

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

**Évaluation du potentiel thérapeutique des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane et
de siARN-DPP4/chitosane pour le contrôle du diabète de type 2**

Par
Myriam Jean

Thèse présentée à l'INRS-Institut Armand-Frappier comme exigence partielle du doctorat
en biologie

Jury d'évaluation de la thèse

Dr Maximilien Arella, président de Jury
Dr Caroline Hoemann, évaluateur externe
Dr Georges Tsoukas, évaluateur externe
Dr Abderrazzak Merzouki, directeur de recherche
Dr Claude Guertin, codirecteur de recherche

Mai 2010

© Droits réservés de Myriam Jean, 2010

RÉSUMÉ

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique qui se caractérise par une hyperglycémie chimique. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 300 millions de personnes seront atteintes du diabète d'ici l'an 2025 et cette augmentation concerne essentiellement le diabète de type 2. Devant l'accroissement alarmant d'individus atteints du diabète de type 2, il s'avère très important d'explorer de nouvelles avenues pour la mise au point de traitements, nouvelle génération, plus efficaces pour réduire les symptômes, les complications et la mortalité associée au diabète de type 2.

Le GLP-1 (glucagon-like peptide 1) est un dérivé du proglucagon qui stimule la sécrétion de l'insuline et inhibe la sécrétion du glucagon, une hormone antagoniste de l'insuline. Pour normaliser les concentrations de glucose chez les personnes atteintes du diabète de type 2, le GLP-1 doit être administré de façon continue afin d'éviter l'inactivation rapide de ce dernier par l'enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Notre projet de recherche consistait donc à développer et à évaluer le potentiel d'une thérapie génique, dont le principe consiste à transférer le gène qui exprime la molécule GLP-1 pour traiter le diabète en utilisant le vecteur d'expression recombinant pVax-GLP-1 combiné à un polymère à base de chitosane comme système de livraison.

Le chitosane est un polysaccharide naturel et biodégradable dont les propriétés biologiques sont définies par sa masse molaire moyenne (Mn) ainsi que par son degré de désacétylation (DD) qui correspond à la fraction monomère glucosamine du polymère. Le chitosane forme instantanément des nanocomplexes avec l'ADN et l'ARN par attraction électrostatique en condensant les acides nucléiques. Le ratio N:P correspond au ratio amide de chitosane : phosphate de l'ADN. Ainsi le plasmide recombinant pVax-GLP-1 (7-37) exprimant la forme active du GLP-1, soit le GLP-1 (7-37), et les plasmides recombinants exprimant les formes variantes du GLP-1 (7-37) soit le [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et le [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)], modifiées pour accroître leur résistance à la dégradation par la DPP-IV et augmenter leur demi vie biologique, ont été complexés avec trois différentes formulations de chitosanes soit le [92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 (DD-Mn-N :P)] pour créer six nanocomplexes thérapeutiques pVax-GLP-1/chitosane (NCT). Ces formulations de chitosane ont été choisies en fonction de leurs propriétés inflammatoires et biodégradables (Jean *et al.*, 2009).

Nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'efficacité de transfection et d'expression de gènes recombinants, en utilisant des nanocomplexes composés des trois formulations de chitosane, *in vitro*, dans trois lignées cellulaires (les cellules hépatocytes HepG2 et les cellules du colon HT-29 et Caco-2). Nous avons démontré que la transfection des lignées cellulaires avec les nanocomplexes codant pour la luciférase et la β -galactosidase a permis une augmentation de l'expression des gènes recombinant dans les cellules HepG2 ($1,2 \times 10^7$ RLU/min*mg de protéine) et dans les cellules Caco-2 ($1,7 \times 10^7$ RLU/min*mg de protéine) relativement aux cellules traitées avec les plasmides recombinants seuls. Les tests de viabilité effectués sur les cellules HepG2, Caco-2 et HT-

29 transfectées avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane ont montré que le chitosane n'a pas d'effet toxique sur les cellules *in vitro*.

Les analyses en microscopie électronique et par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont démontré que les NCT pVax-G LP-1/chitosane ont une forme principalement sphérique, un diamètre variant entre 163 à 246 nm et un potentiel zêta variant de 26 mV à 32 mV. Nous avons également démontré que le chitosane protège plus de 70 % de l'ADN recombinant contre la dégradation par des concentrations élevées de DNase I (2 unités/ μ g d'ADN). Les analyses en microscopie confocale des cellules transfectées avec les NTC ont démontré que les nanocomplexes sont internalisés dans les HepG2, 4 heures suivant leur ajout sur les cellules. Toutefois seuls NCT composés du chitosane 92-10-5, relâche la totalité du pVax-GLP-1 à l'intérieur des cellules 24 heures suivant la transfection. La quantification de l'expression du peptide GLP-1 dans les cellules HepG2 transfectées avec les NCT a montré que les NCT composés du chitosane 92-10-5 permettent une expression plus importante du GLP-1 et de ses formes variantes (30 à 120 ng/L) que les NCT composés des chitosanes 80-10-10 et 80-80-5 (10-60 ng/L). L'expression des formes variantes du GLP-1 était 4 fois plus élevée que celle du GLP-1 natif, confirmant leur protection contre la dégradation par l'enzyme DPP-IV. Nos résultats suggèrent que, *in vitro*, le chitosane n'est pas toxique et représente un système de livraison efficace et sécuritaire du plasmide recombinant pVax-GLP-1 permettant ainsi une expression continue du GLP-1.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'expression du GLP-1 et son effet sur la tolérance au glucose, *in vivo*, en utilisant un modèle animal diabétique (rats ZDF). Nous avons montré que l'administration des NCT aux rats diabétiques ZDF induit une augmentation de l'expression du GLP-1 d'une manière continue (35 pmol/L), ce qui confère une tolérance au glucose 2 fois plus importante que celle observée chez les rats ZDF non traités et ce, durant 29 jours suivants la fin du traitement. Ceci a été confirmé par l'évaluation du taux d'insuline chez les rats qui passe de 5 ng/ml à 12 ng/ml suivant le traitement avec les NCT et par l'évaluation de la prise de poids qui diminue de 5% chez les rats traités avec les NCT comparativement aux rats injectés avec le pVax seul. Par ailleurs, les études histologiques nous ont permis d'évaluer d'une part, le potentiel inflammatoire de chacun des NCT et d'autre part, leur cinétique de biodégradabilité. Ainsi, les NTC pVax-GLP-1/92-10-5, suite à leur administration, se sont avérés peu inflammatoires et leur dégradation était complétée en environ 1 jour comparativement aux NCT pVax-GLP-1/80-10-10 et 80-80-5. Ces derniers étaient moins biodégradables et ont suscité une plus grande mobilisation des leucocytes aux sites d'injections. Ces résultats révèlent, pour la première fois, que les NTC composés du chitosane 92-10-5 seraient les candidats potentiels pour livrer de façon continue, *in vivo*, la protéine recombinante GLP-1 à des fins thérapeutiques tout en évitant une réponse immunitaire qui pourrait être néfaste pour l'organisme et nuisible pour le traitement du diabète de type 2.

Parallèlement, nous avons développé d'autres NCT composés d'ARN interférents (siARN) dirigés contre l'ARNm du gène DPP-IV et complexés aux 3 différentes formulations de chitosane soit le 92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (% DD, Mn, ratio N : P). Ces NCT (siARN-DPP4/chitosane) ont été conçus afin de diminuer l'expression *in vitro*

de la DPP-IV responsable de la dégradation du GLP-1. Les analyses par microscopie électronique et par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont démontré que les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane produits sont sphériques et homogènes, ils ont un diamètre de 71 à 111 nm et un potentiel zêta variant de 16 mV à 20 mV. Des analyses, *in vitro*, des cellules HepG2 transfectées avec les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane, en microscopie confocale ont démontrées que les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane sont internalisés 1 heure suite à la transfection des cellules alors que les ODN sont relâchés du chitosane à partir de 2 jusqu'à 30 heures suivant la transfection.

Nous avons également démontré, par des tests enzymatiques, que l'utilisation de NCT (siARN-DPP4/chitosane) permet de réduire jusqu'à 50 % l'expression de l'enzyme DPP-IV dans les cellules HepG2 et Caco-2. Ces résultats, ont été confirmés par la quantification du niveau d'expression de la DPP-IV par qRT-PCR et qui a montré que la transfection des cellules HepG2 avec les NCT (siARN-DPP4/chitosane) entraîne une inhibition de l'expression du gène DPP-IV de l'ordre de 65%.

En conclusion, au cours de ce projet nous avons mis au point et ce, pour la première fois, des NCT (pVax-GLP-1/chitosane) qui expriment le GLP-1 sous sa forme active qui agit en stimulant la sécrétion d'insuline, en diminuant la prise de poids et en conférant une meilleure tolérance au glucose chez les rats diabétiques. Ces NCT constituent un matériel novateur très important dans le développement d'une thérapie génique pour le traitement efficace du diabète de type 2. Parallèlement, nous avons démontré le potentiel des NCT (siARN-DPP4/chitosane) capable de réduire, *in vitro*, l'expression de l'enzyme DPP-IV responsable de l'inactivation du GLP-1. Ainsi, nos travaux montrent le potentiel des NCT pVax-GLP-1/chitosane qui pourront être utilisés en thérapie génique seuls ou combinés aux NCT (siARN-DPP4/chitosane) pour le traitement du diabète de type 2.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur Dr Abderrazzak Merzouki ainsi que mes codirecteurs de recherche, Dr Claude Guertin et Dr Micheal Buschmann qui m'ont appris énormément et m'ont permis de mener à bien mon projet de doctorat.

Mes remerciements vont à l'équipe du Dr Buschmann pour leur savoir faire et leur rigueur de travail, à monsieurs Marc Henrichon (INRS-IAF) et Chi-Yuan Chang (École Polytechnique), techniciens de laboratoire du Dr Merzouki, pour leur soutien. Je remercie également mes collègues Mohamad Alameh et Diogo De Jesus pour leur disponibilité et leur intérêt porté au projet ainsi que le Dr Latifa Bouhdoud, stagiaire post-doctoral, qui a été d'une aide inestimable pour la rédaction de cette thèse. De même, je voudrais exprimer toute ma gratitude à ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de doctorat.

Ce projet de Doctorat a été rendu possible grâce aux bourses d'excellence offertes par la Fondation Armand-Frappier, au support financier des laboratoires du Dr Merzouki et du Dr Buschmann de l'École Polytechnique de Montréal et aux subventions octroyées aux Drs M. Buschmann et A. Merzouki par les instituts de recherche en santé du Canada (IRSC, métabolisme et diabète) et le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG).

Finalement, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance envers mes parents, ma famille et mes amis (es) pour leur soutien, leurs encouragements et leur confiance.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
REMERCIEMENTS	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTES DES ABRÉVIATIONS	XIV
INTRODUCTION.....	16
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	20
REVUE DE BIBLIOGRAPHIQUE.....	24
1. THÉRAPIE GÉNIQUE	25
1.1. <i>Historique</i>	25
1.2. <i>Critère de la thérapie génique</i>	27
1.2.1. <i>Choix du gène thérapeutique et des cellules ciblées</i>	27
1.2.2. <i>Vecteur de transfert de gène</i>	27
1.2.2.1. <i>Méthodes virales</i>	28
1.2.2.2. <i>Méthode non-virale</i>	31
1.2.2.2.1. <i>Lipoplexes</i>	32
1.2.2.2.2. <i>Polyplexes</i>	33
1.2.3. <i>Stratégie de transfert</i>	35
2. CHITOSANE	35
2.1. <i>Historique</i>	35
2.2. <i>Source de chitine</i>	36
2.3. <i>Structure chimique de la chitine et du chitosane</i>	36
2.4. <i>Production de la chitine et du chitosane</i>	40
2.5. <i>Applications du chitosane comme système de livraison de l'ADN</i>	41
3. DIABÈTE DE TYPE 2	42
3.1. <i>Insuline</i>	43
3.2. <i>Traitements actuels pour le diabète de type 2</i>	43
3.3. <i>GLP-1 «glucagon-like peptide 1»</i>	48
3.4. <i>Proglucagon et production du GLP-1</i>	49
3.5. <i>Actions pancréatiques du GLP-1</i>	56
3.6. <i>Effets extra pancréatiques du GLP-1</i>	60
3.7. <i>Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), un inhibiteur du GLP-1</i>	60
3.7.1. <i>Stratégies pour accroître la concentration de GLP-1 chez les diabétiques</i>	64
4. ARN INTERFÉRENTS ET LEURS MÉCANISMES D'ACTION	66
4.1. <i>Inhibition de l'expression des gènes par l'utilisation des ARN interférents</i>	70

4.2. Applications du chitosane comme système de livraison des siARN	71
MATÉRIELS ET MÉTHODES	73
1. PRÉPARATION DES FORMULATIONS DE CHITOSANE	74
2. TRANSFECTION DE CELLULES HUMAINES <i>IN VITRO</i> AVEC LES NANOCOMPLEXES CHITOSANE-ADN.....	74
2.1. Préparation du chitosane	75
2.2. Préparation des nanocomplexes pADN/chitosane	76
2.3. Lignées cellulaires : conditions de culture et procédure de transfection	76
3. TRANSFECTION DES CELLULES HUMAINES <i>IN VITRO</i> AVEC LES LIPOPLEXES (PADN/LIPOFECTAMINE)	78
3.1. Test enzymatique de la luciférase.....	79
3.2. Test enzymatique de la β -galactosidase.....	80
4. TEST DE VIABILITÉ DES CELLULES TRANSFECTÉES AVEC DES NANOCOMPLEXES PADN/CHITOSANE.	84
5. CLONAGE DU GÈNE CODANT POUR LE PROGLUCAGON	85
5.1. Synthèse de l'ADNc du proglucagon.....	85
5.2. Amplification par PCR de l'ADNc du proglucagon	90
5.3. Clonage du fragment d'ADN codant pour le proglucagon dans le vecteur pCR [®] 2.1	91
5.3.1. Transformation des cellules bactériennes <i>E. coli</i> (INVaF').....	94
5.3.2. Sélection des colonies recombinantes et purification de l'ADN plasmidique	94
6. CLONAGE DES SÉQUENCES D'ADN CODANT POUR LE GLP-1 ET SES FORMES VARIANTES	96
6.1. Amplification par PCR des séquences d'ADN codant pour le GLP-1 et ses formes variantes	97
6.2. Clonage des fragments d'ADN codant pour le peptide GLP-1 et ses formes variantes dans le vecteur pCR [®] 2.1.....	99
6.3. Sous clonage des fragments codant pour le peptide GLP-1 et ses formes variantes dans le vecteur d'expression pVax.....	99
6.3.1. Transformation des cellules bactériennes <i>E. coli</i> XL-1Blue	100
6.3.2. Sélection des bactéries <i>E. coli</i> XL1-Blue recombinantes.....	101
7. PRODUCTION À GRANDE ÉCHELLE DU PLASMIDE pVAX ET DES PLASMIDES RECOMBINANTS pVAX-GLP-1	101
8. ANALYSE DES NANOCOMPLEXES THÉRAPEUTIQUES pVAX-GLP-1/CHITOSANE (NCT) PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE	103
9. DÉTERMINATION DU POTENTIEL ZÊTA ET DE LA TAILLE DES NCT pVAX-GLP-1/CHITOSANE	103
10. PROTECTION, CONTRE LA DIGESTION PAR LA DNASEI, DES NCT À BASE DE CHITOSANE	104
10.1. Digestion des NCT pVax-GLP-1/chitosane par la DNase I et par la chitosanase	105
10.2. Analyses par électrophorèse sur gel d'agarose	105
11. ANALYSE, PAR MICROSCOPIES CONFOCALE, DE L'INTERNALISATION DES NCT pVAX-GLP-1/CHITOSANE <i>IN VITRO</i> . 106	
11.1. Marquage de l'ADN plasmidique et du chitosane	106
11.2. Transfection des cellules HepG2 avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane marqués	107
12. QUANTIFICATION, PAR TEST ELISA, DE L'EXPRESSION DU GLP-1 RECOMBINANT PAR LES CELLULES HEPG2 TRANSFECTÉES AVEC NCT	108
13. EXPÉRIENCES, <i>IN VIVO</i> , CHEZ LES RATS ZDF.....	109
13.1. Protocoles d'injections des rats ZDF avec les NCT	109
13.2. Quantification de l'expression du GLP-1 recombinant par test ELISA.....	110
13.3. Test de tolérance au glucose	110
13.4. Quantification de la sécrétion d'insuline, par test ELISA, chez les rats traités avec les NCTpVax-GLP-1/chitosane	111

13.5.	<i>Analyse histologique aux sites d'injections des nanocomplexes thérapeutiques (NCT) pVax-GLP-1/chitosane</i>	112
14.	PRÉPARATION DES DUPLEX D'ADN (ODN) MIMANT LES SIARN	112
15.	ANALYSE DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GELS DE POLYACRYLAMIDE	113
16.	OBSERVATION DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE ..	114
17.	DÉTERMINATION DU POTENTIEL ZÊTA ET DE LA TAILLE DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE.....	115
18.	ÉTUDE DE LA PROTECTION, PAR LE CHITOSANE, DES ODN-DPP4 DANS LES NANOCOMPLEXES CONTRE LA DIGESTION PAR LA DNASE I.	115
19.	ANALYSE, PAR MICROSCOPIE CONFOCALE DE L'INTERNALISATION DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE <i>IN VITRO</i>	115
20.	SILENÇAGE, <i>IN VITRO</i> , DU GÈNE DPP-IV PAR L'UTILISATION DE SIARN-DPP4	116
20.1.	<i>Synthèse de siARN-DPP4</i>	116
20.2.	<i>Transfection in vitro des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 avec les NCT siARN-DPP-4/chitosane</i>	117
20.3.	<i>Transfection in vitro des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 avec les lipoplexes (siARN-DPP4/lipide)</i>	118
20.4.	<i>Test enzymatique de l'activité de la DPP-IV in vitro</i>	119
20.5.	<i>Quantification, par qRT-PCR, de l'ARNm du DPP-IV dans les cellules transfectées avec NCT (siARN-DPP4/chitosane)</i>	120
20.5.1.	<i>Extraction de l'ARN total</i>	120
20.5.2.	<i>Détermination de la qualité et de la quantité de l'ARN total</i>	121
20.5.3.	<i>Réaction de transcription inverse à partir de l'ARN total</i>	122
20.5.4.	<i>Amplification en temps réel (qRT-PCR) du gène de la DPP-IV</i>	123
21.	ANALYSES STATISTIQUES	124
RÉSULTATS		125
1.	ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE TRANSFECTION ET DE L'EXPRESSION DE GÈNES RECOMBINANTS <i>IN VITRO</i> EN UTILISANT LE CHITOSANE	126
1.1.	<i>Expression du gène EFGPLuc codant pour la luciférase</i>	126
1.2.	<i>Expression du gène lac Z codant pour la β-galactosidase</i>	133
2.	ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ DU CHITOSANE SOUS FORME DE NANOCOMPLEXE <i>IN VITRO</i>	136
3.	CONSTRUCTION DES VECTEURS RECOMBINANTS CODANT POUR LE PEPTIDE GLP-1 (7-37) ET SES FORMES VARIANTES.	139
4.	CARACTÉRISATION DES NANOCOMPLEXES pVAX-GLP-1/CHITOSANE (NCT)	147
4.1.	<i>Analyse, par microscopie électronique, des NCT (pVax-GLP-1/chitosane)</i>	147
4.2.	<i>Détermination du potentiel zêta et de la taille des NCT (pVax-GLP-1/chitosane)</i>	147
5.	PROTECTION, CONTRE LA DIGESTION PAR LA DNASEI, DES NCT (pVAX-GLP-1) À BASE DE CHITOSANE	151
6.	ÉTUDE DE L'INTERNALISATION DES NCT pVAX-GLP-1/CHITOSANE <i>IN VITRO</i>	154
7.	ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DU PEPTIDE GLP-1 (7-37) ET SES FORMES VARIANTES <i>IN VITRO</i>	157
8.	ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DU PEPTIDE GLP-1 (7-37) CHEZ LES RATS ZDF TRAITÉS PAR L'ADMINISTRATION DES NCT (pVAX-GLP-1/CHITOSANE)	160
9.	TEST DE TOLÉRANCE AU GLUCOSE SUITE AU TRAITEMENT DES RATS ZDF AVEC LES NCT pVAX-GLP-1/CHITOSANE ...	163
10.	ÉVALUATION DE LA QUANTITÉ D'INSULINE PRODUITE CHEZ LES RATS ZDF TRAITÉS AVEC LES NCT pVAX-GLP-1/CHITOSANE	167

