la mort d'une partie des cellules, soit on avaitensemencé moins de cellules, dans ce cas les cellules étaient en phase de multiplication active au moment du test de transfection, ce qui explique que le niveau de transfection est plus élevé.

Les lots 15, 33, 57 et 64 ont un niveau de transfection très inférieur à ceux des témoins, et la barre d'erreur ne révèle pas de différence significative entre les trois puits. Dans ces cas, une ou plusieurs des séquences intégrées dans le lot de plasmides pourraient avoir un effet inhibiteur sur le test de transfection. L'effet que nous recherchons étant une augmentation du niveau de transfection, nous n'avons pas poursuivi le travail de caractérisation de l'effet de ces lots de plasmides.

3. Tests de transfection sur cellules hAoSMC

La lignée hAoSMC est une lignée primaire, pour laquelle on obtient un faible niveau d'expression du gène rapporteur lors de tests de transfection. Quand ces cellules sont transfectées avec 250ng de plasmide pXL2652 par puits d'une plaque 24 puits, le niveau d'expression de la b-galactosidase est de 100CPS/ μ g de protéines. Le faible niveau de transfection des cellules hAoSMC peut être le reflet d'une faible pénétration du plasmide dans le cytoplasme cellulaire, du manque de diffusion du plasmide dans le cytoplasme ou du faible import nucléaire. D'autre part les cellules primaires constituent un modèle *in vitro* dont les caractéristiques sont proches des conditions tissulaires *in vivo*.

Pour valider le modèle des cellules hAoSMC comme un modèle d'étude de la diffusion cytoplasmique et de l'import nucléaire, nous avons testé l'entrée du plasmide dans le cytoplasme cellulaire lors d'un test de transfection.

Dans le cas de cellules musculaires cultivées *in vitro*, il a été démontré que l'efficacité de transfection d'un complexe lipide cationique/ADN (3nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN, la taille de ces complexes varie entre 500 et 1000nm) dépend du degré de différenciation des cellules. Les cellules non différenciées ou myoblastes, fusionnent et évoluent en cellules musculaires différenciées ou myotubes quand elles approchent de la confluence et que la concentration en sérum du milieu de culture diminue. Les complexes lipide cationique/ADN dont la taille est inférieure à 500nm sont internalisés par les myoblastes des lignées C2C12 et C2C7. En revanche l'internalisation de microsphères fluorescentes calibrées de 100nm diminue quand le degré de fusion des myoblastes en myotubes augmente, et l'internalisation de microsphères de 200nm est nulle dans les myotubes (140). Dans ce modèle les complexes ADN/vecteur entrent peu dans les cellules quand elles sont différenciées.

Ce n'est pas le cas des cellules hAoSMC : l'ADN fluorescent est internalisé dans toutes les cellules hAoSMC lors d'un test de transfection dans lequel il est complexé avec un lipide cationique, dans une solution de carbonate et au rapport 6nmole de lipide cationique / μ g d'ADN, rapport pour lequel les particules sont agrégées (diamètre > 1000nm) (figure 25).

Nous n'avons pas évalué la quantité d'ADN internalisé par rapport à la quantité de plasmide simplement fixé sur la membrane plasmique. Selon (140), seulement 60% des particules sont internalisées dans les myoblastes. Il est possible qu'une proportion non négligeable du plasmide ne soit pas internalisé. Cependant le marquage ponctué des cytoplasmes (figure 25)

des hAoSMC montre qu'une partie des complexes est internalisé et piégé dans des vésicules, certainement des endosomes.

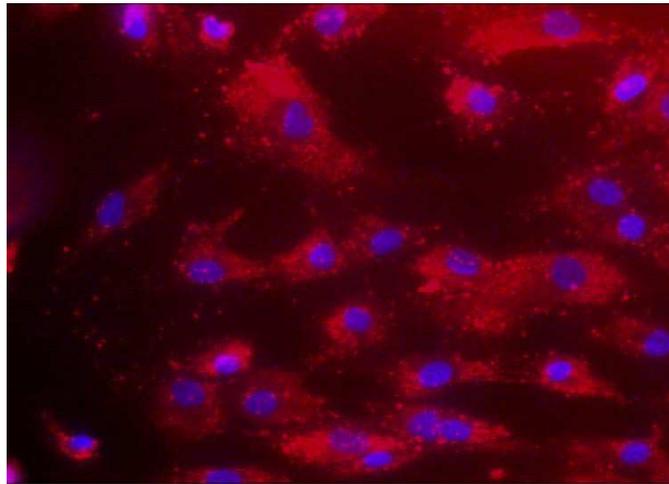


Figure 25 Résultat d'une transfection sur cellules hAoSMC avec un plasmide fluorescent. Transfection 24h avec 6nmoles RPR120535/ μg d'ADN : le plasmide fluorescent pénètre dans le cytoplasme des cellules, le marquage des cytoplasmes est ponctué.

Les cellules hAoSMC se divisent peu, ce qui peut expliquer que l'import nucléaire des plasmides n'est pas efficace. Le modèle des cellules hAoSMC est donc un bon modèle pour étudier la diffusion cytoplasmique et l'import nucléaire de la banque de plasmides aléatoires. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 120000 cellules par puits, elles sont à confluence au moment du test, ce qui constitue une barrière supplémentaire à l'import nucléaire des plasmides. Nous avons considéré que la pénétration dans le cytoplasme cellulaire d'un plasmide était équivalente dans des cellules confluentes (lors des tests des plasmides de la banque) et dans des cellules non confluentes (figure 25), suite à des observations sur d'autres lignées cellulaires.

Selon le même protocole que celui des tests de transfection sur cellules HeLa, la banque de plasmides aléatoires a été criblée par des tests de transfection sur cellules hAoSMC.

Les tests de transfection ont été réalisés sur 4 séries différentes de lots car nous n'avons pas pu produire suffisamment de cellules hAoSMC pour réaliser tous les tests de transfection le même jour. Pour chaque lot testé, le résultat est exprimé en CPS/ μg de protéines puis rapporté au résultat du témoin de la série de tests de transfection. De cette façon les résultats sont comparables d'une série de tests à une autre.

Les résultats sont présentés dans la figure 26. Chaque couleur d'histogrammes représente une de ces séries, chaque série contient un témoin. La cinquième série correspond à trois lots non testés (lots 35, 57 et 67) dans les autres séries et deux lots pour lesquels l'expression de la luciférase est supérieure à celle des témoins dans les premières séries (lots 38 et 65). Ces résultats nous paraissaient intéressants et nous souhaitons les reproduire pour valider un effet d'un des plasmides du lot. Cependant l'augmentation du niveau d'expression du gène rapporteur avec ces lots n'a pas pu être reproduite, et semble donc s'expliquer par un artefact de l'expérience.

Figure 26 Tests de transfection des 86 lots de plasmides sur cellules hAoSMC. Résultats exprimés en pourcentage de l'activité β -galactosidase (en coups par seconde (CPS)/ μ g de protéines) du témoin (T). Tests de transfection réalisés en 4 séries indépendantes. Série 1 : lots AB à 5, série 2 : lots 9 à 32, série 3 : lots 7 et 33 à 48, série 4 : lots 49 à 85.

Dans la première série de résultats (lots AB à 5), l'activité β -galactosidase des lots est comparable à celle des témoins, autour de 1500 à 2000CPS, la concentration en protéines étant équivalente dans tous les puits.

Dans la deuxième série, toutes les activités sont entre 40 et 60% du témoin. La valeur en CPS du témoin est presque deux fois plus élevée que les valeurs en CPS des autres puits, la concentration en protéines étant semblable, supérieure aux concentrations en protéines des puits de la première série. L'activité β -galactosidase est autour de 5000CPS (10000CPS pour le témoin).

Dans la troisième série, les activités β -galactosidase sont beaucoup plus faibles que dans les deux premières séries (nous n'avons pas utilisé le même lot de kit de dosage de l'activité β -galactosidase Clontech), autour de 40 à 50CPS. Les résultats des lots 37 et 38 sont plus de 150% du témoin.

Dans la quatrième série les activités β -galactosidase sont aussi autour de 20 à 40 CPS (même kit de dosage que la série 3). Les résultats des lots 65 et 66 sont autour de 150% du témoin.

La cinquième série a été réalisée avec le nouveau kit, les valeurs de l'activité β -galactosidase sont de l'ordre de 1500 à 2000CPS, les concentrations en protéines sont équivalentes dans tous les puits. Ces points correspondent à des lots qui présentaient des valeurs aberrantes lors des premiers essais ou à des points dont on voulait vérifier une éventuelle amélioration du niveau de transfection. On ne retrouve pas les résultats encourageants des lots 38 et 65, qui sont certainement dus à un artefact de l'expérience.

Même si les résultats des différentes séries ne sont pas facilement comparables, aucun lot ne permet de conclure à une augmentation importante de l'activité β -galactosidase dans ce système de transfection, suggérant qu'aucun des plasmides aléatoires ne diffuse mieux dans le cytoplasme ou n'entre dans le noyau cellulaire.

Les résultats n'ont pas pu être répétés par manque de préparations de plasmides et de cellules hAoSMC. Nous aurions pu préparer à nouveau les lots de plasmides mais les résultats peu encourageants ne nous ont pas engagés à le faire.

E. Discussion des résultats

Le clonage de la banque a été long et fastidieux, les criblages de la banque dans le système des cellules HeLa perméabilisées à la digitonine ou lors de tests de transfections sur la lignée cellulaire HeLa ou sur les cellules primaires hAoSMC n'ont pas mis en évidence d'effet positif d'une des séquences aléatoires sur la diffusion cytoplasmique et l'import nucléaire des plasmides.

La stratégie envisagée initialement ne comprenait pas d'étape d'amplification et d'isolement des clones bactériens. Nous envisagions de cribler la banque obtenue après transformation de bactéries DH5 α compétentes avec les produits de la ligature du plasmide avec les oligonucléotides aléatoires sans avoir à sélectionner les clones positifs, pensant que le rendement de la ligature serait meilleur. Cette étape a considérablement alourdi le protocole de construction de la banque et surtout limité le nombre de clones testés.

Nous n'avons cloné que 8160 plasmides aléatoires. Or la séquence aléatoire comprenant 35 bases, choisies parmi les 4 bases existantes, il y a 4^{35} soit $1,2 \times 10^{21}$ séquences possibles, ayant approximativement toutes la même probabilité d'avoir été synthétisées et clonées dans le plasmide. Il est très probable qu'il existe des séquences permettant d'améliorer l'interaction de plasmides avec des protéines cytoplasmiques karyophiles, mais nous ne les avons pas obtenues lors de ce clonage.

Pour travailler sur un système de banque, il est nécessaire que la plupart des étapes soient **automatisables**. Il existe des appareils capables de piquer des clones un à un sur des boîtes de pétri et de les mettre en culture. De même le transvasement des cultures en plaques de 96 puits vers des plaques de stockage de 384 puits peut être réalisé par des manipulateurs de plaques. La construction de cette banque aurait pu en grande partie être automatisé.

Le principal problème de cette banque a été son criblage. Le modèle des cellules perméabilisées à la digitonine n'est pas adapté au criblage de banques parce que l'utilisation de ce type de cellules est délicate et donc difficilement automatisable. Le criblage par transfection reste automatisable, puisque certains protocoles de transfection sont réalisés dans des plaques 96 puits. La préparation des complexes plasmide aléatoire / vecteur pourrait être réalisée dans des plaques 96 puits, puis les complexes pourraient être transvasés à l'aide d'une pipette multicanaux à la plaque 96 puits contenant les cellules. Après 24 heures de transfection, les lavages, lyse des cellules, centrifugation pourraient être réalisés dans la même plaque, dans laquelle une pipette multicanaux prélèverait le volume nécessaire à la lecture de l'activité du gène rapporteur et au dosage des protéines.

Si nous avons détecté un lot de plasmides contenant une séquence aléatoire permettant d'améliorer l'import nucléaire du plasmide, nous nous serions heurtés à un autre problème puisque la banque ainsi construite ne permet pas **d'identifier** directement la séquence mise en cause. Le lot de plasmides aléatoire aurait dû être divisé en lots de plus petite taille, eux-mêmes auraient été testés et ainsi de suite jusqu'à l'identification de la séquence impliquée.

Il serait intéressant de mettre en place une banque dont le criblage pourrait être automatisé, et être analysé à partir de l'expression de la séquence améliorant l'import nucléaire. On pourrait imaginer une banque dans laquelle la séquence de nucléotides aléatoire serait clonée en aval du promoteur. Par transfection, on introduirait ces plasmides par lots dans les cellules, le criblage des ARN messagers par RT-PCR permettrait de déterminer l'entrée d'un des

plasmides aléatoires dans le noyau puisque ce plasmide s'exprimerait, d'identifier directement la séquence aléatoire impliquée, en éliminant plusieurs étapes sources d'aléas.

Dans la stratégie envisagée au début de cette étude nous ne souhaitons pas risquer d'introduire un codon stop avant le gène rapporteur en intégrant une séquence aléatoire après le promoteur. Si la séquence aléatoire avait été intégrée en aval de la cassette d'expression, la fixation d'une protéine karyophile sur cette séquence aurait pu modifier le profil d'expression du gène rapporteur, par encombrement stérique ou éventuellement par activation de l'expression. Nous souhaitons intégrer la séquence aléatoire à une localisation dans laquelle elle n'aurait pas modifié l'expression du gène rapporteur.

D'autre part il serait avantageux de cloner la séquence de nucléotides aléatoires dans un plasmide codant un autre gène rapporteur, par exemple la luciférase. Nous avons choisi la β -galactosidase car elle est détectable par coloration des clones bactériens ou par dosage avec un kit commercial. La luciférase n'est détectable que par dosage, mais la sensibilité de détection du kit commercial de dosage est très supérieure à celle du kit de dosage de la β -galactosidase.

Les études récentes consistant à intégrer la séquence de liaison d'un facteur de transcription dans un plasmide soulignent le rationalisme de notre approche. Il serait intéressant, plutôt que de partir de séquences synthétiques totalement aléatoires, de partir de séquences existantes. Les ADN ou ARN viraux pénètrent le noyau cellulaire sous la forme d'un complexe multiprotéique appelé complexe de préintégration. Il est probable que ce soit sous la forme de tels complexes que l'on puisse promouvoir l'entrée des plasmides dans les noyaux cellulaires. D'autre part l'association de l'ADN plasmidique avec des protéines permettrait la neutralisation ou au moins le masquage d'une partie des charges de l'ADN, ce qui pourrait permettre une meilleure diffusion de la molécule jusqu'au pore nucléaire.

V. Stratégie d'amélioration du passage du pore nucléaire : couplage d'une séquence de localisation nucléaire sur le plasmide

A. Choix de la séquence peptidique et stratégie du couplage

1. Choix de la séquence à coupler

Plusieurs équipes ont tenté de coupler une ou plusieurs séquences NLS à des plasmides, de façon covalente ou par simple interaction électrostatique.

Si on considère que l'import nucléaire d'un plasmide-NLS suit la même voie que l'import nucléaire d'une protéine présentant une séquence NLS, le transport nécessite l'intervention de deux protéines cytoplasmiques : la séquence NLS interagit avec l'importine α , qui interagit avec l'importine β par le biais de la séquence IBB de l'importine α , et l'importine β interagit finalement avec les protéines du pore nucléaire. L'importine α sert d'adaptateur entre le récepteur de l'import (l'importine β) et le substrat à importer (le plasmide-NLS).

L'efficacité de l'import nucléaire du plasmide-NLS pourrait être diminuée par l'intervention de l'importine α . Nous avons opté pour un système ne faisant pas intervenir d'adaptateur. Nous avons choisi de coupler le peptide IBB de façon covalente sur un plasmide dans le but d'augmenter l'expression du gène rapporteur par augmentation de l'import nucléaire de ce plasmide. Le plasmide-IBB interagirait directement avec l'importine β et ce complexe bipartite pourrait être importé dans le noyau via le pore nucléaire par la voie classique de la diffusion facilitée (voir paragraphe I E 1).

Chez la levure, on dénombre une seule importine α (Srp1p) alors que chez les eucaryotes supérieurs au moins 6 homologues d'importines α ont été identifiés : la snurportine 1 (adaptateur entre les UsnRNP et l'importine β), XRIP α (adaptateur dans le cas de la replication protein A ou RPA), imp7 (qui forme un hétérodimère avec imp β pour l'import nucléaire de l'histone H1) et RanBP8 (tableau 11).

Nom de l'importine α , date de description	Provenance	Références bibliographiques
yImp α 1, Kap α , ySRP1 1992	Levure	(141), (142)
hImp α 1, Kap α 1, NPI-1, hSRP1 β , RCH2 1994	Homme	(143), (144), (145)
mImp α 1, Kap α 1, NPI-1, SRP1 β , RCH2 1994	Souris	(146), (147), (144)
xImp α 1, Kap α 1 1994	Xenope	(148),
hImp α 2, Kap α 2, hSRP1 α , RCH1 1994	Homme	(149), (150), (151)
mImp α 2, Kap α 2, SRP1 α , RCH1, penduline, PTAC58, Imp α P1 1995	Souris	(142), (146), (152)
xImp α 2, Kap α 2 1994	Xenope	(148)
mImp α 3, Kap α 3, Imp α Q2 1997	Souris	(147)
hImp α 4, Kap α 4, QIP1 1997	Homme	(153), (154)

mImp α 4, Kap α 4, Imp α Q1 1997	Souris	(147)
hImp α 6, Kap α 5 1997	Homme	(154)
mImp α 6, Kap α 5, Imp α S2 1997	Souris	(147)

Tableau 11 Description des différentes importines α décrites jusqu'à présent. Chaque importine est désignée par plusieurs noms.

Les importines α sont formées de 10 répétitions en tandem d'un motif Arm (pour Armadillo), chaque répétition Arm étant composée de 3 hélices α (voir figure 8). La conformation de la protéine est une superhélice droite, dont le sillon présente deux sites de fixation à des séquences NLS. A leur extrémité N-terminale, les importines α présentent le site IBB, riche en acides aminés basiques et fortement conservé, qui permet leur interaction avec l'importine β . Les différents domaines IBB sont décrits dans le tableau 12.

Nom de l'importine	Séquence IBB (N-terminal vers C-terminal)
yImp α 1	RRTNFKNKGRFSAD ELRRRR DTQQV ELRKA KRDEALAKRRNF
hImp α 1	RLKSYKNKSLNPDEMRRRR EEGLQLRKQ KREEQLFKRRNV
mImp α 1	RLKSYKNKSLNPDEMRRRR EEGLQLRKQ KREEQLFKRRNV
xImp α 1	RMRKFKNKGD TAE LRRRRV EVSV ELRKA AK DEQILKRRNV
hImp α 2	RLHRFKNKGD STEM RRRR IEVN VELRKA AK DDQMLKRRNV
mImp α 2	RLNRFKNKGD STEM RRRR IEVN VELRKA AK DEQMLKRRNV
xImp α 2	RMRKFKNKGD TAE LRRRRV EVSV ELRKA AK DEQILKRRNV
mImp α 3	RIKSFKNKGRD VET MRRHR NEVT VELRKN KR DEHLLKRRNV
hImp α 4	RLKNFKNKGRD LET MRRQR NEVV VELRKN KR DEHLLKRRNV
mImp α 4	RLKNFKNKGRD LET MRRQR NEVV VELRKN KR DEHLLKRRNV
hImp α 6	RMKSYKNKALNPQEMRRRR EEGIQLRKQ KREEQLFKRRNV
mImp α 6	RMKSYKNNALNP EM RRRR EEGIQLRKQ KREEQLFKRRNV

Tableau 12 Séquence des domaines IBB des différentes importines α . y : de levure (yeast), h : humain, m : murine, x : de xénope. Les acides aminés présents dans toutes les importines α sont représentés en rouge. En bleu : acides aminés présents dans au moins 8 importines α parmi les douze décrites.

La plupart des substrats dont l'import nucléaire nécessite l'intervention d'un adaptateur (importine α) peuvent interagir avec les sites IBB de toutes les importines α , avec des affinités variables (154).

Nous avons choisi la séquence IBB de l'importine α 2 humaine (hSRP1 α ou hImp α 2) décrite par Weis et al. (149), la première décrite et la mieux documentée. Cette séquence interagit avec l'importine β 1 (59) : le domaine IBB de l'importine α 2 a une partie N-terminale étendue (résidus 11 à 23) et une partie C-terminale en hélice (résidus 24 à 51), il interagit avec la surface interne de la superhélice définie par les répétitions HEAT de l'importine β 1. Le complexe IBB / importine β 1 a une configuration compacte, les répétitions HEAT 7 à 19 de l'importine β 1 s'enroulant autour de l'IBB.

Cette séquence IBB de l'importine α 2 humaine ne diffère de son homologue murine que par deux acides aminés, E (acide glutamique) au lieu de D (acide aspartique), dans la partie C-terminale et N (asparagine) au lieu de H (histidine) dans la partie N-terminale. Les deux acides aminés E et D ne diffèrent entre eux que par un groupement $-CH_2-$ dans la chaîne latérale, les deux chaînes latérales sont acides, conférant des propriétés très semblables aux deux acides aminés. Nous avons estimé que cette différence était négligeable dans les interactions de la séquence IBB avec les importines (nous possédons des importines α et β -GST murines recombinantes couplées à la GST, ces importines ont été utilisées dans les tests d'interaction décrits dans le paragraphe V B).

2. Analyse de la séquence IBB choisie et stratégie du couplage

Dans un premier temps, en collaboration avec l'Institut Curie, nous avons tenté de produire l'IBB recombinante à partir d'un plasmide qui avait été fourni par l'équipe de Y. Yoneda. La purification de cette séquence n'était pas efficace et nous n'avons pas pu la produire dans des quantités suffisantes pour permettre un couplage chimique à un plasmide. D'autre part la séquence IBB n'était pas optimale, elle était allongée de 38 acides aminés du fait du clonage dans un plasmide d'expression.

Nous avons fait synthétiser la séquence optimale à façon, par la société DICTAGENE S.A. (Epalinge, Suisse).

Le peptide obtenu est beaucoup plus pur, permettant de réaliser des couplages chimiques en évitant des interactions avec des résidus biologiques.

A cette séquence ont été ajoutés :

- Partie N terminale : une séquence polyhistidine et un marqueur myc
- Partie C-terminale : une cystéine, permettant le couplage du peptide à un plasmide.

La séquence finale du peptide (62 acides aminés) est la suivante :

[H]HHHHHHGEQKLISEEDLAARLHRFKNKGKDSTEMRRRRRIEVNVELRKAKKDDQ
MLKRRNVS[OH]

Cette séquence contient :

- 1 acide aminé aromatique (F)
- 24 acides aminés à chaîne latérale basique (24 charges positives) (K, R, H)
- 10 acides aminés à chaîne latérale acide (10 charges négatives) (D, E)
- 8 acides aminés à chaîne latérale polaire non chargée (N, Q, S, T, Y)
- 19 acides aminés à chaîne latérale non polaire (A, V, I, L, P, M, W, C, G)

Le peptide est globalement basique, avec une charge positive nette de +14 à pH 7.

Sa masse molaire est de 7534,62g/mol (7,5kDa). Le peptide a été fourni sous forme lyophilisée par aliquots de 500µg, stocké à -20°C. Nous l'avons solubilisé à la concentration de 1mg/ml dans du tampon HEPES 50mM supplémenté en inhibiteurs de protéases (aprotinine, leupeptine, pepstatine à 1µg/ml) à pH7,5 et conservé à -80°C.

Le peptide IBB interagit avec les parois des tubes et matériaux utilisés. Pour son étude nous avons dû employer des tubes à faible adsorption de surface (tubes « low-binding »). Après un an et demi de conservation sous forme lyophilisée à -20°C, dans le tube d'origine à absorption de surface normale qui nous avait été fourni par Dictagène S.A., il ne reste que 30% en masse de produit (dosage par la méthode BCA).

On souhaite coupler l'IBB au plasmide de façon covalente par son extrémité C-terminale pour respecter l'orientation de la séquence dans l'importine α .

Le peptide IBB est couplé à un plasmide à l'aide d'un court espaceur, le TFPAM-6 (azoture de 6-méthyl-tétrafluorobenzyle, figure 27), molécule bifonctionnelle comprenant un résidu azoture et un résidu maléimide, permettant de coupler du côté maléimide le peptide au niveau du thiol libre de la cystéine, et du côté azoture le plasmide par photoactivation.

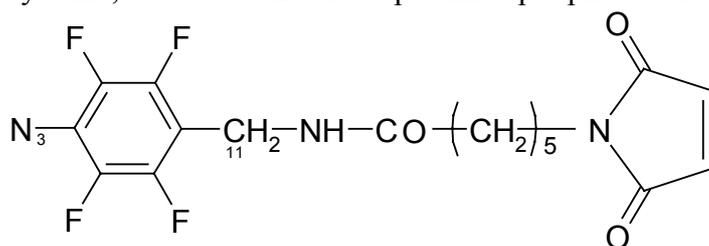


Figure 27 Formule du TFPAM-6. L'IBB est fixé sur la partie maléimide, et le plasmide sur la partie azoture.

B. Couplage covalent du peptide IBB sur le plasmide et étude de l'import nucléaire du plasmide-IBB

1. Interaction de l'IBB synthétique avec les importines

Pour tester l'interaction du peptide IBB avec ses récepteurs cellulaires et déterminer la spécificité de ces interactions, nous avons utilisé les tests d'interaction mis en place par (155), dont le principe est schématisé dans la figure 28 (le protocole exact est détaillé dans le paragraphe III B 1 d). Les importines-GST sont couplées à une résine de glutathion-sépharose, la résine fonctionnalisée obtenue est lavée puis mise en contact avec la protéine P (ici, l'IBB) dont on veut tester l'interaction avec les importines.

Figure 28 Principe du test d'interaction entre une importine et une protéine P. La résine de glutathion-sépharose est fonctionnalisée par incubation avec les importines-GST. Après lavages, la résine fonctionnelle est mise en incubation avec la protéine P. La fraction de protéine P n'interagissant pas avec les importines est séparée de la résine par centrifugation (**fraction S**). La résine est lavée et les protéines couplées à la résine sont décrochées par traitement au SDS et séparées de la résine par centrifugation (**fraction E**).

La **fraction S** contient les protéines qui ne sont pas retenues sur la résine, soit parce qu'elles n'interagissent pas avec la protéine fixée sur la résine, soit parce que l'interaction n'est pas assez forte. La **fraction E** contient la fraction de protéines P interagissant avec les importines ainsi que les importines fixées sur la résine.

Il est possible que la fraction E contienne des protéines ayant précipité dans les conditions salines utilisées pour ces tests. Le tampon de fixation que nous avons utilisé ne provoque pas la précipitation de l'IBB à température ambiante, il y a donc peu de chance que l'IBB précipite lors des tests.

D'autre part nous avons volontairement utilisé des conditions de décrochage des protéines à forte température dans un tampon ayant de fortes capacités de solubilisation, pour récupérer le maximum des protéines fixées sur la résine.

a) Test du matériel

L'IBB est basique, il est susceptible de s'accrocher de façon non spécifique sur la résine de glutathion-sépharose.

La figure 29 confirme que l'IBB n'interagit pas avec la résine non greffée, puisqu'on ne voit pas de bande correspondant à l'IBB après dépôt de la fraction E (interagissant avec la résine)

sur gel NuPAGE 10%. Par contre la fraction S (n'interagissant pas avec les billes) contient une grande quantité du peptide IBB.



Figure 29 Test d'interaction du peptide IBB avec des billes de glutathion-sépharose. Dépôt de 2 μ g (dans 30 μ l de tampon de fixation) de peptide IBB sur 30 μ l de résine sèche. Gel NuPAGE 10%, coloration du gel au bleu de Coomassie. M₁ : marqueur Sigma protéines de faible poids moléculaire ; M₂ : marqueur 12 (Novex) ; T : 500ng de peptide IBB témoin ; S : 1/3 de la fraction S ; L₁ à L₅ : 1/3 des solutions des lavages n°1, 2, 4, 5 ; E : totalité de la fraction E.

b) Interaction du peptide IBB avec les importines

Nous avons testé l'interaction du peptide IBB avec les importines α et β selon le principe décrit dans la figure 28. Le cytochrome c a été utilisé comme témoin négatif : il ne possède pas de séquence lui permettant d'interagir avec ou l'importine β .

Le dépôt sur gel des fractions E des tests d'interaction de l'IBB et du cytochrome c avec l'importine β révèle la présence d'une grande quantité d'IBB et d'une petite quantité de cytochrome c dans cette fraction (figure 30). Les fractions S de ces deux tests d'interaction présentent les deux protéines. Le dépôt sur gel du dernier lavage de la résine avant le décrochage des protéines ne révèle pas la présence de peptide IBB. La fraction de cytochrome c présente dans la fraction E pourrait être du cytochrome c ayant précipité lors du test d'interaction (on a déposé 8 μ g de cytochrome c sur 3 μ g d'importine).

D'autre part quand on augmente la quantité d'IBB déposée sur la résine fonctionnalisée avec l'importine β pour des quantités constantes d'importine β , la quantité d'IBB récoltée dans la fraction E augmente.

La bande au poids moléculaire 6,5kDa dans le puits 6 du gel « fraction S » correspond à l'inhibiteur de protéases aprotinine qui a été ajouté au tampon dans lequel le cytochrome c et l'IBB ont été dissous, elle est aussi observée sous les bandes correspondantes à l'IBB.

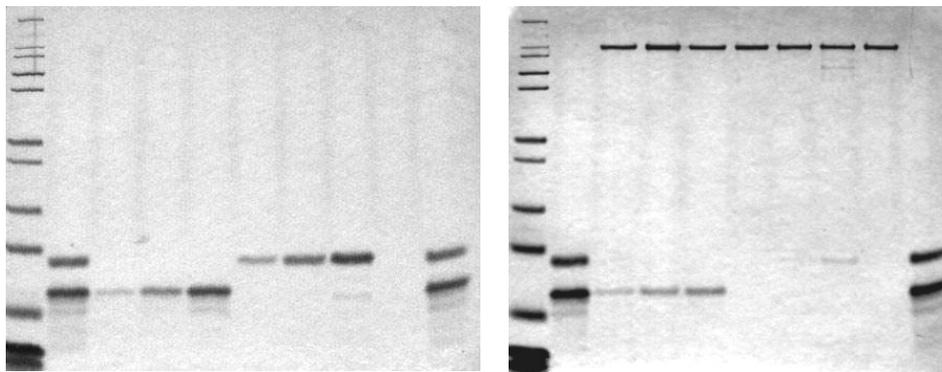


Figure 30 Test d'interaction du peptide IBB et du cytochrome c avec l' importine β -GST greffés sur des billes de glutathion-sépharose. Dépôt du peptide IBB et du cytochrome c dans 100 μ l de tampon de fixation sur 30 μ l de résine sèche greffée par 3 μ g d'importine β -GST. Gel NuPAGE 10%, coloration au bleu de Coomassie. Dépôt de 1/10 des fractions S et 2/3 des fractions E. M : marqueur 12 (Novex) ; T : IBB (500ng) + cytochrome c (500ng) ; 1, 2, 3 : IBB (dépôt respectivement de 1,25 μ g, 2,5 μ g et 5 μ g sur la colonne) ; 4, 5, 6 : Cyt c (dépôt respectivement de 2 μ g, 4 μ g, 8 μ g).

Le peptide IBB est donc capable d'interagir avec l'importine β alors que le cytochrome c ne l'est pas.

c) Spécificité de l'interaction du peptide IBB avec l'importine β

Pour tester la spécificité de l'interaction entre l'IBB et l'importine β , le test d'interaction a été réalisé avec l'importine α et la GST.

Quand on dépose sur gel NuPAGE les fractions E et S des tests d'interaction entre l'IBB et l'importine α ou la GST (figure 31), on note la présence d'IBB dans les deux cas.

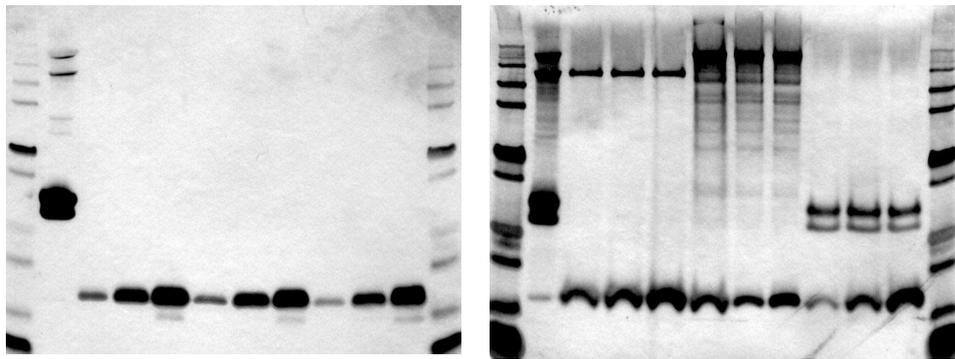


Figure 31 Test d'interaction du peptide IBB avec les importines α , β et la GST. Gel NuPAGE 10%, coloration au nitrate d'argent. Dépôt de 1/10 des fractions S et de 2/3 des fractions E. M : marqueur 12 (Novex) ; T: IBB (500ng) + importine α (500ng) + importine β (500ng) + GST (500ng) ; imp α : résine fonctionnalisée par de l'importine α -GST, imp β : par de l'importine β -GST, GST : par de la GST ; 1, 2, 3 : IBB (dépôt respectivement de 1,25 μ g, 2,5 μ g et 5 μ g sur 30 μ l de résine, dans 100 μ l de tampon de fixation).

Finalement, dans ce modèle d'interaction *in vitro*, le peptide IBB synthétique interagit avec toutes les protéines utilisées.

d) Discussion

On ne peut pas conclure sur la spécificité de l'interaction entre le peptide IBB et les importines. Nous avons testé différents tampons pour diminuer les interactions non-spécifiques entre l'IBB et les protéines greffées à la résine, entre autre nous avons ajouté au tampon de fixation des quantités croissantes de casaminoacides, de BSA ou de tween 20. Ces modifications ne permettent pas de démontrer la spécificité de l'interaction.

L'interaction entre le peptide IBB et l'importine α pourrait être expliquée par le fait que l'importine α non complexée à l'importine β semble former des dimères (importine α de levure uniquement, figure 32) ou se replier sur elle-même (53) (importine α de levure) (55) (importine α de souris).

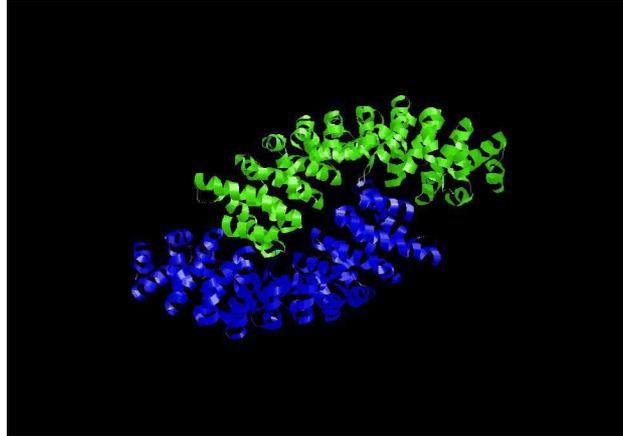


Figure 32 Structure de l'importine α de levure homodimérisée. D'après (53).

Kobe n'observe pas de dimérisation de l'importine α , il propose que la séquence IBB, contenant une séquence NLS interne, se replierait sur le site d'interaction entre l'importine α et les séquences NLS des protéines karyophiles cytoplasmiques et le masquerait. En interagissant avec l'importine β , la partie N-terminale de l'importine α libérerait le site de fixation des protéines-NLS et permettrait une interaction beaucoup plus forte avec les protéines karyophiles cytoplasmiques (55).

On ne peut pas expliquer l'interaction du peptide IBB avec la GST. Görlich précise que les protéines ribosomales et les histones, présentant de longues séquences fortement basiques homologues aux séquences IBB, interagiraient avec l'importine β de façon précoce dans le cytoplasme, ce qui leur éviterait de précipiter ou d'interagir avec les protéines cellulaires (38). On peut donc envisager que, même si le test d'interaction *in vitro* n'est pas concluant, on pourrait avoir des résultats satisfaisants d'interaction de l'IBB avec son récepteur dans des modèles cellulaires.

2. Couplage covalent du peptide IBB à un plasmide

a) Couplage du peptide IBB au TFPAM-6

Le thiol libre de la cystéine à l'extrémité C-terminale du peptide IBB réagit avec le maléimide du TFPAM-6 pour former l'IBB-TFPAM (figure 33).

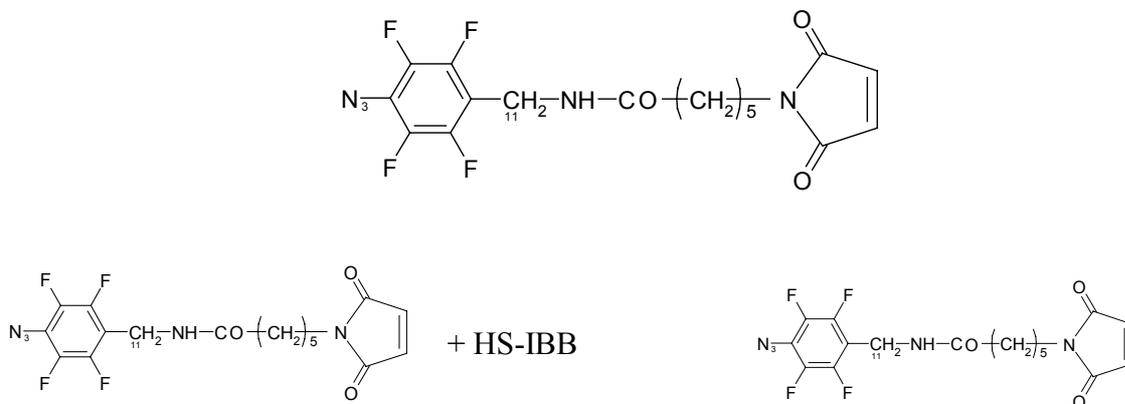


Figure 33 Réaction de couplage de l'IBB au TFPAM-6. La réaction est spontanée à température ambiante et à pH voisin de 7. Le thiol libre de la cystéine C-terminale du peptide IBB réagit avec le maléimide du TFPAM-6

Les réactifs et les produits de la réaction peuvent être suivis par chromatographie liquide haute performance : ils absorbent à 220nm et ont des temps de rétention variables.

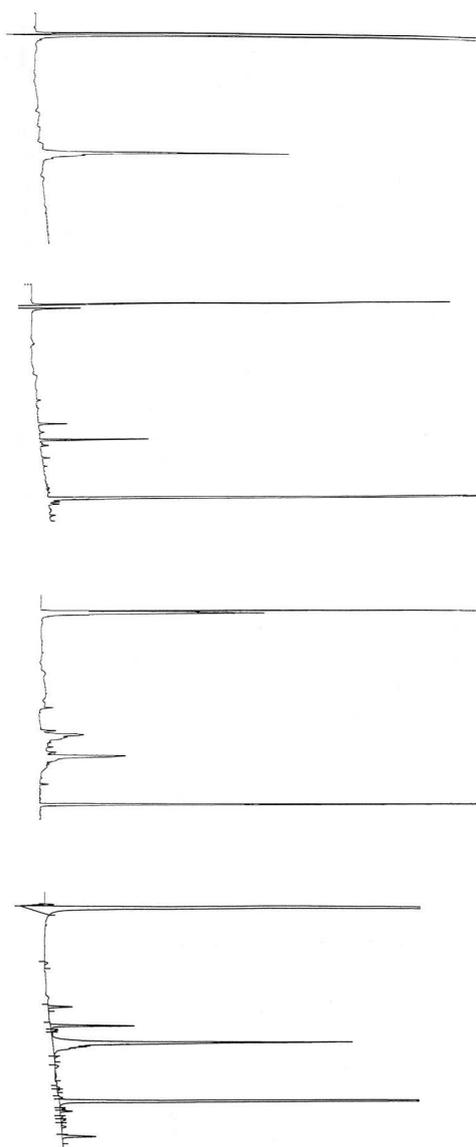


Figure 34 Chromatographes des réactifs et produits de réaction : colonne silice C18 monomérique ; gradient de 10 à 60% d'acétonitrile + 0,1% TFA des temps 10mn à 40mn ; débit 1ml/mn ; détection à 220nm ; A : peptide IBB (25µg dans 100µl de tampon HEPES pH7,5) ; B : TFPAM-6 (25µg dans 100µl de méthanol) ; C : IBB (25µg) + TFPAM-6 (5µg) dans 100µl de tampon HEPES pH7,5 ; D : IBB (20µg) + TFPAM-6 (10µg) dans 100µl d'eau + 0.08% TFA (pH2).

Le temps de rétention du peptide IBB, est de 21,1mn (figure 34, « IBB », pic noté I).

Le TFPAM-6, dissous dans du méthanol, (figure 34, « TFPAM-6 ») contient deux impuretés qui sont éluées aux temps de rétention 20,6 (pic T1) et 22,9mn (pic T2), le temps de rétention du TFPAM-6 lui-même est de 31,7mn (pic T3).

A pH2 (dans de l'eau + 0,08% TFA) la réaction n'a pas lieu, on distingue les quatre pics des réactifs, notés T1, T2, T3 et I (figure 34, « R pH2 »). Le décalage des pics du TFPAM-6 dans le chromatographe « R pH2 » par rapport au chromatographe « TFPAM-6 » est dû au changement du tampon de préparation des échantillons avant l'injection sur la colonne.

A pH7,5 (figure 34, « R pH7,5 ») la réaction a lieu, on observe trois pics principaux notés R1, R2 et R3. Après dialyse on ne détecte plus que deux pics R1 et R2.

Pour vérifier que les pics correspondent bien aux espèces supposées, l'éluat en sortie de colonne est recueilli et analysé par électrophorèse sur gel NuPAGE 10% (figure 35).



Figure 35 Eluats en sortie de colonne de chromatographie : dépôt de 15µl de chaque fraction récoltée en sortie de colonne correspondant aux pics indiqués au niveau des puits sur des gels NuPAGE 10%, coloration au nitrate d'argent. A : réaction à pH2 ; B : réaction à pH 7,5 (pics R1, R2, R3) et IBB seul (pic I); M : marqueur 12 (Novex).

Le pic I dans le chromatogramme de la réaction à pH2 (figure 34, « R pH2 ») correspond effectivement à l'élution du peptide IBB, de même que le pic I du chromatogramme de l'IBB (figure 34, « IBB »). Les pics R1 et R2 du chromatographe de la réaction à pH7,5 correspondent à l'élution de peptides de masse moléculaire proche de celle de l'IBB, certainement l'IBB n'ayant pas réagi (pic R1) et l'IBB-TFPAM (pic R2).

Nous ne disposons pas d'une technique permettant de séparer l'IBB-TFPAM de l'IBB. La mise en place d'un protocole de purification par chromatographie liquide haute performance préparative n'est pas envisageable du fait de la faible stabilité de l'IBB-TFPAM, qui perd son activité de couplage au plasmide en 15 jours.

Nous avons pris la décision d'utiliser l'IBB-TFPAM sans purification préalable.

b) Deuxième étape du couplage

L'extrémité azoture de tétrafluorobenzyle du TFPAM-6 dans l'IBB-TFPAM a la capacité de former des liaisons covalentes après activation du groupement azoture en groupement nitrène par une lumière d'une longueur d'onde proche de 360nm (nous avons utilisé une lampe monochromatique à 365nm). Les groupements fluorés assurent un meilleur rendement de la photoactivation. Le groupement nitrène est fortement réactif et se lie sur les groupements nucléophiles environnants, donc particulièrement sur les bases de l'ADN.

Cette réaction est semblable à celle du marquage d'un plasmide avec un groupement photoRed (voir matériel et méthodes, paragraphe III B 3 d). Dans cette dernière réaction, nous avons observé que les molécules d'eau interfèrent avec la réaction : si le milieu de réaction est fortement aqueux, le rendement est diminué. Nous avons supposé qu'il en est de même dans le cas de la réaction de l'IBB-TFPAM sur le plasmide.

3. Interaction du plasmide-IBB avec les importines

a) Interaction du plasmide avec la résine

Le plasmide est susceptible d'interagir avec la résine de glutathion-sépharose. Nous avons réalisé un test d'interaction entre le plasmide pXL3031 et la résine non fonctionnalisée. Par analyse sur gel d'agarose, on détecte la présence de plasmide dans la fraction S et les deux premiers lavages de la résine, mais ni dans le dernier lavage ni dans la fraction E (figure 36). En conclusion le plasmide n'interagit pas avec la résine.

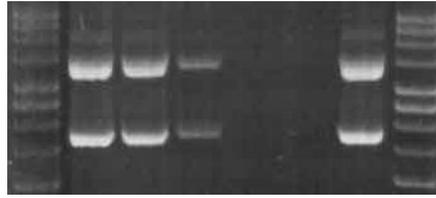


Figure 36 Test d'interaction de pXL3031 avec les billes de glutathion-sépharose. M : marqueur supercoiled DNA ladder Gibco BRL, T : témoin (500ng de pXL3031), S : fraction S, L_i : ième lavage (i=1, 5), E : fraction E. Test d'interaction de 1µg de pXL3031 sur 30µl de résine non fonctionnalisée. Dépôt de 1/3 de la fraction S et des solutions de lavage et de la totalité de la fraction E.

b) Interaction du plasmide-IBB avec les importines

Le peptide IBB a été couplé au plasmide pXL3031, à différents rapports molaires peptide/plasmide et l'interaction entre ces plasmides et les importines α et β a été évaluée.

Les rapports molaires plasmide/IBB cités dans ce paragraphe et les suivants correspondent aux quantités d'IBB-TFPAM initialement mises en contact et photoactivées en présence de plasmide : il n'y a pas eu de purification après la photoactivation, l'IBB-TFPAM qui n'est pas fixé covalamment au plasmide n'a pas été éliminé et nous n'avons pas dosé l'IBB effectivement couplé aux plasmides.

Pour 10 IBB par plasmide on ne détecte pas de plasmide dans la fraction E (correspondante au plasmide-IBB interagissant avec la résine fonctionnalisée, voir figure 28) du test d'interaction avec l'importine β . Pour 25 et 50 IBB par plasmide, on détecte la même quantité de plasmide dans les fractions E. Cependant on retrouve aussi la même quantité de plasmide-IBB dans la fraction E quand le mélange plasmide et IBB-TFPAM n'a pas été photoactivé (il n'y a alors pas de liaison covalente entre le plasmide et l'IBB). On détecte aussi la même quantité de plasmide dans la fraction E lors des tests d'interaction avec l'importine α (figure 37).



Figure 37 Test d'interaction de pXL3031-IBB avec les importines. T : témoin (500ng de pXL3031), S : surnageant, E : éluat. hv ou non hv : photoactivé ou non photoactivé. Tests d'interaction de 8µg de plasmide-IBB avec 30µl de résine fonctionnalisée avec l'importine α -GST ou l'importine β -GST, dans 100µl de tampon de fixation. Dépôt de 1/10 des fractions S et de 2/3 des fractions E.

Les quantités de plasmides dans les fractions E et S ont été dosées par la méthode Picogreen. Les résultats des dosages sont indiqués dans le tableau 13. Les 5 essais décrits dans ce tableau sont totalement indépendants.

quantité plasmide	Conditions (mole de plasmide : mole d'IBB)					
	8μg	1:10 33ng 0,4%	1:25 49ng 0,6%	1:44 79ng 0,1%	1:25 non hv 25ng 0,3%	
8μg	1:10 43ng 0,5%	1:25 126ng 1,6%	1:50 194ng 2,4%	1:25 non hv 185ng 2,3%	1:25 impα 287ng 3,6%	1:25 non hv impα 410ng 5%
8μg	1:0 PR 31ng 0,4%	1:10 PR 188ng 2,3%	1:0 11ng 0,1%	1:10 49ng 0,6%		
3μg	1:0 16ng 0,5%	1:10 24ng 0,8%	1:20 31ng 1%	1:40 44ng 1,5%		
2μg	1:0 5ng 0,25%	1:10 5ng 0,25%	1:20 12ng 0,6%	1:40 51ng 2,5%		

Tableau 13 Bilan des tests d'interaction pXL3031-IBB avec les importines α et β. PR : plasmide fluorescent marqué par photoactivation avec du photoRed. Quantités en ng : quantité de plasmide dans la fraction E, quantités en pourcentage : pourcentage de plasmide dans la fraction E par rapport à la quantité de plasmide initialement déposée sur la résine ; hv : photoactivé, non hv : non photoactivé.

c) Discussion

Pour un même rapport molaire plasmide / IBB on détecte des quantités très différentes de plasmides dans les fractions E. On peut penser qu'il y a une interaction entre le plasmide-IBB et les importines mais qu'elle est trop faible pour être quantifiée précisément. Cette conclusion souligne le fait que ce type de test reste qualitatif et non quantitatif. Toutefois le plasmide-IBB, avec liaison covalente ou non couplé, interagit avec l'importine β alors qu'on ne détecte pratiquement pas d'interaction dans le cas du plasmide sans IBB.

A nouveau le plasmide-IBB interagit autant avec l'importine α qu'avec l'importine β, et autant si l'IBB est lié de façon covalente ou non covalente avec le plasmide. On ne peut donc pas conclure sur une interaction spécifique du plasmide-IBB avec le récepteur cellulaire de l'IBB. Cependant la présence d'IBB, couplé de façon covalente ou non covalente, permet de retenir le plasmide sur la résine fonctionnalisée avec de l'importine α ou de l'importine β.

4. Tests cellulaires du plasmide-IBB

a) Test d'import sur cellules HeLa perméabilisées à la digitonine

Nous avons réalisé des tests d'import avec un plasmide fluorescent marqué par photoactivation (voir matériel et méthodes, paragraphe III B 3 d) auquel a été couplé de l'IBB aux rapports molaires de 1:10, 1:25 et 1:50 (plasmide:IBB, quantités d'IBB mises initialement au contact des plasmides). Dans tous les cas la fluorescence n'est visible que dans le cytoplasme et sur l'enveloppe nucléaire des cellules perméabilisées comme dans le cas du plasmide fluorescent sans IBB (figure 38), alors que la BSA-NLS est activement importée dans le noyau des cellules perméabilisées (données non représentées).

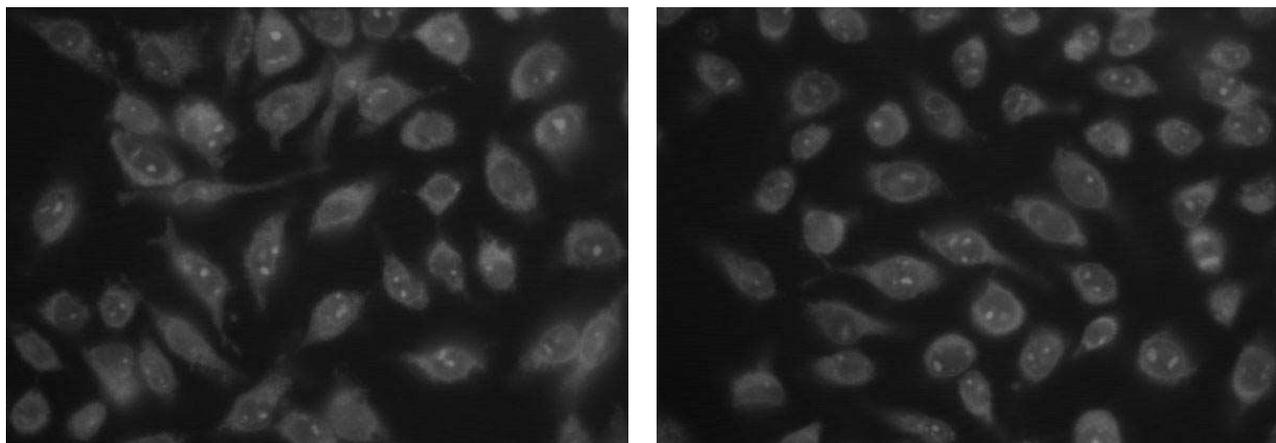


Figure 38 Test d'import de pXL3031-IBB fluorescent. Peptide IBB couplé par photoactivation au rapport 1:25 (mol plasmide:mol IBB). Test d'import de 3 μ g de plasmide pXL3031 marqué au photoRed. Cellules HeLa perméabilisées à la digitonine, ensemencées la veille à raison de 50000 cellules par puits de labteks 4 puits. Grossissement : x40.

Dans ces conditions, l'IBB ne permet donc pas d'améliorer l'import nucléaire du plasmide pXL3031 fluorescent.

b) Tests de transfection du plasmide-IBB

(1) De 1 à 10 moles d'IBB par mole de plasmide

Les tests de transfection ont été réalisés avec 250ng de plasmide pXL3031 auquel ont été couplées des quantités croissantes d'IBB, allant de 1 à 10 moles d'IBB par mole de plasmide. Le lipofectant utilisé est le RPR120535, au rapport molaire de 6nmol de RPR120535/ μ g de plasmide. Dans ces conditions la transfection est efficace quand les complexes sont dilués dans du milieu de culture sans sérum avant d'être déposés sur les cellules. S'ils sont dilués dans du milieu de culture avec sérum, le transfert de gènes est inefficace quand les complexes sont formulés dans du NaCl 150mM et efficace quand les complexes sont formulés dans une solution de NaCl 150mM / NaHCO₃ 20mM (voir paragraphe III B 2 a). Les résultats du test de transfection sont présentés dans la figure 39.

Figure 39 Transfection de pXL3031-IBB sur des cellules HeLa, faibles quantités de peptide IBB. 6nmol RPR120535/ μ g pXL3031-IBB, complexes préparés dans carbonate 20mM/NaCl 150mM et dilués dans du milieu avec sérum. Transfection 24h.

Dans les conditions allant de 1:1 à 1:7,5 (mole de plasmide : mole d'IBB) la présence de peptide IBB couplé de façon covalente au plasmide ne modifie pas le niveau d'expression du gène rapporteur, ici la luciférase.

(2) De 10 à 500 moles d'IBB par moles de plasmide

Dans les mêmes conditions, si on couple 1:10 à 1:500 (mole de plasmide : mole d'IBB), l'expression du gène rapporteur diminue avec le nombre de peptides IBB couplés aux plasmides (figure 40).

Figure 40 Transfection de pXL3031-IBB sur des cellules HeLa, fortes quantités de peptide IBB. 6nmol RPR120535/ μ g pXL3031-IBB, complexes préparés dans carbonate 20mM/NaCl 150mM et dilués dans du milieu avec sérum. Transfection 24h.

La transfection est inefficace si les complexes sont préparés dans du NaCl 150mM (données non représentées).

c) Tests de transfection d'un plasmide fluorescent-IBB

Dans les mêmes conditions de transfection que celles décrites pour le plasmide-IBB non fluorescent, et pour 10 peptides IBB par plasmide, on observe un marquage du cytoplasme des cellules, mais aucune fluorescence dans les noyaux. Le marquage du cytoplasme est ponctué (figure 41).

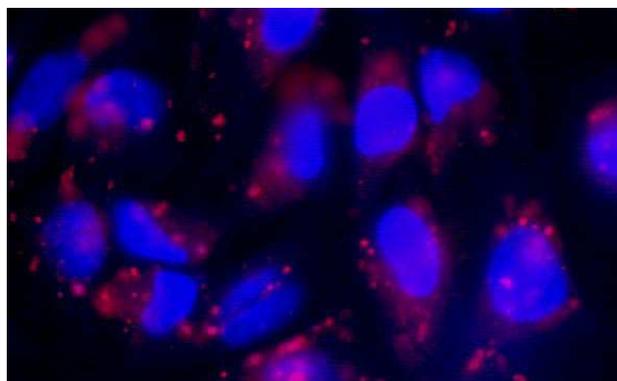


Figure 41 Transfection de pXL3031PhotoRed-IBB sur cellules HeLa. Peptide IBB couplé de façon covalente au rapport de 1:10 (mol plasmide:mol IBB). Lipofectant : RPR120535 à 6nmole/ μ g d'ADN, complexes préparés

dans une solution de carbonate 20mM/NaCl 150mM, dilués dans du milieu de culture avec sérum, 5µg d'ADN par puits, transfection 24h. Observation au microscope à fluorescence, grossissement x100.

d) Conclusion

Si plus de 10 peptides IBB sont couplés à un plasmide l'expression du gène rapporteur est en partie inhibée. Si on couple de 1 à 10 peptides IBB sur un plasmide on n'observe pas d'augmentation significative du niveau d'expression du transgène. Pour 10 peptides IBB par plasmide, la transfection avec un plasmide fluorescent de cellules HeLa met en évidence une localisation cytoplasmique du plasmide-IBB, sous forme de vésicules.

Dans le système des cellules perméabilisées à la digitonine, si 10, 25 ou 50 peptides IBB sont couplés sur un plasmide fluorescent, on observe un marquage diffus dans le « fantôme » de cytoplasme des cellules et sur l'enveloppe nucléaire, mais pas dans le noyau.

On peut conclure que le peptide IBB couplé de façon covalente sur un plasmide n'améliore pas l'import nucléaire du plasmide. Dans les tests de transfection, le plasmide-IBB semble stocké dans des vésicules cytoplasmiques, certainement des endosomes.

Par contre les tests d'interaction du plasmide-IBB avec les importines a permis de mettre en évidence une propriété importante du peptide IBB. En effet que l'IBB-TFPAM soit photoactivé en présence du plasmide (couplage covalent) ou qu'il soit simplement mis en contact avec ce dernier (pas de couplage covalent de l'IBB au plasmide), la quantité de plasmide interagissant avec les importines est équivalente.

C. Complexation du peptide IBB avec un plasmide et étude des propriétés du complexe plasmide / IBB

Dans cette partie nous avons étudié les propriétés du complexe formé par simple mise en contact du peptide IBB avec des plasmides.

1. Le peptide IBB complexe les plasmides

L'incubation de plasmides avec le peptide IBB à des rapports molaires allant de 1/10 à 1/500 (plasmide/IBB) provoque des changements dans les propriétés physico-chimiques du plasmide (figure 42). A partir de 100 moles d'IBB par moles de plasmides, la migration du plasmide est retardée. Ce retard s'accroît quand on augmente le nombre de moles de peptide IBB, pour un nombre de moles de plasmides constant. A partir de 250 moles d'IBB par moles de plasmides, une fraction du plasmide ne migre plus dans le gel. Pour des quantités supérieures à 500 moles d'IBB par mole de plasmides, le plasmide ne migre plus, il reste dans les puits du gel.

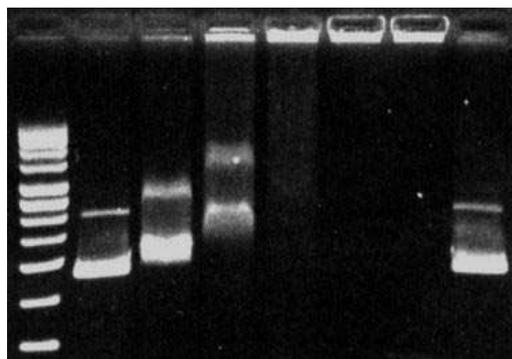


Figure 42 Retard sur gel du plasmide pXL3031 complexé avec le peptide IBB. 1 : marqueur de taille de plasmides surenroulés (Gibco BRL) ; 2 et 8 : pXL3031 ; 3, 4, 5, 6 et 7 : pXL3031 / IBB aux rapports molaires de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000. Les échantillons (300ng de plasmide par puits) ont été préparés dans 20µl d'HEPES 50mM pH7,5.