11.	DÉTERMINATION DE LA DURÉE DE L'EFFICACITÉ DU TRAITEMENT AVEC LES NCT pVax-GLP-1/CHITOSANE, CHEZ LES RATS ZDF, PAR DES TESTS SUCCESSIFS DE TOLÉRANCE AU GLUCOSE.....	170
12.	ÉVALUATION DU POIDS DES RATS ZDF DURANT LE TRAITEMENT AVEC LES NCT	173
13.	ANALYSE HISTOLOGIQUE DES SITES D'INJECTIONS DES NCT pVax-GLP-1/CHITOSANE.....	176
14.	ÉLABORATION DES NANOCOMPLEXES ODN -DPP4 /CHITOSANE.....	184
14.1.	ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GELS À PH VARIABLE	184
15.	CARACTÉRISATION DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE	190
15.1.	<i>Analyse par microscopie électronique des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane.....</i>	190
15.2.	<i>Détermination du potentiel zêta et de la taille des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane</i>	190
16.	PROTECTION, CONTRE LA DIGESTION PAR LA DNASEI, DES ODN-DPP4 FORMANT DES NANOCOMPLEXES AVEC LE CHITOSANE.....	194
17.	ÉTUDE DE L'INTERNALISATION DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE <i>IN VITRO</i>	197
18.	CINÉTIQUE D'INTERNALISATION DES NANOCOMPLEXES ODN-DPP4/CHITOSANE <i>IN VITRO</i>	202
19.	SILENÇAGE DU GÈNE DE LA DPP-IV PAR L'UTILISATION DES NCT siARN-DPP4/CHITOSANE	205
19.1.	<i>Activité enzymatique de la DPP-IV dans les cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 traitées avec les NCT siARN-DPP4/chitosane.....</i>	205
19.2.	<i>Évaluation de la cytotoxicité des NCT siARN-DPP4/chitosane.....</i>	206
19.3.	<i>Quantification du niveau d'expression de l'ARNm de gène de la DPP-IV par qRT-PCT.....</i>	206
	DISCUSSION	212
	CONCLUSION.....	228
	RÉFÉRENCES	231
	ANNEXES.....	254

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Schéma de la structure chimique de la chitine et du chitosane.....	38
Figure 2 :	Synthèse et sécrétion du GLP-1.....	51
Figure 3 :	Représentation des variations d'insuline, du GLP-1 et du glucagon suite à la prise d'un repas chez un sujet non diabétique.....	53
Figure 4 :	Mécanisme d'action du GLP-1.....	58
Figure 5 :	Métabolisme du GLP-1.....	62
Figure 6 :	Mécanismes d'action des siARN et des miARN.....	68
Figure 7 :	Vecteurs recombinants utilisés pour la transfection et l'analyse de l'expression du gène recombinant <i>in vitro</i>	81
Figure 8 :	Séquence nucléotidique des exons du gène codant pour le proglucagon.....	88
Figure 9 :	Vecteurs de clonage (PCR2.2) et d'expression (pVax).....	92
Figure 10 :	Expression de l'enzyme luciférase par les cellules HepG2 et Caco-2 transfectées avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane.....	129
Figure 11 :	Expression de l'enzyme luciférase par les cellules HT-29 et HEK 293 transfectées avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane.....	131
Figure 12 :	Expression de l'enzyme β -galactosidase par les cellules HepG2 transfectées avec les nanocomplexes pVax-LacZ/chitosane.....	134
Figure 13 :	Niveau de viabilité des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 après transfection avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane.....	137
Figure 14 :	Profil électrophorétique de l'ARN total extrait de cellules intestinales et de l'ADNc du proglucagon.....	141
Figure 15 :	Profil électrophorétique du plasmide recombinant contenant le gène codant pour le GLP-1, avant et après une digestion avec les endonucléases <i>XhoI</i> et <i>HindIII</i>	143
Figure 16 :	Schéma de la construction du plasmide recombinant pVax-GLP-1 (7-37) et ses formes variantes.....	145
Figure 17 :	Images des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane en microscopie électronique.....	148
Figure 18 :	Protection, par le chitosane, du plasmide recombinant pVax-GLP-1 dans les NCT, contre la digestion de la DNase I.....	152

Figure 19 :	Internalisation des nanocomplexes pVax-GLP-1/92-10-5 et libération du plasmide recombinant à l'intérieur des cellules HepG2.	155
Figure 20 :	Quantification de l'expression du GLP-1 (7-37) et ses formes variantes par les cellules HepG2 transfectées avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane.....	158
Figure 21 :	Quantification de l'expression du GLP-1(7-37) recombinant suite à l'administration des NTC pVax-GLP-1/chitosane aux rats ZDF.....	161
Figure 22 :	Test de tolérance au glucose chez les rats ZDF à la fin du traitement par les NCT pVax-GLP-1/chitosane.....	165
Figure 23:	Quantification de l'insuline avant et après le traitement des rats ZDF avec les NTC pVax-GLP-1/chitosane.....	168
Figure 24:	Tests successifs de tolérance au glucose chez les rats ZDF à la fin du traitement avec les NTC (pVax-GLP-1/chitosane).....	171
Figure 25:	Évaluation du poids des rats ZDF durant le traitement avec les NCT.....	174
Figure 26:	Analyse des coupes correspondantes aux sites d'injection des NCT pVax-GLP-1/92-10-5 par voie IM ou SC.....	178
Figure 27 :	Analyse des coupes correspondantes aux sites d'injection des NCT pVax-GLP-1/80-10-10 par voie IM ou SC.....	180
Figure 28 :	Analyse des coupes correspondantes aux sites d'injection avec les NCT pVax-GLP-1/80-80-5 par voie IM ou SC.....	182
Figure 29 :	Profils électrophorétiques des nanocomplexes ODN-DPP4 /chitosane 92-10.....	186
Figure 30 :	Stabilité des nanocomplexes ODN - DPP4 /chitosane 92-10.....	188
Figure 31 :	Images des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane en microscopie électronique.....	191
Figure 32 :	Protection, par le chitosane, des ODN-DPP4 dans les nanocomplexes contre la digestion de la DNase I.....	195
Figure 33 :	Internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5 et libération du des ODN-DPP4 à l'intérieur des cellules HepG2.....	198
Figure 34 :	Internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/80-10-10 et libération du des ODN-DPP4 à l'intérieur des cellules HepG2.	200
Figure 35 :	Images en microscopie confocale des cellules HepG2, 1 et 2 heures suivant l'ajout des nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5.....	203
Figure 36 :	Activité enzymatique de la DPP-IV dans les cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 traitées avec les NCT siARN-DPP4/chitosane.	208
Figure 37 :	Niveau de viabilité et quantification relative du niveau d'expression d'ARNm du gène de la DPP-IV qRT-PCR dans les cellules HepG2 traitées avec les NCT siARN-DPP4/chitosane.....	210

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Exemples documentés des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique : avantages et inconvénients associés à leur utilisation.....	30
Tableau II :	Valeurs des concentrations de glucose, de GLP-1 et d'insuline chez l'humain et le rat diabétique (ZDF).....	55
Tableau III :	Chitosanes utilisés pour le projet.....	74
Tableau IV :	Valeurs de la taille et du potentiel zêta des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane.....	150
Tableau V :	Valeurs de la taille et du potentiel zêta des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane.....	193

LISTES DES ABRÉVIATIONS

a.a	:	Acide aminé
A	:	Base déoxyadénine
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
a.n	:	Acide nucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
α	:	Alpha
β	:	Bêta
μg	:	Microgramme
μl	:	Microlitre
BSA	:	Albumine sérique bovine
CPA	:	Cellule présentatrice d'antigène
CTL	:	Lymphocytes T-cytotoxiques
DO	:	Densité optique
E. Coli	:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	:	Acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA	:	« Enzyme linked immunosorbent assay »
G	:	Base déoxyguanine
GLP-1	:	Glucagon like peptide 1
GLP-2	:	Glucagon like peptide 2
g	:	Gramme
IgG	:	Immunoglobuline Gamma
kb	:	Kilobase
kDa	:	Kilodalton
kg	:	Kilogramme
M	:	Molaire
mg	:	Milligramme

miARN :	Micro ARN
ml :	Millilitre
mM :	Millimolaire
nm :	Nanomètre
NCT :	Nanocomplexes thérapeutiques
ODN :	Oligodésoxyribonucléotide
Pb :	Paire de base
PBS :	Solution saline phosphatée
PCR :	Réaction en chaîne de polymérisation
p/v :	Poids par volume
rpm :	Rotation par minute
siARN :	ARN interférents
qRT-PCR :	Réaction en chaîne de polymérisation en temps réel
T :	Base désoxythymidine
TAE :	Tris acétate EDTA
TE :	Tris-HCL EDTA
µm :	Micromètre
UV :	Ultraviolet
V :	Volt
v/v :	Volume par volume
×g :	Force gravitationnelle

INTRODUCTION

Le diabète est une maladie chronique incurable causée par une carence en insuline (Ahren *et al.* 2002) ou un défaut d'utilisation de l'insuline entraînant un excès de sucre dans le sang. L'hyperglycémie provoquée par un taux de glucose élevé entraîne des complications telles que la néphropathie, la rétinopathie, la neuropathie, l'infarctus, l'hypertension et l'artériosclérose (Lin *et al.* 2009). Selon l'Association diabète Québec, près de 500 000 personnes sont atteintes du diabète au Québec. Ce nombre important de diabétiques entraîne un fardeau économique énorme, soit 2 milliards de dollars par année en coût aux soins de santé au Québec, en plus d'avoir un impact socio-économique très important. Selon diabète Québec, la majorité des diabétiques (90%) sont atteints du diabète non insulino-dépendant appelé aussi diabète de type 2. Le diabète de type 2 se caractérise par une production insuffisante d'insuline et/ou une incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline produite par le pancréas. D'après les prévisions de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre d'adultes affectés par le diabète de type 2 entre 1995 et 2025 dans les pays en développement augmentera de 170 % passant ainsi de 84 à 228 millions de personnes. Au niveau mondial, on prévoit une hausse de 122 %, du nombre de personnes atteintes passant de 135 à 300 millions. Cette augmentation mondiale est due à l'accroissement et au vieillissement de la population, ainsi qu'à des facteurs étroitement associés à l'urbanisation et à l'industrialisation, telle qu'un mode de vie sédentaire, un régime alimentaire trop riche et l'obésité.

Il existe plusieurs approches de traitement pour le diabète de type 2 et dans tous les cas le but à atteindre est un meilleur contrôle de la glycémie afin de réduire la mortalité, les symptômes et les complications liés au diabète. Il est, d'abord, possible d'obtenir un meilleur contrôle de la glycémie simplement par une meilleure hygiène de vie. Grâce à une alimentation équilibrée et l'activité physique, il est possible de réduire le poids corporel souvent associé avec le diabète de type 2. La perte de poids étant souvent passagère les effets bénéfiques de l'adaptation des habitudes de vie sur le contrôle de la glycémie ne sont généralement pas durables (souvent moins d'un an). Pour cette raison les médicaments antidiabétiques, permettant la régularisation du taux de glucose dans le

sang, peuvent être prescrits seuls, associés entre eux ou combinés avec l'insuline pour traiter les patients atteints du diabète de type 2. Il existe plusieurs classes de médicaments antidiabétiques disponibles, parmi lesquelles les biguanides, les sulfamides hypoglycémiantes, les glinides et les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, les analogues du GLP-1, les gliptines, et l'insuline (Philippe 2009). L'autocontrôle glycémique par le patient devient nécessaire particulièrement lors de l'utilisation des médicaments susceptibles de causer l'hypoglycémie (sulfonylurée, glinides, insuline). Chacun des traitements antidiabétiques comporte des inconvénients tels que des troubles gastro-intestinaux, la prise de poids, la rétention hydro-sodée, le risque d'insuffisance cardiaque et de fracture, l'effet de courte durée et les coûts élevés. Ainsi, de nouveaux médicaments, nouvelle génération, doivent être développés pour traiter et améliorer la santé des gens atteints du diabète de type 2, tout en évitant les inconvénients associés à l'intervention.

Le GLP-1, une hormone incrétine normalement produite par l'organisme suite à l'ingestion de nourriture (McIntyre *et al.* 1965; Creutzfeldt & Ebert 1985), a plusieurs effets bénéfiques qui permettent un meilleur contrôle du taux de glucose. Le GLP-1 est, entre autres, un potentialisateur de l'effet du glucose sur la sécrétion de l'insuline (Schmidt *et al.* 1985), il augmente l'expression de l'insuline (Fehmann & Habener 1992) et inhibe l'induction de l'apoptose des cellules β (Liu *et al.* 2004; Bregenholt *et al.* 2005). Il a été démontré que la sécrétion du GLP-1 est diminuée chez les patients atteints du diabète de type 2 (Toft-Nielson *et al.* 1996; Vilsboll *et al.* 2001).

La thérapie génique est devenue une avenue intéressante pour traiter des maladies métaboliques telles que le diabète. La thérapie génique est une stratégie qui consiste à introduire un gène codant pour un composé thérapeutique dans des cellules ciblées. Le principe de la thérapie génique repose donc sur la transfection cellulaire. Les virus sont des vecteurs efficaces pour la livraison de l'ADN, cependant leur utilisation *in vivo* comporte des risques. À l'heure actuelle, l'utilisation de virus comme système de livraison des gènes chez l'homme est déconseillée, en raison des pathologies importantes qu'il peut causer chez le patient (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2008). En effet, la possibilité de recombinaisons endogènes, la possibilité d'effet oncogénique (Daniel & Smith 2008)

et la possibilité de réactions immunologiques (Hartman *et al.* 2008) sont des risques associés aux virus utilisés comme vecteurs et qui peuvent causer de sérieuses complications chez le patient. Ainsi, il est primordial de trouver une alternative qui permettrait une livraison efficace des gènes sans causer d'effet toxique. Le chitosane est un polymère qui comporte plusieurs avantages qui favorisent son utilisation comme système de livraison. Le chitosane est biocompatible et biodégradable, ce qui lui confère une faible cytotoxicité. Pour livrer les gènes, le chitosane est complexé avec des plasmides d'ADN de façon à former des nanocomplexes (complexe pADN/chitosane). La formation de ces nanocomplexes est rapide, simple et peu coûteuse. De plus, le chitosane protège l'ADN plasmidique contre les nucléases et le condense pour faciliter son trajet dans les milieux extracellulaires. Par contre, le désavantage de l'utilisation des chitosanes par rapport aux vecteurs viraux réside dans la faible efficacité de transfection des cellules humaines. La recherche sur les différents types de chitosanes est toujours en cours afin de déterminer les formulations qui permettent une bonne condensation de l'ADN, ainsi qu'une faible cytotoxicité tout en offrant une bonne efficacité de transfection. Ainsi, le développement d'un système de livraison sécuritaire qui transporte des gènes codants pour une protéine telle que le GLP-1 ou qui livre des siARN impliqués dans l'inhibition des gènes associés au diabète comme le DPP-IV (enzyme qui dégrade le GLP-1) (Mentlein *et al.* 1993), est primordiale afin de normaliser le taux de glucose chez les personnes atteintes de diabète de type 2.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

L'utilisation du GLP-1 natif ou son analogue, chez des modèles animaux, permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose (Arulmozhi & Portha 2006; Ding *et al.* 2006). De plus, il a été démontré que l'administration de GLP-1 par voie sous-cutané, à des patients diabétiques, améliore la sensibilité à l'insuline et la fonction des cellules bêta pancréatiques (Zander *et al.* 2002). Toutefois la courte demi-vie du GLP-1 due à dégradation rapide par l'enzyme DPP-IV, nécessite des injections continues de GLP-1 bioactif. Des recherches ont démontré que la thérapie génique est une avenue intéressante pour fournir un apport continu de GLP-1 et ainsi maintenir une glycémie normalisée chez le modèle animal (Oh *et al.* 2003; Choi *et al.* 2005; Lee *et al.* 2007; Lee *et al.* 2008). Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle une thérapie génique non virale à base de chitosane peut permettre la livraison sécuritaire du gène GLP-1 (forme native et/ou variante), son expression continue et ainsi la normalisation du taux de glucose chez un modèle animal du diabète de type 2. De plus et toujours selon notre hypothèse principale, le chitosane peut également servir de système de livraison pour des siARN pour le contrôle de l'expression génique du DPP-IV responsable de la dégradation du GLP-1.

L'ensemble des travaux déjà réalisés sur les biens faits de la molécule GLP-1 dans le traitement du diabète de type 2 et sur le potentiel du chitosane comme système de livraison de l'ADN était à l'origine de notre projet de recherche dont le but consistait à mettre au point de nouveaux nanocomplexes thérapeutiques pADN/chitosane (NCT) permettant la synthèse continue et contrôlée du GLP-1 sous sa forme active et la mise au point de nanocomplexes thérapeutiques siARN/chitosane permettant le silençage du gène codant pour l'enzyme DPP-IV responsable de l'inactivation du GLP-1.

Objectifs de la recherche :

Pour atteindre notre but, nous nous sommes fixé les objectifs suivants :

- 1) Déterminer l'efficacité de transfection et la cytotoxicité des différentes formulations de chitosane soit les [92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 (DD-Mn-N:P)] utilisées comme système de livraison de l'ADN pour l'expression de

gènes recombinants dans différentes lignées cellulaires (HepG2, Caco-2 et HT-29).

- 2) Construire les vecteurs d'expressions eucaryotique recombinant pVax-GLP-1 exprimant la forme active du GLP-1 soit le GLP-1 (7-37), ou exprimant les formes variantes du GLP-1 (7-37) soit le [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et le [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)] (NCT).
- 3) Établir et caractériser les nanocomplexes thérapeutiques GLP-1/chitosane (NCT).
- 4) Analyser l'internalisation et le déplacement des nanocomplexes (pVax-GLP-1/chitosane) *in vitro* et évaluer le niveau d'expression du GLP-1 et ses formes variantes *in vitro*.
- 5) Analyser l'expression du peptide GLP-1 (7-37) *in vivo*, suite à des injections intramusculaires ou sous-cutanées des NCT aux rats diabétiques ZDF (modèle animal).
- 6) Déterminer le pouvoir thérapeutique des NCT (pVax-GLP-1/chitosane) *in vivo* chez les rats diabétiques ZDF en évaluant :
 - a. la synthèse du peptide GLP-1 recombinant fonctionnel par des tests de tolérance au glucose.
 - b. la stimulation de la sécrétion d'insuline chez les ZDF traités
 - c. les réponses immunitaires suscitées par l'administration des NCT pVax-GLP-1/chitosane.
 - d. la cinétique de biodégradation des NCT pVax-GLP-1/chitosane.
- 7) Établir et caractériser des ODN mimants la forme des siARN dirigés contre l'ARNm de l'enzyme DPP-IV.

- 8) Analyser l'internalisation et le déplacement des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane et la libération des ODN *in vitro*.
- 9) Déterminer, *in vitro*, la capacité des NCT siARN-DPP4/chitosane d'inhiber l'expression du gène DPP-IV en quantifiant :
 - a. L'activité de la DPP-IV dans les cellules traitées avec les NCT siARN-DPP4/chitosane par des tests enzymatiques.
 - b. L'ARNm de la DPP-IV dans les cellules traitées avec les NCT siARN-DPP4/chitosane par des techniques de qRT-PCR.

La réalisation de ces objectifs est fondamentale et d'une importance primordiale pour l'évaluation du potentiel thérapeutique des NCT pVax-GLP-1/chitosane et des NCT siARN-DPP4/chitosane dans le traitement des symptômes associés au diabète de type 2. Si ces NCT s'avèrent efficaces, nous assisterons à la naissance d'une thérapie, basée sur le génie génétique, qui permettra la production continue et contrôlée du GLP-1 à l'intérieur même de l'organisme, et constituera par le fait même une avenue novatrice pour le contrôle du taux de glucose chez les individus atteints du diabète.