Le peptide IBB étant fortement cationique et l'ADN fortement anionique l'interaction électrostatique entre ces deux molécules provoque la formation d'un complexe, l'IBB réduit la charge négative du plasmide entraînant un retard de migration du plasmide sur gel d'agarose. Si le peptide IBB a totalement neutralisé la charge du plasmide, le complexe formé n'est pas stable et s'agrège, formant alors des particules neutres de grande taille qui ne passent plus au travers des mailles du gel.

2. Transfert de gènes par les complexes plasmide/IBB ou lipofectant/plasmide/IBB

Nous avons étudié l'expression du gène rapporteur luciférase codé par un plasmide complexé au peptide IBB, en présence ou en l'absence de lipofectant, par transfection sur cellules HeLa. En présence de lipofectant et dans des conditions de transfection peu efficace (complexes formulés dans du NaCl 150mM, puis dilués dans du milieu avec sérum) l'expression de la luciférase est augmentée d'un facteur proche de 1000 en présence de 500 moles d'IBB par mole de plasmide (figure 43). Ce résultat a pu être reproduit lors de trois tests de transfection indépendants, on note une augmentation linéaire de l'expression du gène rapporteur quand la quantité de peptide IBB complexant le plasmide augmente.

Figure 43 Transfection de cellules HeLa par pXL3031 complexé au peptide IBB. 6nmol RPR120535/µg d'ADN, 250ng d'ADN par puits, complexes formulés dans NaCl 150mM puis dilués dans du milieu avec sérum.

Dans des conditions de transfection efficace (les complexes sont formulés dans une solution de NaCl 150mM/NaHCO₃ 20mM puis dilués dans du milieu avec sérum) la présence d'IBB ne modifie pas le niveau d'expression de la luciférase (figure 44). Il en est de même lorsque les tests de transfection sont réalisés avec des complexes préparés dans une solution de NaCl 150mM et dilués dans du milieu de culture sans sérum (données non représentées).

Figure 44 Transfection de cellules HeLa par pXL3031 complexé au peptide IBB. 6nmol RPR120535/μg d'ADN, 250ng d'ADN par puits, complexes formulés dans NaCl150mM/NaHCO₃ 20mM puis dilués dans du milieu avec sérum.

3. Localisation cellulaire de complexes plasmide/IBB

L'augmentation du niveau de transfection observée quand le plasmide est complexé avec un rapport molaire 1/500 (plasmide/IBB) peut résulter

- d'une entrée accrue du plasmide dans le cytoplasme cellulaire,
- d'une diffusion améliorée du plasmide dans le cytoplasme,
- d'une pénétration accrue du plasmide dans le noyau cellulaire.

Nous avons étudié la localisation cellulaire d'un plasmide fluorescent après complexation avec le peptide IBB et transfection de cellules dans des conditions de transfection efficace (préparation des complexes dans une solution de NaCl 150mM, dilution des complexes et transfection dans du milieu de culture sans sérum). Ces conditions sont équivalentes aux conditions de la transfection de la figure 44.

Nous avons réalisé des tests de transfection avec un plasmide fluorescent (138) complexé avec le peptide IBB seul ou le peptide IBB et le lipofectant RPR120535 (132) sur deux types cellulaires (HeLa et hAoSMC) dans les conditions suivantes (tableau 14):

	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
pXL3031	+	+	+	+
IBB	-	+	-	+
lipofectant	-	-	+	+

Tableau 14 Conditions de transfection de pXL3031 fluorescent. Transfection réalisée dans des Labteks 4 puits. + : l'élément a été ajouté. - : l'élément n'a pas été ajouté. pXL3031 : 1μg par puits ; IBB : 1/500 (mole plasmide :mole IBB) ; lipofectant : 6nmol RPR120535/μg d'ADN.

Dans les conditions 1 et 2 (test de transfection sans lipofectant), on ne détecte de fluorescence ni dans le cytoplasme, ni dans le noyau des cellules. Le peptide IBB ne permet donc pas d'améliorer le passage du plasmide à travers la membrane plasmique.

En présence de lipofectant, on détecte des vésicules fluorescentes dans le cytoplasme des cellules, mais pas dans le noyau. Les vésicules fluorescentes sont réparties de façon homogène dans le cytoplasme et à proximité de l'enveloppe nucléaire.

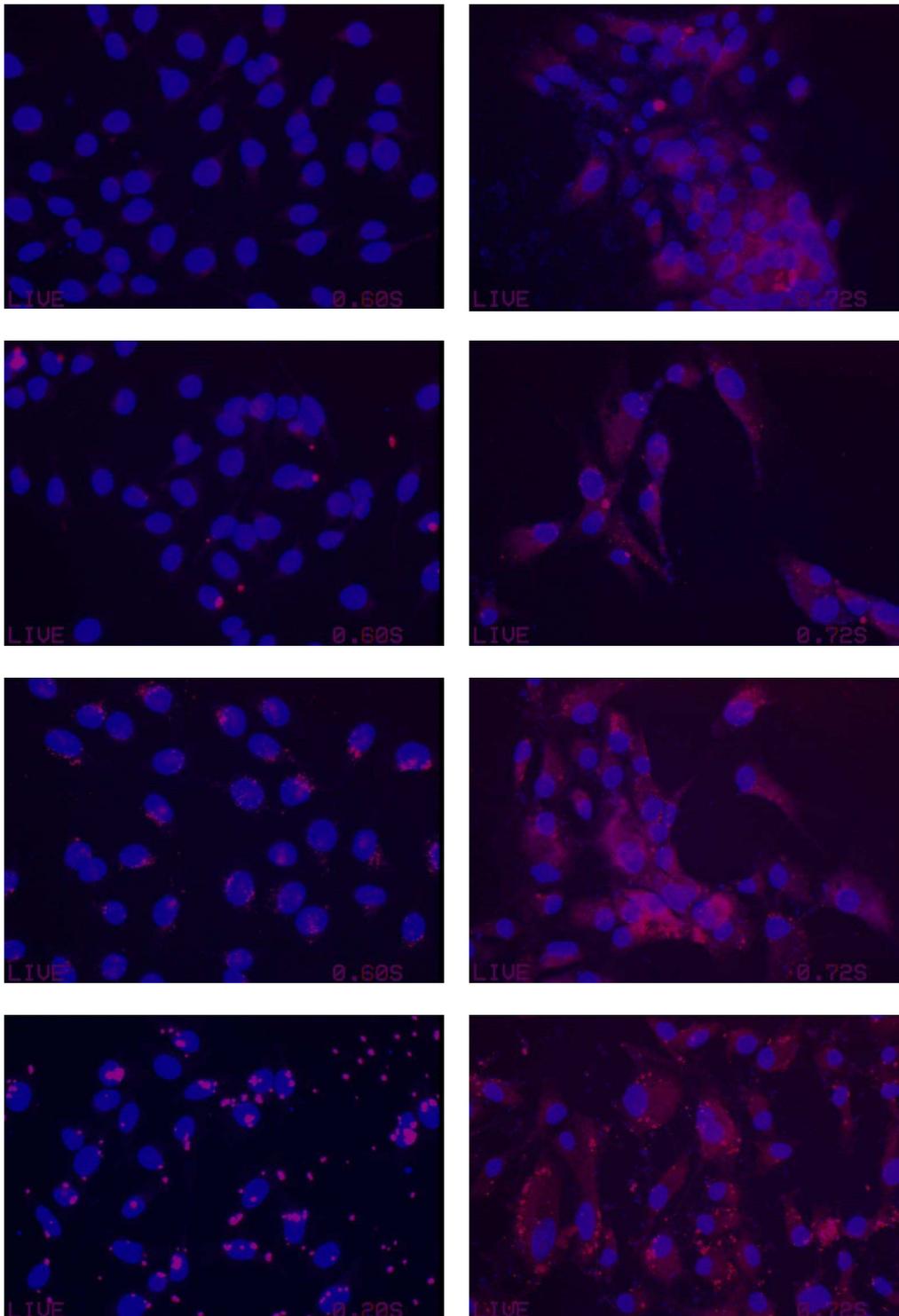


Figure 45 Tests de transfection de pXL3031 PhotoRed en présence de lipofectant et d'IBB. pXL3031 PR : pXL3031 photoRed, + RPR120535 : ajout du lipofectant RPR120535 au rapport 6nmole / μ g d'ADN, + IBB : ajout d'IBB au rapport 1 : 500 (mole de plasmide : mole d'IBB). H1 à 4 : transfection sur cellules HeLa, S1 à 4 : transfection sur cellules hAoSMC.

Dans le cas où le peptide IBB a été ajouté aux complexes (condition 4), les vésicules sont plus grosses que quand les complexes sont formés sans peptide IBB (figure 45). Les résultats sont semblables sur les cellules HeLa et sur les cellules hAoSMC.

Dans le cas d'un test de transfection en présence de lipofectant, la présence de peptide IBB augmente l'agrégation du plasmide dans le cytoplasme des cellules. Des études complémentaires permettraient de déterminer si le lipofectant RPR120535 est encore présent dans ces complexes ou si les complexes ne sont constitués que de plasmide et d'IBB.

Il a été montré que la taille du complexe plasmide/lipofectant peut être corrélée avec l'efficacité de transfection (156). Il est possible que l'augmentation du niveau de transfection observée en présence de 500 moles de peptide IBB pour 1 mole de plasmide soit simplement due à la modification de la taille des complexes plasmide/lipofectant.

Ce résultat rappelle celui qui avait été obtenu avec des peptides précompactants de l'ADN tels que des fragments de l'histone H1 (157). Dans cette étude, les plasmides compactés avec des dimères de fragment d'histone H1 se localisaient dans le cytoplasme des cellules sous la forme de vésicules de grande taille après transfection avec un lipide cationique. Le plasmide seul, complexé avec le lipide cationique dans les mêmes conditions, donnait lieu à un marquage ponctué dans le cytoplasme des cellules, mais avec des vésicules de taille beaucoup plus petites.

4. Analyse de la taille des particules formées

Nous avons analysé la taille des particules formées entre le peptide IBB et le plasmide pXL3031, en variant le rapport molaire plasmide/IBB (figure 46).

Les complexes ont été préparés dans de l'eau (et non une solution de NaCl 150mM, mais ce paramètre affecte peu la répartition des tailles des complexes) ou une solution de bicarbonate 20mM puis dilués au dixième dans du milieu de culture contenant 10% de sérum pour reconstituer les conditions utilisées dans les tests de transfection. Les tailles des particules plasmide/IBB sont analysées au nanosizer N4.

Dans le cas où les complexes sont préparés dans de l'eau (figure 46, E), la population peut être répartie en deux sous-populations, quel que soit le rapport molaire plasmide/IBB. Pour tous les rapports molaires, la première sous-population, environ 50% des particules, est constituée de particules dont la taille avoisine 100nm. La deuxième sous-population est constituée de particules de plus grande taille, autour de 600nm pour les rapports molaires 1:10 à 1:100 et autour de 3000nm (particules agrégées) pour les rapports molaires 1:250 et 1:500.

Dans le cas où les complexes ont été formulés dans une solution de carbonate, à l'œil nu on distingue une floculation de la solution de complexes. Le nanosizer ne détecte plus qu'une population de particules de grande taille, entre 1500 et plus de 3000nm, les particules sont totalement agrégées. Les particules dont la taille est comprise entre 10 et 15nm dans le cas des rapports molaires 1:10 à 1:50 sont certainement des particules trop grosses dont le nanosizer n'a pas pu identifier précisément la taille (figure 46, C).

Figure 46 Analyse de taille des complexes plasmide/IBB. La légende indique le pourcentage de particules parmi la population globale. E : complexes formulés dans de l'eau, C : complexes formulés dans une solution de carbonate 20mM

Dans le cas des complexes préparés dans de l'eau à un rapport molaire de 1:500 (mole de plasmide:moles d'IBB), nous avons étudié la stabilité colloïdale de la suspension à température ambiante (figure 47).

Figure 47 Evolution de la tailles des particules formulées avec 500 moles d'IBB pour 1 mole de plasmide. La légende indique le pourcentage de particules de la population globale.

L'agrégation des complexes formés avec 1 mole de plasmide pour 500 moles d'IBB est progressive, 1h30 après l'ajout du milieu avec sérum la majorité des particules ont un diamètre moyen supérieur à 1 μ m.

5. Discussion

On estime que l'ADN double brin à pH7,5 contient 3,2nmoles de charges négatives par μ g. Le peptide IBB contient 14 charges positives par molécule, sa masse molaire est de 7535g/mole, 1 μ g d'IBB contient donc 0,133nmole de peptide, soit 1,86nmoles de charge positive.

1pmole de plasmide contient 7,7nmoles de charges négatives et 500pmoles d'IBB contiennent 7nmoles de charges positives. Au rapport molaire 1:500 (plasmide:IBB) les particules formées sont donc pratiquement neutres, ce qui explique l'agrégation.

L'IBB complexe l'ADN, mais nous ne pouvons pas conclure sur une éventuelle compaction du plasmide par le peptide IBB, puisque nous n'avons pas de données sur l'expulsion du Bet en présence d'IBB.

Il a été montré que la taille du complexe plasmide/RPR120535 conditionne l'efficacité de transfection (156). Quand les complexes sont formulés dans du NaCl 150mM puis dilués dans du milieu de culture avec sérum, les particules formées sont de petite taille et la transfection est très peu efficace. Quand les complexes sont formulés dans du NaCl 150mM puis dilués dans du milieu de culture sans sérum, les particules sont plus grosses et la transfection est efficace. Pour obtenir une transfection efficace en présence de sérum on peut formuler les complexes dans du NaCl 150mM/NaHCO₃ 20mM. La taille des particules est alors plus importante et la transfection efficace (156).

En présence de peptide IBB, il est probable que l'agrégation des complexes RPR120535/plasmide soit à l'origine de l'augmentation du niveau de transfection (8000CPS/ μ g de protéines au rapport molaire 1:500 au lieu de 80CPS/ μ g de protéines aux rapports molaires 1:0 à 1:100). Notons cependant que le niveau de transfection n'atteint pas le niveau obtenu avec les complexes RPR120535/plasmide formulés dans une solution de carbonate (1000000 CPS/ μ g de protéines quel que soit le rapport mol plasmide/mol IBB).

Ces résultats s'apparentent à ceux obtenus avec les peptides précompactants de l'ADN, tels que des fragments de protéines histones, de protamine ou des polylysines de faible poids moléculaire (157). Cependant l'effet de ces peptides permettait de rétablir le niveau de transfection obtenu dans les conditions optimales. Ce n'est pas le cas avec le peptide IBB, mais nous n'avons pas testé différents ordres de mélange du peptide avec l'ADN et le lipide cationique, ni cherché les conditions optimales de préparation des complexes (pH, concentrations salines...).

Bien que la complexation de l'ADN par l'IBB puisse sembler être un avantage puisqu'il pourrait permettre une meilleure interaction du complexe ADN/IBB avec les membranes cellulaires lors des tests de transfection et une protection du plasmide contre l'action des nucléases, on peut envisager que l'IBB, complexé à l'ADN, n'a plus la conformation nécessaire à son interaction avec l'importine β , son récepteur cellulaire.

D. Discussion des résultats

L'étude approfondie des caractéristiques biochimiques du peptide IBB a permis de déceler qu'il peut s'associer par liaison électrostatique avec l'ADN, le pré-compacter et rétablir l'expression du gène rapporteur dans des tests de transfection en conditions habituellement inefficaces.

Le peptide IBB couplé de façon covalente à un plasmide interagit avec son récepteur, l'importine β , mais la spécificité de cette interaction n'a pas pu être démontrée de façon rigoureuse. Nous aurions pu envisager des tests d'interaction avec un peptide de même taille et de même charge que le peptide IBB, ou un peptide IBB inversé ou muté pour tester la spécificité de l'interaction. Le coût de production d'un peptide de 60 acides aminés est trop élevé pour que nous ayions pu faire synthétiser de peptide.

Les tests de transfection du plasmide-IBB n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression du gène rapporteur car les peptides ont été couplés aléatoirement sur le squelette du plasmide, et donc certainement sur la cassette d'expression, abolissant sa transcription. On pourrait imaginer, comme dans les travaux de (91), de coupler un peptide IBB unique en un site précis sur un plasmide. Cependant dans une telle approche on ne peut pas garantir que la conformation finale du peptide sera compatible avec l'interaction avec l'importine β . D'autre part si le peptide est capable de complexer le plasmide quand il n'y est pas fixé covalamment il doit être capable de le complexer même après couplage covalent, et dans ce cas le peptide n'est certainement pas accessible pour son récepteur.

Le projet initial consistait à améliorer l'import nucléaire d'un plasmide par couplage covalent d'un signal de localisation nucléaire de type IBB. Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'import nucléaire d'un tel plasmide.

VI. Ciblage extracellulaire : le système modèle du ciblage du récepteur aux asialoglycoprotéines des hépatocytes

Ce travail a été réalisé avec l'aide d'Arnaud Jollet et de Céline Largeau sous la responsabilité de Virginie Escriou.

A. Introduction et stratégie

Ce programme, en collaboration avec C. Monneret à l'Institut Curie et F. Schuber à l'Université de Strasbourg, consiste à mettre au point des méthodes de formulation et de caractérisation de complexes ADN/lipides ciblés vers le récepteur aux asialoglycoprotéines des hépatocytes. Les lipides choisis, fournis par nos collaborateurs, présentent une tête de ciblage constituée de résidus galactose, reconnue par le récepteur aux asialoglycoprotéines.

Les propriétés recherchées pour ces formulations sont :

- Une compaction efficace de l'ADN
- Une bonne stabilité colloïdale des complexes
- La présentation des têtes de ciblage à la surface des complexes ADN/lipide. Ces têtes de ciblage peuvent alors être reconnues par le récepteur aux asialoglycoprotéines.

A terme, ces formulations devraient permettre le transfert de gènes ciblé dans les hépatocytes via le récepteur aux asialoglycoprotéines, c'est à dire

- L'absence de transfert de gènes dans les lignées cellulaires ne présentant pas le récepteur
- Un transfert de gènes accru dans les lignées cellulaires présentant le récepteur
- Un transfert de gènes augmenté par la présence de chloroquine dans le milieu de culture des cellules, agent endosomolytique permettant la libération de l'ADN dans le cytoplasme cellulaire après internalisation des complexes ADN/lipide par la voie de l'endocytose à récepteur.

Pour mettre au point de telles formulations, nous avons choisi d'associer à l'ADN un **lipide cationique**, permettant sa compaction, et un **lipide galactosylé**, permettant le ciblage des récepteurs aux asialoglycoprotéines. Ces deux lipides ont été associés sous forme de liposomes grâce à l'adjonction d'un **lipide neutre** à la formulation.

Grâce à ces complexes présentant des têtes de ciblage galactose linéaires ou biantennées, **l'influence de la structure de la tête de ciblage sur les caractéristiques des complexes** peut être étudiée (taille des liposomes et des complexes ADN/liposomes, compaction de l'ADN par les liposomes, présentation des têtes de ciblage à la surface des liposomes et des complexes).

L'avancée des travaux a mis en évidence des problèmes d'interaction non-spécifique des vecteurs lipidiques cationiques avec les membranes de toutes les cellules, pouvant masquer d'éventuelles interactions entre les têtes de ciblages et le récepteur aux asialoglycoprotéines.

La première solution envisagée a consisté à ajouter des polymères aux formulations de liposomes de façon à masquer les charges positives des complexes. Cependant ces polymères masquaient aussi les têtes de ciblages.

La seconde solution envisagée a consisté à remplacer les lipides galactosylés utilisés jusqu'alors par un lipide présentant à la fois **une tête de ciblage et une chaîne de polyéthylène glycol (PEG)**. Le polyéthylène glycol, polymère neutre, est couramment utilisé

pour masquer les charges de surface de liposomes préformés. Nous avons choisi de l'inclure dans les lipides constituant le liposome pour éviter que les chaînes libres ne masquent les têtes de ciblage.

La tête de ciblage de ce lipide PEG galactosylé est triantennée, présentant un résidu galactose à l'extrémité de chaque antenne.

Ces liposomes ont permis d'étudier l'influence d'un espaceur polyéthylène glycol sur les caractéristiques des complexes ADN/liposome et sur le transfert de gènes.

B. Formulation et caractérisation de liposomes et de lipoplexes à têtes de ciblage galactosylées linéaires ou biantennées

1. Formulation des liposomes galactosylés

a) Les différents lipides et liposomes

(1) Les lipides ciblants

Les glycolipides linéaires et biantennés ont été synthétisés par M. Azoulay, du laboratoire de C. Monneret (Institut Curie). Ils sont composés de trois parties : une queue hydrophobe constituée d'une double chaîne aliphatique (dioctadécylamide), un espaceur et une tête de ciblage galactose ou lactose (figure 48).

Figure 48 Structure des glycolipides galactose. La tête ciblante contient un ou plusieurs résidus galactose, l'espaceur est de taille variable et la queue hydrophobe est constituée d'une double chaîne aliphatique (voir tableau...)

Ils peuvent être classés en trois groupes en fonction de la longueur et de la structure de l'espaceur et de la tête de ciblage (tableau 15).

Les glycolipides du **groupe 1** ont une tête de ciblage **mono-galactose**, les composés 1 et 2 ont un espaceur court et le composé 3 un espaceur plus long. Les composés 1 et 2 diffèrent par la configuration anomérique de leur tête de ciblage : le composé 1 présente un β -galactose et le composé 2 présente un α -galactose. Le **groupe 2** est constitué de glycolipides à tête de ciblage galactose **bi-antennée**, de longueur d'espaceur et d'antenne variable : antennes et espaceur courts (composé 4), antennes et espaceur longs (composé 5), antennes longues et espaceur court (composé 6). Dans le **groupe 3** les glycolipides sont **mono-antennés** mais la tête de ciblage est composée d'un résidu **lactose**, de configuration anomérique α (composé 7) ou β (composé 8).

Groupe	Composé	Structure de l'antenne	Longueur de l'antenne de l'espaceur	Structure du glycolipide
1	1	mono-gal, β	Court	
	2	mono-gal, α	Court	

	3	mono-gal, α	Long	
2	4	di-gal, α	Court Court	
	5	di-gal, α	Long Long	
	6	di-gal, α	Long Court	
3	7	mono-lac, α	Court	
	8	mono-gal, β	Court	

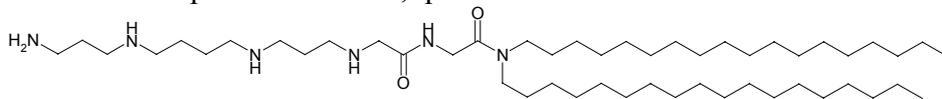
Tableau 15 Formules des glycolipides. Les glycolipides peuvent être répartis en trois groupes. Groupe 1 : mono-galactoses, groupe 2 : galactoses bi-antennée, groupe 3 : mono-lactoses.

(2) Les lipides cationiques

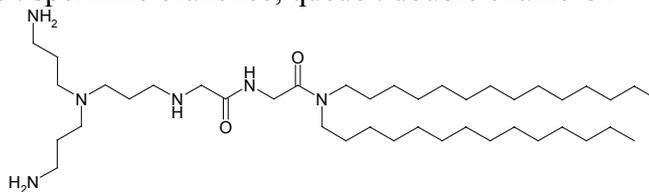
Les lipides cationiques de type RPR ont été préparés par l'équipe des chimistes du laboratoire. Ils nous sont fournis sous forme lyophilisée, que nous solubilisons dans du chloroforme pour la formulation de liposomes. Leur structure est schématisée dans la figure 49, les formules détaillées sont présentées dans la figure 50.

Figure 49 Structure des lipides cationiques. La tête cationique est une chaîne spermine, linéaire ou branchée, la queue hydrophobe est une chaîne carbonée en C14 ou C18.

A – RPR120535. tête : spermine linéaire, queue : double chaîne C18



B – RPR209120. tête : spermine branchée, queue : double chaîne C14



C – RPR122766. Tête : spermine linéaire, queue : double chaîne C14

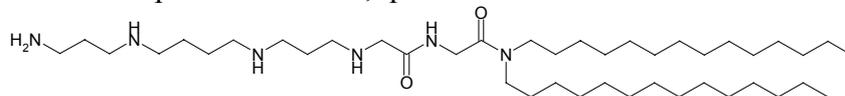


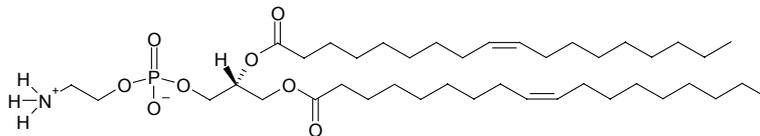
Figure 50 Formule des lipides cationiques.

(3) Les lipides neutres

Ils sont utilisés pour permettre la formulation de liposomes avec les lipides cationiques (figures 51 et 52). La DOPE possède en outre des propriétés fusogènes permettant la rupture de la membrane des endosomes dans lesquels elle est piégée.

Figure 51 Structure des lipides neutres.

A - DOPE



B - EPC

Egg Phosphatidyl choline : mélange de phosphatidylcholine extraite d'œuf (Avanti Polar).

Figure 52 Description des lipides neutres.

(4) Combinaison des lipides : préparation de liposomes

Pour comparer les propriétés des différents glycolipides, nous avons choisi de les formuler sous forme de liposomes. Ce type de formulation permet de préparer des suspensions homogènes de particules de taille et de composition contrôlée dont la structure est schématisée dans la figure 53.

Figure 53 Structure des liposomes ciblant. La tête de ciblage, représentée en rouge, est constituée d'un ou plusieurs résidus galactose. Les têtes cationiques, représentées en orange sont constituées d'une chaîne spermine, linéaire ou branchée. Le corps du liposome, représenté en bleu, est constitué par les queues hydrophobes des lipides ciblant, cationiques et neutres.

Des liposomes ont été préparés avec tous les glycolipides présentés dans le tableau 15 dans deux environnements lipide cationique/lipide neutre : RPR120535/DOPE et RPR209120/EPC. Les glycolipides du groupe 3 ont aussi été formulés dans l'environnement RPR122766/DOPE. Les différentes formulations sont résumées dans le tableau 16.

	RPR120535/DOPE/glycolipide 1/1/0,5 (mole/mole/mole)	RPR209120/EPC/glycolipide 1/1/1 (mole/mole/mole)	RPR122766/DOPE/glycolipide 1/1/1 (mole/mole/mole)
Groupe 1 Glycolipides 1, 2 et 3	+	+	0
Groupe 2 Glycolipides 4, 5, 6	+	+	0
Groupe 3 Glycolipides 7, 8	+	+	+

Tableau 16 Les différents liposomes galactose. Les + indiquent que les liposomes ont été préparés. Les 0 indiquent que les liposomes n'ont pas été préparés. RPR120535, RPR209120 et RPR122766 : lipides cationiques. DOPE et EPC : lipides neutres. Glycolipides : lipides décrits dans le tableau 15.

Pour chacun de ces types de liposomes, des liposomes témoins (sans glycolipides) ont été préparés, c'est à dire RPR120535/DOPE 1/1,5 (mole/mole), RPR209120/EPC 1/2 (mole/mole) et RPR122766/DOPE 1/2 (mole/mole).

On appelle liposome (resp. lipoplexe) galactose *i* le liposome (resp. lipoplexe) formulé avec le glycolipide *i* (*i* étant le numéro du composé utilisé, voir le tableau 15).

b) Analyse de la taille des liposomes

Les tailles des liposomes que nous avons préparés ont été mesurées et comparées aux tailles des liposomes témoin. Les résultats sont décrits dans la figure 54.

Figure 54 Analyse de taille des liposomes galactose. Pour chacun des glycolipides, des liposomes ont été préparés dans deux (glycolipides des groupes 1 et 2) ou trois (glycolipides du groupe 3) environnements lipide cationique/lipide neutre (voir tableau 16), notés Env. 1 (RPR120535/DOPE), Env. 2 (RPR209120/EPC) et Env. 3 (RPR122766/DOPE). Chaque environnement est représenté par une couleur d'histogramme.

Tous les liposomes ont une taille comprise entre 70 et 200nm. L'ajout de glycolipides dans la composition des liposomes n'entraîne pas de modification notable de la taille des liposomes, et ce quel que soit l'environnement lipide cationique/lipide neutre : RPR120535/DOPE, RPR209120/EPC ou RPR122766/DOPE et quelle que soit la structure de la tête de ciblage.

c) Accessibilité des résidus galactose à la surface des liposomes

Nous avons utilisé un test déjà décrit (158) pour étudier l'accessibilité des têtes de ciblage galactose à la surface des liposomes, ainsi que l'influence du glycolipide et de l'environnement lipide cationique/lipide neutre sur leur accessibilité. Le principe de ce test est présenté dans la figure 55.

L'agglutinine I du ricin ou RCA₁₂₀ (Ricinus Communis Agglutinin) est une glycoprotéine de poids moléculaire 120kDa, ayant une forte affinité pour les composés présentant des résidus galactose terminaux. En interagissant avec ces composés, elle provoque leur agrégation qui peut être suivie par mesure de l'absorbance, par exemple à 450nm.

RCA₁₂₀ lie préférentiellement les résidus galactose de configuration anomérique β , et l'affinité augmente avec le nombre de résidus galactose, jusqu'à une valeur seuil atteinte avec les **trigalactoses**, les ligands naturels des récepteurs aux asialoglycoprotéines étant des glycoprotéines triantennées. L'affinité de RCA₁₂₀ pour les chaînes galactose **polyantennées** est supérieure à l'affinité pour les chaînes galactose linéaires (158).

La RCA₁₂₀ n'a pas la même configuration que le récepteur aux asialoglycoprotéines des hépatocytes humain. L'interaction RCA₁₂₀/liposomes galactose peut toutefois constituer une approximation des interactions liposomes galactose/récepteurs aux asialoglycoprotéines des hépatocytes humains.

Figure 55 Principe du test d'agrégation par la lectine RCA₁₂₀. Les têtes de ciblage galactose accessibles à la surface des liposomes sont reconnues par RCA₁₂₀. RCA₁₂₀ se lie aux résidus galactose et provoque l'agrégation des liposomes, qui peut être suivie par mesure de l'absorbance à 450nm.

Des tests d'agrégation des liposomes galactose par RCA₁₂₀ ont été menés, les résultats sont présentés dans la figure 56. Les tests d'agrégation ont été réalisés avec deux concentrations de glycolipides : 12,5 et 25µM. Si l'agrégation est spécifiquement due à la tête de ciblage galactose, alors elle est réversible et l'agrégat peut être dissout par l'ajout d'un excès de galactose.

Figure 56 Accessibilité des têtes de ciblage galactose à la surface des liposomes : agrégation des liposomes par RCA₁₂₀. 12,5 µM et 25 µM : concentrations de glycolipide. + gal : dissolution de l'agrégat par ajout d'un excès de galactose libre. L'axe des abscisses représente le numéro identifiant le glycolipide (voir tableau 15).

Avec les liposomes galactose du **groupe 1** (liposomes 1, 2 et 3, mono-galactoses) on n'observe pas d'augmentation de l'absorbance à 450nm en présence de RCA₁₂₀, les liposomes ne sont pas agrégés. La lectine ne doit pas présenter une affinité suffisante pour les galactoses présentés à la surface des liposomes ou ces galactoses ne sont pas accessibles.

Parmi les liposomes du **groupe 2** (liposomes 3, 4 et 5, deux antennes mono-galactose), seul le liposome 5 est agrégé par RCA₁₂₀, l'agrégation est légèrement supérieure quand le liposome est formulé dans l'environnement RPR120535/DOPE que lorsqu'il est formulé dans l'environnement RPR209120/EPC. D'autre part, on n'observe pas d'augmentation de l'agrégation quand le test est réalisé avec 25µM du lipide cationique RPR120535, par rapport à 12,5µM, signe que la lectine est saturée par son ligand.

Le composé 5, qui présente deux galactoses en α, est agrégé par RCA₁₂₀. L'anomérisation β ne semble donc pas être une caractéristique essentielle pour l'agrégation.

D'autre part la longueur de chaîne totale du composé 5 est la même que celle du composé 6. La différence entre ces deux composés se situe dans la longueur relative des antennes et de l'espaceur. Le composé 5 (espaceur long et antennes longues) est agrégé alors que le composé 6 (espaceur court, antennes très longues) ne l'est pas, la chaîne du composé 5 semble présenter une certaine rigidité qui pourrait permettre aux résidus galactose d'être plus accessibles.

On aurait pu imaginer que la lectine RCA₁₂₀ aurait la même affinité pour des liposomes présentant deux mono-galactoses adjacents que pour des liposomes présentant des têtes de ciblage galactose biantennées (figure 57).

Figure 57 Interaction des têtes de ciblage galactose mono et biantennées avec RCA₁₂₀. Deux résidus galactose de deux glycolipides adjacents dans le liposome peuvent interagir avec une molécule de RCA₁₂₀.

Ce n'est pas le cas puisque les liposomes 3 (monogalactoses) ne sont pas agrégés par RCA₁₂₀ alors que les liposomes 5 (galactoses biantennés) le sont. On peut à nouveau imaginer que les doubles antennes mono-galactoses sont plus rigides et donc plus accessibles à la surface des liposomes que les chaînes linéaires.

Dans le **groupe 3**, les liposomes 7 (graphe C) s'agrègent en présence de RCA₁₂₀ quand ils sont formulés dans l'environnement RPR209120/EPC, mais pas dans les autres environnements. Dans le cas des liposomes 8 (graphe C), les liposomes s'agrègent quel que soit l'environnement cationique, mais l'agrégation est de moindre importance dans l'environnement RPR122766/DOPE, le meilleur environnement semblant être RPR209120/EPC.

L'environnement cationique des lipides galactose semble être un facteur important de l'accessibilité des résidus galactose à la surface des liposomes, RPR209120/EPC représente l'environnement le plus favorable. La caractéristique du lipide cationique permettant la meilleure accessibilité des résidus galactose ne semble pas être sa queue carbonée (en C14 plutôt qu'en C18 dans le lipide RPR120535) puisque le lipide RPR122766 (C14 comme le RPR209120) est le lipide cationique le moins favorable à l'accessibilité des résidus galactose. La structure bi-antennée de la chaîne spermine du lipide RPR209120 semble être une caractéristique importante.

Le fait que la chaîne galactose des composés du groupe 3 soit linéaire est « compensé » par la présence de deux résidus galactose à la suite (soit un lactose) dans la chaîne : l'affinité de la

lectine RCA₁₂₀ pour les liposomes du groupe 3 est aussi importante que son affinité pour le liposome 5.

Le composé 7 est un α -lactose, le composé 8 un β -lactose. On note effectivement dans ces conditions une préférence de RCA₁₂₀ pour le composé en β , puisque les liposomes 8 sont agrégés quelles que soient les conditions alors que les liposomes 7 ne sont agrégés que dans les conditions les plus favorables.

Dans le modèle « agrégation par RCA₁₂₀ » les caractéristiques des glycolipides permettant de préparer des liposomes dont les caractéristiques sont celles que nous avons décrites dans l'introduction de cette partie semblent être :

- Une structure polyantennée de la tête de ciblage
- Une certaine « rigidité » de l'espaceur et de la tête de ciblage : les résidus galactose sont alors accessibles à la surface des liposomes
- Une tête de ciblage galactose d'anométrie β
- Un environnement lipide cationique/lipide neutre de type RPR209120/EPC.

2. Préparation des complexes liposomes galactose/ADN

Les liposomes préparés précédemment ont été utilisés pour former des complexes liposomes/ADN (ou lipoplexes), à différents rapports nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN.

a) Les différents types de complexes formés

Les diagrammes de phases décrits pour les complexes micelles de lipides cationiques/ADN (voir III B 2 a et (133)) peuvent être adaptés aux liposomes galactose. En fonction du rapport nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN, les tailles et les caractéristiques physico-chimiques permettent de définir trois types de lipoplexes, décrits dans la figure 58.

Condition	Lipoplexe de type A Excès d'ADN / lipide cationique	Lipoplexe de type B ADN = lipide cationique	Lipoplexe de type C Excès lipide cationique / ADN
Propriétés du lipoplexe	Petite taille Complexes anioniques ADN peu compacté	Agrégat de grande taille Complexes neutres ADN précipité	Petite taille Complexes cationiques ADN compacté

Figure 58 Caractéristiques des complexes liposomes galactose/ADN en fonction du rapport nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN. Les plasmides, anioniques, forment des complexes avec les liposomes galactose,

cationiques. Les têtes de ciblage sont représentées en rouge, les têtes cationiques en orange et le corps hydrophobe du liposome en bleu. En fonction du rapport de charges + apportées par les lipides cationiques aux charges – apportées par le plasmide, les lipoplexes formés sont de type A, B ou C.

La notion d' « excès d'ADN/lipide cationique » correspond à un excès de charges – apportées par l'ADN par rapport aux charges + apportées par le lipide cationique.

b) Taille des complexes liposome galactosylé/ADN

Nous avons évalué la taille des lipoplexes formés avec les liposomes galactose à différents rapports nmole de lipide cationique/ μg d'ADN, dans les trois environnements lipide cationique/lipide neutre (figure 59).

Figure 59 Taille des lipoplexes galactose en fonction du rapport charges nmole de lipide cationique/ μg d'ADN.

Comme dans le cas des liposomes galactose, la présence de glycolipides et les différents environnements (lipides cationiques) n'affecte pas de façon importante la répartition de tailles des lipoplexes galactose : la zone d'instabilité colloïdale (lipoplexes de type B) existe pour tous les lipoplexes galactose, pour des rapports autour de 1 à 6 nmoles de lipide cationique / μg d'ADN. Jusqu'à une valeur voisine de 1nmole de lipide cationique/ μg d'ADN, les particules sont de petite taille (lipoplexes de type A), à des rapports supérieurs à 4 à 6nmole de lipide cationique/ μg d'ADN, les particules sont aussi de petite taille (lipoplexes de type C).

c) Compaction de l'ADN par les liposomes galactose

La compaction de l'ADN par les liposomes cationiques est évaluée par la mesure de la diminution de la fluorescence du BEt intercalé entre les bases de l'ADN : plus l'ADN est compacté, plus il éjecte le BEt qui ne fluoresce plus. Les résultats des tests de compaction sont présentés dans la figure 60.

Figure 60 Compaction de l'ADN par les liposomes galactose. Fluorescence (%) : pourcentage de fluorescence du BEt dans le complexe par rapport à la fluorescence du BEt dans le plasmide seul.

Les liposomes galactose ont la même capacité que les liposomes cationiques à expulser le Bet intercalé entre les bases de l'ADN : ils compactent aussi bien l'ADN que les liposomes témoins quand ils sont formulés avec dans l'environnement RPR120535/DOPE. Formulés

dans l'environnement RPR209120/EPC, les liposomes 3, 4, 5 et 6 compactent un peu moins bien l'ADN que les liposomes témoins.

La présence de têtes de ciblage n'affecte pas la capacité des liposomes cationiques à compacter l'ADN.

d) Accessibilité des résidus galactose à la surface des lipoplexes

Afin d'étudier l'accessibilité des têtes de ciblage à la surface des lipoplexes, les tests d'agrégation par la lectine RCA₁₂₀ ont été menés pour différentes concentrations en glycolipides, indiquées dans la légende de la figure 61. Les lipoplexes ont été préparés pour deux rapports nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN, correspondants à deux types de lipoplexes : les lipoplexes de type A et les lipoplexes de type C (voir figure 58).

Figure 61 Agrégation des lipoplexes galactose par RCA₁₂₀. LP : lipoplexe, LS : liposome. Lipoplexe A : lipoplexe formulé à 0,4nmole de lipide cationique/ μ g ADN (excès d'ADN par rapport au lipide cationique).

Lipoplexe C : lipoplexe formulé à 6nmoles de lipide cationique/ μg ADN (excès de lipide cationique par rapport à l'ADN). 12 μM , 24 μM , 25 μM , 50 μM : concentration en glycolipide.

Les tests d'agrégation par RCA₁₂₀ menés avec les lipoplexes formulés à l'aide des liposomes galactose eux-même non agrégés par RCA₁₂₀ (liposomes 1, 2, 3, 4, 6, voir figure 56) sont négatifs : la présence d'ADN ne permet pas une meilleure accessibilité des résidus galactose à la surface des liposomes.

Les **lipoplexes de type C (lipoplexe C)** préparés avec les liposomes 5 et 8 sont agrégés par RCA₁₂₀ quel que soit l'environnement lipide cationique/lipide neutre. Les lipoplexes préparés avec les liposomes 7 sont agrégés par RCA₁₂₀ quand ils sont formulés dans l'environnement RPR209120/EPC mais pas dans l'environnement RPR120535/DOPE. Dans tous les cas, l'agrégation des lipoplexe est égale ou supérieure à l'agrégation des liposomes formulés avec la même quantité de lipide cationique (figure 61).

La présence de l'ADN au contact des liposomes semble modifier les interactions électrostatiques au sein des liposomes, pouvant aboutir à une accessibilité accrue des résidus galactose à la surface des lipoplexes, permettant une agrégation par RCA₁₂₀ plus importante.

L'instabilité colloïdale des **lipoplexes de type B**, n'a pas pu être étudiée puisque les lipoplexes sont agrégés avant l'incubation avec RCA₁₂₀.

Quel que soit le liposome galactose utilisé, les **lipoplexes de type A (lipoplexe A)**, ne sont pas agrégés par RCA₁₂₀. Dans ce type de lipoplexes (voir figure 58) l'ADN n'est pas totalement compacté par le lipide, et des clichés de microscopie électronique montrent des boucles d'ADN non compacté autour des particules (133). Il est probable que des boucles d'ADN non compacté masquent les résidus galactose présentés à la surface des particules et empêchent leur interaction avec RCA₁₂₀. Les lipoplexes de type A ne peuvent donc pas être utilisés dans des tests de transfection ciblée.

e) Conclusion des caractérisations des lipoplexes galactose

L'étude des caractéristiques physico-chimiques des liposomes et lipoplexes préparés avec les glycolipides galactose mono et biantennés ont montré que l'incorporation de glycolipides de structures variées ne modifie pas les propriétés des complexes liposomes/ADN. Ainsi les diagrammes de phase des complexes sont identiques, la compaction de l'ADN pas les liposomes est semblable.

L'accessibilité de la tête de ciblage à la surface des liposomes dépend de la structure du glycolipide, et n'est pas modifiée lorsqu'on ajoute de l'ADN au liposome.

3. Tests de transfection ciblée avec les complexes liposomes galactose/ADN

Les tests de transfection ont été menés sur cellules HeLa (n'ayant pas le récepteur aux asialoglycoprotéines) et HepG2 (présence de récepteurs aux asialoglycoprotéines démontrée par Céline Largeau au laboratoire). Le rapport nmole de lipide cationique/ μg d'ADN a été fixé à 5, à ce rapport on est en présence de lipoplexes de type C (voir figure 58). Les tests ont été menés en présence de chloroquine : si l'entrée des complexes dans la cellule s'effectue par la voie de l'endocytose à récepteur, la chloroquine est connue pour déstabiliser les endosomes et libérer les lipoplexes dans le cytoplasme, améliorant de ce fait l'efficacité de transfection. Les résultats d'un des tests de transfection sont présentés dans la figure 62.

Figure 62 Tests de transfection des lipoplexes galactose sur cellules HeLa et HepG2. Lipoplexes galactose (RPR120535/DOPE/glycolipide 0,5/1/1 mol/mol/mol) préparés avec 5nmole de lipide cationique/ μg de pXL3031, dans une solution de NaCl 150mM puis dilués dans du milieu de culture avec sérum supplémenté en chloroquine. CPS : coups par seconde.

Le niveau d'expression de la luciférase est supérieur dans les tests de transfection sur cellules HeLa, par rapport au niveau d'expression sur les cellules HepG2. Les niveaux d'expression sont comparables quel que soit le lipoplexe galactose et comparables au niveau du témoin.

Dans ces conditions de transfection, **on n'observe donc pas de ciblage du récepteur aux asialoglycoprotéines avec les lipoplexes galactose.**

Le niveau d'expression relativement élevé sur les deux lignées cellulaires peut être expliqué par la charge des lipoplexes, très positive, et qui induit des interactions non spécifiques des lipoplexes avec les membranes plasmiques. Les lipoplexes seraient alors internalisés dans les cellules par la voie de l'endocytose adsorptive, sans passer par le récepteur aux asialoglycoprotéines.

Si les interactions entre les têtes de ciblage galactose et les récepteurs aux asialoglycoprotéines existent, elles sont certainement masquées par le transfert de gènes dû aux interactions non-spécifiques lipoplexes cationiques/membranes cellulaires.

4. Bilan de l'étude des glycolipides mono et bi-antennés

Nous avons formulé des liposomes galactose. Ces liposomes ont des tailles équivalentes aux tailles des liposomes cationiques classiques, et ont les mêmes propriétés de compaction de l'ADN.

Les liposomes 5, 7 et 8 formulés avec le lipide cationique RPR209120 et les liposomes 5 et 8 formulés avec le lipide cationique RPR120535 présentent des résidus galactose à leur surface, accessibles à la lectine RCA₁₂₀. La structure du glycolipide et l'environnement lipide cationique/lipide neutre sont donc des caractéristiques importantes permettant l'accessibilité des têtes de ciblage à la surface des liposomes.

Lorsque ces liposomes sont complexés avec de l'ADN à un rapport de charge tel qu'on obtient des petites particules chargées positivement (en excès de lipide cationique c'est à dire lipoplexes de type C), les têtes de ciblage galactose sont toujours accessibles à la surface des complexes. Par contre, dans le cas où les complexes sont de petite taille et globalement chargés négativement (excès d'ADN par rapport au lipide cationique, c'est à dire lipoplexes de type A), les têtes de ciblage galactose ne sont pas accessibles à RCA₁₂₀, elles semblent être masquées par les boucles d'ADN non compacté par le liposome.

Même si les têtes de ciblage galactose sont accessibles à la surface des lipoplexes, on n'observe pas de ciblage des cellules HepG2 lors de tests de transfection *in vitro* avec ces lipoplexes formulés à un rapport de charges élevé. A des rapports de charge élevés (lipoplexes de type C), les lipoplexes sont formulés avec un excès de liposomes, donc un excès de charges positives provenant des lipides cationiques. Ces lipoplexes, chargés positivement, peuvent interagir avec les membranes cellulaires, chargées négativement, et être internalisés dans les cellules par endocytose adsorptive. Cette voie d'internalisation masquerait alors l'internalisation par endocytose à récepteur.

Nous avons envisagé de masquer ces charges positives, en mettant ces lipoplexes galactose avec le stabilisateur colloïdal BRIJ, mais dans ce cas les résidus galactose ne sont plus accessibles à la lectine RCA₁₂₀.

C. Têtes de ciblage triantennées : analyse du rôle d'un espaceur polyéthylèneglycol (PEG)

Un moyen de limiter l'internalisation des lipoplexes par endocytose adsorptive consiste à réduire leur charge positive. Le polyéthylène glycol est un polymère neutre employé pour « enrober » les lipoplexes. Ajouté après formulation des complexes, il masque leurs charges positives en maintenant leur stabilité colloïdale.

Nous avons choisi d'intégrer les PEG dans les glycolipides pour éviter que leur chaîne ne masque les résidus galactose. Ils servent en outre d'espaceur entre la queue hydrophobe et la tête de ciblage du glycolipide, qui est alors projetée à l'extérieur du liposome et donc potentiellement plus accessible.

Les liposomes (resp. lipoplexes) formulés avec un glycolipide présentant un espaceur PEG sont appelés liposomes (resp. lipoplexes) PEG galactose.

1. Formulation des liposomes PEG galactose

a) Le lipide utilisé

Les liposomes PEG galactose sont composés de trois entités lipidiques : un lipide cationique (RPR120535), un lipide neutre (DOPE) et le lipide PEG (tableau 17).

groupe	structure antenne	longueur de l'antenne de l'espaceur	Structure du glycolipide
4	tri-gal, β	Court Long (PEG)	

Tableau 17 Structure du lipide PEG galactose

Le lipide PEG galactose a une tête de ciblage tri-antennée présentant trois résidus galactose. Cette tête de ciblage est reliée à une double chaîne hydrophobe (queue hydrophobe) en C18 par un espaceur PEG de 45 résidus.

La structure de cette tête de ciblage est plus proche de la structure du ligand naturel des récepteurs aux asialoglycoprotéines des hépatocytes. L'affinité du récepteur pour cette tête de ciblage devrait donc être augmentée par rapport à l'affinité du récepteur pour les têtes de ciblage mono et bi-antennées.

Ce lipide PEG galactose a été synthétisé par B. Frisch dans le laboratoire de F. Schuber de la faculté de Strasbourg.

Nous avons préparé des liposomes présentant différentes concentrations de ce lipide PEG galactose, ayant une concentration en chaînes PEG constante grâce à l'ajout dans la formulation du lipide RPR258858 (figure 63), qui a été synthétisé par C. Masson au laboratoire.

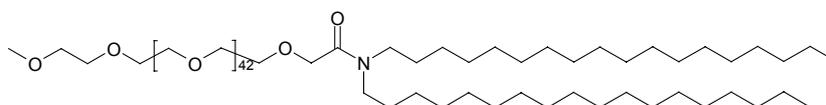


Figure 63 Formule du RPR258858

Les liposomes ont tous été préparés dans l'environnement lipide cationique/lipide neutre RPR120535/DOPE (figure 64). Les détails des formulations sont présentés dans le tableau 18.

Figure 64 Structure des liposomes PEG galactose. Les têtes de ciblage galactose tri-antennées (représentées en rouge) sont projetées à l'extérieur des liposomes par les chaînes des espaceurs polyéthylène glycol, qui masquent en partie les charges + des lipides cationiques (représentés en orange).

	RPR120535	DOPE	RPR258858	Lipide PEG gal
Liposome T	1	1	0	0
Liposome Tpeg	1	1	0,1	0
Liposome 9A	5	5	0,4	0,1
Liposome 9B	5	5	0,25	0,25
Liposome 9C	5	5	0,1	0,4

Tableau 18 Préparation de liposomes PEG galactose. Lipide PEG gal : lipide PEG galactose (voir tableau 17). Les chiffres indiqués indiquent les rapports molaires de chaque lipide dans le liposome.

Du fait de la présence de la chaîne PEG, le lipide PEG galactose est soluble dans l'eau. Nous avons remarqué qu'il tend à s'extraire des liposomes lors de leur préparation.

b) Caractérisation des liposomes

Nous avons vérifié que les propriétés physico(chimiques des liposomes PEG galactose étaient compatibles avec un transfert de gènes ciblé (voir introduction).

(1) Taille des liposomes PEG galactose

Pour chaque type de liposomes, on observe la présence d'une population majoritaire de particules de petite taille, autour de 100 à 150 nm, et d'une population de taille plus importante, comprise entre 500 et 1000 nm. Les tailles moyennes des liposomes sont indiquées dans la figure 65.

Figure 65 Analyse de la taille des liposomes. Les liposomes sont préparés avec le lipide PEG galactose dans l'environnement lipide cationique/lipide neutre RPR120535/DOPE. Les détails de concentrations sont indiqués dans le tableau 18.

La présence de ces deux populations de particules résulte du mode de préparation des liposomes : le film lipidique est réhydraté pour former de grosses particules multicouches, puis ces particules sont transformées en liposomes par apport d'énergie sous la forme d'ultrasons (sonication). Ici, la sonication est imparfaite. Nous avons préféré travailler avec un mélange de petits et gros liposomes plutôt que de risquer d'endommager la préparation en appliquant la sonication plus longtemps.

Les liposomes PEG galactose ont donc une taille moyenne équivalente à la taille moyenne des liposomes témoins.

(2) Accessibilité des résidus galactose à la surface des liposomes

Comme dans le cas des liposomes galactose, nous avons testé l'accessibilité des résidus galactose à la surface des liposomes PEG galactose à l'aide du test d'agrégation par RCA₁₂₀ (voir figure 55).

Figure 66 Agrégation des liposomes PEG galactose par l'agglutinine RCA₁₂₀. 12,5μM et 25μM : concentration de lipide PEG ; + gal : dissolution de l'agrégat par ajout d'un excès de galactose.

Ce test n'a été réalisé qu'une fois, la figure ne présente donc pas de barre d'erreur.

Les liposomes 9A, 9B et 9C s'agrègent en présence de RCA₁₂₀. Les résidus galactose sont donc accessibles à la surface des liposomes PEG galactose. On aurait pu penser qu'une longue chaîne PEG pourrait masquer les résidus galactose à leur surface, ce n'est pas le cas.

Pour tous les liposomes, l'agrégat est dissout par l'ajout d'un excès de galactose, l'agrégation est donc due aux têtes de ciblage galactose.

On peut remarquer qu'à concentration de glycolipide égale, les liposomes PEG galactose sont davantage agrégés que les liposomes galactose ne l'étaient (voir figure 56) : l'absorbance à 450nm variait entre 0 et 80 unités d'absorbance lors des tests d'agrégation menés avec les liposomes galactose présentant des têtes de ciblage linéaires et biantennées, à la concentration de 25µM de glycolipide. Ici l'agrégation varie entre 200 et 290 unités d'absorbance selon la quantité de lipide PEG galactose dans le liposome. Cette augmentation de l'agrégation est certainement due à l'affinité de RCA₁₂₀ pour les têtes de ciblage galactose triantennées, qui est très supérieure à son affinité pour les têtes de ciblage mono et biantennées.

Les têtes de ciblage galactose sont accessibles à la surface des liposomes PEG galactose, et ce quelle que soit la concentration en lipide PEG galactose dans le liposome.

2. Préparation de complexes liposomes PEG galactose/ADN

a) Les différents types de complexes formés

Comme dans le cas des liposomes galactose préparés avec les glycolipides linéaires et biantennés, nous avons préparé des complexes liposomes PEG-galactose/ADN à différents ratios nmole de lipide cationique/µg d'ADN, pour obtenir des lipoplexes de type A, B et C (figure 67).

Condition	Lipoplexe de type A Excès d'ADN / lipide cationique	Lipoplexe de type B ADN = lipide cationique	Lipoplexe de type C Excès lipide cationique / ADN
Propriétés du lipoplexe	Petite taille Complexes anioniques ADN peu compacté	Agrégat de grande taille Complexes neutres ADN précipité	Petite taille Complexes cationiques ADN compacté

Figure 67 Caractéristiques des complexes liposomes PEG galactose/ADN en fonction du rapport nmole de lipide cationique/µg d'ADN. Les plasmides, anioniques, forment des complexes avec les liposomes PEG galactose, cationiques. Les têtes de ciblage sont représentées en rouge, les têtes cationiques en orange, les chaînes PEG en bleu clair et le corps hydrophobe du liposome en bleu foncé. En fonction du rapport de charges + apportées par les lipides cationiques aux charges - apportées par le plasmide, les lipoplexes formés sont de type A, B ou C.

b) Analyse de la taille des lipoplexes

Nous avons mesuré la taille des particules obtenues par complexation des liposomes PEG galactose avec de l'ADN, à différents rapports nmole de lipide cationique/ μg d'ADN.

Figure 68 Taille des lipoplexes PEG galactose. Les complexes liposome PEG galactose/ADN ont été préparés à différents rapports nmole de lipide cationique/ μg d'ADN. La taille des particules obtenues est évaluée au nanosizer N4.

Les lipoplexes Tpeg, 9A, B et C ont un diagramme de phase modifié par rapport au diagramme de phases du témoin (figure 68) : ils s'agrègent aussi, mais la zone d'agrégation est à des rapports compris entre 1 et 2 nmole RPR120535/ μg d'ADN. D'autre part la taille des particules résultant de cette agrégation est comprise entre 500 et 1000 nm, elle est moins élevée que la taille des agrégats de la zone B du diagramme de phases du lipoplexe témoin T. La présence d'un espaceur PEG masque en partie les charges des lipoplexes et crée un encombrement stérique qui stabilise les particules en limitant leur précipitation dans la zone de neutralité où les lipoplexes T précipitent.

Nous avons tracé les diagrammes de phase d'autres lots des lipoplexes PEG galactose formulés avec le même lot de lipide PEG galactose, ils présentent eux aussi une légère agrégation autour de 2nmole RPR120535/ μg d'ADN. L'ampleur de l'agrégation varie en fonction du lot, témoin du manque de reproductibilité dans la préparation de ces liposomes.

c) Compaction de l'ADN dans les lipoplexes

Les diminutions de la fluorescence du BÉt, dues à son exclusion des lipoplexes aux différents rapports de charges sont présentés dans la figure 69.

Figure 69 Compaction de l'ADN par les lipoplexes PEG galactose. Pourcentage de fluorescence du BÉt dans le complexe par rapport à la fluorescence du BÉt dans le plasmide seul.

Les lipoplexes Tpeg, 9A, B, C compactent l'ADN autant que les lipoplexes T.

La compaction de l'ADN n'est pas modifiée par la présence d'espaces PEG et de têtes de ciblage galactose triantennées dans la formulation des liposomes.

d) Accessibilité des résidus galactose à la surface des lipoplexes

Les tests d'agrégation des lipoplexes par la lectine RCA₁₂₀ ont été menés aux différents rapports nmol lipide cationique/ μ g d'ADN présentés dans la légende de la figure 70.

Figure 70 Agrégation des lipoplexes PEG galactose par RCA₁₂₀. 0,4 ; 1 et 6 : rapport nmole lipide cationique/ μ g d'ADN. + gal : réversion de l'agrégation des lipoplexes par ajout d'un excès de galactose libre dans le puits. A, B et C : lipoplexes de type A (0,4nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN, à 12 μ M de lipide PEG galactose), de type B (1nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN, à 25 μ M de lipide PEG galactose) et de type C (6nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN, à 25 μ M de lipide PEG galactose).

L'agrégation des lipoplexes a été étudiée à trois rapports nmol RPR120535/ μ g d'ADN pour lesquels les complexes lipide cationique/ADN sont théoriquement de type (voir figure 67) A (petites particules chargées négativement, rapport 0,4), B (particules neutres, agrégées, rapport 1) et C (petites particules, chargées positivement, rapport 6).

La présence de PEG dans les lipides galactose diminue l'étendue de la zone d'agrégation des particules, on peut donc étudier l'agrégation des particules par la lectine RCA₁₂₀ au rapport 1 nmol RPR120535/μg d'ADN (lipoplexes de type B) alors qu'on ne pouvait pas l'étudier dans le cas des lipoplexes galactose.

Les lipoplexes sont agrégés par RCA₁₂₀ aux différents rapports nmol RPR120535/μg d'ADN étudiés et, pour chacun des rapport, le niveau d'agrégation augmente avec la quantité de lipide PEG galactose contenue dans le liposome : l'agrégation du lipoplexe 9C est supérieure à l'agrégation du lipoplexe 9B, qui est supérieure à l'agrégation du lipoplexe 9A.

Pour chacun des liposomes, l'agrégation des lipoplexes augmente avec le rapport nmol RPR120535/μg d'ADN. Plus on ajoute de lipide cationique aux complexes, plus ils sont agrégés par la lectine, donc plus les lipoplexes présentent de résidus galactose accessibles à leur surface.

e) Analyse du potentiel zêta des lipoplexes

Alors que les liposomes T (sans PEG) ont un potentiel zêta de 130mV, les liposomes contenant une chaîne PEG ont des potentiels zêtas compris entre 20 et 30mV.