REVUE DE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Thérapie génique

La thérapie génique est une approche fondée sur la possibilité de transférer et de faire exprimer des séquences codantes d'ADN au sein du noyau cellulaire à des fins préventives ou curatives. Les objectifs initiaux de la thérapie génique ont évolué. Le concept initial qui consistait à remplacer un gène défectueux et de corriger des maladies héréditaires monogéniques grâce à un transfert durable de gènes, s'est très rapidement étendu à des maladies acquises beaucoup plus fréquentes, à savoir les maladies infectieuses, dégénératives, métaboliques et les cancers. En effet, la thérapie génique vise présentement à remplacer ou compléter un allèle mutant défectif par un allèle fonctionnel ou à surexprimer une protéine recombinante dont l'activité a un impact thérapeutique ou vaccinal prophylactique (immunisation génétique). Récemment, le concept de la thérapie génique s'est élargi davantage afin d'inclure le phénomène des ARN interférents (siARN) ou du silençage. En effet, les siARN ont été rapidement reconnus comme étant un outil puissant dans le domaine thérapeutique grâce à leur capacité de cibler et d'inhiber l'expression de certains gènes ayant un rôle direct dans des maladies incurables comme le cancer, le diabète et certaines maladies virales et dégénératives (Burkhardt *et al.* 2006; Cejka *et al.* 2006; Devi 2006). Cependant, il faut noter que la traduction de la thérapie génique en une réalité clinique courante ne sera possible que par le développement de système de livraison efficace et sécuritaire des siARN thérapeutiques (Ichim *et al.* 2004; Takeshita & Ochiya 2006; Vorhies & Nemunaitis 2007b).

1.1. Historique

Le concept de la thérapie génique était évoqué par la communauté scientifique à la fin des années 1960, suite aux travaux, récompensés d'un prix Nobel, de George Wells Beadle, Edward Lawrie Tatum et Joshua Lederberg George qui ont démontré que les gènes agissent en régulant des événements chimiques définis. À cette époque, il s'agissait d'une idée strictement théorique. Ce n'est qu'à partir des années 1980, grâce au développement du génie génétique, qu'on assiste à une véritable révolution médicale qui

propulse la thérapie génique à l'avant-scène. Soulignons entre autres les travaux de Richard Mulligan et son équipe à Boston qui ont mis au point des vecteurs à base de rétrovirus recombinants (Stuhlmann *et al.* 1989b; Stuhlmann *et al.* 1989a). À l'aide de ce vecteur, ils transférèrent le gène muté de la réductase dihydrofolate dans des embryons de souris. Le premier essai clinique, dans le domaine de la thérapie génique, est initié par Rosenberg aux États-Unis à la fin des années 1980. Son essai clinique consistait à transférer un gène bactérien, inséré dans un rétrovirus, pour marquer et suivre le devenir des lymphocytes dans un protocole d'immunothérapie pour traiter le cancer (Rosenberg *et al.* 1990). Dans les années 1990, le séquençage du génome humain a accéléré de façon remarquable l'identification de gènes responsables de plusieurs maladies. Le séquençage complet du génome humain a permis l'identification et la caractérisation de 50 000 à 100 000 gènes humains (Marshall 2000) et a résulté en une meilleure compréhension des gènes normaux ou aberrants qui peuvent jouer des rôles importants dans certaines maladies. Ce développement a ouvert de vastes possibilités dans le domaine du traitement de maladie, via la livraison de matériel génétique sain aux cellules cibles affectées par la maladie. En 1999, des premiers essais cliniques sont réalisés par l'équipe du professeur Alain Fischer, à l'hôpital Necker-Enfants maladies, à Paris, sur de jeunes patients dits « enfants bulles » atteints de déficience immunitaire sévère. La thérapie génique consistait à ajouter aux cellules de la moelle osseuse une copie normale d'un gène, le « gamma-c », défectueux chez ces enfants (Cavazzana-Calvo *et al.* 2000). Son équipe obtient les premiers succès cliniques au monde de thérapie génique pour une dizaine d'enfants-bulles. Malheureusement, deux patients développeront après quelques mois des leucémies, l'un étant décédé, l'essai est interrompu précipitamment en 2002. Des recherches montreront que ces leucémies sont dues à l'insertion aléatoire du gène thérapeutique dans un proto-oncogène (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2003). L'essai est redémarré en 2004, selon un protocole modifié utilisant de nouveaux vecteurs rétroviraux, puis sera à nouveau interrompu en 2005 suite à de nouvelles complications. Cependant, sur les 16 enfants traités à ce jour, 15 sont guéris de façon satisfaisante de leur déficit aigu.

Actuellement, au-delà de 400 essais cliniques en thérapie génique ont été réalisés sur plus de 4000 patients. Ces essais cliniques utilisent des molécules d'ADN soit pour la

production de protéines recombinantes, soit pour l'immunisation génétique. Ils concernent le cancer à 64 %, les maladies infectieuses à 8 %, les maladies héréditaires monogéniques à 15 %, le marquage cellulaire à 10 % et autres à 3 %.

1.2. Critère de la thérapie génique

La mise en œuvre d'un protocole de thérapie génique nécessite la prise en compte d'un certain nombre de critères : 1) déterminer le gène que l'on veut transférer, 2) choisir les cellules cibles, 3) choisir un vecteur de transfert de gène adapté et 4) déterminer une stratégie de transfert de gène.

1.2.1. Choix du gène thérapeutique et des cellules ciblées

Dans le cas des maladies génétiques, la thérapie génique vise à apporter aux cellules une copie fonctionnelle du gène dont la déficience est à l'origine de la maladie. Il faut donc cibler les cellules qui produisent normalement la protéine exprimée par le gène d'intérêt. Dans le cas des maladies acquises, le choix du gène est plus large et n'est plus dicté par la génétique. Par exemple dans une maladie métabolique comme le diabète de type 2, tous les gènes dont l'expression permet la régulation du taux de glucose peuvent être ciblés par la thérapie génique. Le choix des cellules cibles peut varier selon la nature et la fonction de la protéine recombinante à exprimer.

1.2.2. Vecteur de transfert de gène

Les vecteurs de transfert de gène sont utilisés afin de livrer un gène aux cellules cibles de l'organisme. Un vecteur de transfert de gène doit répondre à une multitude de critères. Le vecteur de transfert doit protéger les molécules d'ADN ou d'ARN contre les nucléases et les condenser pour assurer leur trajet dans les milieux extracellulaires pour faciliter la transfection des cellules cibles et enfin, permettre le transport du gène à travers le cytoplasme et jusqu'au noyau de la cellule. La thérapie génique, dans le modèle animal, utilisant l'ADN nu ou l'ARNi nu, s'est avérée peu efficace en raison de leur élimination rapide (Takakura *et al.* 2001). En effet, les nucléases réduisent la durée de vie des siARN à 6 minutes (Soutschek *et al.* 2004), et celle des ADN à 10 minutes (Kawabata *et al.*

1995). En plus, l'ADN ne n'a pas une biodistribution spécifique et dispose d'un faible rendement d'internalisation suite à une livraison systémique. La livraison de gène recombinant dans le modèle animal en absence de système de livraison est une approche qui nécessite l'injection rapide de grands volumes (deux fois la masse sanguine en 2 minutes chez la souris), ou l'utilisation de pressions hydrostatiques très fortes (Herweijer & Wolff 2007). Cette méthode nommée hydrodynamique est donc difficilement applicable en clinique. L'utilisation de vecteur de transfert de gène est donc préférable afin d'augmenter l'efficacité de la livraison des gènes aux cellules cibles tout en assurant une protection contre une reconnaissance par le système immunitaire. De nombreuses méthodes permettent de transférer l'ADN dans les cellules. Les plus connues en essai clinique sont les méthodes dites virales et les méthodes non-virales.

1.2.2.1. Méthodes virales

La majorité des essais cliniques ont été réalisés avec des vecteurs de transfert de gènes d'origine virale. Les virus, grâce à leur structure et leur mécanisme d'action, sont utilisés pour véhiculer des gènes thérapeutiques. Naturellement, les virus agissent en libérant leurs génomes à l'intérieur des cellules qu'ils infectent. L'insertion des gènes viraux dans la cellule cible permet la synthèse de nouvelles particules virales. Par des techniques de biologie moléculaire, la substitution des gènes de la réplication du virus ou de sa virulence par un ou plusieurs gènes à potentialités thérapeutiques assure l'incapacité du virus à se répliquer seul. Le virus ainsi modifié permet le transfert des gènes bénéfiques dans les cellules cibles infectées, tout en évitant la production de nouvelles particules virales et sans provoquer de maladie.

Des virus appartenant à diverses familles virales ont été modifiés afin de générer des vecteurs viraux pour la livraison de gène. Ces virus comprennent les rétrovirus, les adénovirus, les adénoassociés virus, les virus herpès simplex, les picornavirus et les alphavirus (Ali *et al.* 1994; Flotte & Carter 1995; Glorioso *et al.* 1995; Smith 1995; Prince 1998; Robbins & Ghivizzani 1998). Le rétrovirus, tel que mentionné précédemment, était le premier virus modifié pour être utilisé à la place des gènes rétroviraux gag, pol, env. Le gène recombinant est ainsi encadré par deux LTR (longues

séquences terminales répétitives) qui servent de promoteur du virus et la séquence Psi du virus est conservée pour permettre l'encapsulation de L'ARN génomique du virus. Grâce à la transcriptase inverse et à l'intégrase, le gène d'intérêt s'intègre dans le génome de la cellule cible et demeure fonctionnel durant toute la durée de vie de la cellule.

Bien que les méthodes virales soient connues pour leur efficacité dans la livraison des gènes, elles présentent cependant certains risques ce qui limite leur utilisation en thérapie génique. En effet, l'utilisation des rétrovirus comme vecteur de transfert peut induire ou résulter dans l'intégration au hasard du génome viral dans l'ADN cellulaire (Daniel & Smith 2008) et entraînent fréquemment une stimulation du système immunitaire (Lowenstein *et al.* 2007; Alexander *et al.* 2008; Hasbrouck & High 2008) (tableau I). En effet, l'intégration de l'ADNc du rétrovirus dans le génome cellulaire peut être responsable de mutation insertionnelle ou bien de l'activation de l'expression des gènes cellulaires sous l'influence des LTR, ce qui constitue un risque d'évolution cancéreuse.

Lors des essais cliniques dirigés par Fisher en 1999, une mutation insertionnelle se serait produite chez un enfant souffrant d'immunodéficience sévère combinée (SCID) et traité par thérapie génique en utilisant les rétrovirus comme vecteur de transfert (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2003). L'enfant a développé une forme de leucémie qui serait causée par le traitement de la maladie SCID (Check 2002). Suite à ce cas, les essais cliniques, utilisant les rétrovirus en thérapie génique, en France et aux États-Unis ont été suspendus et les essais prévus au Japon ont été reportés. Pendant ce temps, l'Allemagne suspendait une panoplie d'essais cliniques impliquant les rétrovirus lorsque les travaux de Li *et al.* ont démontré que l'utilisation de vecteur rétrovirus en thérapie génique causait la leucémie chez les souris (Li *et al.* 2002).

Tableau I : Exemples documentés des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique : avantages et inconvénients associés à leur utilisation.

Type de vecteur	Avantages	Inconvénients
Rétrovirus	Transduction stable (intégration) (Moore <i>et al.</i>)	N'infecte que des cellules en division. Intégration au hasard dans l'ADN chromosomique Insertion mutagenèse (Daniel & Smith 2008; Hacein-Bey-Abina <i>et al.</i> 2008)
Adénovirus	Infecte les cellules quiescentes (Lai <i>et al.</i> 2002; Palmer & Ng 2008)	Peu ou pas d'intégration Forte stimulation du système immunitaire (Hartman <i>et al.</i> 2008) Induit une réponse immunitaire innée et la maturation des CD; induit une réponse des cellules T et B à l'antigène de l'adénovirus et du transgène (Yang <i>et al.</i> 1996; Jooss & Chirmule 2003; Hensley <i>et al.</i> 2005)
Adénoassocié virus	Infecte les cellules quiescentes Transduction stable (Lai <i>et al.</i> 2002) Expression à long terme dans plusieurs tissus (Lai <i>et al.</i> 2002) Ce vecteur est faiblement immunogène la réponse à l'antigène de la capsid peut être contournée par immunosuppression (Mingozzi <i>et al.</i> 2007).	Faible capacité de transport (4,5 kb) certains types cellulaires difficiles à infecter Faible probabilité d'intégration Efficacité réduite avec des administrations répétées (Riviere <i>et al.</i> 2006). Capsid induit les cellules T et la production d'anticorps (Mingozzi <i>et al.</i> 2007) Transgène peut induire une réponse cellulaire B et T (Lin <i>et al.</i> 2007).
Lentivirus	Infecte les cellules en G1 transduction stable (intégration) (Pfeifer & Hofmann 2009)	Intégration au hasard dans l'ADN chromosomique Difficulté de production Induit une réponse immunitaire acquise et innée (Follenzi <i>et al.</i> 2007).

Lors d'un essai en thérapie génique, l'utilisation de l'adénovirus pour livrer le gène ornithine carbamyl transférase afin de traiter un trouble métabolique lié au cycle de l'urée, a provoqué une forme rare de désordre inflammatoire au foie puis la mort du patient traité (Marshall 1999). Il a été mentionné par Marshall que l'adénovirus n'a pas atteint seulement les cellules cibles du foie, mais aussi d'autres organes, ce qui a déclenché une activation du système immunitaire inné. Ces types de complications auraient mené à une détresse du système respiratoire et à une défaillance multiple et fatale des organes.

L'utilisation des vecteurs viraux a suscité l'inquiétude quant à l'incidence à long terme du gène recombinant intégré et de la présence du virus chez les patients. En effet, des chercheurs ont démontré la présence du virus utilisé comme vecteur dans le sperme d'un patient traité avec l'adénovirus (Boyce 2001). Cette observation soulève des questions sur l'effet de l'utilisation des vecteurs viraux en thérapie génique sur la génétique de la progéniture des patients traités, rendant ainsi cette méthode virale-non sécuritaire.

À l'heure actuelle, l'utilisation de virus comme système de livraison des gènes chez l'homme est déconseillée, car il peut causer des pathologies importantes chez le patient (Hacein-Bey-Abina *et al.* 2008). Ainsi, il est primordial de trouver une alternative qui permettrait une livraison efficace des gènes sans causer des effets néfastes ou dangereux pour le patient.

1.2.2.2. Méthode non-virale

Pour surmonter les inconvénients des méthodes virales, les systèmes de livraison non-viraux ont été établis pour le traitement de maladies par la thérapie génique. L'utilisation des systèmes de livraison non viraux a pour avantage d'éviter les problèmes associés à l'intégration mutagéniques ou aux effets de la présence à long terme du vecteur et/ou du gène recombinant. Contrairement aux vecteurs viraux, les vecteurs non-viraux sont sécuritaires et peuvent être produits à grande échelle. Les premiers systèmes de livraison

non-viraux furent le diéthyleaminoéthyle (DEAE) dextrane (Lopata *et al.* 1984) et le phosphate de calcium (Chen & Okayama 1987). Par la suite les recherches ont mené à l'élaboration d'une variété de formulations pouvant être utilisées comme système de livraison (Felgner & Ringold 1989; Gao & Huang 1991; Bennett *et al.* 1997; Pitard *et al.* 1997; Sternberg *et al.* 1998; Godbey *et al.* 1999; Dai *et al.* 2005). Ces formulations peuvent être classées en deux grandes catégories : les lipoplexes et les polyplexes. Les lipoplexes sont des vecteurs à base de lipide généralement cationique. Les polyplexes sont des vecteurs composés de différentes formulations possibles de polymères.

1.2.2.2.1. Lipoplexes

Les liposomes cationiques sont les vecteurs non-viraux les plus utilisés en thérapie génique. L'équipe de Felgner fut la première à utiliser un lipide cationique synthétique pour former des complexes avec l'ADN (lipoplexe) et transférer des cellules (Felgner *et al.* 1987). Depuis, les formulations à base de lipides cationiques n'ont cessé de se multiplier. Les liposomes cationiques sont des molécules amphiphiles comportant une chaîne hydrophobe, composée essentiellement d'acides gras, attachée par un « espaceur » à une tête polaire hydrophile chargée positivement (mono ou multicationique) qui leur permet d'interagir avec les molécules d'ADN chargées négativement (Pedroso de Lima *et al.* 2003). La caractéristique majeure du liposome est sa capacité de traverser les membranes des cellules et de fusionner avec celles-ci. Le liposome, souvent sphérique, peut également se déformer, s'aplatir et de ce fait passer à travers les espaces situés entre les cellules. Étant donné la composition de sa paroi, très proche de celle des membranes cellulaires, le liposome est capable de fusionner avec celles-ci libérant ainsi le produit qu'il contient à l'intérieur de la cellule. Suite à la formation de complexes liposome/ADN, trois types de structure de lipoplexes peuvent être obtenus : des micelles renfermant l'ADN, des couches superposées de lipides et d'ADN et des structures mixtes circulaires et longitudinales (Sternberg *et al.* 1994; Koltover *et al.* 1998). Le segment hydrophobe du lipide est un élément clé dans la détermination des caractéristiques macroscopiques des liposomes telles que la grandeur, la forme et la stabilité. Ce segment contrôle aussi l'interaction avec les autres lipides et avec l'ADN. Toutes ces

caractéristiques peuvent affecter l'efficacité de transfection des lipoplexes (Smisterova *et al.* 2001; Matulis *et al.* 2002; Zuhorn *et al.* 2002) . Cependant, le contrôle de ces paramètres est limité étant donné que les liposomes sont instables dans le temps et par conséquent leur potentiel pharmaceutique reste limité (Simberg *et al.* 2001).

1.2.2.2.2. Polyplexes

Les polyplexes sont des vecteurs composés de différentes formulations possibles de polymères. Les polycations et les polypeptides sont des exemples de polyplexes couramment utilisés comme système de livraison de l'ADN. L'assemblage des polyplexes contrairement aux lipoplexes, ne nécessite pas d'interaction entre les molécules polycationiques, ce qui permet d'améliorer le contrôle des propriétés macroscopiques des nanoparticules (Thomas & Klibanov 2003)

Plusieurs types de polycations synthétiques et naturels ont été étudiés pour leur potentiel comme système de livraison de l'ADN. Les polycations ont été utilisés pour la première fois avant même les formulations de liposomes pour insérer de l'ADN étranger dans les cellules (Henner *et al.* 1973; Ehrlich *et al.* 1976; Fraley *et al.* 1980). Les polyplexes ont pris de l'importance suite à l'introduction de polyéthylènimines (PEI) (Bousiff, 1995). Les polyéthylènimines sont des polymères ramifiés ou linéaires. Ils ont une haute densité de charges cationiques et possède une fonction amine à tous les trois regroupements. Il a été démontré que le poids moléculaire de ces polymères peut influencer l'efficacité de transfection (Demeneix *et al.* 1998).

Le chitosane est un polymère cationique extrait de la carapace des crustacés qui est considéré comme un système de livraison non toxique pour les transfusions *in vitro* (MacLaughlin *et al.* 1998; Mao *et al.* 2001). Le chitosane partiellement désacétylé possède plusieurs avantages : il peut former des complexes polyélectrolytes pour la livraison de l'ADN de façon sécuritaire, sa synthèse est simple, son coût est réduit, la taille de l'ADN n'est pas limitée lors de la formation des polyplexes, de plus sa structure et sa chimie sont ajustables (poids moléculaire et degré de désacétylation) ce qui lui

confère des propriétés physico-chimiques particulières (Ishii *et al.* 2001; Lavertu *et al.* 2006b). Des études ont démontré dernièrement qu'en contrôlant et en choisissant le poids moléculaire et le degré de désacétylation (DD) du chitosane, il est possible d'obtenir des niveaux de transfection *in vitro* similaires à ceux obtenus avec un système phospholipiques commercialisé (Lavertu *et al.* 2006b). En raison de ses nombreuses qualités, le chitosane a été choisi dans ce projet comme système de livraison des gènes thérapeutiques. La section 2 de ce chapitre décrit en détail l'origine, les caractéristiques et les applications du chitosane.