La mesure des potentiels zêta des lipoplexes PEG galactose aux différents rapports de charges sont présentés dans la figure 71.

Figure 71 Mesures du potentiel zêta des lipoplexes PEG galactose. Les lipoplexes sont préparés aux différents rapports nmole de lipide cationique/μg d'ADN et dilués dans une solution de NaCl 150mM. Le potentiel zêta de la solution est mesuré cinq fois à 25°C.

Pour tous les types de lipoplexes, l'inversion du potentiel zêta se situe entre 1 et 2nmol RPR120535/μg d'ADN. Les potentiels zêta extrêmes des lipoplexes PEG galactose sont plus faibles que ceux du lipoplexe témoin RPR120535/DOPE. Ce phénomène est surtout visible pour les rapports de charge élevés. A 8nmol RPR120535/μg d'ADN le potentiel zêta du témoin atteint 45mV, alors que les potentiels zêta des lipoplexes PEG galactose oscillent entre 10 et 25mV. La présence de chaînes PEG permet donc de masquer, au moins partiellement, les charges positives des lipoplexes dues à la présence d'un excès de lipide cationique, et donc de diminuer la charge globale de la particule.

3. Efficacité biologique en transfection

Le niveau d'expression obtenu après transfection par des lipoplexes cationiques est élevé : les lipoplexes cationiques interagissent avec les membranes plasmiques des cellules, sont internalisés par endocytose non spécifique, libèrent l'ADN dans le cytoplasme, l'ADN migre jusqu'au noyau et traverse l'enveloppe nucléaire, certainement au moment de la mitose.

Quel que soit le rapport de charge, les lipoplexes formulés avec des liposomes PEG ou PEG galactose ont des charges de surface inférieures aux charges de surface des lipoplexes cationiques classiques. La présence de lipides PEG ou PEG galactose dans les lipoplexes devrait donc réduire l'endocytose non spécifique et diminuer le niveau d'expression du gène rapporteur. Par contre la présence de têtes de ciblage, permettant une endocytose récepteur spécifique, devrait nous permettre d'observer une augmentation du niveau d'expression par rapport au témoin lipoplexes PEG sans tête de ciblage.

Après analyse des lignées cellulaires utilisées, Céline Largeau a démontré que la lignée HepG2 présente le récepteur aux asialoglycoprotéines, mais la lignée SKHep1 n'en possède pas, elle peut donc être utilisée comme lignée témoin négatif.

Nous avons réalisé plusieurs séries de tests de transfection, avec des lots de liposomes différents, à différents rapports de charge et en présence ou en l'absence de chloroquine. Les résultats obtenus sont très hétérogènes d'un lot de liposomes à un autre.

Les résultats de transfection sur Hep G2 et SK Hep1 avec les lipoplexes 9C, deux lots de lipoplexes témoin PEG et un lot de lipoplexes témoin sont présentés dans la figure 72.

Figure 72 Tests de transfection avec les lipoplexes PEG galactose. Les légendes indiquent le rapport nmole lipide cationique/ μ g ADN. Tpeg1 et 2 : lipoplexes témoin PEG, lot 1 et 2. Transfection 24 heures dans des plaques 24 puits.

Aux rapports nmol RPR120535/ μ g ADN étudiés (3, 4, 5 et 6) les lipoplexes sont de petite taille et cationiques (lipoplexes de type C). Plus le rapport nmole de lipide cationique/ μ g d'ADN augmente, plus la charge cationique augmente (voir figure 60).

Sur les cellules **Hep G2**, en présence de chloroquine on n'observe pas d'effet des résidus PEG. On peut cependant détecter une augmentation d'un facteur deux du niveau d'expression de la luciférase avec les lipoplexes 9C par rapport à la moyenne de Tpeg1 et Tpeg2. Cet effet a pu être reproduit une fois. Cet effet de la tête de ciblage est très faible, pourtant la lignée présente des récepteurs aux asialoglycoprotéines.

En l'absence de chloroquine, on observe un effet des résidus PEG, le niveau de transfection est, selon le rapport de charges, de 1 à 1,5logs moins élevé que le niveau de transfection avec le témoin. On n'observe d'effet de la tête de ciblage qu'au rapport 6nmoles RPR120535/ μ g d'ADN, et cet effet est faible puisqu'on n'observe qu'une augmentation de 0,5log par rapport aux lipoplexes témoin PEG. Cependant les niveaux de transfection sont très faibles (entre 10 et 100CPS/ μ g de protéines), il convient d'être prudent sur l'interprétation de ce résultat.

Sur les cellules **SK Hep1**, en présence de chloroquine, les niveaux de transfection sont comparables quel que soit le lipoplexe et quel que soit le rapport de charge. On n'observe aucun effet de la présence d'une tête de ciblage, résultat prévisible puisque nous n'avons pas détecté de récepteur sur ces cellules. Par contre on n'observe pas non plus d'effet des résidus PEG. En l'absence de chloroquine, l'effet des résidus PEG est très marqué, puisqu'on observe deux logs de différence dans le niveau d'expression avec le premier lot de lipoplexes témoin PEG par rapport aux lipoplexes témoin. La différence est moins marquée dans le cas du deuxième lot de lipoplexes Tpeg, ce qui souligne le manque de reproductibilité dans la préparation des liposomes. Dans le cas des lipoplexes 9C, le niveau de transfection est comparable à celui du lot 2 de lipoplexes Tpeg, mais est 1 à 2 logs au-dessus du niveau de transfection du lot 1 de lipoplexes Tpeg. L'interprétation des résultats sur cette lignée cellulaire peut donc amener à deux conclusions contradictoires si on considère un lot ou l'autre de lipoplexes Tpeg, alors que les cellules ne présentent pas le récepteur aux asialoglycoprotéines.

4. Bilan de l'étude des lipides PEG galactose

Différents liposomes PEG galactose ont été formulés et analysés. Tous ces liposomes ont des tailles semblables à celles des liposomes galactose, qui sont semblables à la taille des liposomes témoins ne présentant pas de têtes de ciblage galactose. Ils ont la capacité de complexer et de compacter l'ADN au même titre que les liposomes ne contenant pas de têtes de ciblage galactose.

Les résidus galactose sont effectivement accessibles à la surface des liposomes PEG galactose, et le sont aussi à la surface des lipoplexes PEG galactose.

Les résidus PEG permettent de masquer la charge de surface des lipoplexes, puisque les potentiels zêta de tous les lipoplexes PEG galactose sont inférieurs aux potentiels zêta des lipoplexes témoins sans lipides PEG. Ces lipoplexes devraient donc permettre de réduire le transfert de gènes non spécifique, dû à la charge positive des complexes ADN / lipides cationiques. Cependant l'effet n'est pas clair dans les tests de transfection que nous avons effectués.

D'autre part, aucun effet significatif de la présence de têtes de ciblage galactose n'est visible dans les conditions de transfection que nous avons employées.

Le principal problème semble résider dans la formulation des liposomes PEG galactose, leurs propriétés physico-chimiques sont très différentes d'un lot de liposome à l'autre.

En particulier nous avons remarqué que le lipide PEG galactose est soluble dans l'eau. Cette propriété représente un inconvénient majeur pour sa formulation en liposomes selon le protocole que nous employons, puisque l'étape finale consiste à réhydrater le film lipidique

homogène dans de l'eau pour former des particules lipidiques multilamellaires, puis à apporter de l'énergie sous forme d'ultrasons pour réduire ces particules en liposomes. Lors de la réhydratation du film lipidique, il est possible qu'une partie du lipide PEG galactose soit extrait du film lipidique et forme des micelles indépendantes dans la solution de liposomes. Pour étudier cette éventualité, nous formulons actuellement des micelles de ce lipide, étudions leurs propriétés physico-chimiques et leur efficacité dans des tests de transfection sur des lignées cellulaires présentant le récepteur aux asialoglycoprotéines.

D'autre part cette étude a attiré notre attention sur le problème de la caractérisation de la présence d'un récepteur dans une lignée cellulaire. Le lignée BNL CL2, lignée hépatocytaire de souris connue pour présenter des récepteurs aux asialoglycoprotéines, a été testée et nous n'avons pas détecté de récepteurs sur la membrane plasmique. Il est possible que la lignée ait évolué et ne les synthétise plus.

On attend une augmentation du niveau d'expression du gène rapporteur lorsque la transfection est réalisée en présence de chloroquine dans le milieu de culture. Le niveau d'expression de la luciférase avec les lipoplexes témoins est augmenté d'un log sur les cellules Hep G2 en présence de chloroquine, il n'est pas augmenté sur les cellules SK Hep1.

En revanche, la chloroquine semble avoir un effet sur le niveau de transfection des liposomes présentant des chaînes espaceur PEG : alors qu'en absence de chloroquine l'effet du PEG est visible, puisque la transfection est inhibée par rapport au témoin (l'hypothèse de l'effet de la chaîne PEG est que la charge cationique des complexes est diminuée par la chaîne PEG, l'internalisation des complexes par endocytose absorptive (voir paragraphe I B 2 b) est donc réduite), en présence de chloroquine le niveau de transfection des liposomes présentant une chaîne PEG est semblable au niveau de transfection du témoin. Il semblerait que les complexes ADN/liposomes PEG soient internalisés et que la chloroquine permette aux complexes de sortir des endosomes. La présence d'un espaceur PEG ne semble pas avoir d'effet sur la limitation de l'internalisation des complexes par endocytose non spécifique. Dans ce cas la pénétration des complexes dans les cellules par endocytose à récepteur via le récepteur aux asialoglycoprotéines pourrait être masquée.

La chaîne PEG pourrait avoir un effet inhibiteur sur la sortie des complexes des endosomes.

VII. Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse ont exploré trois voies visant à améliorer l'efficacité du transfert de gènes non viral.

Au moment où j'ai initié mon travail, les stratégies basées sur le **couplage covalent de séquences peptidiques de localisation nucléaire** à l'ADN plasmidique étaient très étudiées. Poursuivant les travaux de Carole Neves qui consistaient à coupler de façon covalente le peptide NLS de l'antigène T de SV40 sur un plasmide, nous avons choisi de coupler le peptide IBB de l'importine α à des plasmides. En théorie un plasmide-NLS SV40 serait véhiculé dans le noyau cellulaire après interaction de l'importine α avec l'importine β . Le couplage du peptide IBB visait à éliminer une étape, puisque le plasmide-IBB pouvait théoriquement être importé dans le noyau cellulaire simplement après interaction avec l'importine β .

Les caractéristiques biochimiques de l'IBB le rendent plus difficile à manipuler que les NLS « classiques », plus petits et moins basiques. L'étude approfondie de ces caractéristiques a toutefois permis de déceler une propriété importante de l'IBB : il peut s'associer par liaison électrostatique avec l'ADN, le pré-compacter et rétablir l'expression du gène rapporteur dans des tests de transfection en conditions habituellement inefficaces. L'un des inconvénients de l'utilisation de cette séquence pour pré-compacter l'ADN est sa taille, qui rend difficile sa production en grande quantité par des méthodes chimiques. Cependant, si ce peptide n'est utilisé que pour compacter l'ADN, la pureté obtenue après production par génie génétique pourrait être suffisante, ce qui limiterait le coût de production.

La spécificité de l'interaction du peptide IBB couplé de façon covalente à un plasmide avec son récepteur, l'importine β , n'a pas pu être démontrée de façon rigoureuse. Les tests de transfection du plasmide auquel l'IBB a été couplé de façon covalente n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression du gène rapporteur car les peptides ont été couplés aléatoirement sur le squelette du plasmide, et donc certainement sur la cassette d'expression, abolissant dans ce cas sa transcription.

On pourrait imaginer, comme dans les travaux de (91), de coupler un peptide IBB unique en un site précis sur un plasmide.

Finalement si l'on souhaite coupler une séquence peptidique à un plasmide, il semble préférable de travailler avec des séquences courtes et moins basiques que la séquence peptidique IBB. Alternativement, on pourrait travailler avec des séquences peptidiques longues mais dont l'efficacité n'est pas tributaire de la conformation, bien que l'existence de telles séquences semble peu probable. Dans ce cas, le peptide permettrait à la fois de promouvoir l'import nucléaire du plasmide et de le protéger de l'action des nucléases lors de son cheminement dans le cytoplasme cellulaire jusqu'au noyau en le pré-compactant.

La bibliographie montre qu'actuellement les recherches se tournent vers des méthodes plus « physiologiques » dans lesquelles on ne fabrique pas des chimères acides nucléiques / peptides, mais on recherche des **séquences nucléotidiques permettant de cibler le noyau**. Ainsi les séquences nucléotidiques fixant un facteur de transcription à l'ADN se révèlent être des candidats intéressants permettant d'améliorer l'étape de diffusion de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule et franchissement de l'enveloppe nucléaire.

C'est dans cette optique que nous avons conçue la stratégie consistant à construire une banque de plasmides présentant une séquence nucléotidique aléatoire. Nous souhaitons identifier une ou plusieurs séquences permettant l'interaction du plasmide avec une ou des protéines karyophiles qui pourraient l'escorter jusqu'au noyau cellulaire.

La méthode que nous avons employée nous a permis de construire une banque de 8100 plasmides. Les difficultés rencontrées lors de la mise en place de cette banque ont considérablement alourdi le travail, limitant le nombre de séquences testées et donc la possibilité d'identifier une séquence permettant d'améliorer le trafic intracellulaire du plasmide. Une banque alternative pourrait être construite, pour laquelle une séquence ayant une réalité biologique serait clonée dans un plasmide, par exemple une séquence dérivée de la rétrotranscription des ARN messagers extraits de cultures cellulaires. D'autre part le système de criblage de la banque que nous avons conçue n'est pas adapté. Le criblage de l'expression d'un plasmide est une technique plus sensible qui permettrait à la fois de détecter la capacité d'une séquence nucléotidique à promouvoir l'import nucléaire et d'identifier cette séquence.

Les connaissances sur les mécanismes d'import nucléaire des protéines karyophiles et du matériel génétique des virus progressent, et avec elles la possibilité de mimer ces mécanismes physiologiques pour construire des vecteurs non-viraux de transfert de gènes plus performants. Il est à présent admis qu'il est nécessaire de construire des **systèmes intégrés**, dans lesquels l'ADN est complexé à un vecteur lui permettant d'entrer dans la cellule, de diffuser dans son cytoplasme jusqu'au noyau cellulaire et de s'y exprimer de façon régulée. Ces vecteurs se comporteraient finalement comme des vecteurs viraux mais ne seraient pas toxiques et ne pourraient pas se répliquer dans l'organisme. Ces systèmes permettraient en outre une expression régulée du gène qu'ils véhiculent, pouvant être inhibée ou activée selon les besoins.

L'import nucléaire du génome viral de HIV est médié par une série de signaux, en particulier par l'action concertée des signaux de localisation nucléaire de trois protéines du complexe de préintégration : MA (protéine de matrice), IN (intégrase) et Vpr. Vpr se comporterait comme une importine β et entraînerait la fixation du complexe de préintégration, constitué du génome viral et de protéines virales, sur le pore nucléaire (159) mais uniquement en présence des séquences NLS de MA par interaction avec l'importine α (160). D'autre part, il est admis qu'une séquence d'ADN du génome viral, appelée « **DNA flap** » contribue à l'import nucléaire du complexe de préintégration (161). Ce complexe de préintégration est un exemple de ces systèmes intégrés qui pourraient tracter les plasmides jusqu'au noyau cellulaire. Ce « DNA flap », inséré dans un vecteur lentiviral, permet une transduction plus efficace de cellules T stimulées 12h par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 que la transduction obtenue avec un vecteur lentiviral classique (162). De même, ces constructions permettent une transduction accrue des cellules neurales en culture et *in vivo*, et cette augmentation de transduction peut être attribuée à une amélioration de l'import nucléaire des complexes ADN/vecteur lentiviral par le fragment « DNA flap » (163). Associer ce type de vecteurs avec des protéines possédant des signaux de localisation nucléaire pourraient permettre d'obtenir un import nucléaire accru.

On peut aussi envisager d'améliorer l'import nucléaire des plasmides par des méthodes physiques telles que **l'électroporation**. Cette technique consiste à appliquer un champ électrique après injection d'ADN dans le tissu cible. L'électroporation de cellules en cultures ou de cellules musculaires *in vivo* permet d'augmenter l'expression du gène rapporteur. Des études sont en cours au laboratoire pour déterminer les causes de cette augmentation : outre les effets de perméabilisation des membranes plasmiques et d'électrophorèse de l'ADN dans la cellule, il est possible que le champ électrique induise une rupture transitoire de l'enveloppe nucléaire ou pousse l'ADN vers le noyau à travers le complexe du pore nucléaire.

Une collaboration est en cours avec H. Cline du Cold Spring Harbor Laboratory, visant à étudier le trafic intracellulaire de plasmides marqués, après injection *in vivo* sur des neurones de têtard avec et sans électrotransfert.

Les stratégies de **ciblage d'un type cellulaire** constituent des stratégies prometteuses car elles pourraient être employées à la fois dans les systèmes de vectorisation d'ADN et dans les systèmes de vectorisation de médicaments. Bien que peu d'essais se soient avérés positifs jusqu'à présent, ils représentent un réel espoir pour les traitements futurs. Les travaux du laboratoire sur le ciblage des hépatocytes grâce aux glycolipides galactosylés se sont tournés vers des formulations de type micelles plutôt que des formulations de type liposomes, les glycolipides PEG galactose semblent s'intégrer plus facilement et de manière stable dans ce type de structures.

Plus généralement les thématiques de ciblage extracellulaire ont évolué vers le ciblage des endothéliums activés, comme les endothéliums pro-inflammatoires qui se développent lors d'accidents cardiovasculaires ou comme les endothéliums résultant de l'angiogenèse consécutive à la croissance d'une tumeur.

Bibliographie

1. KAY, M. A., GLORIOSO, J. C. & NALDINI, L. (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics., *Nature Medicine*, 7, 33-40.
2. CAVAZZANA_CALVO, M., HACEIN BEY, S., DE_SAINTE_BASILE, G. et al. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease., *Science*, 288, 669-72.
3. DE_SMEDT, S. C., DEMEESTER, J. & HENNINK, W. E. (2000) Cationic polymer based gene delivery systems., *Pharmaceutical Research*, 17, 113-26.
4. UHEREK, C. & WELS, W. (2000) DNA-carrier proteins for targeted gene delivery., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 44, 153-66.
5. PEDROSO_DE_LIMA, M. C., SIMOES, S., PIRES, P., FANCA, H. & DUZGUNEY, N. (2001) Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 277-94.
6. BOUSSIF, O., LEZOUALC_H, F., ZANTA, M. A. et al. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7297-301.
7. GODBEY, W. T. & MIKOS, A. G. (2001) Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes., *The Journal of Controlled Release*, 72, 115-25.
8. SAFINYA, C. R. (2001) Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery., *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 440-8.
9. HARASHIMA, H., SHINOHARA, Y. & KIWADA, H. (2001) Intracellular control of gene trafficking using liposomes as drug carriers., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 85-9.
10. POUTON, C. W. & SEYMOUR, L. W. (2001) Key issues in non-viral gene delivery., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 187-203.
11. WOLFF, J. A., MALONE, R. W., WILLIAMS, P. et al. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo., *Science*, 247, 1465-8.
12. WOLFF, J. A., WILLIAMS, P., ACSADI, G. et al. (1991) Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo., *Biotechniques*, 11, 474-85.
13. LIU, F., SONG, Y. & LIU, D. (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA., *Gene Therapy*, 6, 1258-66.
14. ZHANG, G., BUDKER, V. & WOLFF, J. A. (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA., *Human Gene Therapy*, 10, 1735-7.
15. BUDKER, V., ZHANG, G., KNECHTLE, S. & WOLFF, J. A. (1996) Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes., *Gene Therapy*, 3, 593-8.
16. LIU, F. & HUANG, L. (2001) Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature., *The Journal of Gene Medicine*, 3, 569-76.
17. BUDKER, V., BUDKER, T., ZHANG, G. et al. (2000) Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process., *Journal of Gene Medicine*, 2, 76-88.
18. NISHIKAWA, M. & HUANG, L. (2001) Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer., *Human Gene Therapy*, 12, 861-70.
19. LUKACS, G. L., HAGGIE, P., SEKSEK, O. et al. (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus., *Journal of Biological Chemistry*, 275, 1625-9.

20. NEVES, C., ESCRIOU, V., BYK, G., SCHERMAN, D. & WILS, P. (1999) Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA., *Cell Biology and Toxicology*, 15, 193-202.
21. LECHARDEUR, D., SOHN, K. J., HAARDT, M. et al. (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer., *Gene Therapy*, 6, 482-97.
22. POLLARD, H., TOUMANIANTZ, G., AMOS, J. L. et al. (2001) Ca²⁺-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids., *The Journal of Gene Medicine*, 3, 153-64.
23. PLANK, C., MECHTLER, K., SZOKA, F. C. & WAGNER, E. (1996) Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery., *Human Gene Therapy*, 7, 1437-46.
24. FINSINGER, D., REMY, J. S., ERBACHER, P., KOCH, C. & PLANK, C. (2000) Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery., *Gene Therapy*, 7, 1183-92.
25. ZABNER, J., FASBENDER, A. J., MONINGER, T., POELLINGER, K. A. & WELSH, M. J. (1995) Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid., *Journal of Biological Chemistry*, 270, 18997-9007.
26. CUIEL, D. T., AGARWAL, S., WAGNER, E. & COTTEN, M. (1991) Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 8850-4.
27. WAGNER, E., ZATLOUKAL, K., COTTEN, M. et al. (1992) Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6099-103.
28. COTTEN, M., WAGNER, E., ZATLOUKAL, K. et al. (1992) High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6094-8.
29. RADLER, J. O., KOLTOVER, I., SALDITT, T. & SAFINYA, C. R. (1997) Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes., *Science*, 275, 810-4.
30. LIN, A. J., SLACK, N. L., AHMAD, A. et al. (2000) Structure and structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes., *Journal of Drug Targeting*, 8, 13-27.
31. FARHOOD, H., SERBINA, N. & HUANG, L. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer., *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1235, 289-95.
32. HAFEZ, I. M. & CULLIS, P. R. (2001) Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery., 47, 139-48.
33. REMY, J. S., KICHLER, A., MORDVINOV, V., SCHUBER, F. & BEHR, J. P. (1995) Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1744-8.
34. XU, Y. & SZOKA, F. C. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection., *Biochemistry*, 35, 5616-23.
35. NOGUCHI, A., FURUNO, T., KAWAURA, C. & NAKANISHI, M. (1998) Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes., *Febs Letters*, 433, 169-73.

36. ESCRIOU, V., CARRIERE, M., BUSSONE, F., WILS, P. & SCHERMAN, D. (2001) Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer., *The Journal of Gene Medecine*, 3, 179-87.
37. MORTIMER, I., TAM, P., MACLACHLAN, I. et al. (1999) Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity., *Gene Therapy*, 6, 403-11.
38. GORLICH, D. & KUTAY, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm., 15, 607-60.
39. NILSSON, J., ASKJAER, P. & KJEMS, J. (2001) A role for the basic patch and the C terminus of RanGTP in regulating the dynamic interactions with importin beta, CRM1 and RanBP1., *Journal of Molecular Biology*, 305, 231-43.
40. QUIMBY, B. B., LAMITINA, T., L_HERNAULT, S. W. & CORBETT, A. H. (2000) The mechanism of ran import into the nucleus by nuclear transport factor 2., *Journal of Biological Chemistry*, 275, 28575-82.
41. STEWART, M. (2000) Insights into the molecular mechanism of nuclear trafficking using nuclear transport factor 2 (NTF2). *Cell Structure and Function*, 25, 217-25.
42. CONTI, E. & IZAURRALDE, E. (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age., *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 310-9.
43. TAKAI, Y., SASAKI, T. & MATOZAKI, T. (2001) Small GTP-binding proteins., *Physiological Reviews*, 81, 153-208.
44. DWORETZKY, S. I., LANFORD, R. E. & FELDHERR, C. M. (1988) The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake., *Journal of Cell Biology*, 107, 1279-87.
45. BEN_EFRAIM, I. & GERACE, L. (2001) Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import., *Journal of Cell Biology*, 152, 411-7.
46. VASU, S. K. & FORBES, D. J. (2001) Nuclear pores and nuclear assembly., *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 363-75.
47. RYAN, K. J. & WENTE, S. R. (2000) The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm., *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 361-71.
48. ALLEN, N. P., HUANG, L., BURLINGAME, A. & REXACH, M. (2001) Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins., *Journal of Biological Chemistry*, 276, 29268-74.
49. GUAN, T., KEHLENBACH, R. H., SCHIRMER, E. C. et al. (2000) Nup50, a nucleoplasmically oriented nucleoporin with a role in nuclear protein export., *Molecular and Cellular Biology*, 20, 5619-30.
50. NAKIELNY, S., SHAIKH, S., BURKE, B. & DREYFUSS, G. (1999) Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain., *Embo Journal*, 18, 1982-95.
51. STOFFLER, D., FAHRENKROG, B. & AEBI, U. (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics., *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 391-401.
52. GOLDBERG, M. W., RUTHERFORD, S. A., HUGHES, M. et al. (2000) Ran alters nuclear pore complex conformation., *Journal of Molecular Biology*, 300, 519-29.
53. CONTI, E., UY, M., LEIGHTON, L., BLOBEL, G. & KURIYAN, J. (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha., *Cell*, 94, 193-204.
54. HEROLD, A., TRUANT, R., WIEGAND, H. & CULLEN, B. R. (1998) Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor., *Journal of Cell Biology*, 143, 309-18.

55. KOBE, B. (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha., *Nature Structural Biology*, 6, 388-97.
56. CONTI, E. & KURIYAN, J. (2000) Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha., *Structure Folding and Design*, 8, 329-38.
57. IMAMOTO, N., KAMEI, Y. & YONEDA, Y. (1998) Nuclear transport factors: function, behavior and interaction., *European Journal of Histochemistry*, 42, 9-20.
58. YONEDA, Y. (2000) New steps toward the nucleocytoplasmic traffic of macromolecules., *Cell Structure and Function*, 25, 205-6.
59. CINGOLANI, G., PETOSA, C., WEIS, K. & MULLER, C. W. (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha., *Nature*, 399, 221-9.
60. CINGOLANI, G., LASHUEL, H. A., GERACE, L. & MULLER, C. W. (2000) Nuclear import factors importin alpha and importin beta undergo mutually induced conformational changes upon association., *Febs Letters*, 484, 291-8.
61. BAYLISS, R., LITTLEWOOD, T. & STEWART, M. (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking., *Cell*, 102, 99-108.
62. VETTER, I. R., ARNDT, A., KUTAY, U., GORLICH, D. & WITTINGHOFER, A. (1999) Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution., *Cell*, 97, 635-46.
63. JAKEL, S. & GORLICH, D. (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells., *Embo Journal*, 17, 4491-502.
64. MOSAMMAPARAST, N., JACKSON, K. R., GUO, Y. et al. (2001) Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins., *Journal of Cell Biology*, 153, 251-62.
65. JAKEL, S., ALBIG, W., KUTAY, U. et al. (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1., *Embo Journal*, 18, 2411-23.
66. WILL, C. L. & LUHRMANN, R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function., *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 290-301.
67. HUBER, J., CRONSHAGEN, U., KADOKURA, M. et al. (1998) Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure., *Embo Journal*, 17, 4114-26.
68. PARASKEVA, E., IZAURRALDE, E., BISCHOFF, F. R. et al. (1999) CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm., *Journal of Cell Biology*, 145, 255-64.
69. WIESE, C., WILDE, A., MOORE, M. S. et al. (2001) Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly., *Science*, 291, 653-6.
70. NACHURY, M. V., MARESCA, T. J., SALMON, W. C. et al. (2001) Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly., *Cell*, 104, 95-106.
71. GRUSS, O. J., CARAZO_SALAS, R. E., SCHATZ, C. A. et al. (2001) Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity., *Cell*, 104, 83-93.
72. KAHANA, J. A. & CLEVELAND, D. W. (2001) Cell cycle. Some importin news about spindle assembly., *Science*, 291, 1718-9.
73. CLARKE, P. R. & ZHANG, C. (2001) Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle?, *Trends in Cell Biology*, 11, 366-71.