Les polypeptides sont des molécules formant une chaîne de plus de 50 acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Les polymères de lysine (PLL) ont été largement étudiés. Il a été démontré que la poly lysine (90-400 résidus) mélangée à l'ADN dans du NaCl (150 mM) mène à la formation de complexes ayant des structures toroïdales de 50-150 nm (Wagner *et al.* 1991). Par la suite, de nombreuses structures peptidiques plus efficaces pour la transfection des cellules ont été synthétisées telles que les dérivés YKAKnWK (Duguid *et al.* 1998) et les alkyles de CWKn (Wadhwa *et al.* 1997).

Des polyplexes peuvent aussi être formés à partir de la protamine. Les protamines sont des petites protéines nucléaires riches en arginine, elles jouent un rôle dans la condensation de l'ADN contenu dans les spermatozoïdes. Elles sont donc responsables de l'organisation de la chromatine spermatique sous une forme très condensée ce qui permet de délivrer l'ADN dans le noyau après fertilisation de l'œuf. Des complexes polyioniques préparés via des attractions électrostatiques entre le sulfate de protamine (PS) et le polymère (L-acide aspartique) ont montré leur potentiel à être utilisé comme système de livraison de l'ADN (Cheng *et al.* 2009). Il a aussi été démontré que l'utilisation de protamine de faible poids moléculaire comme vecteur pouvait prolonger l'expression d'un gène recombinant jusqu'à 12 jours après la transfection (Kharidia *et al.* 2008).

1.2.3. Stratégie de transfert

Il existe deux grandes stratégies de transfert de gène : l'*ex vivo* et l'*in vivo*. La stratégie *ex vivo* nécessite de prélever les cellules, de les maintenir en culture pour les transfecter, puis de les réimplanter dans l'organisme (Van Tendeloo *et al.* 2001; Paul *et al.* 2002). La stratégie *in vivo* consiste à injecter directement les vecteurs de transfert de gène, par voie parentérale ou chirurgicale.

La stratégie de transfert de gène doit être déterminée en fonction des tissus ciblés. La thérapie *ex vivo* est avantageuse dans le cas de tissus cultivables, car elle permet de contrôler le transfert d'un gène à un type de cellules cibles et évite la dissémination des gènes et des vecteurs dans le reste de l'organisme (Suhonen *et al.* 2006; Hoffman & Li 2008; Ritter *et al.* 2009). Pour les stratégies *in vivo*, il est plus difficile de contrôler le type de cellules transfectées et l'efficacité de transfection. Par contre, l'étape de mise en culture étant éliminée, l'administration des gènes et de leurs vecteurs est simplifiée (Suhonen *et al.* 2006).

2. Chitosane

2.1. Historique

Au cours des 30 dernières années, l'effort de recherche consacré à la chitine et au chitosane extrait de la chitine s'est accru de manière exponentielle. Le chitosane est un polymère naturel biodégradable ayant de nombreuses applications dans divers domaines telles que l'alimentation, le traitement des eaux usées, le cosmétique, les emballages, les produits nutraceutiques, les substances hypocholestérolémiantes et les biomédicales.

La chitine a d'abord été découverte en 1811 par Henri Braconnot, directeur du Jardin botanique à Nice en France (Braconnot 1811). Braconnot avait observé qu'une substance retrouvée dans les champignons était insoluble dans l'acide sulfurique. C'est en 1859 que Rouget avait remarqué que la chitine traitée par de la potasse à chaud donnait un composé

soluble dans des solutions aqueuses acides. C'est ainsi qu'il découvre le chitosane, un dérivé de la chitine.

2.2. Source de chitine

Présente dans de nombreux organismes vivants, la chitine est le polysaccharide le plus abondant après la cellulose. La chitine est produite par les insectes, les arachnides, les animaux marins, les champignons, les algues chlorophycées, certaines levures et bactéries (Crini *et al.* 2009). La chitine chez les animaux invertébrés a une fonction de soutien des téguments et elle est surtout retrouvée au niveau de la cuticule. Actuellement, les crustacés constituent la source première de la chitine pour les industries, car c'est à partir des crustacés qu'on obtient le meilleur rendement d'extraction de chitine. La proportion de chitine dans les déchets de crustacés varie d'une espèce à l'autre. On trouve de 15 à 30 % en masse sèche dans les carcasses de crabes et de 30 à 40 % dans les crevettes grises (Kurita 2006). Une fois décalcifiées, les cuticules sont formées de 55 à 85 % de chitine (Crini *et al.* 2009). La quantité importante de chitine retrouvée dans les déchets de crustacés justifie grandement son utilisation comme matière première. L'accessibilité de ces ressources naturelles et l'importante quantité de déchets de crustacés produite par l'industrie de la pêche augmentent grandement l'intérêt de la production industrielle du chitosane.

2.3. Structure chimique de la chitine et du chitosane

La chitine est un polymère linéaire constitué d'un enchaînement d'unités monomères N-acétyl- β -D-glucosamine reliée par une liaison glycosidique (1 \rightarrow 4). Théoriquement, la chitine, le chitosane et la cellulose sont des polysaccharides dont la structure chimique diffère uniquement par les groupements en position C-2 (Crini *et al.* 2009). En position C-2, la cellulose possède un résidu hydroxyle alors que la chitine possède un résidu acétamide (poly (N-acétyl- β -D-glucosamine)) et le chitosane une amine (poly (D-glucosamine)). La chitine est caractérisée par la fraction de groupements N-acétamide résiduel appelé degré d'acétylation (DA). Le DA d'un polymère peut être déterminé par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) ou par un titrage par une base

forte. Le chitosane se caractérise par son degré de désacétylation (DD). Le DD correspond donc à la quantité relative de groupement acétylés retiré de la macromolécule de chitine lors de la préparation du chitosane. La chitine commerciale contient aussi des monomères D-glucosamine. Le nom de chitine est donc donné à tous les copolymères formés d'unités constitutives N-acétyle-D-glucosamine et D-glucosamine, dont le DA est supérieur à 50% (Crini *et al.* 2009). La désacétylation en milieu basique de la chitine permet d'obtenir le chitosane (figure 1). Le chitosane est un copolymère linéaire qui possède un arrangement aléatoire d'unités D-glucosamine et d'unités N-acétyle-D-glucosamine reliées par des liaisons β -(1→4) (figure 1).

Ainsi, le chitosane et la chitine se distinguent par la proportion relative des unités N-acétyles glucosamine et glucosamine les constituant, c'est-à-dire leur degré d'acétylation. Ce paramètre influe sur toutes leurs propriétés physico-chimiques, tel que la masse moléculaire en poids, la viscosité, la solubilité, etc. La frontière entre le chitosane et la chitine correspond à un DD de 50%. Avec un $DD > 50\%$ le composé est nommé chitosane alors qu'avec un $DD < 50\%$, il s'agit de chitine.

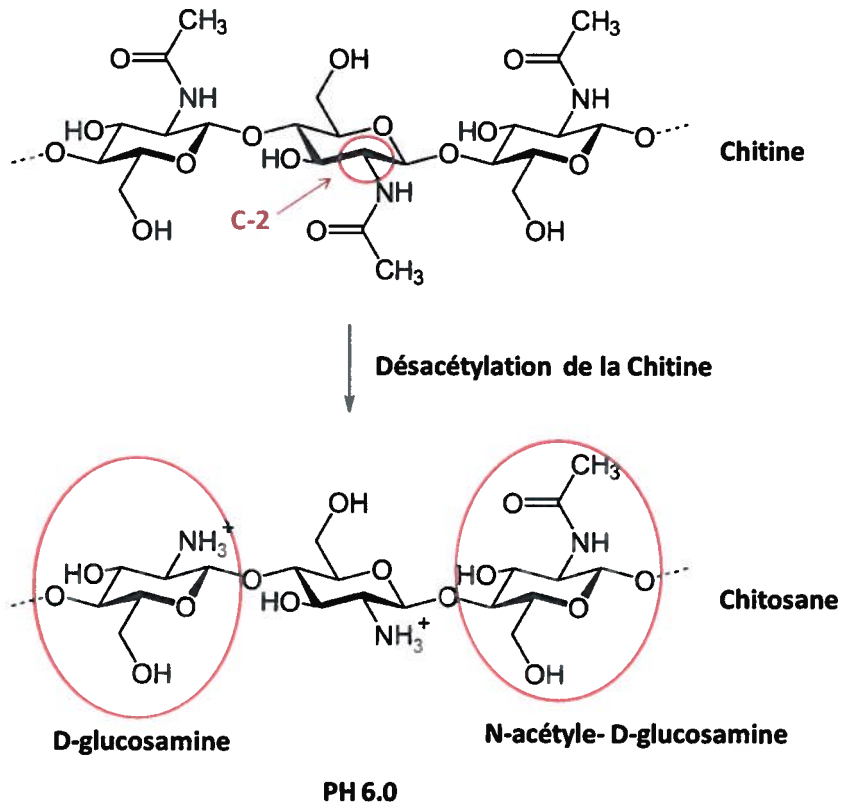


Figure améliorée (NEUROtiker 2008)

2.4. Production de la chitine et du chitosane

La production de la chitine et du chitosane se fait selon la méthode d'Onsoyen et Skaugrud (Onsoyen & Skaugrud 1990). D'abord, la carapace des crustacés est broyée, ensuite le broyat est déprotéinisé par l'utilisation d'une solution d'hydroxyde de sodium ou par un procédé enzymatique. Les carapaces sont ensuite déminéralisées et lors de cette étape, le carbonate de calcium est extrait par dissolution dans une solution d'acide chlorhydrique. La chitine brute ainsi obtenue est faiblement désacétylée (DD 20-30%). Une étape de décoloration par un agent oxydant (KMnO_4 , NaOCl ou H_2O_2) est ensuite effectuée pour éliminer complètement les pigments. Le chitosane est finalement obtenu à partir de la chitine par un procédé de désacétylation en milieu basique. Ce procédé commence d'une façon générale par une désacétylation partielle de la chitine brute dans une solution d'hydroxyde de sodium concentré, à une température de 110-115 °C, durant quelques heures dans une atmosphère inerte et en présence d'un agent réducteur (NaBH_4). Ensuite le chitosane est séché puis purifié par dissolution dans un solvant acide. La solution acidifiée est filtrée, séchée et broyée. Le chitosane obtenu possède un taux de désacétylation (DD) d'environ 70 à 80 %.

La désacétylation est une étape délicate, car des conditions expérimentales trop agressives pour la macromolécule peuvent entraîner une forte dépolymérisation. Batista et Roberts (1990) suggèrent un procédé de désacétylation de la chitine en milieu soude concentrée en présence de solvants miscibles à l'eau, tels que le 2-propanol ou l'acétone. Ces solvants réduisent la dépolymérisation du chitosane et rendent possible son utilisation industrielle.

Les propriétés biologiques du chitosane sont définies, entre autres, par son degré de désacétylation (DD) qui correspond à la fraction monomère glucosamine du polymère. Dans le cas d'applications en pharmacie et en cosmétologie (Muzzarelli *et al.* 1990), un taux de désacétylation voisin de 100 % est nécessaire. Alors que pour l'application du

chitosane comme système de livraison de l'ADN, le DD peut varier entre 70 à 98 % (Ishii *et al.* 2001; Lavertu *et al.* 2006b).

2.5. Applications du chitosane comme système de livraison de l'ADN

La production de protéines recombinantes nécessite l'utilisation d'un système de livraison approprié qui permettra l'internalisation du transgène et son expression dans les cellules transfectées. Le chitosane est un polyélectrolyte cationique qui, lorsque mis en présence de polyélectrolytes anioniques tels que l'ADN et l'ARN, forme instantanément des polyplexes ou nanocomplexes par attraction électrostatique. Le chitosane peut donc condenser des acides nucléiques et être utilisé comme vecteur de livraison (Jameela *et al.* 1994; Lee *et al.* 2005). L'empaquetage de l'ADN par le chitosane peut améliorer l'internalisation puisque le chitosane est un matériau bioadhésif qui prolonge la période de contact entre la formulation et le tissu ciblé (Hagesaether *et al.* 2009). De plus, le chitosane possède la capacité de s'introduire entre les jonctions des cellules. Cette caractéristique a pour effet d'augmenter l'internalisation du système de livraison dans les cellules et d'augmenter la perméabilité des membranes (Dodane *et al.* 1999). Des études *in vivo* ont démontré l'efficacité de l'expression de gènes recombinants en utilisant le chitosane pour condenser l'ADN et le livrer aux cellules. En effet, les chitosanes ayant différents Mw et DD ont été utilisés avec succès comme système de livraison de l'ADN plasmidique chez la souris par voie systémique (Lee *et al.* 2005), intramusculaire (Yoo *et al.* 2005), intra trachéale (Koping-Hoggard *et al.* 2001; Koping-Hoggard *et al.* 2004; Issa *et al.* 2006), orale (Chen *et al.* 2004), ainsi que chez le lapin par voie topique (de la Fuente *et al.* 2008) et intestinale (MacLaughlin *et al.* 1998). Les études portant sur le chitosane comme système de livraison de l'ADN ont été réalisées principalement en utilisant des gènes rapporteurs comme le gène de la luciférase et le gène de l'EGFP.

Le chitosane a aussi été utilisé avec succès comme système de livraison pour les vaccins nasaux (Iqbal *et al.* 2003; Vila *et al.* 2004; Khatri *et al.* 2008). En effet, Iqbal et son équipe ont démontré que la livraison par voie intra nasale et intradermique, d'un complexe chitosane/ADN codant pour un épitope du virus respiratoire syncytial (RSV),

induit une réponse spécifique et protectrice des CTL chez les souris BALB/c (Iqbal *et al.* 2003). D'autres études ont démontré que des nanocomplexes de chitosane peuvent être utilisés pour l'immunisation orale en induisant une réponse immunitaire TH1 très spécifique chez la souris (Roy *et al.* 1999; Chew *et al.* 2003).

Plus récemment, Ghendon et son équipe, ont découvert que le chitosane agit comme un adjuvant lors de l'immunisation de souris en augmentant l'immunogénicité de l'antigène. En effet, l'ajout du chitosane à l'antigène lors de l'immunisation de souris, conduit à une augmentation du titre d'anticorps (de 4 ou 6 fois) (Ghendon *et al.* 2008; Ghendon *et al.* 2009). Ces travaux ont également montré que le chitosane stimulerait la prolifération et l'activité cytotoxique des leucocytes mononucléés spléniques et amorcerait également l'augmentation du nombre de cellules CD3, CD3/NK, I-AK (MHC II), et H-2Db (MHC I) chez la souris (Ghendon *et al.* 2009).

3. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est dû à une insuffisance de la capacité du pancréas à faire face à un état d'insulinorésistance. Cette affection peut être due à la conjonction d'une anomalie pancréatique de l'insulinosécrétion et/ou d'une insulinorésistance des tissus cibles. La cause de l'anomalie pancréatique n'est pas bien connue. Par contre, au niveau anatomique, des études ont montré la présence d'un infiltrat d'amyloïde qui entoure les îlots de Langerhans du pancréas des patients atteints du diabète de type 2 (Liu *et al.* 2009). Cet infiltrat est composé d'amyline, un peptide sécrété par les cellules β en même temps que l'insuline. L'amyline possède des effets anti-insuline *in vitro* et *in vivo* (Liu *et al.* 2009). Le mécanisme de l'insulinorésistance est aussi mal connu. Il est possible que l'insulinorésistance soit due à une diminution des récepteurs de l'insuline ou à une disponibilité intracellulaire accrue en acides gras qui en servant de précurseurs à des médiateurs lipidiques entraînent une diminution du signal de l'insuline (Reaven 1988).

Il est maintenant reconnu qu'une sécrétion inadéquate d'insuline est l'un des premiers éléments qui déclenchent le développement du diabète de type 2 et cette

progression est causée par une dysfonction des cellules β (Weyer *et al.* 1999; Kahn 2000; Pratley & Weyer 2001).

3.1. Insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, elle est formée de deux chaînes de 21 et 30 acides aminés, reliées par deux ponts disulfures. L'insuline joue un rôle anabolique majeur dans l'organisme, elle favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène, et le stockage des lipides et inhibe la mobilisation des réserves énergétiques. Elle exerce aussi des fonctions pléiotropes sur le métabolisme des protéines (augmentation de la synthèse des protéines et inhibition de la protéolyse) (Saltiel & Kahn 2001). L'action de l'insuline est déclenchée lors de sa liaison à son récepteur spécifique (RI) présent à la surface de toutes les cellules de l'organisme, mais particulièrement à la surface des cellules du foie, du muscle et du tissu adipeux. Le récepteur RI fait partie de la famille des récepteurs de facteurs de croissance qui possèdent une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire (Capeau 2003). La tyrosine kinase, activée par la liaison de l'insuline au récepteur RI, recrute des substrats intracellulaires tels que les protéines IRS (insulin receptor substrate) qui vont entraîner l'activation des voies de signalisation par l'insuline (White 2002). Les principales voies de la signalisation insulinique comprennent la voie d'activation de la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3) qui permet la synthèse du glycogène, le transport du glucose, l'antipolypolyse, l'anti-apoptose et la transcription de certains gènes. Les événements de signalisations induits par l'insuline conduisent aussi à l'activation de la voie des MAP kinases impliquées dans l'expression des gènes, la croissance et la différenciation cellulaires (Capeau 2003).

3.2. Traitements actuels pour le diabète de type 2

Il existe plusieurs approches de traitement pour le diabète de type 2, dans tous les cas le but à atteindre est un meilleur contrôle de la glycémie. L'objectif final du traitement est la réduction de la mortalité, des symptômes et des complications liés au diabète. C'est par l'analyse de l'hémoglobuline glycosylée (ou HbA1c) qu'est généralement évalué le

contrôle glycémique. En effet, les globules rouges contiennent une protéine, l'hémoglobine (Hb) qui est une protéine susceptible d'être modifiée par la glycation suite à la fixation d'oses ou monosaccharides. Comme l'HbA1c fixe la molécule de glucose, la glycation est directement associée à la concentration moyenne de glucose dans le sang des patients. La valeur de l'hémoglobine glycosylée est exprimée en pourcentage de l'hémoglobine totale, et se situe pour un individu sain, entre 3,5% et moins de 6,5%. Cette valeur peut atteindre 15% chez un sujet diabétique (Anonyme 2009a).

L'insuline n'est pas le premier traitement recommandé pour le diabète de type 2 car même si elle permet de baisser les glycémies en favorisant le transport et le métabolisme du glucose intramusculaire, elle facilite la prise de poids en stimulant la lipogenèse. De plus, le patient doit subir une formation pour contrôler lui-même les injections d'insuline qui peuvent causer une hypoglycémie. L'insulinothérapie est donc contre-indiquée particulièrement si le déséquilibre du diabète de type 2 s'accompagne d'une prise de poids.

3.2.1. Diète et activité physique

Un meilleur contrôle des glycémies peut être d'abord atteint par une alimentation plus équilibrée, une augmentation de l'activité physique et une bonne gestion du stress. Selon diabète Québec, environ 90 % des personnes souffrantes du diabète de type 2 ont un surplus de poids ou sont obèses. Il est donc primordial d'accorder une attention particulière aux habitudes alimentaires afin d'apporter les modifications qui s'imposent (Anonyme 2009b). En plus de permettre la perte de poids, un entraînement physique à faible intensité ciblant l'oxydation lipidique accroît la sensibilité à l'insuline chez les patients atteints du syndrome métabolique (Dumortier *et al.* 2003). Ces mesures sont souvent suffisantes pour équilibrer le diabète de type 2 lorsque les complications ne sont pas apparues. Évidemment, toute modification importante des habitudes de vie représente un défi majeur pour les patients et les améliorations obtenues sont parfois insuffisantes pour stopper le diabète de type 2.

3.2.2. Médicaments antidiabétiques

L'étape suivante, si nécessaire, est un traitement par des antidiabétiques oraux ou injecté. Les médicaments antidiabétiques peuvent être prescrits seuls, associés entre eux ou en traitement combiné avec l'insuline. Il existe plusieurs classes de médicaments antidiabétiques, parmi lesquelles les biguanides, les sulfamides hypoglycémiantes, les glinides, les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, les analogues du GLP-1 et les gliptines.

3.2.2.1. Sulfonylurées

Les sulfonylurées ont une action sur les cellules β des îlots de Langerhans qui se fait par le biais de protéines régulatrices SUR (qui contiennent le site de liaison des sulfonylurées hypoglycémiantes) (Aguilar-Bryan *et al.* 1995) et se traduit par une inhibition des canaux potassiques (K^+ ATP) et une activation des canaux calciques aboutissant à l'insulinosécrétion. La plupart des sulfonylurées utilisées en clinique diabétologique tel que la glibenclamide la glimépiride peuvent se lier aussi à la protéine SUR présente au niveau du cœur et conduire à des effets secondaires néfastes chez des patients diabétiques de type 2 présentant une pathologie cardiovasculaire associée. Le gliclazide est le seul qui présente une spécificité remarquable vis-à-vis des canaux K^+ ATP des cellules β , et donc ne présentant aucun risque d'interférence néfaste avec le système cardiovasculaire (Lawrence *et al.* 2001). L'hypoglycémie induite par les sulfonylurées est aussi un effet secondaire connu de cette classe d'antidiabétiques utilisés pour traiter le diabète de type 2. De plus, on remarque que chez les patients traités par les sulfonylurées, le contrôle glycémique se détériore au cours de la maladie (Philippe 2009).

3.2.2.2. Glinides ou meglitinides

Cette famille d'insulinosécrétants est représentée par la répaglinide et la nateglinide. Comme les sulfonylurées, les glinides agissent sur les cellules β des îlots de Langerhans en fermant les canaux potassiques et ouvrant les canaux calciques. Ils

provoquent ainsi, après une stimulation glycémique, une sécrétion insulinaire rapide et de courte durée (Dornhorst 2001; Blickle 2006). Les effets gastro-intestinaux sont fréquents avec ce traitement (Philippe 2009).

3.2.2.3. Biguanides

Cette famille comprend le metformine et ses dérivés. Leur mécanisme d'action n'est pas entièrement élucidé, mais on évoque une réduction de la production hépatique de glucose par la voie de la gluconéogenèse et une augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline permettant une augmentation de l'utilisation périphérique du glucose, c'est-à-dire au niveau des muscles et des cellules hépatiques (Bosni, 2009). Les biguanides réduisent aussi les triglycérides et le cholestérol-LDL. Les biguanides n'ont pas d'effet sur le poids et ne causent pas d'hypoglycémie (Philippe 2009). Les biguanides ont fait la preuve de leur effet sur la réduction de la mortalité cardiovasculaire chez les diabétiques de type 2. Leur principale contre-indication est l'insuffisance rénale à cause du risque d'acidose lactique, complication grave, mais heureusement rarissime (Bosi, 2009). Les biguanides peuvent aussi entraîner des troubles intestinaux comme des nausées ou de la diarrhée.

3.2.2.4. Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase

Les principales molécules de la famille des alpha-glucosidases sont l'acarbose, le miglitol et le voglibose. Elles peuvent être utilisées en monothérapie ou en association avec les sulfamides, les biguanides ou l'insuline. Les glucides absorbés sont dégradés par l'amylase salivaire et pancréatique en disaccharides (saccharose, lactose, maltose), puis par les alpha-glucosidases (maltase, lactase, saccharase ou invertase) en monosaccharides. L'inhibition de cette enzyme alpha-glucosidase retarde l'hydrolyse des hydrates de carbone alimentaires en monosaccharides résorbables et réduit les pics plasmatiques de glucose et d'insuline facilitant ainsi le contrôle métabolique des diabétiques (Tielmans *et al.* 2007). Leur efficacité est comparable à celle de la metformine (Hoffmann & Spengler 1997). Les effets secondaires les plus fréquents sont les troubles digestifs à type de

douleurs abdominales ou de ballonnement. De plus, ce traitement a un effet de courte durée souvent inférieur à 1 an (Philippe 2009).

3.2.2.5. Thiazolidinediones (TZD)

Les thiazolidinediones ou glitazones sont une nouvelle classe d'antidiabétiques oraux agissant comme insulinosensibilisateurs. Les principaux TZD utilisés pour le traitement du diabète de type 2 sont la rosiglitazone et la pioglitazone. Les TZD sont de nouvelles molécules, liant les récepteurs de type PPARs « peroxisome proliferator activated receptor γ » exprimés principalement dans le tissu adipeux (Halimi 2005). Suite à leur activation, de jeunes adipocytes sont recrutés ce qui entraîne une réduction des acides gras libres circulants, de certaines cytokines pro-inflammatoires, de l'insulinorésistance musculaire et de la production hépatique de glucose (Halimi 2005). Les TZD ont une action favorable sur la baisse de la glycémie à jeûne, et de l'HbA_{1c}. Ils ont un effet bénéfique sur le profil lipidique en diminuant surtout les triglycérides et en augmentant le cholestérol-HDL. Par contre, les TZD peuvent causer une rétention hydrosodée, une prise de poids, des risques d'insuffisance cardiaque et de fracture (Philippe 2009). De plus, le prix de ce médicament est élevé.

3.2.2.6. Analogue du GLP-1

Les analogues de GLP-1, tels que l'exénadine, stimulent la sécrétion de l'insuline lors d'une augmentation de la glycémie (Gallwitz 2005). Les analogues du GLP-1 ont l'avantage de ne pas causer d'hypoglycémie et d'entraîner une perte de poids facilitée par sensation de satiété fournie par le médicament. Toutefois, les analogues du GLP-1 doivent être administrés par injection SC de plus, il y a peu d'expériences à long terme sur les analogues de GLP-1 et le prix de l'intervention est élevé (Philippe 2009). Les fonctions du GLP-1 sont décrites dans la section 3.3. de ce chapitre.

3.2.2.7. Gliptines

Les gliptines agissent en inhibant le DPP-IV, une enzyme responsable de la dégradation du GLP-1 et du peptide inhibiteur gastrique (GIP). En réduisant la dégradation du GLP-1 et du GIP, il y a une stimulation indirecte de la sécrétion d'insuline. Cette intervention n'a pas d'effet sur le poids du patient et n'entraîne pas d'hypoglycémie. Par contre, les gliptines doivent être administrées fréquemment (2 à 3 fois/jour) et le traitement est coûteux (Philippe 2009).

3.2.3. Limites des traitements antidiabétiques

Chacun des traitements antidiabétiques comporte des inconvénients et des limites. Les médicaments fréquemment utilisés tels que la metformine et les sulfamides hypoglycémifiants sont efficaces au début du diabète de type 2. Toutefois, la défaillance insulino-sécrétoire du diabétique de type 2 s'aggravant avec le temps. En effet, des études ont montré l'augmentation progressive quasi inéluctable de l'HbA1c, même chez les patients qui arrivent à ne pas prendre de poids (Bosni, 2009). Afin de repousser les limites et d'éviter les inconvénients associés aux médicaments antidiabétiques, de nouveaux traitements, tels que la thérapie génique, doivent être développés pour traiter le diabète de type 2.

3.3. GLP-1 «glucagon-like peptide 1»

Les incrétines, dont fait partie le GLP-1, sont des hormones relâchées par les cellules épithéliales du tube gastro-intestinal qui augmentent la sécrétion de l'insuline (McIntyre *et al.* 1965; Creutzfeldt & Ebert 1985). Plus précisément, le GLP-1 est sécrété par les cellules L de l'intestin en réponse à l'ingestion de nourriture. Le GLP-1 joue un rôle potentialisateur de l'effet du glucose sur la sécrétion de l'insuline. Le GLP-1 diminue aussi la sécrétion du glucagon, une hormone antagoniste de l'insuline et hyperglycémifiante, qui est sécrétée par les cellules des îlots de Langerhans du pancréas. La sécrétion du GLP-1 est diminuée chez les patients atteints du diabète de type 2 (Toft-

Nielson *et al.* 1996; Vilsboll *et al.* 2001).

3.4. Proglucagon et production du GLP-1

Le GLP-1 est secrété par les cellules intestinales en réponse à l'ingestion de nutriments (Mojsov *et al.* 1986). Plus précisément, le GLP-1 est produit dans les cellules L du jéjunum et de l'iléon par un mécanisme de clivage protéolytique différentiel de la molécule pré-pro-glucagon (Thorens 2003). La séquence en acide aminé du précurseur du proglucagon humain a été déterminée par Bell et son équipe en 1983 à partir de la séquence en nucléotide d'un seul gène codant pour le proglucagon (Bell *et al.* 1983). Les auteurs ont démontré que la prohormone est composée du glucagon et de deux séquences, positionnées en COOH-terminale, qui ont une similarité de 50% avec le glucagon, soit le glucagon like peptide-1 (GLP-1) et le glucagon like peptide-2 (GLP2) (figure 2). Les trois différentes séquences sont séparées par des sites potentiels de clivage dibasique. La molécule pré-proglucagon est exprimée dans les cellules L de l'intestin et les cellules α du pancréas (figure 2). Dans les cellules intestinales, le proglucagon est clivé pour produire la glicentine et l'oxyntomoduline, dont les rôles physiologiques, aux concentrations circulantes observées, ne sont pas encore bien définis (Thorens 2003) (figure 2). Le GLP-1, sous la forme active (appelé GLP-1 (7-37) ou GLP-1 (7-36) amide), et le GLP-2 sont les principaux peptides biologiques actifs produits dans les cellules intestinales. Dans les cellules α du pancréas, le GLP-1 et le GLP-2 ne sont pas ou très peu produits, par contre le glucagon est le peptide biologique actif le plus abondant dans ces cellules.

La sécrétion du GLP-1 est stimulée principalement par la présence de glucose, grâce à un mécanisme de reconnaissance directe de ce dernier au niveau des cellules L, et aussi par un mécanisme indirect impliquant le système nerveux entérique. Ainsi, le GLP-1 est un potentialisateur de l'effet du glucose et ne peut avoir d'effet sur la sécrétion de l'insuline en absence de ce nutriment. La figure 3 schématise les variations du GLP-1, de l'insuline et du glucagon suite à la prise d'un repas chez un sujet non diabétique. Le tableau II résume les concentrations d'insuline, de GLP-1 et de glucose chez l'homme et

le rat diabétique (rats ZDF).

La séquence du GLP-1 est très conservée entre les différentes espèces. Des études sur des mammifères montrent une homologie de 100 % entre les sections correspondantes au GLP-1 sur la séquence du proglucagon (Bell *et al.* 1983; Lopez *et al.* 1983; Heinrich *et al.* 1984; Seino *et al.* 1986).

Figure 2 : Synthèse et sécrétion du GLP-1.

Les unités transcriptionnelles du proglucagon consistent en 6 exons et 5 introns. Quatre des six exons codent pour des domaines fonctionnels distincts. Le précurseur du proglucagon subit des modifications post-traductionnelles différentielles et dépendantes des tissus dans lequel il est exprimé. Dans les cellules intestinales, le pro-glucagon est clivé pour produire principalement le GLP-1 et le GLP-2. Il y a aussi production de la glicentine et de l'oxyntomoduline. Dans les cellules α du pancréas, le proglucagon est clivé pour produire essentiellement le glucagon. GRPP: *glicentin related polypeptide*; MPF: *major proglucagon derived peptide*; IP2 : *intervening peptide 2*.

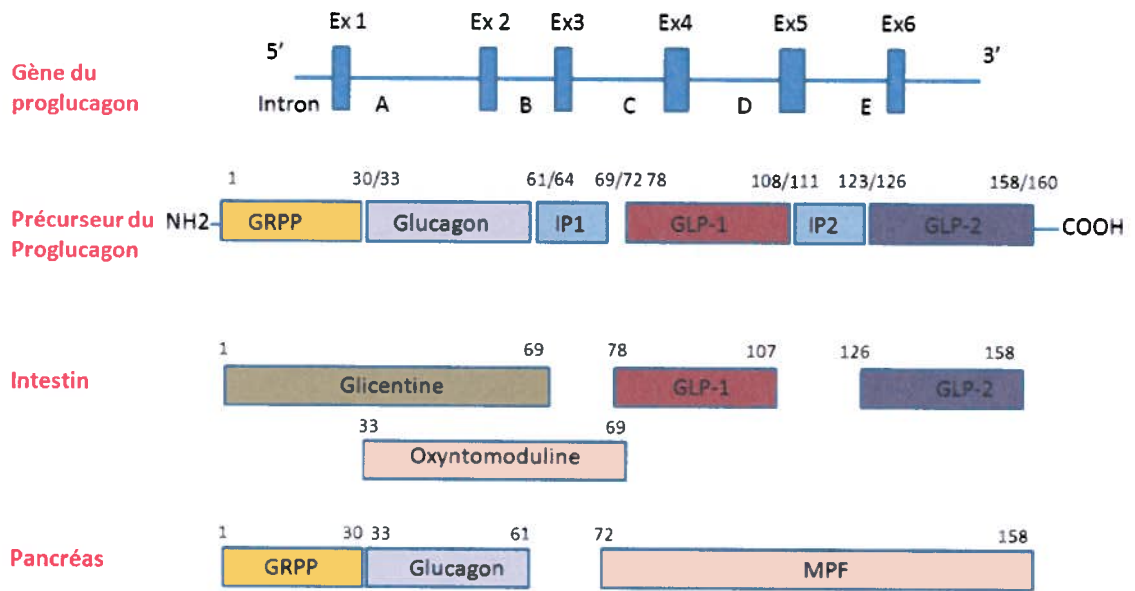
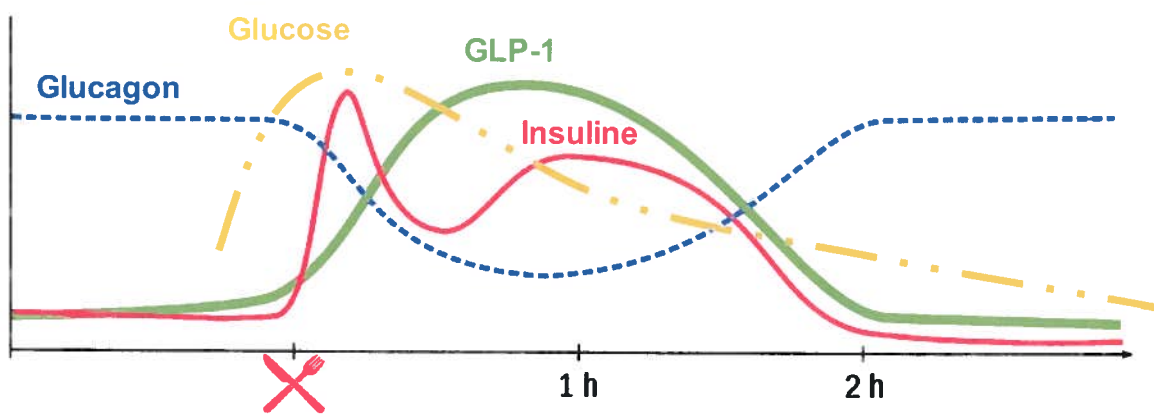


Figure améliorée (Orskov *et al.* 1992; Usdin *et al.* 1993; Thorens 2003)

Figure 3 : Représentation des variations du glucose, d'insuline, du GLP-1 et du glucagon suite à la prise d'un repas chez un sujet non diabétique.



Anonyme, 2008 à partir de Kieffer et Habener, 1999

Tableau II : Valeurs des concentrations de glucose, de GLP-1 et d'insuline chez l'humain et le rat diabétique (ZDF).

	Sujet diabétique		Rat diabétique (ZDF)	
	À jeûne	Après un repas	À jeûne	Nourri
GLP-1	2,5 à 5 pmol/L	7-10 pmol/L		5-10 pmol/L
Glucose	9 mmol/l	13 mmol/l	130-300 mg/dl	400-450 mg/dl
Insuline	50 pmol/l	175 pmol/l		1-5 ng/ml

(Pick *et al.* 1998; Hui *et al.* 2002; Oh *et al.* 2003; Choi *et al.* 2004; Ahren 2007; Anonyme 2010)

3.5. Actions pancréatiques du GLP-1

Le GLP-1 se fixe à son récepteur spécifique à la surface des cellules β pancréatiques, déclenche l'activation de la protéine G qui à son tour active l'adénylate cyclase résultant dans la production d'AMP cyclique (Orskov *et al.* 1992; Usdin *et al.* 1993) (figure 4). Les mécanismes moléculaires par lesquels une augmentation d'AMPc intracellulaire déclenche la voie de signalisation du glucose ne sont pas encore bien connus.

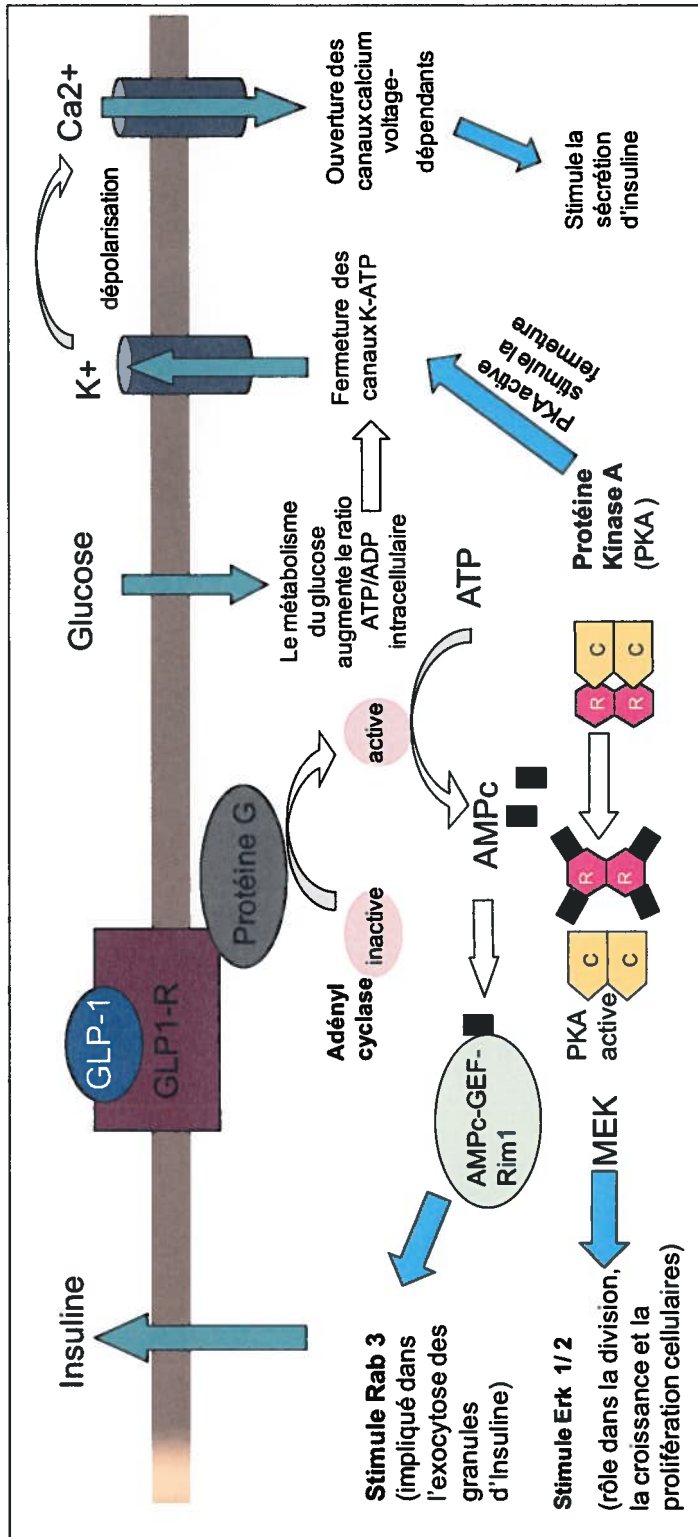
Le GLP-1 agit directement à travers la cascade d'activation AMPc/PKA pour accentuer et sensibiliser les cellules β à la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose. Le métabolisme du glucose dans les cellules β cause une augmentation de l'adénosine triphosphate (ATP) et une augmentation au niveau cytoplasmique du ratio ATP : adénosine triphosphate (ADP), ce qui mène à la fermeture des canaux K_{ATP} (figure 4). La fermeture des canaux K_{ATP} conduit à la dépolarisation, à l'ouverture des canaux calcium voltage-dépendants puis à la stimulation de la sécrétion de l'insuline. Le GLP-1 a un effet potentialisateur de l'action du glucose en fermant aussi les canaux K_{ATP} via une phosphorylation contrôlée par la protéine kinase (PKA) (figure 4). Ces canaux possèdent un site phosphorylé par la PKA activée par la protéine G (Beguin *et al.* 1999). Le fait que l'inhibiteur PKA Rp-AMPc renverse l'action du GLP-1 sur l'action des canaux K_{ATP} confirme l'implication de la PKA dans la phosphorylation et la fermeture de ces canaux (Holz *et al.* 1993).