74. MELCHIOR, F. (2001) Ran GTPase cycle: One mechanism - two functions., *Current Biology*, 11, R257-60.
75. HETZER, M., BILBAO_CORTES, D., WALTHER, T. C., GRUSS, O. J. & MATTAJ, I. W. (2000) GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly., *Molecular Cell*, 5, 1013-24.
76. ZHANG, C. & CLARKE, P. R. (2000) Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts., *Science*, 288, 1429-32.
77. ZHANG, C. & CLARKE, P. R. (2001) Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system., *Current Biology*, 11, 208-12.
78. NEMERGUT, M. E., MIZZEN, C. A., STUKENBERG, T., ALLIS, C. D. & MACARA, I. G. (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B., *Science*, 292, 1540-3.
79. KOMEILI, A. & K O'SHEA, E. K. (2001) new perspectives on nuclear transport, *annual review of genetics*, 35, 341-364.
80. NAKANISHI, M., AKUTA, T., NAGOSHI, E. et al. (2001) Nuclear targeting of DNA., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 17-24.
81. WHITTAKER, G. R. & HELENIUS, A. (1998) Nuclear import and export of viruses and virus genomes., *Virology*, 246, 1-23.
82. WHITTAKER, G. R., KANN, M. & HELENIUS, A. (2000) Viral entry into the nucleus., 16, 627-51.
83. DEAN, D. A. (1997) Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific., *Experimental Cell Research*, 230, 293-302.
84. WILSON, G. L., DEAN, B. S., WANG, G. & DEAN, D. A. (1999) Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences., *Journal of Biological Chemistry*, 274, 22025-32.
85. DEAN, D. A., DEAN, B. S., MULLER, S. & SMITH, L. C. (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear import., *Experimental Cell Research*, 253, 713-22.
86. LI, S., MACLAUGHLIN, F. C., FEWELL, J. G. et al. (2001) Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid., *Gene Therapy*, 8, 494-7.
87. VACIK, J., DEAN, B. S., ZIMMER, W. E. & DEAN, D. A. (1999) Cell-specific nuclear import of plasmid DNA., *Gene Therapy*, 6, 1006-14.
88. LANGLE_ROUAULT, F., PATZEL, V., BENAVENTE, A. et al. (1998) Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein-Barr virus oriP sequences and EBNA1: implications of the nuclear import of plasmids., *Journal of Virology*, 72, 6181-5.
89. MESIKA, A., GRIGOREVA, I., ZOHAR, M. & REICH, Z. (2001) A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei., 3, 653-7.
90. CIOLINA, C., BYK, G., BLANCHE, F. et al. (1999) Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha., *Bioconjugate Chemistry*, 10, 49-55.
91. NEVES, C., BYK, G., SCHERMAN, D. & WILS, P. (1999) Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation., *Febs Letters*, 453, 41-5.
92. SEBESTYEN, M. G., LUDTKE, J. J., BASSIK, M. C. et al. (1998) DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA., *Nature Biotechnology*, 16, 80-5.
93. ZANTA, M. A., BELGUISE_VALLADIER, P. & BEHR, J. P. (1999) Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus.,

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 91-6.
94. SUBRAMANIAN, A., RANGANATHAN, P. & DIAMOND, S. L. (1999) Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells., *Nature Biotechnology*, 17, 873-7.
 95. COLIN, M., HARBOTTLE, R. P., KNIGHT, A. et al. (1998) Liposomes enhance delivery and expression of an RGD-oligolysine gene transfer vector in human tracheal cells., *Gene Therapy*, 5, 1488-98.
 96. HARBOTTLE, R. P., COOPER, R. G., HART, S. L. et al. (1998) An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery., *Human Gene Therapy*, 9, 1037-47.
 97. HART, S. L., ARANCIBIA_CARCAMO, C. V., WOLFERT, M. A. et al. (1998) Lipid-mediated enhancement of transfection by a nonviral integrin-targeting vector., *Human Gene Therapy*, 9, 575-85.
 98. COLIN, M., MAURICE, M., TRUGNAN, G. et al. (2000) Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells., *Gene Therapy*, 7, 139-52.
 99. JENKINS, R. G., HERRICK, S. E., MENG, Q. H. et al. (2000) An integrin-targeted non-viral vector for pulmonary gene therapy., *Gene Therapy*, 7, 393-400.
 100. ERBACHER, P., REMY, J. S. & BEHR, J. P. (1999) Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway., *Gene Therapy*, 6, 138-45.
 101. FENSKE, D. B., MACLACHLAN, I. & CULLIS, P. R. (2001) Long-circulating vectors for the systemic delivery of genes., *Current Opinion in Molecular Therapy*, 3, 153-8.
 102. BREITFELD, P. P., SIMMONS, C. F., STROUS, G. J., GEUZE, H. J. & SCHWARTZ, A. L. (1985) Cell biology of the asialoglycoprotein receptor system: a model of receptor-mediated endocytosis., *International Review of Cytology*, 97, 47-95.
 103. WATTIAUX, R., LAURENT, N., WATTIAUX_DE_CONINCK, S. & JADOT, M. (2000) Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41, 201-8.
 104. ASHWELL, G. & HARFORD, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver., *Annual Review of Biochemistry*, 51, 531-54.
 105. SCHWARTZ, A. L. (1984) The hepatic asialoglycoprotein receptor., *Critical Reviews in Biochemistry*, 16, 207-33.
 106. SCHWARTZ, A. L. (1991) Trafficking of asialoglycoproteins and the asialoglycoprotein receptor., *Targeted Diagnosis and Therapy*, 4, 3-39.
 107. STOCKERT, R. J. (1995) The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression., *Physiological Reviews*, 75, 591-609.
 108. BIANUCCI, A. M. & CHIellini, F. (2000) A 3D model for the human hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGP-R). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 18, 435-51.
 109. IOBST, S. T. & DRICKAMER, K. (1996) Selective sugar binding to the carbohydrate recognition domains of the rat hepatic and macrophage asialoglycoprotein receptors., *Journal of Biological Chemistry*, 271, 6686-93.
 110. KOLB_BACHOFEN, V., SCHLEPPER_SCHAFFER, J., VOGELL, W. & KOLB, H. (1982) Electron microscopic evidence for an asialoglycoprotein receptor on Kupffer cells: localization of lectin-mediated endocytosis., *Cell*, 29, 859-66.
 111. SPIESS, M. (1990) The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors., *Biochemistry*, 29, 10009-18.

112. KELM, S. & SCHAUER, R. (1988) The galactose-recognizing system of rat peritoneal macrophages; identification and characterization of the receptor molecule., *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 369, 693-704.
113. BIESSEN, E. A., BAKKEREN, H. F., BEUTING, D. M., KUIPER, J. & VAN_BERKEL, T. J. (1994) Ligand size is a major determinant of high-affinity binding of fucose- and galactose-exposing (lipo)proteins by the hepatic fucose receptor., *Biochemical Journal*, 299 (Pt 1), 291-6.
114. PARK, J. H., CHO, E. W., SHIN, S. Y., LEE, Y. J. & KIM, K. L. (1998) Detection of the asialoglycoprotein receptor on cell lines of extrahepatic origin., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 304-11.
115. NISHIKAWA, M., MIYAZAKI, C., YAMASHITA, F., TAKAKURA, Y. & HASHIDA, M. (1995) Galactosylated proteins are recognized by the liver according to the surface density of galactose moieties., *American Journal of Physiology*, 268, G849-56.
116. BIESSEN, E. A., BEUTING, D. M., ROELEN, H. C. et al. (1995) Synthesis of cluster galactosides with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor., *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 1538-46.
117. WU, G. Y. & WU, C. H. (1987) Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system., *Journal of Biological Chemistry*, 262, 4429-32.
118. HARA, T., ARAMAKI, Y., TAKADA, S., KOIKE, K. & TSUCHIYA, S. (1995) Receptor-mediated transfer of pSV2CAT DNA to a human hepatoblastoma cell line HepG2 using asialofetuin-labeled cationic liposomes., *Gene*, 159, 167-74.
119. KAWAKAMI, S., YAMASHITA, F., NISHIKAWA, M., TAKAKURA, Y. & HASHIDA, M. (1998) Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 252, 78-83.
120. SHIMADA, K., KAMPS, J. A., REGTS, J. et al. (1997) Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglyceryl-poly(ethyleneglycol)s., *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1326, 329-41.
121. SLIEDREGT, L. A., RENSEN, P. C., RUMP, E. T. et al. (1999) Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor., *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 609-18.
122. KAWAKAMI, S., FUMOTO, S., NISHIKAWA, M., YAMASHITA, F. & HASHIDA, M. (2000) In vivo gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes., *Pharmaceutical Research*, 17, 306-13.
123. LIM, D. W., YEOM, Y. I. & PARK, T. G. (2000) Poly(DMAEMA-NVP)-b-PEG-galactose as gene delivery vector for hepatocytes., *Bioconjugate Chemistry*, 11, 688-95.
124. NISHIKAWA, M., YAMAUCHI, M., MORIMOTO, K. et al. (2000) Hepatocyte-targeted in vivo gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system., *Gene Therapy*, 7, 548-55.
125. PARK, Y. K., PARK, Y. H., SHIN, B. A. et al. (2000) Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier., *Journal of Controlled Release*, 69, 97-108.
126. NIIDOME, T., URAKAWA, M., SATO, H. et al. (2000) Gene transfer into hepatoma cells mediated by galactose-modified alpha-helical peptides., *Biomaterials*, 21, 1811-9.
127. GAUCHERON, J., SANTAELLA, C. & VIERLING, P. (2001) In vitro gene transfer with a novel galactosylated spermine bolaamphiphile., *Bioconjugate Chemistry*, 12, 569-75.
128. HISAYASU, S., MIYAUCHI, M., AKIYAMA, K. et al. (1999) In vivo targeted gene transfer into liver cells mediated by a novel galactosyl-D-lysine/D-serine copolymer., *Gene Therapy*, 6, 689-93.

129. ZANTA, M. A., BOUSSIF, O., ADIB, A. & BEHR, J. P. (1997) In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine., *Bioconjugate Chemistry*, 8, 839-44.
130. PLANK, C., ZATLOUKAL, K., COTTEN, M., MECHTLER, K. & WAGNER, E. (1992) Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand., *Bioconjugate Chemistry*, 3, 533-9.
131. KWOH, D. Y., COFFIN, C. C., LOLLO, C. P. et al. (1999) Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver., *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1444, 171-90.
132. BYK, G., DUBERTRET, C., ESCRIOU, V. et al. (1998) Synthesis, activity, and structure--activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer., *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 229-35.
133. PITARD, B., AGUERRE, O., AIRIAU, M. et al. (1997) Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14412-7.
134. KREISS, P., CAMERON, B., RANGARA, R. et al. (1999) Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency., *Nucleic Acids Research*, 27, 3792-8.
135. TUREK, J., DUBERTRET, C., JASLIN, G. et al. (2000) Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection., *The Journal of Gene Medicine*, 2, 32-40.
136. WRAY, W., BOULIKAS, T., WRAY, V. P. & HANCOCK, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels., *Analytical Biochemistry*, 118, 197-203.
137. SOUBRIER, F., CAMERON, B., MANSE, B. et al. (1999) pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy., *Gene Therapy*, 6, 1482-8.
138. NEVES, C., BYK, G., ESCRIOU, V. et al. (2000) Novel method for covalent fluorescent labeling of plasmid DNA that maintains structural integrity of the plasmid., *Bioconjugate Chemistry*, 11, 51-5.
139. ADAM, S. A., MARR, R. S. & GERACE, L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors., *Journal of Cell Biology*, 111, 807-16.
140. HELBLING-LECLERC, A., SCHERMAN, D. & WILS, P. (1999) Cellular uptake of cationic lipid/DNA complexes by cultured myoblasts and myotubes., *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1418, 165-75.
141. YANO, R., OAKES, M., YAMAGHISHI, M., DODD, J. A. & NOMURA, M. (1992) Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature-sensitive RNA polymerase I mutations, in *Saccharomyces cerevisiae*., *Molecular and Cellular Biology*, 12, 5640-51.
142. KUSSEL, P. & FRASCH, M. (1995) Yeast Srp1, a nuclear protein related to *Drosophila* and mouse pendulin, is required for normal migration, division, and integrity of nuclei during mitosis., *Molecular and General Genetics*, 248, 351-63.
143. O'NEIL, R. E. & PALESE, P. (1995) NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein., *Virology*, 206, 116-25.
144. CORTES, P., YE, Z. S. & BALTIMORE, D. (1994) RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 7633-7.
145. MOROIANU, J., BLOBEL, G. & RADU, A. (1995) Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks

- import substrate at nuclear pore complexes., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 2008-11.
146. PRIEVE, M. G., GUTTRIDGE, K. L., MUNGUIA, J. E. & WATERMAN, M. L. (1996) The nuclear localization signal of lymphoid enhancer factor-1 is recognized by two differentially expressed Srp1-nuclear localization sequence receptor proteins., *Journal of Biological Chemistry*, 271, 7654-8.
 147. TSUJI, L., TAKUMI, T., IMAMOTO, N. & YONEDA, Y. (1997) Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression., *Febs Letters*, 416, 30-4.
 148. GORLICH, D., PREHN, S., LASKEY, R. A. & HARTMANN, E. (1994) Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import., *Cell*, 79, 767-78.
 149. WEIS, K., MATTAJ, I. W. & LAMOND, A. I. (1995) Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences., *Science*, 268, 1049-53.
 150. CUOMO, C. A., KIRCH, S. A., GYURIS, J., BRENT, R. & OETTINGER, M. A. (1994) Rch1, a protein that specifically interacts with the RAG-1 recombination-activating protein., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 6156-60.
 151. MOROIANU, J., HIJIKATA, M., BLOBEL, G. & RADU, A. (1995) Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6532-6.
 152. IMAMOTO, N., SHIMAMOTO, T., TAKAO, T. et al. (1995) In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import., *Embo Journal*, 14, 3617-26.
 153. SEKI, T., TADA, S., KATADA, T. & ENOMOTO, T. (1997) Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234, 48-53.
 154. KOHLER, M., ANSIEAU, S., PREHN, S. et al. (1997) Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family., *Febs Letters*, 417, 104-8.
 155. REXACH, M. & BLOBEL, G. (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins., *Cell*, 83, 683-92.
 156. ESCRIOU, V., CIOLINA, C., LACROIX, F. et al. (1998) Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes., *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1368, 276-88.
 157. SCHWARTZ, B., IVANOV, M. A., PITARD, B. et al. (1999) Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo., *Gene Therapy*, 6, 282-92.
 158. HAENSLER, J. & SCHUBER, F. (1988) Preparation of neo-galactosylated liposomes and their interaction with mouse peritoneal macrophages., *Biochimica Et Biophysica Acta*, 946, 95-105.
 159. POPOV, S., REXACH, M., ZYBARTH, G. et al. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex., *Embo Journal*, 17, 909-17.
 160. HAFFAR, O. K., POPOV, S., DUBROVSKY, L. et al. (2000) Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex., *Journal of Molecular Biology*, 299, 359-68.

161. ZENNOU, V., PETIT, C., GUETARD, D. et al. (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap., *Cell*, 101, 173-85.
162. DARDALHON, V., HERPERS, B., NORAZ, N. et al. (2001) Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap., *Gene Therapy*, 8, 190-8.
163. ZENNOU, V., SERGUERA, C., SARKIS, C. et al. (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain., *Nature Biotechnology*, 19, 446-50.

Annexes

Ce travail a donné lieu à l'écriture de quatre articles, dont deux sont publiés, un est accepté pour publication et le dernier est en cours de préparation. Les références de ces articles sont les suivantes :

Annexe 1 :

CARRIERE, M., NEVES, C., WILS, P., SOUBRIER, F., MAHFOUDI, A. & SCHERMAN, D. (2001) Optimization of plasmids for gene delivery., *S.T.P. Pharma Science*, 11(1), 5-10.

Annexe 2 :

ESCRIOU, V., **CARRIERE, M.**, BUSSONE, F., WILS, P. & SCHERMAN, D. (2001) Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer., *The Journal of Gene Medicine*, 3, 179-87.

ESCRIOU, V., **CARRIERE, M.**, SCHERMAN, D. & WILS, P., NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to nucleus., *Advanced Drug Delivery Reviews*, *Accepté pour publication*.

CARRIERE, M., ESCRIOU, V., AZOULAY, M., JOLLET, A., MONNERET, C. & SCHERMAN, D. New synthetic glycolipids for targeted gene transfer: synthesis, formulation in lipoplexes and specific interaction with lectins., *En préparation*.

Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer

Virginie Escriou^{1*}
Marie Carrière¹
Florence Bussone¹
Pierre Wils²
Daniel Scherman¹

¹UMR7001, Vectorologie Moléculaire et Cellulaire, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris/Centre National de la Recherche Scientifique/Aventis Pharma, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, 13 Quai Jules Guesde, BP 14, 94403 Vitry sur Seine, France

²Aventis Gencell, 3825 Bay Center Place, Hayward, CA 94545, USA

*Correspondence to: V. Escriou, UMR7001, Vectorologie Moléculaire et Cellulaire, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris/CNRS/Aventis Pharma, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, 13 Quai Jules Guesde. BP 14, 94403 Vitry sur Seine, France.
E-mail: virginie.escriou@aventis.com

Received: 24 October 2000

Revised: 14 December 2000

Accepted: 18 December 2000

Published online: 13 February 2001

Abstract

Background Cationic lipid-mediated gene transfer is a promising approach for gene therapy. However, despite the significant amount of lipoplexes internalized by target cells, transgene expression remains too low. Obstacles to nuclear accumulation of plasmid DNA include: the passage of DNA across the cellular membrane, the dismantling of nucleolipidic particles in the cytoplasm and the nuclear import of plasmid DNA. The purpose of the present study was to evaluate the impact of cell status on cationic lipid-mediated transfer.

Methods Cells were either growth-arrested (by aphidicolin) or synchronized (by a classical double-thymidine block protocol) and cationic lipid-mediated transfection of these cells was evaluated. For the study of the nuclear import of plasmid DNA, two techniques were developed: microinjection of plasmid DNA into intact cells, and the use of cells permeabilized with digitonin.

Results When CV-1 cells were growth-arrested by aphidicolin, cationic lipid-mediated gene transfer was inhibited. HeLa cells were synchronized and incubated with lipoplexes at different times after release of the block. Gene expression was greatly enhanced when cells underwent mitosis. When transfection was performed during the early period after block release, when fewer than 5% of the cells had divided, gene expression was carefully quantified and could be attributed to cells that escaped cell cycle block. However, by direct analysis of nuclear import of GFP-coding plasmid using cytoplasmic microinjection, GFP expression could be detected in a few cells that had not divided.

Conclusions Cationic lipid-mediated gene transfer efficiency increased when cells underwent mitosis. However, when cells did not divide, gene transfer was not completely abolished. Nuclear import of plasmid was greatly facilitated by a mitotic event. In non-mitotic cells, nuclear envelope crossing by plasmid DNA could be detected but was a very rare event. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords cationic lipid; nuclear import; plasmid DNA; synchronization; cell cycle

Introduction

Most gene therapy trials currently in progress involve viral vectors [1]. However, it has been widely reported that the outcome of both viral and

non-viral clinical trials in terms of gene transfer, gene expression, biological consequences and clinical benefit has been disappointing. A major problem with viruses is the immune response that precludes repeated administrations. Cationic lipid-mediated cellular transfer of plasmid DNA is therefore a promising approach for gene therapy. However, despite its advantages over viral systems, non-viral gene transfer results in substantially less gene expression than observed with viral systems [2].

The general consensus is that in order to be expressed in mammalian cells, intact plasmid DNA must first be transported across the plasma membrane and reach the cytoplasmic compartment. Therefore, the design of gene delivery vehicles has focused mainly on increasing the stability of nucleic acids and enhancing the cellular uptake of plasmid DNA. The delivery of DNA into the cytoplasm is indeed a critical step for gene transfer. However, assuming that one DNA molecule per cell nucleus is sufficient to initiate the expression of the encoded protein, the large number of cationic lipid-DNA complexes internalized into the cytoplasm [3–5] suggests that there are other subsequent barriers, such as nuclear import of DNA. Indeed, in most cell types a fundamental limitation to gene expression in currently used non-viral systems seems to be the inability of DNA to migrate from the cytoplasm into the nucleus. This limitation was elegantly demonstrated by the early work of Capecchi who showed that plasmids microinjected into the cytoplasm of cultured cells are very poorly expressed, whereas plasmids microinjected into the nucleus are highly expressed [6–8].

The purpose of the present study was to evaluate the impact of cell cycle status on cationic lipid-mediated gene transfer and to investigate whether the presence of the nuclear envelope really prevents nuclear import of plasmid DNA. Efficiency of gene transfer was studied on cells that were either growth-arrested by aphidicolin or synchronized by a classical double-thymidine block protocol. Nuclear import of plasmid DNA *per se* was also evaluated using two techniques: microinjection of plasmid DNA into intact cells and permeabilization of cells with digitonin.

Materials and methods

Materials

Propidium iodide (P-3566; Molecular Probes, Eugene, Oregon), RNase ONE (5000 units/ml; Promega, Madison, WI) and aphidicolin, BrdU kit (Boehringer-Mannheim, Meylan, France) were used in the experiments.

Cell culture

CV-1 cells, derived from African green monkey, were obtained from Dr S. Koutouzov (INSERM U25, Paris) and Hela (ATTC, CCL-2), epithelial-like cell line derived from human adenocarcinoma, were obtained from ATCC.

The cells were grown in Minimum Essential Medium (MEM; Gibco-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin (50 U/ml and 50 µg/ml, respectively) and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Cultures were maintained at 37°C in a 5% CO₂/air incubator.

Plasmids

pEGFP-C1 plasmid was purchased from Clontech, Palo Alto, CA. The pXL3031 plasmid carries a cassette containing the enhancer-promoter from the immediate-early gene of cytomegalovirus (CMV), the engineered cytoplasmic luciferase gene (Luc⁺) and the SV40 polyadenylation site. Luc⁺ is a newly designed cytosolic form of luciferase obtained from pGL3 vectors (Promega). Its expression, compared to the previous form of luciferase (pCDNA3; Promega), often increased 10- to >100-fold. This pCOR plasmid (pCOR being a plasmid with conditional origin of replication) was grown and purified as described elsewhere [9]. Fluorescent plasmid was prepared as described previously [10]. In brief, a *p*-azido-tetrafluoro-benzyl-lissamine conjugate was synthesized and used to covalently associate fluorescent molecules to plasmid DNA by photoactivation (30 fluorophores by plasmid DNA).

Synchronization

Thymidine was prepared as a stock solution of 100 mM thymidine in serum-free medium. A thymidine block was initiated in cultures at a cell density that permitted active growth throughout the time course of the synchronization procedure, i.e. 60 000 cells/well of six-well culture plates. The first thymidine block was imposed by removing the growth medium by aspiration and providing fresh medium containing 2 mM thymidine. The cells were blocked for 16 h. The cells were released from the first block for 9 h by removing the thymidine-containing medium by aspiration and washing twice with an equal volume of serum-free medium prior to replacement with normal growth medium containing 24 µM deoxycytidine. Following the 9-h release period, a second thymidine block was imposed by adding thymidine to a final concentration of 2 mM. After 16 h, the second thymidine block was released by removing the thymidine-containing medium by aspiration and the cells were wash twice with an equal volume of serum-free medium and fed with normal growth medium containing 24 µM deoxycytidine [11].

Cell cycle analysis

Cells were harvested using trypsin-EDTA, transferred to a 15-ml conical tube, and centrifuged at 1000 g for 5 min. The supernatant was then removed. Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and the pellet was resuspended in approximately 500 µl PBS. Cold ethanol (2 ml) was added very slowly while vortexing to

prevent clumping, and fixed at -20°C for at least 20 min or left overnight. After fixation, cells were centrifuged at 1000 g for 15 min to eliminate ethanol. Pelleted cells were washed with 2 ml PBS and resuspended in staining solution containing NaCl 100 mM, PIPES 10 mM pH 7.4, Triton X-100 0.1% (v/v), MgCl_2 2 mM, RNase ONE 20 U/ml and propidium iodide 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Fixed samples were analysed using a FACS-Calibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA) flow cytometer which has an argon laser exciting at a wavelength of 488 nm. For each sample, 15 000 events were collected which consisted of side scatter, forward scatter, and fluorescence emission centered at 580 nm (FL2). Two additional parameters, FL2-area and FL2-width, were collected for cell cycle analysis. CellQuest software was employed to analyse the list-mode data. ModFit software was used to determine the percentage of each G0/G1, S and G2/M phase in the population by analysing FL2-area data.

Transfection

Transfection conditions (lipid/DNA ratio, amount of DNA) have been optimized with regard to linearity between the amount of DNA and luciferase activity, reproducibility and absence of toxicity. Luciferase encoded by the Luc⁺ gene was chosen as reporter protein because of its high and rapidly occurring activity. No gene expression could be obtained in a 4-h transfection with any other reporter gene such as GFP or β -galactosidase. Cells were seeded on 24- or six-well culture plates at the appropriate density and submitted to various treatments (aphidicolin or synchronization). The plasmid DNA pXL3031 was diluted in 150 mM NaCl, 20 mM NaHCO_3 and mixed with RPR120535 as described previously [3]. The mixture was vortexed, left for 10 min at room temperature, diluted in complete culture medium containing FBS, and then added to the cells (0.5 or 1 μg DNA per culture well for 24- and six-well culture plates, respectively). After the indicated time of transfection, cells were washed twice with PBS and lysed with 200 μl cell culture lysis reagent (Promega). When concentrated lysate was needed, the same transfection conditions were applied to three wells of a six-well plate. At the desired time, cells were harvested with trypsin and pooled in a 1.5-ml tube before lysis in a final volume of 100 μl cell culture lysis reagent. Luciferase expression was quantified on 10 μl centrifuged lysate supernatant, using a luciferase assay kit (Promega). Light emission was measured using a multilabel counter Victor² (EG & G Wallac, Evry, France). Light emission was normalized to the protein concentration of each sample, determined using the Pierce BCA assay (Interchim, Montluson, France).

Permeabilization

Digitonin-permeabilized Hela cells were prepared according to the method of Adam *et al.* [12]. Cells grown on coverslips were immersed for 5 min in 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ice-cold digitonin (Sigma) in transport buffer (20 mM HEPES

pH 7.3, 110 mM potassium acetate, 5 mM sodium acetate, 2 mM magnesium acetate, 0.5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, leupeptin and pepstatin) and washed in cold import buffer. A 50- μl drop of transport buffer containing an ATP regenerating system (1 mM ATP, 0.5 mM GTP, 10 mM creatine phosphate and 0.4 U/ml creatine phosphokinase), 25 μl Hela cytoplasmic extracts (~ 15 mg/ml) and 5 μg plasmid DNA labelled with lissamine [10] was carefully placed on the inverted coverslip. The transport was allowed to proceed for 30 min at 30°C . The coverslips were then rinsed with import buffer, fixed with 2% paraformaldehyde 0.1% glutaraldehyde and mounted on slides in PBS containing 50% glycerol. The coverslips were sealed at the slide with nail polish. Slides were examined with a Zeiss Axiophot fluorescence microscope, with 40 \times and 100 \times objective lens, coupled to a cooled CCD camera (Hamamatsu, Japan) and Samba imaging software (Unilog, Meylan, France).

Microinjection

Cells were grown on CELLocate microgrid coverslips (Eppendorf, Hamburg, Germany). The DNA solution (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in water) was injected into the cells using glass micropipettes having tip diameters ranging from 0.3 to 0.7 μm (Femtotips; Eppendorf). Injections were carried out under visual control on a fixed stage of an inverted phase-contrast microscope (Axiovert 135, Zeiss; 320 \times magnification), using a Micromanipulator 5171 and Microinjector 5242 (Eppendorf). The average volume (0.1–0.2 pl) injected into each cell was determined as described previously [13]. Following injection, the cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2 incubator for 4–5 h. These microinjection conditions were optimized with regard to DNA concentration, composition of DNA solution and incubation time after injection. Every hour, phase-contrast and fluorescence microscopy pictures were taken using a cooled CCD camera and Samba imaging software.

Results

It is widely admitted that rapidly growing cell lines are more efficiently transfected than slow growing cells [14–16]. The mechanism by which cell proliferation increases transfection is not certain. The first hypothesis is that cell division facilitates cationic lipid-mediated transfection on account of the breakdown of the nuclear envelope during mitosis. We first compared the transfection efficiency of rapidly growing cells and growth-arrested cells. Aphidicolin blocks cells in S phase by inhibiting the replicative DNA polymerase α and allows G2, M and G1 cells to accumulate at the G1/S border. This action is reversible by removal of the drug. A 24-h treatment with aphidicolin does not affect the synthesis of the four dNTPs and DNA polymerases [17]. In preliminary experiments, we optimized the conditions for using

aphidicolin to efficiently arrest the growth of several cell lines. We chose monkey kidney-derived CV-1 cells because they retain a normal morphology as observed by phase-contrast microscopy after a 36-h treatment with up to 10 μM aphidicolin. The cell cycle status of cells was determined by flow cytometry of permeabilized cells stained with propidium iodide. Cell proliferation was also studied by monitoring the incorporation of BrdU in growing cells and fluorescence staining with conjugated anti-BrdU antibodies. A typical asynchronous CV-1 cell culture contained 64.4 ± 7.7 , 17.4 ± 5.2 and $18.1 \pm 9.3\%$ ($n=7$) of cells in the G1, S and M phases, respectively (Figure 1A). When the concentration of aphidicolin was increased, cells accumulated in G1 phase. Treatment of CV-1 with aphidicolin at 15 μM for 36 h caused more than 90% of the cells to become arrested in the G1 phase of the cell cycle (Figure 1A). When cell proliferation was assayed by monitoring the incorporation of BrdU into cell nuclei, no staining was detectable from 5 μM aphidicolin (data not shown). In order to determine whether aphidicolin treatment affects gene transfer efficiency, transfection of cells treated with increasing concentrations of aphidicolin was analysed. Cells treated with aphidicolin for 36 h or exponentially growing cells were incubated with complexes of cationic lipid (RPR120535) and plasmid DNA (pCMV-Luc⁺) for 24 h under optimal conditions. As indicated in Figure 1B, increasing concentrations of aphidicolin decreased transgene expression compared with actively dividing cells. At 5 μM aphidicolin, 20% of transgene expression remained. At 25 μM aphidicolin, gene expression fell to 4% of the control value. The results from these experiments suggest that aphidicolin treatment severely inhibits cationic lipid-mediated transfection. However, in these experiments, cells were left for up to 60 h in the presence of aphidicolin and inhibition of various cellular processes is likely to have occurred.