La stimulation de la voie de signalisation du glucose, via le GLP-1, implique une voie dépendante de l'activation de la protéine kinase A (dépendante de l'AMPc) (figure 4). Une voie indépendante de la PKA a été aussi décrite par l'équipe d'Ozaki (Ozaki *et al.* 2000). Dans cette voie, l'AMPc interagit avec la protéine AMPc-GEF (ou Epac2) pour former un complexe actif (AMPc-GEF-Rim1) capable de stimuler l'activité de la protéine Rab3 impliquée dans l'exocytose des granules d'insuline.

Le GLP-1 active la transcription et l'expression du gène de la pro-insuline, permettant ainsi de fournir continuellement et progressivement de l'insuline (Fehmann & Habener 1992). De plus, le GLP-1 régule à la hausse l'expression des gènes de la machinerie cellulaire impliquée dans la sécrétion de l'insuline tels que la glucokinase et le GLUT-2 (transporteur de glucose) (Buteau *et al.* 1999) (figure 4). De plus, le GLP-1 a un effet sur l'expansion de la masse des cellules β pancréatiques. En effet, des études chez des rats ayant subi une pancréatectomie partielle (Xu *et al.* 1999), chez des rats traités à la streptozotocine à la naissance (Tourrel *et al.* 2002) et chez des souris diabétiques ob/ob (Stoffers *et al.* 2000), ont démontrées que des injections de GLP-1 ou de son agoniste (exendine-4) sont associées à une augmentation de la masse cellulaire β , en raison d'une stimulation de la néogenèse à partir de la région ductale et/ou d'une prolifération des cellules β des îlots. Les mécanismes par lesquels l'activation du récepteur du GLP-1 stimule la prolifération des cellules β ou de leurs précurseurs ne sont pas encore élucidés. L'activation de la voie AMPc par le GLP-1 conduirait à l'activation de la voie des MAP-kinases, avec une phosphorylation des kinases Erk1/2 (Ehse *et al.* 2002; Gomez *et al.* 2002) qui pourrait participer au contrôle de la prolifération des cellules β (figure 4). En plus de stimuler la prolifération des cellules β , le GLP-1 accroît également la différenciation de nouvelles cellules β pancréatiques à partir de cellules progénitrices de l'épithélium du canal de Wirsung (Zhou *et al.* 1999). Il a été aussi démontré que le GLP-1 induit une prolifération des cellules β chez les rats âgés et intolérants au glucose résultant ainsi en une amélioration de la tolérance au glucose (Perfetti *et al.* 2000). Ceci signifie que le GLP-1 peut être l'origine d'une mobilisation de nouvelles cellules β chez un individu possédant un nombre insuffisant de cellules fonctionnelles. Des études récentes ont démontré que le GLP-1 peut aussi inhiber l'induction de l'apoptose des cellules β par les cytokines et les acides gras (Liu *et al.* 2004; Bregenholt *et al.* 2005). Chez les personnes atteintes de diabète de type 2, l'expansion insuffisante de la masse cellulaire est causée par une augmentation de la mortalité cellulaire par apoptose (Pick *et al.* 1998), le GLP-1 pourrait ainsi, par inhibition de l'apoptose, améliorer l'expansion des cellules β en réponse à une résistance à l'insuline ou à une déféctuosité des cellules β .

Figure 4 : Mécanisme d'action du GLP-1.

Au niveau des cellules β pancréatiques, le GLP-1 se lie à des récepteurs heptahélicaux spécifiques couplés à l'activation de l'adénylate-cyclase et à la production d'AMP cyclique. Le GLP-1 est un potentialisateur de l'effet du glucose, il a un effet insulinothrope qu'en présence de concentration élevée de glucose. La stimulation par le glucose implique une voie dépendante de l'activation de la protéine kinase/MEK et une voie dépendante de l'interaction de l'AMPc avec la protéine AMPc-GEF. R : Sous-unités régulatrices. C : Sous-unités catalytiques.



d'après: (Orskov *et al.* 1992; Usdin *et al.* 1993; Skalhegg & Tasken 1997)

3.6. Effets extra pancréatiques du GLP-1

Peu de travaux ont été réalisés jusqu'à présent pour étudier la distribution des récepteurs GLP-1 dans les tissus. La présence de ces récepteurs a été démontrée dans les adipocytes (Valverde *et al.* 1993; Egan *et al.* 1994), le cerveau (Egan *et al.* 1994), les reins (Egan *et al.* 1994), le cœur (Egan *et al.* 1994), les muscles squelettiques (Egan *et al.* 1994), le foie (Egan *et al.* 1994), les intestins (Egan *et al.* 1994) et au niveau de l'estomac (Schmidtler *et al.* 1991; Schepp *et al.* 1992; Schmidtler *et al.* 1993; Wettergren *et al.* 1993; Schepp *et al.* 1994). La présence de ces récepteurs laisse supposer une action potentielle du GLP-1 dans ces tissus. Egan *et al.* (1994) ont montré que le GLP-1 est capable d'augmenter le métabolisme du glucose via la stimulation de la sécrétion de l'insuline dans les cellules adipeuses 3T3-L1. Dans ces cellules, le GLP-1 augmenterait de façon significative la prise du 2-déoxyglucose par l'insuline.

3.7. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), un inhibiteur du GLP-1

Il a été démontré que des injections sous-cutanées chez l'humain de GLP-1 mènent à une faible diminution du taux de glucose dans le sang et à une courte stimulation de la sécrétion d'insuline par le foie (Nauck *et al.* 1996). L'effet limité du GLP-1 s'expliquerait par la dégradation de ce peptide suite à son injection. En effet, suite à l'administration du GLP-1 chez l'humain, moins de 10% des peptides demeurent sous une forme intacte et biologiquement active (Deacon *et al.* 1995). La demi-vie du GLP-1 circulant a été estimée à 1 minute chez le cochon (Holst & Deacon 1998), de 2 à 4 minutes chez le rat (Kieffer *et al.* 1995) et de 4 à 11 min chez l'humain (Kreymann *et al.* 1987; Schjoldager *et al.* 1989; Orskov *et al.* 1993; Kieffer *et al.* 1995)

La dégradation rapide du GLP-1 est due à l'expression d'une enzyme, la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) qui clive la séquence His :Ala :Glu située dans la région N-terminale du GLP-1 (Hansen *et al.* 1999). Ainsi, la molécule GLP-1 clivée

devient inactive et agirait même comme un antagoniste pour le récepteur GLP-1 (Knudsen & Pridal 1996) (figure 5).

Le DPP-IV hydrolyse le GLP-1 (7-36) amide actif du sérum humain pour former le métabolite inactif GLP (9-36) amide et joue ainsi un rôle important dans le métabolisme du GLP-1 (Mentlein *et al.* 1993). Kieffer *et al.* (1995) ont suivi la dégradation du GLP-1-(7-36) amide suite à un marquage radioactif de ce peptide sous différentes conditions. Les analyses par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) des métabolites résultants, notamment le GLP-1-(9-36) amide ont montré une réduction significative de ces métabolites en présence d'un inhibiteur de la DPP-IV, la diprotine A (Kieffer *et al.* 1995). La DPP-IV est une enzyme produite par les cellules endothéliales (Mentlein *et al.* 1993). Il s'agit d'une glycoprotéine présente à la surface des cellules de type II. Elle est fortement retrouvée dans les reins et à plus faible niveau dans le foie, le pancréas, le placenta, le thymus, la rate, les cellules épithéliales, l'endothélium vasculaire et les cellules myéloïdes et lymphoïdes (Mentlein 1999). La DPP-IV est une peptidase limitante pour l'activité et l'action du GLP-1. Par un rapide clivage des deux acides aminés en position N-terminale, elle inactive le GLP-1 (Mentlein 1999; Deacon & Holst 2002; Weber 2004). L'exposition de cellules glomérulaires endothéliales humaines à de fortes concentrations de glucose mène à une augmentation significative de l'expression du DPP-IV et de son activité *in vitro* (Pala *et al.* 2003). L'augmentation du DPP-IV contribue donc à la réduction du GLP-1 et de son effet sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline chez les diabétiques de type 2.

Figure 5: Métabolisme du GLP-1.

Le GLP-1 est un potentialisateur de l'effet du glucose et a de l'effet sur la sécrétion d'insuline qu'en présence de ce nutriment. Ainsi suite à un repas, le GLP-1 sous sa forme active augmente la sécrétion de l'insuline afin de normaliser le taux de glucose dans le sang. Le GLP-1 est ensuite rapidement dégradé par l'enzyme DPP-IV qui clive la séquence His :Ala :Glu située dans la région N-terminal du GLP-1. Le GLP-1 inactivé peut agir comme un antagoniste pour le récepteur GLP-1 puis il est éliminé de l'organisme.

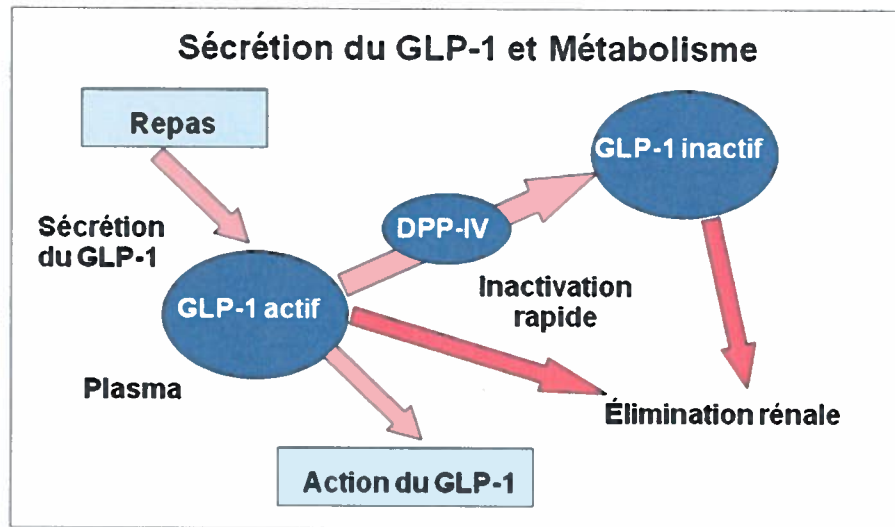


Figure améliorée (Adoop 2007)

3.7.1. Stratégies pour accroître la concentration de GLP-1 chez les diabétiques

En raison de ses nombreux avantages, le GLP-1 est un candidat prometteur pour le traitement du diabète de type 2. Par contre, l'inconvénient principal de l'utilisation du GLP-1 comme agent thérapeutique réside dans sa courte demi-vie. Pour contourner cette entrave, des chercheurs ont utilisé une formulation injectable, un copolymère biodégradable [DL-lactide-co-glycolide)-b-éthylène glycol-b-(DL-lactide-co-glycolide)] (ReGEL), afin de contrôler le relargage du GLP-1 synthétique (Choi *et al.* 2004). Ils ont démontrés que le ReGEL permet un relâchement du GLP-1 bioactif de façon constante, *in vitro* et *in vivo*, et ce durant deux semaines chez le rat ZDF (Suna Choi *et al.*, 2004). Une simple injection, par voie sous-cutanée, des formulations ReGEL/ZnGLP-1 permet une augmentation du taux d'insuline et un contrôle du glucose durant 2 semaines (Choi *et al.* 2004). Des travaux ont également démontré la livraison d'un plasmide recombinant codant pour le GLP-1 complexé au polyéthylènimines (PEI) permet de contrôler les symptômes associés au diabète de type 2 chez le modèle animal. En effet, l'administration systémique de complexes PEI/plasmide GLP-1 a permis une augmentation de la sécrétion d'insuline et une réduction du niveau de glucose durant 2 semaines chez le rat ZDF et la souris DIO (Oh *et al.* 2003; Choi *et al.* 2005). Une méthode virale à également été utilisé, dans une stratégie de thérapie génique, pour livrer le gène codant pour le GLP-1 chez la souris diabétique *ob/ob* (Lee *et al.* 2007) et chez le rats ZDF (Lee *et al.* 2007; Parsons *et al.* 2007). Cette stratégie a permis le contrôle du taux de glucose sur une période allant de 20 à 60 jours suivant l'administration de l'adénovirus recombinant codant pour une forme active de GLP-1.

L'utilisation d'inhibiteurs de la DPP-IV pour prolonger l'activité biologique du GLP-1 devient une nouvelle classe d'agents pharmacologiques pour la diminution du taux de glucose et le traitement du diabète de type 2 (Deacon & Holst 2002; Weber 2004). En effet, l'inhibition du DPP-IV permet l'augmentation de la sécrétion de l'insuline, la diminution du taux de glucose dans le sang, la prise du glucose par les muscles suite à une stimulation de l'insuline, et aussi l'amélioration de la sensibilité

hépatique et périphérique par l'insuline chez le rat (Pospisilik *et al.* 2002). Il a été démontré que des souris et des rats déficients pour la DPP-IV ont une meilleure tolérance au glucose et une augmentation de la sécrétion d'insuline suite à la prise de forte dose de glucose par voie orale (Marguet *et al.* 2000; Nagakura *et al.* 2001). Des études à court terme, impliquant l'inhibition de la DPP-IV, par l'utilisation de produits pharmacologiques, ont démontré l'augmentation de la tolérance au glucose chez les rats zucker en utilisant l'isoleucine thiazolidine (Pederson *et al.* 1998) et l'inhibiteur oral NP DPP728 (Balkan *et al.* 1999). Une augmentation de la tolérance au glucose est aussi observée, chez les souris soumises à une diète riche en gras (Ahren *et al.* 2000) et chez les rats fischer (Nagakura *et al.* 2001), après un traitement à la valine pyrrolidide comme inhibiteur de la dipeptidyl peptidase IV. L'effet de valine pyrrolidide a été aussi étudié chez le cochon qui présente certaines ressemblances avec l'humain en termes de physiologie gastro-intestinale. Les résultats ont démontré qu'à des doses permettant 90 % d'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV, il y a une augmentation du niveau basal du GLP-1 intact, une augmentation de la proportion du GLP-1 demeurant non dégradée durant une infusion, et une augmentation de la durée de vie du GLP-1 dans le plasma (Deacon *et al.* 1998).

L'inhibition de la DPP-IV augmente la tolérance au glucose chez l'humain (Ahren *et al.* 2000; Hoffmann *et al.* 2001). En effet, chez les patients atteints du diabète de type 2, l'utilisation d'inhibiteur de la DPP-IV réduit significativement le taux de glucose dans le sang (Ahren *et al.* 2002) (Mest 2006). De plus, l'inhibition du DPP-IV retarde le développement du diabète (Sudre *et al.* 2002).

4. ARN interférents et leurs mécanismes d'action

Les petits ARN interférents (siARN) sont de petits fragments d'ARN double brin d'une longueur de 21 à 25 nucléotides qui peuvent inhiber l'expression d'un gène. Les siARN se distinguent des micro-ARN (miARN) par leur origine et la diversité des fonctions auxquelles ils sont associés. À l'inverse des miARN, les siARN ne sont pas produits par des gènes, mais ils résultent de la fragmentation d'ARN double-brin par le mécanisme d'interférence à l'ARN. Ainsi, le mécanisme d'action des ARN interférents est guidé par de petits ARN qui sont divisés en deux groupes : les siARN et miARN (figure 6).

Le silençage d'un gène, c'est-à-dire l'inhibition de l'expression d'un gène, peut être induite par des siARN spécifiques qui clivent une séquence d'ARN messenger qui leur est complémentaire. Dans le cytoplasme de la cellule, les longs ARN double brin sont clivés en siARN par la RNase III, une enzyme appelée Dicer. Ensuite, un complexe d'enzyme composé de l'argonaute 2 (AGO2 ou EIF2C2) et un complexe d'induction du silençage (RNA-induced silencing complex: RISC) se lient aux siARN, puis l'enzyme AGO 2 clive le brin sens ou brin passager des siARN (figure 6).

Quant aux micro ARN, ils proviennent d'une structure en épingle à cheveux qui est naturellement transcrite par le génome, et ils agissent en bloquant la traduction et en dégradant les ARNm ayant une complémentarité imparfaite (de Fougerolles *et al.* 2007). Dans le noyau de la cellule, les petits ARN contiennent des loupes ou des petites structures en épingle à cheveux, nommé Pri-miARN, codantes pour des régions intra géniques ou à l'intérieur des introns (Meister & Tuschl 2004; Kim & Rossi 2007). Ces pri-ARN sont transformés en pré-miARN dans le noyau puis exportés dans le cytoplasme (de Fougerolles *et al.* 2007). Les pré-micro-ARN sont ensuite coupés et transformés par l'enzyme Dicer, de façon à produire des micro-ARN à double brin imparfaitement complémentaires. Encore une fois, un complexe d'enzyme composé de l'argonaute 2 (GO2 ou EIF2C2) et un complexe d'induction du silençage (RNA-induced

silencing complex: RISC) se lie aux duplex de micro-ARN. Ensuite, contrairement au siARN où le brin sens est clivé, le brin sens est relâché dans le cas des miARN (figure 6).

Ainsi, autant pour les siARN que les miARN, il y a la formation d'un complexe qui contient le brin antisens ou le brin guide. L'activation du complexe AGO2-RISC mène à la liaison du brin guide au brin de l'ARNm complémentaire puis à l'inactivation de l'expression du gène correspondant. Si la complémentarité est parfaite ou presque comme c'est le cas avec les siARN, le complexe clive le brin d'ARNm entre les nucléotides qui sont complémentaires au 10^e et 11^e nucléotide en 5' du brin guide.

L'utilisation des siARN induit d'une façon puissante l'inhibition de l'expression d'un gène puisque le clivage de l'ARNm mène rapidement à une dégradation nucléotidique du fragment d'ARN ce qui conduit l'activation du complexe RISC qui par conséquent, permettra la dégradation d'un autre ARNm de façon catalytique (Hutvagner & Zamore 2002) (Sharp & Zamore 2000; McManus & Sharp 2002; Tuschl 2002; Dillin 2003).

Figure 6 : Mécanismes d'action des siARN et des miARN.

Le mécanisme d'action des siARN débute par le clivage des ARNdb en siARN par l'enzyme Dicer. Les siARN sont pris en charge par le complexe RISC «RNAi-induced silencing complex » et le brin passager est clivé par l'argonaute 2 (AGO2). Le brin anti-sens sert de guide pour reconnaître l'ARNm ciblé et pour le cliver.

Le mécanisme d'action des miARN débute par la présence des pri-miARN endogènes qui sont transcrits par l'ARN polymérase II (pol II) et modifiés par l'enzyme Drosha dans le noyau. Il en résulte des pré-miARN qui sont exportés du noyau vers le cytoplasme, par l'enzyme exportin 5, liés à l'enzyme Dicer et modifiés par cette dernière pour permettre leur chargement sur le complexe RISC. Le brin passager est relâché de façon à obtenir un miARN mature lié au RISC actif. Le miARN reconnaît des séquences (3' de la région non traduite (UTR)) de l'ARNm, ce qui mène à l'inhibition de la traduction. La liaison du miARN à l'ARNm peut aussi entraîner la dégradation de l'ARNm ciblé par les «P-body».