We therefore decided to gain further understanding of cationic lipid-mediated transfection processes in dividing and non-dividing cells by investigating the efficiency of gene expression after transfection of cells at different stages of the cell cycle. We chose to synchronize HeLa cells using excess thymidine since this method is one of the most effective techniques. The rationale of this method is that high concentrations of thymidine inhibit ribonucleotide reductase activity, and thereby inhibit DNA synthesis in S-phase cells by depleting the nucleotide precursor pools of dCTP. Cells in G2, M and G1 phases are not affected by excess thymidine treatment and continue throughout the cell cycle until reaching the G1-S phase boundary when the onset of DNA synthesis is inhibited. In this way a synchronous population of normally growing cells can be obtained at the beginning of S phase. No toxicity of the drug is expected since gene transfer is performed after the removal of thymidine. Cell cycle analysis was performed for each transfection sample to monitor the progress of the synchronized cells throughout the experiments. Almost all (96.0 ± 5.3 , $n=8$) of the thymidine-treated HeLa cells progressed from late G1

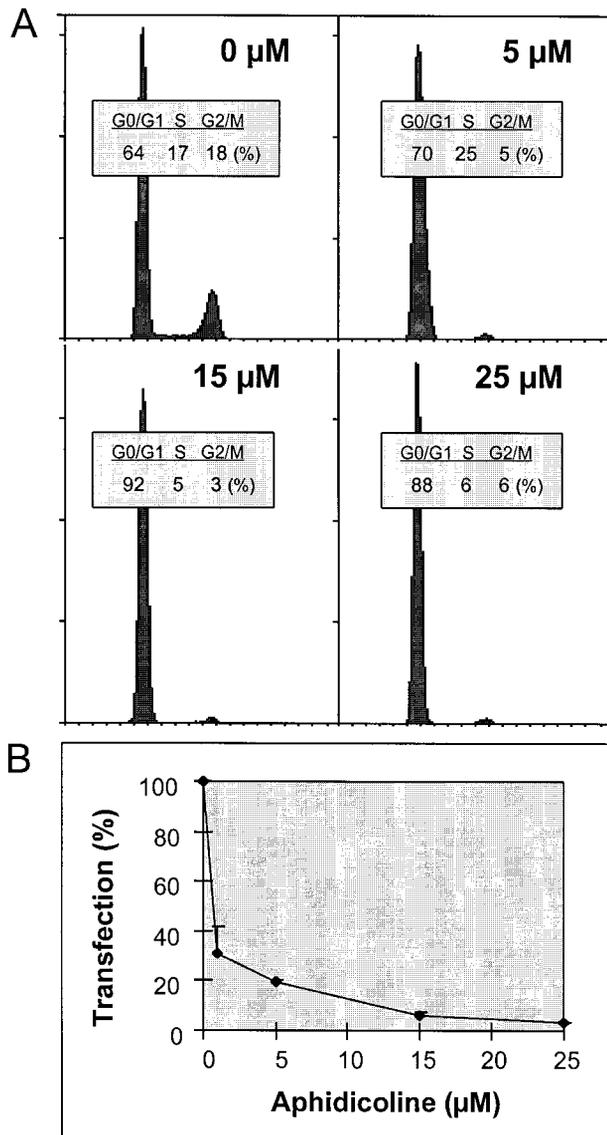


Figure 1. Effect of aphidicolin on cell cycle and gene expression in CV-1 cells. Cells were treated with increasing amounts of aphidicolin for 36 h and analysed by flow cytometry (A) or submitted to a 24-h transfection with lipoplexes (B). (A) Cells were treated for DNA content analysis as described in Materials and methods. Histograms of relative iodide fluorescence versus number of cells are shown for each aphidicolin concentration. For each condition, the breakdown of the population according to cell cycle phase is indicated. (B) After a 36-h incubation with aphidicolin, cells were transfected in the presence of the same amount of aphidicolin with 1 μg pCMV-Luc⁺ plasmid formulated with cationic lipid as described in Materials and methods. Luciferase activity is expressed as a percentage of the activity obtained in the absence of aphidicolin. Luciferase activity obtained without aphidicolin was 99.9 ± 56.8 pg luciferase/ μg protein ($n=4$)

phase through S and G2/M phases in synchrony after the removal of excess thymidine (Figure 2A). The extent of thymidine synchronization was highly reproducible in the eight independent cell samples studied. Figure 2A describes a single, representative experiment. Synchronous cells were then submitted to a transient and short transfection, i.e. 4 h, beginning at different intervals after the thymidine release. This very short transfection

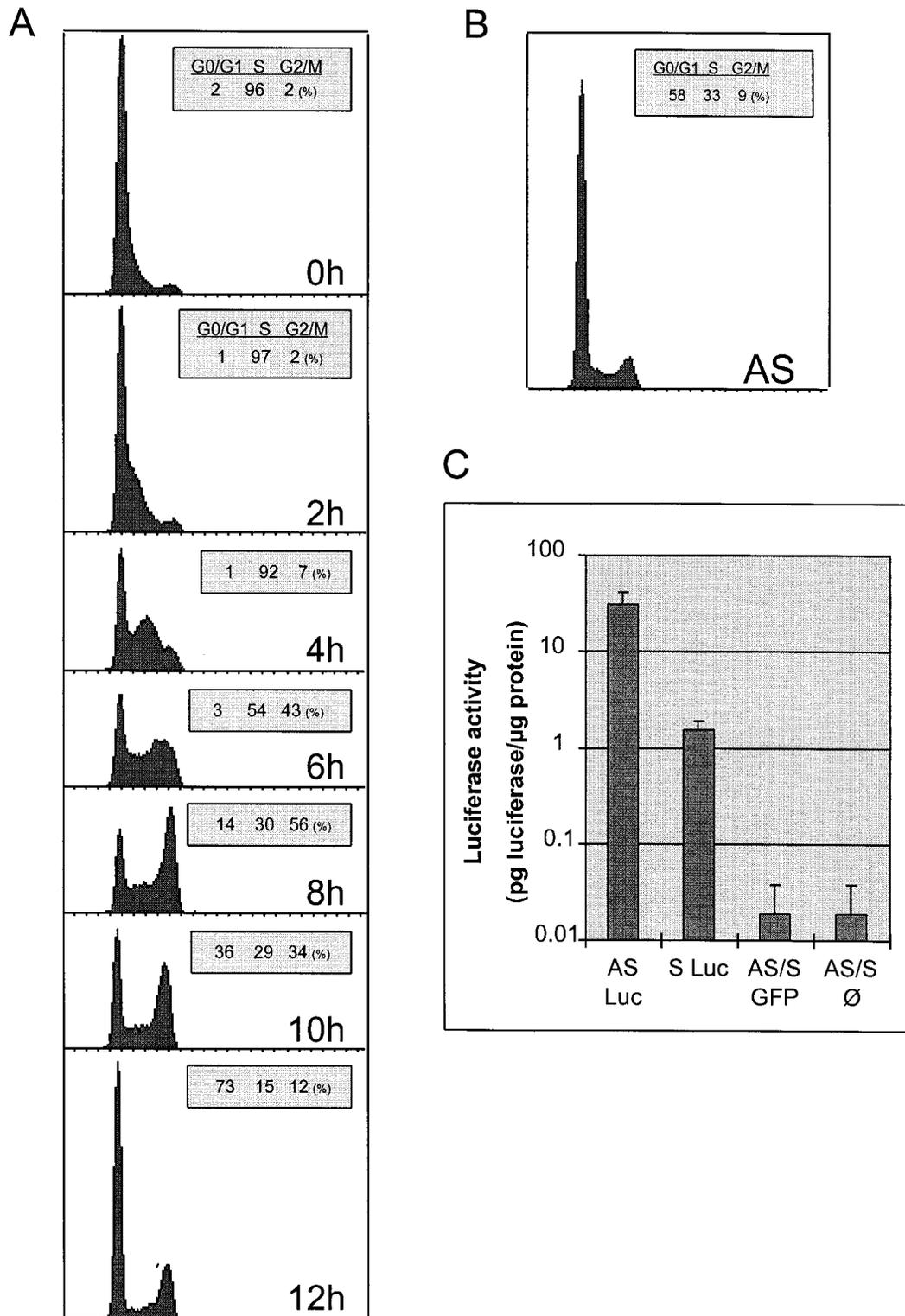


Figure 2. Transfection in synchronized cells. HeLa cells were synchronized by a double-thymidine block as described in Materials and methods. Exponentially growing cells (B) and cells at different times after the release from the second thymidine block (A) were analysed for DNA content in a flow cytometer. For each condition, the breakdown of the population according to cell cycle phase is indicated. (C) Synchronized cells were transfected for 4 h immediately after the block release, with 1 μ g plasmid formulated with cationic lipid and lysed in a concentrated procedure as described in Materials and methods to obtain detectable levels of luciferase activity. This luciferase expression (S Luc) was compared with these obtained with asynchronous cells transfected with the same luciferase-coding plasmid (AS Luc) and with asynchronous (AS) or synchronized (S) cells transfected with a GFP-coding plasmid (GFP) or not transfected (\emptyset)

Table 1. HeLa cells that had been synchronized by a double-thymidine block were allowed to proceed through the cell cycle by replacing the medium with thymidine-free medium (at $t=0$) and were compared for luciferase gene expression with asynchronous cells that had not been exposed to thymidine (control). At 2-h intervals ($t=0, 2, 4, 6$ and 8 h) cells were incubated with $1\ \mu\text{g}$ plasmid formulated with cationic lipid. After a 4-h incubation with the transfection medium, cells were analysed for luciferase activity. Control cells were also analysed for luciferase activity after a 4-h incubation with the transfection medium. Luciferase expression is expressed as the mean of three experiments \pm standard deviation; each experiment was performed on triplicate samples

Time interval	Luciferase activity (pg luciferase/ μg protein)	Percentage
Control	1.43 ± 0.81	100
0 h–4 h	0.20 ± 0.15	14
2 h–6 h	0.65 ± 0.56	45
4 h–8 h	0.72 ± 0.31	51
6 h–10 h	1.44 ± 0.17	101
8 h–12 h	13.54 ± 2.30	949

was possible thanks to the use of the Luc⁺ form of luciferase, as explained in the Materials and methods section. The gene expression obtained was compared with the luciferase activity of asynchronous cells incubated for 4 h with the same complexes (Table 1). For the first three time intervals (0 h–4 h, 2 h–6 h and 4 h–8 h), gene expression increased slowly and remained lower than in the control cells. During this time period cells entered and progressed through S phase, and reached G2 phase. At the fourth interval (6 h–10 h), gene expression was the same as that obtained with control cells. At this time, about one-third of the synchronized cells have already undergone mitosis. Then gene expression increased sharply, in the time interval 8 h–12 h, when most of the cells have undergone mitosis. These results suggest that an event associated with mitosis considerably enhances transgene expression.

We also noticed that during the first time interval after the thymidine release, gene expression was low but nevertheless detectable. As indicated by cell cycle analysis, no more than 5% of the cells divided during the first 4 h after thymidine removal. We performed a 4-h transfection on synchronized cells immediately after removing the thymidine block and on control cells and measured gene expression in concentrated samples (see Materials and methods) in order to ascertain that this activity was distinct from background activity. Gene expression of non-dividing synchronized cells was clearly measurable, whereas no activity was obtained with either synchronized cells or non-synchronized cells transfected with either a control plasmid or not transfected (Figure 2C). However, transgene expression of synchronized cells represents $5.2 \pm 1.5\%$ ($n=9$) of control cells. It is possible that this level of gene expression was derived from the small percentage of cells that escaped cell cycle arrest.

Since no final conclusion could be drawn from these results, nuclear import of plasmid DNA *per se* was subsequently assayed. In the first series of experiments, nuclear import of plasmid DNA was studied on digitonin-permeabilized cells or by microinjection into intact cells. Plasmid DNA was fluorescently labelled and followed by fluorescence microscopy. The labelling technique is based on the direct binding of a fluorophore to the plasmid via a photoactivable linker arm [10]. Lissamine-labelled plasmid was either microinjected into the cytoplasm of intact cells (data not shown) or incubated with digitonin-permeabilized cells, in the presence of cytosolic extract and an ATP regenerating system. Whatever the experimental conditions used, we were able to detect plasmid DNA accumulated at the nuclear periphery but never within the nucleus (Figure 3). We concluded that either plasmid DNA is not able to cross the nuclear envelope, or

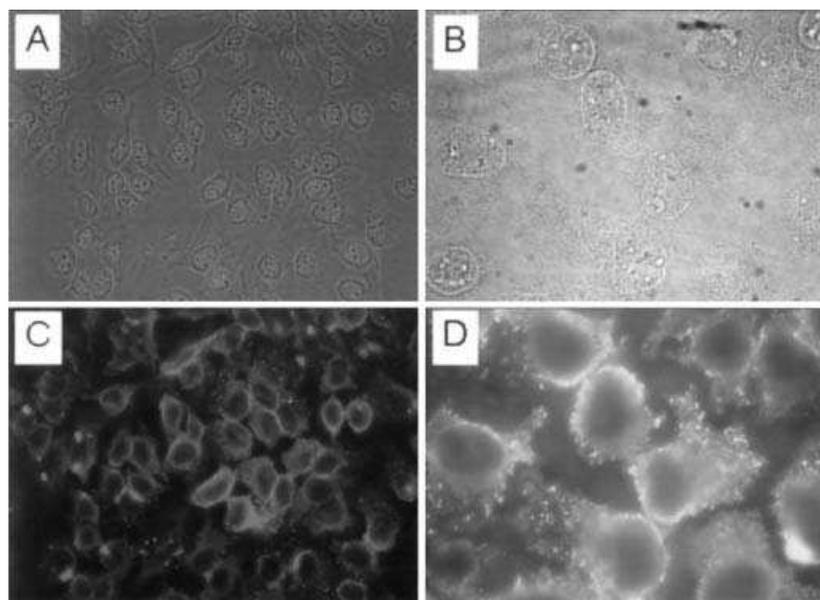


Figure 3. Assay of nuclear import of fluorescent plasmid in digitonin-permeabilized cells. HeLa cells were permeabilized using digitonin as described in Materials and methods and incubated for 30 min at 30°C in the presence of $5\ \mu\text{g}$ fluorescent plasmid in import buffer. Phase contrast (A, B) and fluorescent (C, D) microscopy is shown. Magnification: A, C $40\times$, B, D $100\times$

fluorescence microscopy is not sensitive enough to detect one or a few copies of plasmid inside the nucleus.

In the next stage, a plasmid DNA containing the gene of the green fluorescent protein (GFP) was microinjected into the cytoplasm of intact cells. In this way detection of fluorescence in a cell indicated that plasmid had entered the nucleus and transcription had occurred. Since the microinjected cells were in proliferation and some of them were likely to divide, each injected cell was repeatedly checked under phase-contrast microscopy. Figure 4 shows phase-contrast microscopic images of a field where all cells were microinjected into the cytoplasm with pEGFP. Images were taken every hour. Fluorescence appeared in some cells after 6-h incubation. One cell (black arrow) divided 4 h after microinjection and the two daughter cells (two black arrows) developed an intense fluorescent signal. In the same field, another cell (white arrow) did not divide during the 6-h incubation, as indicated by the presence of the nuclear envelope, and developed a less intense fluorescent signal. In order to obtain quantitative data, we injected more than 250 cells in three separate experiments and each injected cell was checked using phase-contrast microscopy to determine whether it had divided or not. Six hours after injection, $15.3 \pm 5.3\%$ of the injected cells expressed GFP but only $1.8 \pm 2.3\%$ of the cells expressed GFP and had not divided. These results suggest that plasmid DNA is able to cross the nuclear envelope with a very low efficiency and indicate that mitosis considerably enhances expression of a transgene. However, we can not exclude the

possibility that nuclear delivery of plasmid DNA could here be an artefact of microinjection that is a rather invasive technique and could in some cells disrupt the nuclear envelope.

Discussion

Different limiting steps have been identified in non-viral gene transfer: (1) the passage of DNA across the cellular or endosomal membrane, (2) the dismantling of nucleolipidic particles in the cytoplasm and (3) the nuclear import of plasmid DNA from the cell cytoplasm [7]. Ourselves and others have demonstrated that, in most cells, significant amounts of lipoplexes were generally internalized by transfected cells [3–5]. The exact mechanism by which plasmid DNA escapes from internalization vesicles and is delivered into the cytoplasm is not known. Szoka and co-workers suggested that the cationic lipids, DOTAP and DOGS, are stripped off the DNA during release from intracellular vesicles [18]. The cytoplasmic movement of viral DNA towards the nucleus is facilitated by the interaction of viral proteins, such as polymerase or capsid proteins, with the microtubular network [19]. For non-viral vectors, very little is known about the fate of plasmid DNA in the cytoplasm. In addition, using microinjection techniques, Lechardeur *et al.* have found that naked plasmid DNA has a rapid turnover ($t_{1/2}$ = approximately 90 min) when directly injected into the cytoplasm [20]. DNA complexation

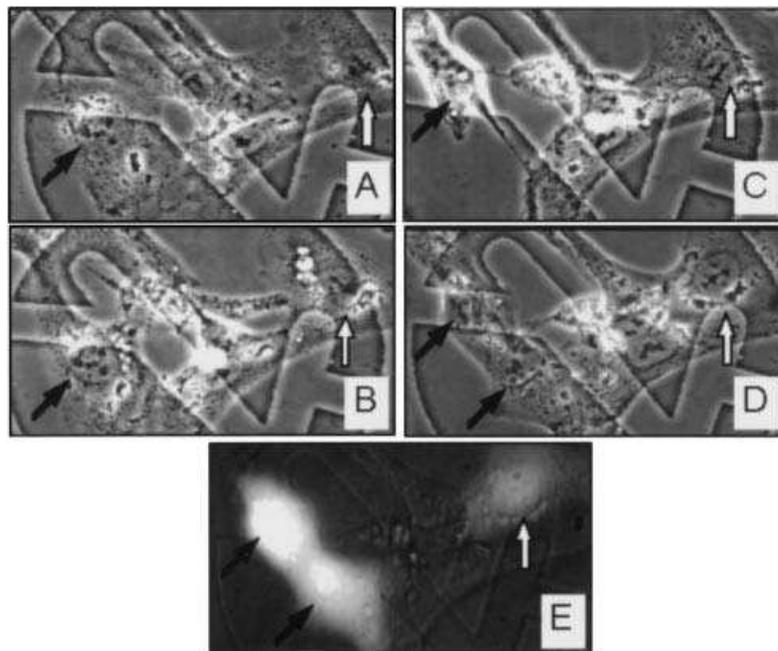


Figure 4. Cytoplasmic microinjection of GFP plasmid. CV-1 cells were microinjected in the cytoplasm with pEGFP. All cells in a field were microinjected. Every hour, phase-contrast and fluorescence microscopy pictures of microinjected cells in the field were taken (A–D). Phase-contrast microscopy of the same field before microinjection (A), or 1 (B), 4 (C) and 6 h (D) after microinjection. (E) Fluorescent microscopy 6 h after microinjection. Black arrow in A and B indicates a cell that divided 4 h after microinjection (C) to give two daughter cells in D (two black arrows). These cells expressed a high level of GFP (E). The white arrow indicates a cell that did not divide throughout the experiment, since its nuclear envelope is clearly detectable on every phase-contrast picture, and ultimately expressed GFP 6 h after microinjection

with cationic polymers, such as PEI or polylysine, was reported to promote gene accessibility to the nucleus, but it was not the case for cationic lipids [21,22]. Overall, intracellular trafficking of plasmid DNA, either naked or complexed with cationic lipid, is largely uncharacterized.

Once within the cytoplasm, the gene must enter the nucleus to be transcribed. In non-dividing cells, nucleocytoplasmic exchanges are regulated by nuclear pore complexes [23]. The pore size is approximately 55 Å in diameter, and molecules with a molecular weight of 40 kDa or less can freely diffuse across the pore. While considerable progress has been made in recent years in characterizing the signals and transporters involved in protein and RNA nucleocytoplasmic trafficking [24], very little is known about the nuclear import of exogenous plasmid DNA. Short nucleic acids such as oligonucleotides diffuse freely through the nuclear pore complex. Theoretically, a free hydrated DNA double helix (3 nm) is thin enough to enter the nuclear pore by diffusion, i.e. with no energy or signal requirement. However, DNA is a macromolecule, and the ability of a molecule to undergo nuclear import is strongly dependent of its molecular weight. In addition, it is established that an association of nucleic acids with proteins is required for nuclear import of large nucleic acids (i.e. virus genomes, mRNA, snRNA). It has been speculated that during non-viral gene transfer, entry of exogenous DNA into the nucleus occurs only in cells that are actively dividing, i.e. when the nuclear envelope breaks down. The impact of cell cycle status in non-viral transfection assays of mammalian cells is not well understood but has been actively studied in the last 5 years [8,14,25–30]. Various techniques have been employed to address this question. Cells were either growth-arrested by drugs [26] or serum starvation [8,27], or synchronized by thymidine-treatment [8,25,28]. Alternatively, some authors have used differentiated cells [14,22] that are known to have stopped their division. Cells in a particular cell cycle phase can also be prepared by elutriation [30].

The present study aims to understand the nuclear import barrier during cationic lipid-mediated gene delivery. We have obtained the same results as others when non-dividing cells were transfected, as compared to exponentially divided cells. When the growth of cells is arrested by drugs, transfection is inhibited [present study, 26]. However, we can not exclude the possibility that aphidicolin interferes with other cellular targets than polymerase. When cells are synchronized, the efficiency of transfection can be assayed on non-divided cells in the absence of any drug. Once again, using this method, transfection was inhibited as described by others [8]. We precisely quantified the transfection activity of the cells that had not divided during the first 4 h after the block release in order to determine whether this low activity could be attributed to non-dividing cells. However, since no complete synchronization could be obtained, we were unable to reach a conclusion on this point. No definitive conclusion can be drawn, except that when cells undergo a mitotic event, transfection efficiency is enhanced. Next

we took advantage of our covalently labelled plasmid [10] to examine the nuclear import of plasmid on permeabilized cells. This cellular model has been specifically and successfully developed to investigate the nuclear import of proteins [12]. Unfortunately, in the present experiment no import could be detected, either because fluorescence microscopy is not sensitive enough to detect only a few molecules among background, or because no nuclear import of plasmid occurred. We were also unable to detect the nuclear import of fluorescent plasmid after microinjection of DNA into the cytoplasm of cultured cells [10].

Recent studies by Wolff and co-workers suggest that the cell cycle-independent nuclear delivery of plasmid DNA exists in primary culture of rat myotubes [31]. The efficiency of nuclear import was evaluated by the onset of GFP expression and cells were followed by phase-contrast microscopy in order to discriminate between dividing and non-dividing cells. We found that dividing cells greatly expressed the transgene, demonstrating that when plasmid DNA is present in the cytoplasm of a dividing cell high levels of expression of the transgene occurs. We were also able to detect GFP expression in cells that had not divided after microinjection. These cells had not divided throughout the experiment since their nuclear envelope remained detectable. Other systems than direct microscopic observation have been used to identify cells that divided during a microinjection experiment [21,22,25] but none of them could prove directly and unambiguously that cells did not divide. To our knowledge this represents the first observation that individual cells were shown to express a transgene after cytoplasmic microinjection of the plasmid, whereas no division has occurred between the time of DNA administration and the onset of transgene expression. Nevertheless microinjection is a harsh treatment, and we can not exclude the possibility that plasmid DNA was forced across the nuclear pores or even across the envelope during the injection procedure. However, considering the time lag between injection and the onset of GFP expression, it seems more likely that plasmid DNA has entered the nucleus after diffusion through the cytoplasm from the injection site to the nucleus.

Because a great number of plasmid DNA molecules in the cytoplasm was initially detected in cells following cytoplasmic injection [10], it is conceivable that effective transport of plasmid DNA into the nucleus would overcome the limitation of cytoplasmic degradation and improve the efficiency of gene expression. Therefore, targeting of DNA to nuclear transporters should be an integral part of the design of an efficient gene therapy delivery system. Several attempts at improving the entry of plasmid DNA into the nucleus have been published. These include the use of electrostatic binding of DNA to cationic NLS-containing proteins or peptides [32,33], as well as covalent attachment of NLS peptides to DNA [34–37]. All these attempts at improving the transport of DNA to the nucleus through the use of nuclear localization signals have met with limited success. Exciting work

was recently described by Zanta *et al.* [38]. Using a capped linear DNA fragment covalently coupled at one end to a single NLS peptide, the authors showed a 10–1000-fold enhancement of reporter gene expression. Surprisingly, the greater enhancements were obtained with rapidly growing cells like 3T3 or HeLa, whereas slow or non-growing cells like neurons or macrophages exhibited a weak enhancement. More work is thus needed in order to develop efficient and rationally based plasmid intracellular targeting strategies.

References

1. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotech* 2000; **18**: 119–128.
2. Li S, Huang L. Non viral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 2000; **7**: 31–34.
3. Escriou V, Ciolina C, Lacroix F, Byk G, Scherman D, Wils P. Cationic lipid-mediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1368**: 276–288.
4. Farhood H, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1235**: 289–295.
5. Yang Y, Huang L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* 1997; **4**: 950–960.
6. Capecchi MR. High efficiency transformation by direct micro-injection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 1980; **22**: 479–488.
7. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18997–19007.
8. Wilke M, Fortunati E, vandenBroek M, Hoogeveen AT, Scholte BJ. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther* 1996; **3**: 1133–1142.
9. Soubrier F, Cameron B, Manse B, *et al.* pCOR: a new design of plasmid vectors for non viral gene therapy. *Gene Ther* 1999; **6**: 1482–1488.
10. Neves C, Byk G, Escriou V, Bussone F, Scherman D, Wils P. Novel method for covalent fluorescent labeling of plasmid DNA that maintains structural integrity of the plasmid. *Bioconjug Chem* 2000; **11**: 51–55.
11. Stein GS, Stein JL, Lian JB, Last TJ, Owen T, McCabe L. Synchronization of normal diploid and transformed mammalian cells. In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 1994; Academic Press, San Diego, USA; 282–287.
12. Adam SA, Sterne-Marr RE, Gerace L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* 1990; **111**: 807–816.
13. Escriou V, Ciolina C, Helbling-Leclerc A, Wils P, Scherman D. Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol* 1998; **14**: 95–104.
14. Fasbender A, Zabner J, Zeiher BG, Welsh MJ. A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther* 1997; **4**: 1173–1180.
15. Uduehi AN, Moss SH, Nuttall J, Pouton CW. Cationic lipid-mediated transfection of differentiated Caco-2 cells: a filter culture model of gene delivery to a polarized epithelium. *Pharm Res* 1999; **16**: 1805–1811.
16. Kitson C, Angel B, Judd D, *et al.* The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Ther* 1999; **6**: 534–546.
17. Pedrali-Noy G, Spadari S, Miller-Faurès A, Miller AOA, Kruppa J, Koch G. Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase α with aphidicolin. *Nucleic Acids Res* 1980; **8**: 377–387.
18. Xu YH, Szoka FC. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 1996; **35**: 5616–5623.
19. Whittaker GR, Helenius A. Nuclear import and export of viruses and virus genome. *Virology* 1998; **246**: 1–23.
20. Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, *et al.* Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 1999; **6**: 482–497.
21. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7507–7511.
22. Zauner W, Brunner S, Buschle M, Ogris M, Wagner E. Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1428**: 57–67.
23. Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 391–401.
24. Adam SA. Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 402–406.
25. Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1445**: 53–64.
26. Mortimer I, Tam P, MacLachlan I, Graham RW, Saravolac EG, Joshi PB. Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther* 1999; **6**: 403–411.
27. Marenzi S, Adams RLP, Zardo G, Lenti L, Reale A, Caiafa P. Efficiency of expression of transfected genes depends on the cell cycle. *Mol Biol Rep* 1999; **26**: 261–267.
28. Brisson M, Tseng WC, Almonte C, Watkins S, Huang L. Subcellular trafficking of the cytoplasmic expression system. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 2601–2613.
29. James MB, Giorgio TD. Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol Ther* 2000; **1**: 339–346.
30. Brunner S, Sauer T, Carotta S, Cotten M, Saltik M, Wagner E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* 2000; **7**: 401–407.
31. Dowty ME, Williams P, Zhang G, Hagstrom JE, Wolff JA. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 4572–4576.
32. Collas P, Husebye H, Alestrom P. The nuclear localization sequence of the SV40 T antigen promotes transgene uptake and expression in zebrafish embryo nuclei. *Transgenic Res* 1996; **5**: 451–458.
33. Subramanian A, Ranganathan P, Diamond SL. Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of non-dividing mammalian cells. *Nat Biotech* 1999; **17**: 873–877.
34. Branden LJ, Mohamed AJ, Smith CIE. A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat Biotech* 1999; **17**: 784–787.
35. Neves C, Byk G, Scherman D, Wils P. Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation. *FEBS Lett* 1999; **453**: 41–45.
36. Sebestyén MG, Ludtke JL, Bassik MC, *et al.* DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat Biotech* 1998; **16**: 80–85.
37. Ciolina C, Byk G, Blanche F, Thuillier V, Scherman D, Wils P. Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjug Chem* 1999; **10**: 49–55.
38. Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 91–96.

Optimization of plasmids for gene delivery

M. Carrière^{1*}, C. Neves³, P. Wils², F. Soubrier², A. Mahfoudi², D. Scherman^{1*}

¹UMR 7001 CNRS-ENSP-Aventis, ²Aventis-Gencell, ³Aventis-Pharmaceutical Sciences, Material and Drug Design, Centre de recherche de Vitry-Alfortville, 13, quai Jules-Guesde, 94403 Vitry-sur-Seine, France

*Correspondence: marie.carriere@aventis.com and daniel.scherman@aventis.com

The efficient and safe delivery of therapeutic genes to target cells upon direct in vivo administration of non-viral vectors is of great interest for the development of gene therapy. Successful non-viral gene transfer requires mastering of plasmid access to target cells, intracellular penetration and nuclear localisation; this review describes the optimisation of plasmid backbone with this respect. Several strategies have been developed for the optimum reduction of the prokaryotic sequences of expression vectors. Approaches such as minicircle and pCOR were developed to diminish the number of CpG motives, to avoid the presence of an antibiotic resistance gene for improved bio-safety, and to reduce the size of the plasmid for better bioavailability. Moreover, this paper outlines the field of plasmid nuclear targeting, either through the adjunction of targeting DNA sequences, or by covalent chemistry on plasmid DNA.