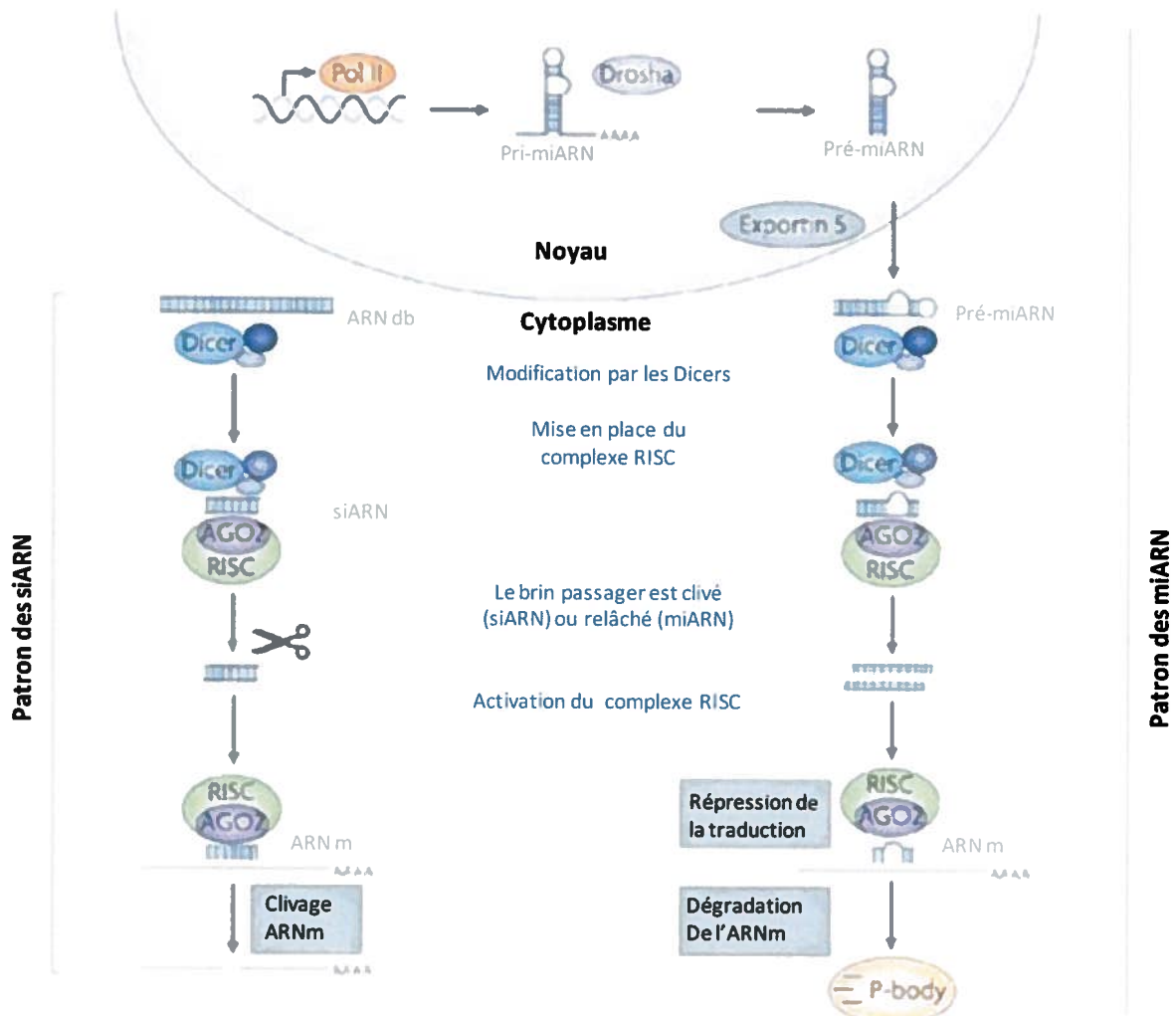


Figure traduite de (de Fougerolles *et al.* 2007)

4.1. Inhibition de l'expression des gènes par l'utilisation des ARN interférents

Le principe de l'utilisation des ARN interférents (ARNi) pour l'inhibition de l'expression des gènes consiste en l'introduction d'un ARN double brin (ARNdb), en particulier, dans les cellules, pour provoquer la dégradation de l'ARNm du gène cible. Les ARN interférents thérapeutiques se présentent comme un nouveau traitement pour des maladies jusqu'à présent incurables par les techniques de médications disponibles. Song et son équipe, en 2003, furent les premiers à démontrer que les ARN interférents peuvent être des éléments thérapeutiques efficaces dans un modèle animal. Leurs recherches ont révélé que des ARN interférents ciblant le gène Fas (impliqué dans l'inhibition de l'apoptose induite par les agents anticancéreux) permettent de protéger les souris contre l'hépatite (Song *et al.* 2003). Des études cliniques en phase I, utilisant les ARN interférents comme traitement pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMRA), ont été terminées sans problème de toxicité non contrôlée (Chappelow & Kaiser 2008). La difficulté résidait dans l'application des effets thérapeutiques des ARN interférents dans une réalité clinique. Pour ce faire, une efficacité contrôlée des ARN interférents devra être démontrée dans des études cliniques chez l'humain.

La sélection des siARN pour inhiber un gène cible consiste d'abord à synthétiser des siARN en se basant sur les données bio-informatiques, puis à une étude *in vitro* pour déterminer leur efficacité à inhiber le gène ciblé. L'étude *in vitro* permet de s'assurer de l'absence de silençage sur des gènes non ciblés et permet également de déterminer si l'ajout de modification chimique est nécessaire pour améliorer la stabilité ou l'efficacité des siARN. Lors de la sélection des siARN, il est important de vérifier la puissance, la spécificité et la stabilité nucléaire de siARN. Il est également important d'éviter ou de minimiser l'inhibition de l'expression de gènes non ciblés qui ont une séquence partiellement homologue avec le gène ciblé. De plus, il faut éviter une réaction découlant de la

reconnaissance des siARN par le système immunitaire. Les ARNi peuvent être synthétisés chimiquement ou transcrits dans un système *in vitro*, et peuvent être utilisés pour la transfection de cellules ou l'injection d'animaux.

4.2. Applications du chitosane comme système de livraison des siARN

La livraison de siARN vers l'ARNm du gène cible est la clé pour le développement d'ARN interférents thérapeutiques cliniquement pertinents. Les nanocomplexes polymériques, formés par autoassemblage de chitosane avec les siARN, peuvent servir pour la livraison extracellulaire, l'absorption cellulaire et le trafic intracellulaire et ainsi devenir une stratégie pour améliorer le potentiel thérapeutique des siARN. Plusieurs études utilisant des systèmes de nanocomplexes (ARN/chitosane) pour la transfection *in vitro* (Duan *et al.* 2008; Ghosn *et al.* 2008; Rojanarata *et al.* 2008; Tahara *et al.* 2008; Jere *et al.* 2009; Kawaguchi *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009; Malhotra *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Yuan *et al.* 2009) et *in vivo* (Howard *et al.* 2006; Pille *et al.* 2006; Kong *et al.* 2007; Gao *et al.* 2009; Howard *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009) ont été documentées. Des études *in vivo* ont démontré que les nanocomplexes pouvaient être utilisés pour la livraison des siARN par voie intrapéritoniale (Howard *et al.* 2009), intranasale (Howard *et al.* 2006; Pille *et al.* 2006; Kong *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2009), intraveineuse (Pille *et al.* 2006; Gao *et al.* 2009), sous-cutané (Wang *et al.* 2009) ou étalés sur la peau sous forme de crème (Wang *et al.* 2008). Le groupe recherche de Wang (2008) a démontré la possibilité de livrer des siARN aux poumons via une livraison transdermale en utilisant une crème imiquimode mélangée avec des nanocomplexes de chitosane-siARN. Des résultats obtenus par microscopie à force atomique suggèrent que le chitosane serait préférable aux liposomes pour une livraison sécuritaire des siARN aux cellules cibles et que les siARN sont encapsulés dans les nanocomplexes formés de chitosane sans être endommagés (Yuan *et al.* 2009).

Certains auteurs ont utilisé, pour la livraison d'ARN interférents, des nanocomplexes où le chitosane est combiné à d'autres composants tels que le polyéthylèneimine (Jere *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2009) le polyéthylène glycol (PEG) (Duan *et al.* 2008), le

pentasodium tripolyphosphate (TTP) (Wang *et al.* 2009) ou le poly(isobutylcyanoacrylate) (de Martimprey *et al.* 2008). Les polymères composés de chitosane et de polyéthylène imine (PEI), par exemple, ont été utilisés pour livrer des siARN *in vitro* dans des cellules A549 de poumons (Jere *et al.* 2009). En effet, dans le cas de l'utilisation du composé chitosane-PEI comme système de livraison, l'inhibition de l'expression du gène cible était 2.5 fois plus efficace et la viabilité des cellules était 2 fois plus grande comparativement à l'utilisation du PEI seul (Jere *et al.* 2009).

Les nanocomplexes formés de chitosane et d'ARN interférents ont été étudiés *in vivo* afin de traiter éventuellement différentes maladies ou pathologies telles que le cancer de la thyroïde (de Martimprey *et al.* 2008), le cancer du sein (Pille *et al.* 2006; Tan *et al.* 2007), le cancer des poumons (Jere *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2009), le cancer des tissus connectifs (Wang *et al.* 2009), les maladies inflammatoires (Andersen *et al.* 2008), les maladies des muqueuses (Howard *et al.* 2006), l'arthrite (Howard *et al.* 2009), les maladies infectieuses causés par le virus respiratoire syncytial (RSV) (Kong *et al.* 2007) asthme (Wang *et al.* 2008) et le glaucome (Duan *et al.* 2008). Des études ont aussi démontré que des nanocomplexes de chitosane-siARN de faible taille (20 nm) ont un potentiel intéressant pour livrer les siARN dans les tissus neuronaux, ouvrant la possibilité de traiter des maladies touchant ce type de tissus (Malhotra *et al.* 2009).

Des études plus poussées sont nécessaires pour évaluer le potentiel de l'utilisation des nanocomplexes siARN/chitosane en thérapie génique pour le traitement du diabète de type 2.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Préparation des formulations de chitosane

Les échantillons de chitosane Ultra pur (Ultrasan™) ont été fournis par la compagnie Biosyntech Inc. (Laval Qc., Canada). Les échantillons ont été soumis à un contrôle de qualité et leur purification a été assurée par des procédés qui ont permis d'éliminer les contaminants de protéines, d'endotoxines bactériennes et de métaux toxiques. Les échantillons de chitosane ont été dépolymérisés et caractérisés tel que décrit par Lavertu et al. (Lavertu *et al.* 2006b). Différentes formulations de chitosane ont été produites pour préparer les nanocomplexes ADN/chitosane. La variation entre les différentes formulations se trouve au niveau du pourcentage de désacétylation (DD), de la masse moléculaire moyenne en nombre (Mn) et du ratio amine du chitosane : phosphate de l'ADN (N:P). Les trois formulations de chitosane retenues et utilisées pour préparer les nanocomplexes ADN/chitosane dans ce projet de recherche sont les formulations de chitosane 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 [DD-M_n-ratio N:P].

Table III : Chitosanes utilisés pour le projet

Chitosane	DD (%)	Mn	N° Lot	N° CHEM
92-10	92,7	9,2	D-BST-60-10-1	2039
80-10	80,0	12,40	D-BST-57-10-2	2987
80-80	80,0	93,8	D-BST-57-80-1	2041

2. Transfection de cellules humaines *in vitro* avec les nanocomplexes chitosane-ADN

Préalablement à l'utilisation des différents nanocomplexes formés de chitosane et d'ADN, *in vivo* dans un modèle animal, nous avons d'abord testé leur efficacité comme véhicule de transfection d'ADN, *in vitro*, en utilisant des lignées cellulaires humaines.

2.1. Préparation du chitosane

Des solutions de 5 mg/ml des chitosanes 92-10, 80-10 et 80-80 [DDA-Mn] ont été préparées dans de l'eau déionisée en ajoutant du HCl (1N) de façon à obtenir un ratio monomère glucosamine: HCl de (1 : 1). La dissolution du chitosane a été assurée par une incubation de 16 heures sous agitation constante. Les chitosanes ont été filtrés sur des filtres à seringue de 0,22 µm, puis ont été dilués dans l'eau stérile de façon à obtenir le ratio amine de chitosane : phosphate d'ADN de 5 :1 ou 10 :1. Trois formulations ont été ainsi préparées : 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-80 [DD-M_n-ratio N:P].

La dilution du chitosane nécessaire pour obtenir le ratio N :P désiré, lorsqu'un volume du chitosane dilué est ajouté à un volume d'ADN, est calculée selon la formule suivante :

$$V_i \text{ Chitosane} = \left\{ \frac{(V_{ADN} * C_{ADN})}{M} * \text{Ratio désiré} \right\} * \left\{ \frac{Mm \text{ chito}}{[(DD\%/100) * V_{chito}]}\right\} * (V_f / C_i)$$

V_{ADN} : Volume de l'ADN (µl)

C_{ADN} : Concentration de l'ADN (µg/µl)

M : Masse moléculaire moyenne des acides nucléiques = 309 g/mol

Mm chito : Masse moléculaire du chitosane (g/mol)

V_f : volume final (c-à-d le volume total une fois le chitosane ajouté à l'ADN) (ml)

C_i : concentration initiale du chitosane (5mg/ml)

Voici un exemple de calcul, pour déterminer la dilution du chitosane nécessaire afin d'obtenir un ratio N : P de 5, lorsque la concentration initiale de chitosane 92-10 (Mm 164,56) est de 5 mg/ml, que la concentration d'ADN est de 0,33 µg/µL et que le volume final de chitosane dilué désiré est de 0,4ml :

$$V_i \text{ Chitosane} = \left\{ \frac{(200 \mu\text{l} * 0,33 \mu\text{g}/\mu\text{l})}{309} * 5 \right\} * \left\{ \frac{164,56 \text{g}/\text{mol}}{[(92/100) * 200 \mu\text{l}]} \right\} * \left(\frac{0,4 \text{ ml}}{5 \text{mg}/\text{ml}} \right) = 0,076 \text{ mL}$$

Dans cet exemple, 76 µl de chitosane (5 mg/ml) doit être ajouté à 324 µl H₂O (total 0,4 ml) pour obtenir une solution de chitosane dilué ayant un ratio N :P de 5 lorsqu'un volume de ce chitosane dilué est mélangé à un volume d'ADN (0,33 µg/µl).

2.2. Préparation des nanocomplexes pADN/chitosane

Un volume de 100 µl de la solution de chitosane à 5 mg/ml préparée telle que décrite dans la section 2.1 de ce chapitre, au ratio N: P désiré a été mis dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant un volume de 100 µl d'ADN plasmidique (pADN) (ex. pEGFPLuc ou pVax-LacZ) à une concentration de 0,33 µg/µl (préparé dans l'eau déionisée et stérile). Les solutions ont été immédiatement et vigoureusement mélangées par pipetage puis ont été incubées durant 30 minutes à la température de la pièce afin d'assurer la formation complète des nanocomplexes pADN/chitosane. Les volumes de chitosanes et d'ADN utilisés pour préparer les nanocomplexes peuvent varier entre 25 µl et 200 µl selon les besoins. Par contre, il est primordial de garder des volumes égaux de chitosane et d'ADN.

2.3. Lignées cellulaires : conditions de culture et procédure de transfection

Trois lignées cellulaires humaines ont été utilisées lors de nos expériences. Il s'agit des cellules épithéliales adhérentes HepG2, HT-29 et Caco-2 (ATCC) qui expriment l'enzyme DPP-IV responsable de la dégradation du GLP-1. Les HepG2 sont des cellules du foie et proviennent d'un carcinome hépatocellulaire. Ces cellules HepG2 possèdent des récepteurs pour l'insuline et l'insuline-like growth factor II (IGF II). Les cellules Caco-2 et HT-29 sont des cellules du colon qui proviennent d'un adénocarcinome colorectal. Les cellules HEK 293 sont des cellules rénales embryonnaires humaines (épithéliales et adhérentes) qui peuvent être transfectées avec les nanocomplexes ADN/chitosane (Lavertu *et al.* 2006b). Ainsi, les cellules HEK 293 ont été utilisées comme contrôle positif.

Les cellules HepG2 ont été maintenues en culture à 37 °C et 5 % de CO₂ dans du milieu MEM «minimum Essential medium» (GIBCO) contenant 8% de Sérum fœtal bovin (SFB) (GIBCO) décomplémenté. Les cellules Caco-2 ont été maintenues en culture à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu MEM (GIBCO) contenant 1 mM de Sodium de pyruvate (GIBCO), 0,15 % de sodium de bicarbonate (GIBCO), 0,1 mM d'aminos acides non essentiels (GIBCO) et 10% de SFB (GIBCO) décomplémenté. Les cellules HT-29

ont été maintenues en culture à 37 °C et 5% de CO₂ dans du milieu Mc Coy's 5 A (GIBCO) contenant 0,22 % de sodium de bicarbonate (GIBCO) et 10 % de SFB (GIBCO) décomplémenté. Les cellules HEK 293 ont été maintenues en culture à 37°C et 5% de CO₂ dans du milieu DMEM «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (DMEM) contenant 10 % de SFB décomplémenté.

Les quatre lignées cellulaires ont été mises en culture dans des plateaux de 24 puits (Corning), à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules HepG2/ puits, $2,0 \times 10^5$ cellules HT-29/ puits, $1,0 \times 10^5$ cellules Caco-2/ puits et $7,5 \times 10^5$ cellules HEK 293/ puits. Le nombre de cellules utilisé pour démarrer les cultures cellulaires est choisi de façon à obtenir une confluence de 50% le jour de la transfection. Ce nombre est déterminé en se basant sur les courbes de croissance que nous avons préétablies pour chacune des lignées cellulaires. Après 24 heures d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, le milieu de culture dans chaque puits a été aspiré puis remplacé par le milieu de transfection dans un volume final de 500 µl/ puits.

La préparation du milieu de transfection a été effectuée séparément dans des plateaux 24 puits où 15,2 µl ou 30,4 µl de chaque échantillon de nanocomplexes, ont été mélangé avec le milieu DMEM (MES (acide 2-(N-Morpholino) éthanesulfonique) 5mM, NaHCO₃ 10 mM) (pH 6,5) dans un volume final de 500 µl/ puits. Les plateaux contenant le milieu de transfection ont été incubés à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 10 minutes, ensuite le contenu de chaque puits a été transféré vers les puits correspondants, dans les plateaux contenant les cellules à confluence pour remplacer l'ancien milieu de culture et déclencher la transfection. La quantité d'ADN plasmidique ajoutée aux cellules était de 2,5 µg ou 5 µg par puits, ce qui correspond à 1,3 µg/cm² ou 2,6 µg/cm² respectivement. Les plateaux contenant les cellules et le milieu de transfection ont été incubés 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Ensuite, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu frais puis les cellules ont été réincubées durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. L'efficacité de transfection a été ensuite évaluée par des tests enzymatiques ou des tests ELISA.

3. Transfection des cellules humaines *in vitro* avec les lipoplexes (pADN/lipofectamine)

La lipofectamine est une formulation de liposome formé, a un ratio 3 :1 (w/v), d'un lipide polycationique, le 2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)éthyl]-N, N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacétate (DOSPA) et d'un lipide neutre, le dioléoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE). La lipofectamine a été utilisée comme contrôle positif lors des transfections cellulaires. Les cellules ont été maintenues en culture dans des plateaux 24 puits tel que décrit dans la section 2.3 de ce chapitre. Pour la préparation des lipoplexes pADN/lipofectamine, l'ADN plasmidique a été préparé en diluant 0,4 µg d'ADN plasmidique dans 25 µl de milieu sans sérum et la lipofectamine a été préparée en diluant 5 µl de lipofectamine (Invitrogen) dans 25 µl de milieu sans sérum. Après 5 minutes d'incubation, le volume de lipofectamine a été mélangé au volume d'ADN dans un tube eppendorf de 1,5 ml, ce mélange a été incubé durant 20 minutes à la température de la pièce afin d'assurer la formation complète des lipoplexes pADN/lipofectamine. Une fois l'incubation terminée, 150 µl de milieu sans sérum ont été ajoutés au tube eppendorf contenant les lipoplexes pADN/lipofectamine pour obtenir la solution de transfection. Parallèlement, le milieu de culture des cellules confluentes a été aspiré puis remplacé par 200 µl/puits de milieu sans sérum et 200 µl de la solution de transfection contenant les lipoplexes pADN/lipofectamine ont été déposés dans chaque puits. Les plaques contenant les cellules et le milieu de transfection ont été incubées durant 4 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Comme la lipofectamine est cytotoxique, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet contenant du sérum puis les cellules ont été réincubées durant 20 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Ensuite, le milieu a été remplacé par du milieu complet frais et les cellules ont été réincubées durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. L'efficacité de transfection a été ensuite évaluée par des tests enzymatiques.