Key words: Gene transfer — Gene therapy — Non-viral vector — Conditional replication — Site-specific recombination — Nuclear import — Nuclear localisation signal.

Considerable advances in molecular biology and genetics are extremely promising for gene therapy. Indeed, therapeutic gene transfer is an appealing strategy, not only to cure monogenic hereditary diseases, but also for life-saving treatment of diseases such as cancer or ischaemia. It is presently recognised that one of the factors limiting the development of gene therapy is the lack of sufficiently efficient or safe gene transfer vectors.

In particular, the efficient and safe delivery of therapeutic genes to target cells upon direct *in vivo* administration remains one of the most important challenges for the development of gene therapy. Non-viral systems use a plasmid as an expression vector in combination with chemical and/or biochemical delivery vectors such as cationic lipids or polymers. These vectors self-associate with plasmids to form particles that can transfect cells.

Non-viral vectors have many advantages over viral systems: a better safety profile, the absence of theoretical size limitation for the therapeutic expression cassette, the suitability of one single gene transfer delivery vector for any desired gene, and simpler development due to easier good manufacturing practices (GMP). On the other hand, concerns have been raised regarding the immunostimulatory prokaryotic CpG motives in plasmid DNA, and the efficiency of non-viral gene transfer remains to be enhanced, especially into non-dividing cells.

Successful non-viral gene transfer calls for several steps to be mastered: preparation, purification and formulation of the therapeutic plasmid and synthetic vector, administration, plasmid access to target cells followed by intracellular penetration and nuclear localisation. Although much work has been dedicated to the optimisation of the delivery vectors and to the expression cassette in the plasmid (promoter, etc.) over the last decade, relatively less research has been conducted into the plasmid prokaryotic backbone per se, i.e. the DNA moiety which does not include the expression cassette. Indeed, this backbone can still be optimised as regards the efficiency and safety of non-viral gene transfer.

In the present review, we describe the work that we and other investigators have carried out in order to obtain optimum reduction in the prokaryotic moiety of expression vectors. This allows the number of CpG motives to be reduced, the presence of an antibiotic resistance gene for improved bio-safety to be avoided, and the size of the plasmid to be decreased, thus leading to improved bioavailability. Moreover, we describe the growing field of plasmid targeting, which has been investigated in order to optimise plasmid cellular trafficking, either through the adjunction of suitable DNA sequences, or by covalent chemistry on plasmid DNA.

I. OPTIMISATION OF PLASMID DNA BACKBONE FOR GENE THERAPY

1. Minicircles

The first strategy to produce minimal backbone DNA molecules was developed by Darquet *et al.* [1]. They produced minicircles, supercoiled recombinant DNA molecules containing only the therapeutic gene expression cassette. Contrary to the plasmids currently used in preclinical and clinical trials of gene transfer, minicircles have neither an origin of replication nor an antibiotic selection marker. They cannot self replicate or confer antibiotic resistance to other micro-organisms. They carry only short bacterial sequences, limiting the production of antibodies against the bacterial proteins and the immune response due to CpG sequences present in the plasmid backbone [2].

The minicircles are the product of the *in vivo* excision of the expression cassette by site-specific recombination between the attP and attB recombination sequences, driven by *E. coli* bacteriophage λ integrase (*Figure 1* [3]). During the bacteriophage λ lytic cycle, the expressed integrase mediates the integration of the circular phage genome into the *E. coli* chromosome by site-specific recombination through the attP sequence of bacteriophage λ and the attB sequence of the *E. coli* chromosome. For minicircle production, the attP and

attB sequences are introduced in the same direction in the plasmid backbone just upstream and downstream of the expression cassette. This plasmid is introduced into the *E. coli* D1210HP strain. This strain harbours a λ thermosensitive lysogen (λ cI857 xis- kil-) phage defective for lethal and lytic functions of the prophage. Upon thermal shift to 42°C, the thermolabile cI857 integrase repressor becomes inactivated, thus inducing the integrase expression. The integrase is produced and its recombination activity on the att sites generates two recombination products, which are called minicircle (containing the therapeutic gene expression cassette and the recombinant attR site) and miniplasmid (containing the origin of replication, the antibiotic marker and the attL site) (Figure 1 [3]). In D1210HP, the yield of non-recombined plasmid is around 40% of the starting material. Only small quantities of minicircles are recovered due to the sub-optimal plasmid copy number, incomplete recombination and the presence of multimeric forms. The introduction of the parA gene (encoding a 24 kDa resolvase) into the D1210HP genome, together with the introduction of a multimer resolution site (MRS) between attP and attB allow the minicircle multimers to be resolved [4]. Up to 1.5mg DNA minicircle per litre of bacterial culture can be produced under optimised conditions [4].

After recombination, the minicircle is purified by digesting the miniplasmid with restriction enzymes. *In vitro* experiments were performed with a minicircle encoding the luciferase gene and the cationic lipid RPR120535 (2-(3-[4-(3-amino-propylamino)-butylamino]-propylamino)-N-dioctadecyl-carbamoylmethyl-acetamide [5]). The minicircle leads to a 2- to 10-fold increase in luciferase activity in various cell lines compared with the non-recombined plasmid with the same molarity of luc-cassette [3]. This transfection enhancement was confirmed with a modified firefly luciferase (luc⁺)-minicircle and a β -galactosidase-minicircle on NIH 3T3 cells [1]. *In vivo* injection of the minicircle into mouse skeletal muscle and experimental tumours gives strongly higher reporter gene expression compared with the non-recombined plasmid. Enhancement of mouse tibial cranial muscle gene transfer is up to 32 times higher with luc-minicircle, 50 times higher with

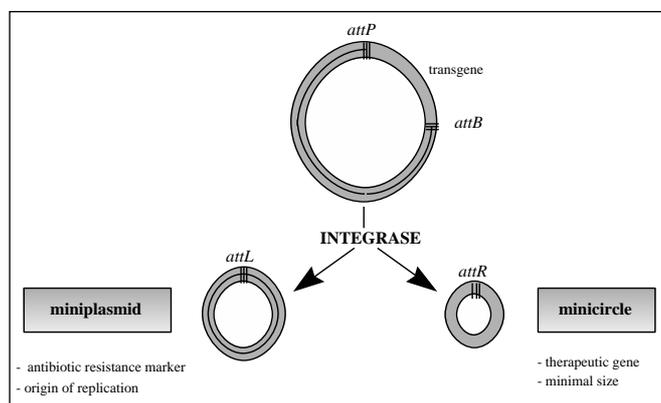


Figure 1 - Main features of minicircle DNA. Minicircles are the product of site-specific recombination between the attB and attP sites driven by *E. coli* bacteriophage λ integrase. They thus lack an origin of replication and an antibiotic resistance gene (for detail see [2]). They cannot self-replicate nor confer antibiotic resistance to other micro-organisms or cells.

luc⁺-minicircle, and 13 times higher with β -gal minicircle [1]. The percentage of transfected myofibers per muscle is also higher when injecting luc⁺-minicircle that that observed following injection of the non-recombined plasmid, with minimal levels of muscle damage [1].

Minicircle purification is the major limitation of the achievement of this strategy: restriction enzymes cannot be used for the production of clinical DNA samples. Chromatographic purification methods have been tested and yield satisfying results (to be published). Triple helix-mediated affinity chromatography of plasmids [6] represents a promising technology for the efficient separation of a minicircle from a miniplasmid after successful recombination.

2. pCOR

More recently, an original host/vector system with a conditional origin of replication was designed [7]. The vector (pCOR for plasmid with conditional origin of replication) backbone consists of three bacterial elements: the R6K γ conditional origin of replication (0.4 kb ori γ), a tRNA suppressor gene (0.2 kb sup Phe), and a cer (0.4 kb ColE1 resolution) fragment to resolve pCOR oligomers (see Figure 2). The size of the pCOR plasmid is thus minimal, which should limit the potential inflammatory response to the prokaryotic CpG sequences during clinical trials.

Propagation of pCOR plasmid is restricted to a specifically engineered bacterial strain expressing the R6K π initiator protein (product of the pir gene), which binds and exerts a trans-positive regulation on the conditional origin of replication (Figure 3 [8]). On the other hand, this bacterial strain carries an amber mutation in the argE gene, involved in arginine biosynthesis, and thus cannot grow on a minimal medium lacking arginine. This mutation can be corrected by the phenylalanine-specific suppressor tRNA encoded by the sup Phe gene on the pCOR plasmid, thus leading to a functionally active argE protein bearing a single Tyr \rightarrow Phe mutation, allowing the strain to grow on minimal medium [8]. With this pCOR construction, no antibiotic resistance gene is required.

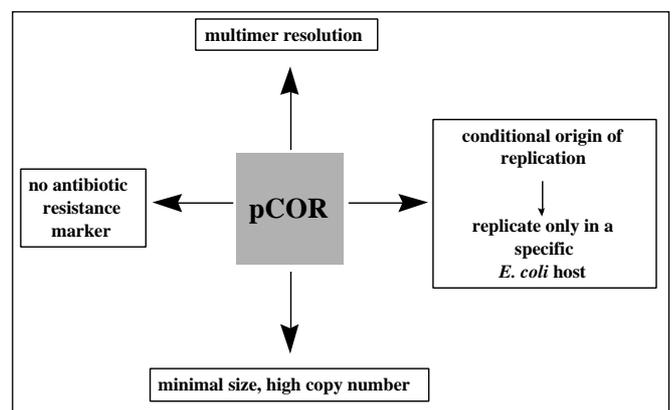


Figure 2 - Main features of pCOR plasmid. pCOR plasmids can only replicate in π -producing (pir-116 gene product) bacteria considerably limiting their host range. pCOR selection does not require antibiotics but uses the expression of a synthetic amber suppressor tRNA gene, specific for phenylalanine (sup Phe). This suppressor corrects an amber mutation in argE gene allowing the recombinant host strain to grow on a minimal medium lacking arginine [1].

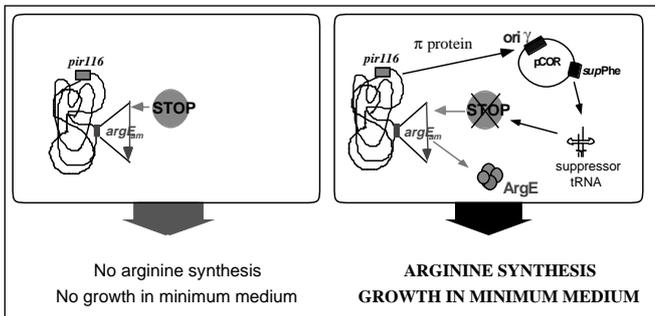


Figure 3 - pCOR host vector system. The XAC-1pir116 strain requires arginine for growth on minimal medium whereas the arginine deficiency of the pCOR host is corrected by the tRNA sup Phe from the plasmid. The amber mutation is shown by a stop and its correction by a crossed-out stop.

The bacterial strain was optimised to enhance pCOR production. Firstly, the mutation of the endA gene avoids the production of endonuclease I which could trigger degradation of pCOR DNA at the pCOR production and purification stages. Then the insertional inactivation of the traD gene abolishes F' transfer and thus avoids low-frequency illegitimate co-transfer of pCOR by conjugation [8].

In vitro standard transfection assays and *in vivo* injection into OF1 murine tibial anterior muscles with luc and luc+ pCOR leads to higher levels of reporter gene expression compared with a conventional plasmid harbouring the same expression cassette [8]. The pCOR plasmid is presently being used in a phase I clinical trial using the FGF1 gene for peripheral artery occlusive disease.

II. OPTIMISATION OF PLASMID DNA FOR NUCLEAR TARGETING

When a green fluorescent protein (GFP) plasmid was microinjected into the nucleus of CV1 cells, about 50% of the injected cells expressed GFP. On the other hand, when the same amount of plasmid was injected into the cytoplasm, no expression of the reporter gene was observed [9]. This may be due either to a lack of diffusion in the cell cytoplasm, or to the incapacity of the plasmid DNA to enter the cell nucleus.

The nucleus is the cellular compartment that encloses chromatin and the machinery necessary for gene transcription. Its composition has to remain intact in order to maintain the integrity of the nuclear structure. Although access to the nucleus is a highly restricted process, a multitude of macromolecules have to enter and exit the nucleus, for the control of the basic cellular metabolism and to respond to changing environmental conditions. Except during mitosis, when the nuclear envelope disappears, the only way macromolecules can enter the nucleus is through the nuclear pore complex (NPC). The NPC allows passive diffusion of small molecules, up to 9 nm, or active transport of larger molecules (up to 25 nm) [10]. The size of a plasmid (from 2 to 50 kbp) places it in the group of macromolecules which have to be imported into the nucleus through an active import process.

The nuclear import mechanism of macromolecules (proteins, RNAs and RNPs) is well documented [11-16]. This mechanism is energy-dependent and carrier-mediated. Karyophilic

macromolecules bear one or more peptide nuclear targeting signals called nuclear localisation sequences (NLSs) [17-20]. Alternatively, a macromolecule can form complexes with karyophilic proteins having NLSs for active importation into the nucleus ("piggyback" transport) [21, 22].

Depending on the imported protein, one or two free cytoplasmic transport factor(s) called karyopherin(s) associate(s) with the NLS sequence to form a pore-targeting complex [15, 23, 24]. These karyopherins are importin- α and importin- β for proteins bearing the SV40 large T antigen NLS, snuportin and importin- β for the m3G UsnRNPs, or transportin alone for the shuttling hnRNP protein A1 [22]. The complexes dock on the distal end of the fibrils protruding from the cytoplasmic ring of the nuclear pore complex. They are translocated through the pore by an energy-dependent mechanism, which has not been fully elucidated, consisting in a series of dissociation/re-association steps of the complex with the nucleoporins.

The nuclear import of proteins is also controlled by the cellular localisation of the protein. This is the case of transcription factors such as NF κ B. To be active, these transcription factors have to enter the nucleus and bind to the DNA. Cytoplasmic retention of NF κ B is the major regulatory mechanism for the inactivation of NF κ B. When the cells are not stimulated, the NF κ B are cytoplasmic, sequestered by the I κ B family members. The κ B inhibitors mask the NF κ B NLS, preventing them from nuclear import. When the NF κ B/I κ B complex dissociates, NF κ B is targeted to the nuclear pore, nuclear translocation and DNA binding take place: the transcription factor is active [25].

1. A nucleotidic sequence can be a nuclear targeting signal

In a recent study, Dean microinjected plasmids containing the SV40 early promoter/enhancer sequence into the cytoplasm of TC7 cells and the plasmids were detected in the nucleus of the majority of the cells by *in situ* hybridisation 8 h after microinjection [26]. Plasmids lacking this sequence, or plasmids containing other parts of the SV40 promoter sequence, did not localise in the nucleus. In parallel experiments, the nuclear import mechanism was shown to be dependent upon energy and cytoplasmic factors. The nuclear import of SV40 bearing plasmids occurred through the nuclear pore complex, since import was inhibited by wheat germ agglutinin (WGA) and by antibodies raised against the nucleoporins. Moreover, the plasmids appeared localised in the areas of active transcription and message-processing inside the nucleus.

To confirm this study, the same plasmids were tested in the digitonin-permeabilised cell model [27]. The plasmids were hybridised with a fluorescein labelled PNA (peptide nucleic acid), in order to retain their transcriptional potential. This fluorescent plasmid, containing the nuclear targeting sequence of the SV40 early promoter/enhancer, was incubated with digitonin-permeabilised HeLa cells, in the presence of the import machinery and an energy-regenerating system. The nuclear import was effective after 90 mn, and maximal after 4 h.

The same group (Dean *et al.*) tested other promoter sequences but these sequences did not show similar nuclear targeting properties [27]. In order to identify another potential sequence

with these targeting properties, we have constructed a library of 7500 plasmids, each plasmid containing a 35 nucleotide-random sequence, and the lacZ reporter gene. After isolation of the plasmids we sequenced a representative number of random sequences to show that they were effectively degenerated. Pools of 96 plasmids were tested for nuclear import on digitonin-permeabilised HeLa cells. The pools were incubated for 30 min with permeabilised cells in the presence of the nuclear import machinery and an energy-regenerating system. The nuclear DNA was then extracted and purified, and DH5 α ultra-competent bacteria were transformed with this nuclear extract. None of the samples showed a representative increase in the number of colonies growing on ampicilline/X-Gal medium. Thus, this approach did not lead to the identification of a specific insert or a group of specific inserts conferring increased active nuclear uptake in the digitonin-permeabilised cells system used. We then transfected human aortic smooth muscle cells (hAoSMC) and HeLa cells with the 96 plasmid pools described above using the lipopolyamine RPR 120535. AoSMC are known to be poorly transfected cells, either because the plasmids cannot enter the cell, or because plasmids badly diffuse in the cytoplasm or cannot pass through the nuclear envelope. No increase in the reporter gene expression was observed 24 h after transfection. Transfection with a control fluorescent plasmid showed that the plasmid can pass the cellular membrane as fluorescent-spotted labelling of the entire cytoplasm but no nucleus labelling could be detected after 24 h transfection. In conclusion, none of the sequences of our library could be shown to significantly target a plasmid to the cell nucleus.

2. Covalent coupling of NLS peptides to the DNA plasmid

Sebestyen *et al.* [28] have developed a two-step method to link large SV40 T antigen NLS-peptides (PKKKRKV) to fluorescently labelled plasmid DNA. The NLS-peptide was first linked to a bromoacetamide derivative of cyclopropa-pyrroloindole (CPI) and then incubated with plasmid DNA. Between twenty-four and one hundred peptides were covalently linked per kilobase pair (kbp) DNA, resulting in a majority of nicked NLS-plasmids. This NLS-bearing DNA could be linearised and then ligated to a linear DNA containing a reporter gene expression cassette. These NLS-plasmids have been shown to be actively imported in the nucleus of digitonin-permeabilised cells when more than 40 NLS-peptides/kbp are linked to the plasmid. This resulted in a spotted staining of the nucleus of digitonin-permeabilised cells, and the spots did not co-localise with the nucleoli of the cells. The rate and the extent of nuclear import were related to the density of NLS peptides coupled to the plasmid. The modification of DNA by NLS peptides totally abolished reporter gene transcription. Moreover, no nuclear staining could be seen when such NLS-plasmids were microinjected into the cytoplasm of HeLa cells.

Zanta *et al.* [29] adopted a totally different approach. The authors developed a linear nucleic acid by digesting plasmid with restriction enzymes, and subsequently capping with hairpin oligonucleotides [30]. This molecule was coupled to a single NLS peptide on one of the hairpin caps. With this vector, the expression level was increased 10- to 1000-fold after transfection

of various cultured cells with a luciferase reporter gene. The time-course study of transgene expression showed that the presence of a single NLS peptide seemed to accelerate the rate-limiting step of transfection. The mechanism implicated here was hypothesised to involve a threading effect of the NLS. NLS would help docking DNA on NPC, and as soon as the DNA starts to enter the nucleus, the DNA would be condensed by histones into chromatin-like structures which would pull the filamentous molecule into the nucleus. According to the proposed model, the presence of multiple NLS on the linearised plasmid would then inhibit the nuclear import, since the NLS-importing complexes could dock on adjacent nuclear pores, and since the DNA could be pulled in opposite directions and blocked on the nuclear envelope.

Even if this approach shows an interesting enhancement of the expression level of the transgene, the molecule remains difficult to produce, and future pharmaceutical development and production of this chimeric DNA cannot be investigated at the present time. Moreover, linearised plasmid DNA seems to lose part of expression vector potency compared with the original supercoiled plasmid.

In a parallel effort, in order to develop a vector that would keep the structural integrity of plasmids, we covalently coupled large T SV40 antigen NLS to circular plasmid DNA [31]. This was achieved via the coupling of cysteine-NLS to p-azido-tetrafluoro-benzyl maleimide, and photoactivation of a controlled number of this compound in the presence of the plasmid. The structural integrity of the plasmid was preserved with this technique: the plasmid-NLS conjugates appeared on agarose gels as supercoiled DNA. This NLS-plasmid conjugate effectively bound to an importin- α -GST fusion protein in a NLS-dependent fashion, showing that NLS peptides bound to DNA could still interact with their receptor. Cytoplasmic microinjection of lissamine-rhodamine B labelled NLS-plasmids did not lead to any nuclear staining: the fluorescence remained cytoplasmic and progressively vanished to a residual spot, probably at the injection site, 6 h after injection. The reporter gene was expressed after cationic-lipid mediated-transfection of this NLS-plasmid in NIH-3T3 cells, showing that the functional integrity of the plasmid was maintained. However, expression enhancement was not significant when 3 or 8 NLS peptides were coupled to the plasmid, and a 60% expression decrease was observed when 43 NLS were coupled.

As indicated, the covalent association of numerous NLS on non-specific sites on the plasmids could inhibit the reporter gene expression. In a site-directed ligand-coupling strategy, we covalently coupled a single NLS peptide at a specific site on plasmid DNA by triple helix formation [32]. The NLS was chemically coupled to the 3' end of a GA₁₉ oligonucleotide (5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3'), which relates to a specific GA₁₉ sequence via a triple helix. A psoralen residue was linked to the 5' end of the GA₁₉ oligonucleotide, allowing covalent attachment of the oligonucleotide to DNA after photoactivation. This GA19 sequence was cloned upstream of the LacZ expression cassette in a plasmid DNA. The plasmid was incubated overnight with an equimolar amount of the GA₁₉-NLS oligonucleotide peptide conjugate, allowing the oligonucleotide to bind to the major groove of duplex DNA by

forming a triple helix. The plasmid was then photoactivated, in order to covalently link the oligonucleotide-peptide conjugate to the plasmid through the psoralen moiety at the specific site defined by the triple helix. With this approach, a single NLS was bound to the plasmid, and the plasmid remained supercoiled. By this technique, several of such sequences could be covalently linked in a site-specific fashion to a plasmid, by simply inserting the required number of target triple-helix sequences in the plasmid. Moreover, this approach can be used to produce the plasmid on a large scale. The expression of the transgene was maintained after transfection on NIH-3T3, but the increase of expression over non-modified plasmid was not significant, either *in vitro* or *in vivo* (unpublished data).

Subramanian *et al.* [33] studied another import system and used a non-covalent NLS coupling to plasmid DNA: they chemically conjugated the nuclear targeting M9 sequence of hnRNP A1 to a 13-peptide cationic peptide (scramble SV40 large T antigen NLS (ScT)), in order to increase the positive charge of the peptide, thus promoting ionic interaction with polyanionic DNA. They complexed M9-ScT with a lacZ plasmid and observed a 63-fold increase in β -Gal expression after bovine aortic endothelium cell (BAEC) lipofection. A classical nuclear import test on digitonin-permeabilised BAECs showed that the M9-ScT fluorescently labelled plasmid was located in the cell nucleus, whereas a fluorescent control plasmid was located in the remaining cytoplasm and on the nuclear envelope of the cells.

*
* *

In conclusion, significant progress has been made to reduce plasmid size and backbone, resulting in potentially less immunostimulatory plasmids for gene therapy. Such an improved expression vector is already in clinical use. Moreover, although an interesting enhancement in terms of the efficacy and specificity of gene transfer has been achieved by targeting the delivery vector associated to the plasmid, particularly in *in vitro* studies, further investigation should be geared towards conferring some intrinsic targeting properties on the plasmid molecule itself. This can be attempted either by inserting an appropriate DNA sequence, or by covalent or non-covalent grafting of a targeting moiety on the plasmid. Although such recent approaches have yielded results that are either still contradictory or unsuitable for pharmaceutical development, these new avenues of research undoubtedly show great promise for the future of gene therapy.

REFERENCES

1. DARQUET A.M., RANGARA R., KREISS P., SCHWARTZ B., NAIMI S., DELAERE P., CROUZET J. and SCHERMAN D. - Minicircle: an improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. - *Gene Therapy*, **6**, 209-218, 1999.
2. SCHWARTZ D.A., QUINN T.J., THORNE P.S., SAYEED S., YI A.K. and KRIEG A.M. - CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. - *J. Clin. Invest.*, **100**, 68-73, 1997.
3. DARQUET A.M., CAMERON B., WILS P., SCHERMAN D. and CROUZET J. - A new DNA vehicle for non-viral gene delivery: supercoiled minicircle. - *Gene Therapy*, **4**, 1341-1349, 1997.
4. KREISS P., CAMERON B., DARQUET A.M., SCHERMAN D. and CROUZET J. - Production of a new DNA vehicle for gene transfer using site-specific recombination. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 560-567, 1998.
5. BYK G., DUBERTRET C., SCHWARTZ B., FREDERIC M., JASLING G., RANGARA R. and SCHERMAN D. - Novel non-viral vectors for gene delivery: synthesis and applications. - *Letts. Peptide Sci.*, **4**, 263-267, 1997.
6. WILSP., ESCRIOU V., WARNERY A., LACROIX F., LAGNEAU D., OLLIVIER M., CROUZET J., MAYAUX J.F. and SCHERMAN D. - Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. - *Gene Therapy*, **4**, 323-330, 1997.
7. KREISS P., CAMERON B., RANGARA R., MAILHE P., AGUERRE-CHARIOL O., AIRIAU M., SCHERMAN D., CROUZET J. and PITARD B. - Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. - *Nucleic Acid Res.*, **27**(19), 3792-3798, 1999.
8. SOUBRIER F., CAMERON B., MANSE B., SOMARRIBA S., DUBERTRET C., JASLING G., JUNG G., LA CAER C., DANG D., MOUVAULT J.M., SCHERMAN D., MAYAUX J.F. and CROUZET J. - pCOR: a new design of plasmid vectors for non-viral gene therapy. - *Gene Therapy*, **6**, 1482-1488, 1999.
9. ESCRIOU V., CIOLINA C., HELBLING-LECLERC A., WILS P. and SCHERMAN D. - Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. - *Cell Biol. Toxicol.*, **14**, 95-104, 1998.
10. STOFFLER D., FAHRENKROG B. and AEBI U. - The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. - *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 391-401, 1999.
11. GÖRLICH D. and MATTAJ I. - Nucleocytoplasmic transport. - *Science*, **271**, 1513-1518, 1996.
12. NIGGE A. - Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. - *Nature*, **386**, 779-787, 1997.
13. YONEDA Y. - How proteins are transported from the cytoplasm to the nucleus. - *J. Biochem. Tokyo*, **121**, 811-817, 1997.
14. MOROIANU J. - Nuclear import and export pathways. - *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **32/33**, 76-83, 1999.
15. KÖHLER M., HALLER H. and HARTMAN E. - Nuclear protein transport pathways. - *Exp. Nephrol.*, **7**, 290-294, 1999.
16. GÖRLICH D. - Transport into and out of the cell nucleus. - *EMBO J.*, **17** (10), 2721-2727, 1998.
17. GARCIA-BUSTOS J., HEITMAN J. and HALL M. N. - Nuclear protein localisation. - *Biochem. Biophys. Acta*, **1071**, 83-101, 1991.
18. JANS D.A., CHAN C.K. and HUEBNER S. - Signal mediating nuclear targeting and their regulation: application in drug delivery. - *Med. Res. Rev.*, **18**(4), 189-223, 1998.
19. BOULIKAS T. - Nuclear import of protein kinases and cyclins. - *J. Cell. Biochem.*, **60**, 61-82, 1996.
20. MICHAEL W.M. - Nucleocytoplasmic shuttling signals: two for the price of one. - *Trends Cell Biol.*, **10**, 46-50, 2000.
21. JANS D.A. and HUBNER S. - Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. - *Physiol. Rev.*, **76**, 651-685, 1996.
22. POLLARD V.W., MICHAEL W.M., NAKIELNY S., SIOMI M.C., WANG F. and DREYFUSS G. - A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. - *Cell*, **86**, 985-994, 1996.
23. WOZNIAK R.W., ROUT M.P. and AITCHISON J.D. - Karyopherins and kissing cousins. - *Trends Cell Biol.*, **8**, 184-188, 1998.
24. WEIS K. - Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. - *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 185-189, 1998.
25. CARTWRIGHT P. and HELIN K. - Nucleocytoplasmic shuttling of transcription factors. - *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 1193-1206, 2000.
26. DEAN D.A. - Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. - *Exp. Cell Res.*, **230**, 293-302, 1997.
27. WILSON G.L., DEAN B.S., WANG G. and DEAN D.A. - Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilised cells requires

- both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. - *J. Biol. Chem.*, **274** (31), 22025-22032, 1999.
28. SEBESTYÉN M.G., LUDTKE J.L., BASSIK M.C., ZHANK G., BUDKER V., LUKHTANOV E.A., HAGSTROM J.E. and WOLFF J.A. - DNA vector chemistry : the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. - *Nat. Biotech.*, **16**, 80-85, 1998.
 29. ZANTA M.A., BELGUISE-VALLADIER P. and BEHR J.P. - Gene delivery: a single nuclear localisation signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 91-96, 1999.
 30. SEIBEL P., TRAPPE J., VILLANI G., KLOPSTOCK T., PAPA S. and REICHMAN H. - Transfection of mitochondria : strategy towards a gene therapy of mitochondrial DNA disease. - *Nucleic Acids Res.*, **23**(1), 10-17, 1995.
 31. CIOLINAC., BYK G., BLANCHE F., THUILLIER V., SCHERMAN D. and WILS P. - Coupling of nuclear localisation signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin α . - *Bioconjugate Chem.*, **10**, 49-54, 1999.
 32. NEVES C., BYK G., SCHERMAN D. and WILS P. - Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation. - *FEBS Lett.*, **453**, 41-45, 1999.
 33. SUBRAMANIAN A., RANGANATHAN P. and DIAMOND S.L. - Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of non-dividing mammalian cells. - *Nat. Biotech.*, **17**, 873-877, 1999.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank V. Escriou, B. Cameron and P. Bigey for their helpful discussions and technical support.

MANUSCRIPT

Received 13 October 2000, accepted for publication 11 December 2000.