3.1. Test enzymatique de la luciférase

Dans cette étude, le plasmide pEGFPLuc (Clontech) (figure 7 a) codant pour le gène de la luciférase a été utilisé pour quantifier l'expression de la luciférase dans les cellules transfectées avec des nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane. Le gène de la luciférase est un gène rapporteur très sensible étant donné l'absence d'activité endogène de la luciférase dans les cellules de mammifères. La luciférase est une enzyme qui catalyse l'oxydation de la luciférine, de façon ATP-dépendante, en oxyluciférine provoquant ainsi l'émission de photons. La lumière émise par la réaction est concentrée à 560 nm et est directement proportionnelle au nombre de molécules de luciférase exprimées.

Les cellules HepG2, Caco-2, HT-29 et HEK 293 ont été mises en culture et transfectées tel que décrit dans la section 2.3 de ce chapitre. 48 heures après la transfection, le milieu des cellules transfectées a été aspiré puis un volume de 100 µl de tampon de lyse (Glo Lysis Buffer) (Promega) a été ajouté dans chacun des puits. Ensuite, les cellules ont été incubées durant 5 minutes à la température de la pièce afin d'assurer la lyse complète des cellules transfectées. Un volume de 25 µl des cellules lysées a été transféré dans un plateau luminomètre 96 puits (Fisher). Dans ce même plateau, un volume de 25 µl du réactif de la luciférase (Bright-Glo™) (Promega) a été ensuite ajouté au lysat cellulaire. La luminescence de la luciférase a été immédiatement mesurée en utilisant l'appareil Infinite 200 series (Tecan). L'instrument mesure la luminescence en RLU/min (unité de lumière relative par seconde). Les données en RLU/min ont été standardisées en fonction du nombre de protéines cellulaires totales (RLU/min*protéine totale). La quantification des protéines cellulaires totales a été réalisée par la réaction de Biuret (Smith *et al.* 1985) en utilisant le système Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Le principe de ce système est basé sur la formation de complexes entre le Cu^{2+} et les liaisons peptidiques qui donnent une couleur mauve quantifiable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm. La quantité de protéines totales est proportionnelle à la valeur de l'absorbance et est déterminée en (mg) à partir d'une courbe standard d'albumine bovine (BSA).

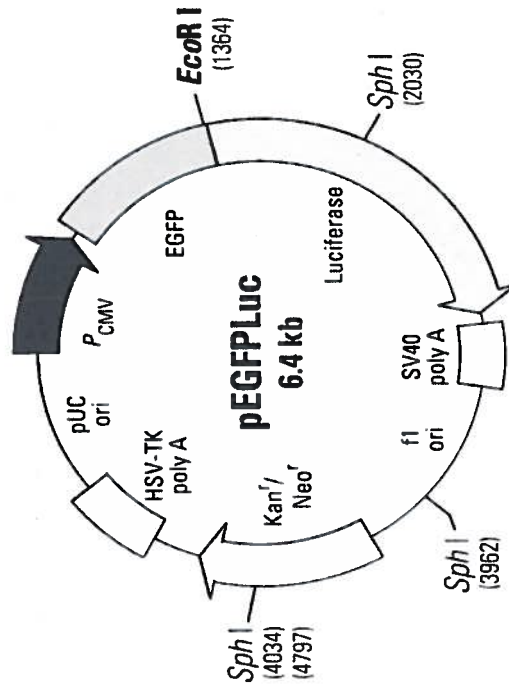
3.2. Test enzymatique de la β -galactosidase

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de la transfection des différentes lignées cellulaires avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane, le plasmide recombinant pVax-LacZ (invitrogen) qui porte le gène codant pour la β -galactosidase (figure 7 b) été complexé aux différentes formulations de chitosane et les nanocomplexes ont servi à la transfection des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29. La β -galactosidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse du X-gal (5-bromo-3-indoyl- β -D-galactopyranoside). Suite à la fixation et l'incubation des cellules dans le substrat X-gal, les cellules transfectées qui expriment le transgène β -galactosidase deviennent bleues.

Figure 7 : Vecteurs recombinants utilisés pour la transfection et l'analyse de l'expression des gènes recombinants *in vitro*.

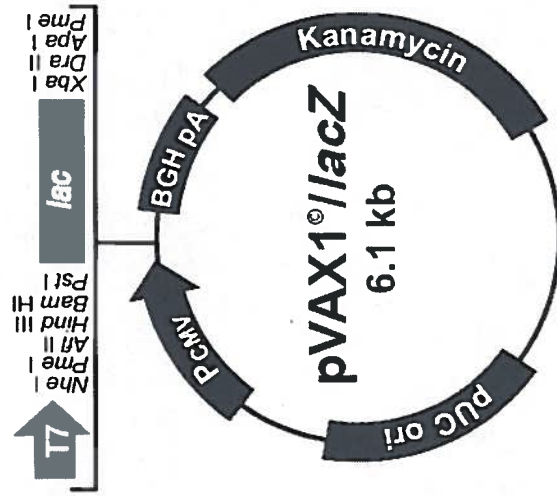
- a) pEGFPLuc
- b) pVax1/ LacZ

a)



- Promoteur cytomégalo virus (CMV): bases 1-589
- Gène de la protéine fluorescente verte (EGFP): 613-1329
- Gène de la luciférase de la luciole (Luc): 1369-3018
- Signal de polyadénylation du virus simien 40 (SV40): 3186-3226
- Origine simple brin f1: bases 4079-4214
- Promoteur SV40: bases 3912-4180
- Gène de résistance à la kanamycine: bases 4263-5057
- Signal de polyadénylation du virus Herpès simplex (HSV): bases 5293-5311
- Origine de réplication (pUC ori): bases 5642-6285

b)



- Promoteur cytomégalo virus (CMV): bases 137-724
- Promoteur T7/site d'amoçage: bases 664-683
- Gène LacZ: bases 773-3829
- Signal de polyadénylation
- Hormone de croissance bovine (BGH) bases 3880-4104
- Gène de résistance à la kanamycine: base 4277-5071
- Origine de réplication (pUC ori): bases 5371-6044

La transfection des cellules avec les nanocomplexes pVax-LacZ/chitosane a été faite dans des plateaux à 8 puits de type «Labtek» (Nalge Nunc International). Les cellules HeG2, HT-29 et Caco-2 ont été mises en culture respectivement à des densités de l'ordre de $1,25 \times 10^5$, 10^5 et 5×10^4 cellules par puits. Ensuite, les cellules ont été incubées durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Les nanocomplexes ont été préparés tel que décrit à la section 2.2 de ce chapitre. Les transfusions ont été réalisées tel que décrit dans la section 2.3 de ce chapitre. La quantité d'ADN plasmidique ajoutée par puits était de 1,25 µg ou 2,5 µg par puits ce qui correspond à 1,3 µg/cm² ou 2,6 µg/cm². Les plateaux contenant les cellules et le milieu de transfection ont été incubés durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Ensuite, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu frais puis les cellules ont été réincubées durant 24 heures à 37 °C, 5 % CO₂.

L'efficacité de transfection a été ensuite évaluée par un test enzymatique de la β-galactosidase. Ainsi, le milieu a été enlevé des puits contenant les cellules transférées et les puits ont été lavés 2 fois avec 400 µl/puits de tampon PBS 1×. Ensuite, les cellules ont été fixées en ajoutant 500 µl/puits de solution de fixation (2% formaldéhyde et 0,2% glutaraldéhyde dans du tampon PBS 1×) puis incubées durant 10 minutes à la température de la pièce. Après la fixation, les puits ont été lavés 2 fois avec 400 µl/puits de tampon PBS 1×, puis 400 µl/puits de la solution de coloration X-Gal (1 mg/ml de X-Gal, 4 mM de K₃ [Fe(CN)₆], 4 mM de K₄ [Fe(CN)₆], 2 mM de MgCl₂ dans un tampon PBS 1×) ont été ajoutés. Après une incubation de 2 heures à 37 °C, les puits ont été lavés 2 fois avec 400 µl/puits de tampon PBS 1× pour enlever le surplus de la solution de coloration. Les puits ont été détachés du plateau labtek. Ensuite, la surface de la lame, où les cellules se sont adhérent, a été recouverte d'une solution PBS 1× contenant 70% de glycérol et d'une lamelle. Des images digitales des cellules ont été prises avec un microscope Zeiss Axiolab équipé d'une caméra analogue Hitachi HV-F22. Le logiciel Northern Éclipse (Mississauga, Ontario, Canada) a été utilisé pour l'analyse des cellules transférées. Le nombre de cellules bleues est proportionnel au nombre de cellules transférées.

4. Test de viabilité des cellules transfectées avec des nanocomplexes pADN/chitosane.

L'analyse de la prolifération cellulaire est importante pour évaluer l'effet du chitosane sur la viabilité des cellules. La résazurine «AlamarBlue» (Invitrogen) a été utilisée comme indicateur de l'activité mitochondriale des cellules transfectées. La résazurine est un indicateur non fluorescent qui se transforme en un intense rouge fluorescent via les réactions de réduction du métabolisme des cellules actives. La quantité de fluorescence produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les cellules endommagées ou non viables ont une faible activité métabolique ce qui génère un signal proportionnellement faible comparativement aux cellules en santé.

Les cellules HepG2, Caco-2 ou HT-29 ont été mises en culture dans des plateaux 96 puits à une densité de 3200, 6400 et 6400 cellules/puits respectivement, ont été incubées durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂ puis elles ont été transfectées avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane tel que décrit dans la section 2.3 de ce chapitre. La quantité pEGFP_{Luc} ajoutée aux cellules correspond à 1,3 µg/cm² ou 2,6 µg/cm². Les plateaux contenant les cellules et le milieu de transfection ont été incubés durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Pour mesurer la viabilité des cellules, le milieu a été aspiré des puits et 100 µl/ puits d'AlmarBlue®, dilué 1 :10 dans du milieu de culture, ont été ajoutés sur les cellules après 4 heures d'incubation à 37 °C, les surnageants dans chaque puits ont été récupérés et leur fluorescence a été mesurée par spectrométrie en utilisant l'appareil Infinite 200 (Series Tecan) à des longueurs d'onde excitation/émission de 560 nm/590 nm.

5. Clonage du gène codant pour le proglucagon

5.1. Synthèse de l'ADNc du proglucagon

5.1.1. Extraction de l'ARN total

L'ARN total a été extrait à partir d'un tissu intestinal provenant d'un rat Wistar (Laboratoires Charles River) nouveau-né (1 jour). Les échantillons de tissu ont été prélevés et broyés dans des tubes eppendorf 1,5 ml (sans RNase) contenant 500 µl de TRIzol® avec un homogénéisateur (Dremel Minimite). Après l'homogénéisation des tissus, le volume a été complété à 1 ml avec du TRIzol® et les échantillons ont été incubés 5 minutes à la température de la pièce. La phase supérieure contenant l'ARN a été prélevée et transvasée dans un tube eppendorf 1,5 ml. Pour éliminer le TRIzol, un volume de 200 µL de chloroforme a été ajouté et les échantillons ont été mélangés durant 15 secondes par inversion. Les échantillons ont été incubés 3 minutes à la température de pièce puis ils ont été centrifugés à $12\ 000 \times g$ durant 15 minutes. Suite à la centrifugation, la phase aqueuse contenant l'ARN a été transférée dans un nouveau tube eppendorf sans RNase. L'ARN a été précipité en ajoutant 500 µl d'isopropanol par ml de TRIzol® en mélangeant vigoureusement et en incubant 10 minutes à la température de la pièce. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à $12\ 000 \times g$ durant 10 minutes puis le surnageant a été soigneusement éliminé. L'ARN précipité sous forme de culot a été ensuite lavé en ajoutant 1 ml d'éthanol 75 % et en centrifugeant à $10\ 000 \times g$ durant 5 minutes. Le surnageant a été soigneusement enlevé et le culot d'ARN a été séché en laissant les tubes ouverts sous une hotte chimique pendant 1 heure. Finalement, l'ARN a été dissous dans 45 µl d'eau traitée au DiéthylènePyrocarbonate (DEPC) contenant du RNAGuard (un inhibiteur de ribonucléase) à une concentration de 2 unités/µl d'échantillon.

La concentration de l'ARN extrait a été quantifiée en utilisant un spectrophotomètre (modèle 6405 UV/Vis, JENWAY) à une longueur d'onde de 260 nm. Les échantillons d'ARN extraits ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose

0,8% contenant le formaldéhyde selon la méthode décrite par Sambrook et al., 1989. Le gel d'agarose a été préparé dans un tampon de formaldéhyde [0,02 M MOPS (pH7.0), 8 mM d'acétate de sodium, 1mM EDTA (pH 8.0), 2,2 M de formaldéhyde]. L'eau utilisée pour faire le tampon a été traitée au DEPC afin d'éliminer la présence d'RNase qui peut dégrader les échantillons d'ARN extraits. Les échantillons ont été incubés durant 15 minutes à 65°C puis refroidis sur glace avant d'être brièvement centrifugés à 10 000 ×g. Un volume de 15 µl d'ARN a été mélangé à un volume de 4 µl de tampon de charge (50% (v/v) glycérol, 1 mM EDTA (pH8,0), 0,25% (p/v) bromophénol bleu et 0,25% (p/v) de xylène cyanol FF. Des volumes de 15 µl des échantillons ainsi que les marqueurs de poids moléculaires 1 kb ont été chargés dans les puits du gel d'agarose et l'électrophorèse a duré 1h00 dans du tampon de formaldéhyde sous un voltage constant (5V/cm). Le gel a été coloré au bromure d'éthidium et les bandes ont été visualisées sous les rayons UV d'un transluminateur (Bio-Rad).

5.1.2. Réaction de transcription inverse

Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour synthétiser l'ADNc du proglucagon par la technique de RT-PCR (transcription inverse couplée à la PCR) ont été choisies en se basant sur les séquences en amont et en aval du gène du proglucagon (Mojsov *et al.* 1986). L'amorce sens (FW-proglucagon) était composée de 18 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5' GCA GAA CAC ACT CAA AGT TC 3') était identique à la séquence située à 81 nucléotides en amont du gène codant pour le proglucagon. Pour sa part, l'amorce antisens (RV-proglucagon) était composée de 19 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5' GCT GAG CGA TTT ATG ACA A 3') était identique à la séquence située à 393 nucléotides en aval du gène codant pour le proglucagon. Les amorces FW-proglucagon et RV-proglucagon sont présentées à la figure 7.

Pour synthétiser l'ADNc, l'ARN total a d'abord été dénaturé par une incubation à 65 °C pendant 5 minutes. L'ADNc a été synthétisé en utilisant le système ThermoScript RT-PCR (Invitrogen). Ainsi, 460 ng d'ARN total a été utilisé dans un volume réactionnel final de 20 µl contenant du tampon de synthèse d'ADNc, un mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration de 1mM de chaque dNTP, des oli(dT)₂₀ à une concentration de 2,5 µM, des DTT à une concentration de 5 M, 40 unités d'un inhibiteur de RNase (RNaseOUT) et 15 unités de la transcriptase inverse (Thermoscript RT). La réaction de transcription inverse par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable d'AB Applied Biosystems (Gene AmpPCRsystem 9700). Les échantillons ont été soumis à une température de 50 °C pendant 60 minutes puis à une température de 85 °C pendant 5 minutes. Ensuite, 2 unités d'RNase ont été ajoutées et les échantillons ont été incubés durant 20 minutes à 37 °C avant d'être utilisés pour la réaction d'amplification par PCR.

Figure 8: Séquence nucléotidique des exons du gène codant pour le proglucagon.

La séquence en acide nucléique du gène codant pour le proglucagon. La séquence en rouge correspond à la séquence codante pour glucagon, en bleu la séquence codante pour le GLP-1 et en vert la séquence codante pour le GLP-2. Les zones ombragées correspondent, dans l'ordre, au site d'initiation (codon d'initiation), au site de terminaison (codon stop) et aux sites de polyadénylation du proglucagon. Les encadrés correspondent aux amorces utilisées pour synthétiser l'ADNc du proglucagon et pour amplifier la séquence codante pour le GLP-1 (7-37) et ses variantes la [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et la [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)] par des réactions PCR et PCR par mutagenèse.

Proglucagon humain: GeneID: 2641

Proglucagon du rat GeneID: 24952

FW-Proglucagon

AGAAG GGCAGAGCTT GGGC BCAGAA CACTCTCAA GTTC CCAAAG GAGCTCCACC TGTCTACACC

Codon d'initiation

TCCTCTCAGC TCAGTCCCAC AAGGCAGAAT AAAAA ATG AAG ACC GTT TAC ATC GTG GCT GGA TTG TTT GTA

ATG CTG GTA CAA GGC AGC TGG CAG CAT GCC CCT CAA GAC ACG GAG GAG AAC GCC AGA TCA TTC CCA

GCT TCC CAG ACA GAA CCA CTT GAA GAC CCT GAT CAG ATA AAC GAA GAC AAA CGC CAT TCA CAG GGC

Glucagon

ACA TTC ACC AGT GAC TAC AGC AAA TAC CTA GAC TCC CGC CGT GCT CAA GAT TTT GTG CAG TGG TTG ATG

FW-GLP-1 (7-37)/ Fw- [Ser⁸]/FW-[Tyr⁹]

AAC ACC AAG AGG AAC CGG AAC AAC ATT GCC AAA CGT CAT GAT GAA TTT GAG AGG CAT GCT GAA GGG

GLP-1

ACC TTT ACC AGT GAT GTG AGT TCT TAC TTG GAG GGC CAG GCA GCA AAG GAA TTC ATT GCT TGG CTG

RV-GLP-1(7-37)

GTG AAA GGC CGA GGA AGG CGA GAC TTC CCG GAA GAA GTC GCC ATA GCT GAG GAA CTT GGG CGC AGA

CAT GCT GAT GGA TCC TTC TCT GAT GAG ATG AAC ACG ATT CTC GAT AAC CTT GCC ACC AGA GAC TTC ATC

GLP-2 Codon stop

AAC TGG CTG ATT CAA ACC AAG ATC ACT GAC AAG AAA TAG GAATATT TCACCATTCA CAACCATCTT

CACAACATCT CCTGCCAGTC ACTTGGGATG TACATTTGAG AGCATATACC GAAGCTATAC TGCTTGGCAT

GCGGACGAAT ACATTTCCCT TTAGCGTTGT GTAACCCAAA GGTTGTAAT GGAATAAAGT TTTTCCAGGG

TGTTGATAAA GTAACAACTT TACAGTATGA AAATGCTGGA TTCTCAAATT GTCTCCTCGT TTTGAAGTTA

CCGCCCTGAG ATTACTTTTC TGTGGTATAA ATTGTAAATT ATCGCAGTCA CGACACCTGG ATTACAACAA

CAGAAGACAT GGTAACCTGG TAACCGTAGT GGTGAACCTG GAAAGAGAAC TTCTTCTTG AACCCTTGT

RV-Proglucagon

CATAAATGCG CTCAGC TTC AATGATCAA GAATAGATTT AAATAA ATAT CTCATC

D'après la séquence du preproglucagon (Mojsov *et al.* 1986)

5.2. Amplification par PCR de l'ADNc du proglucagon

Pour la réaction d'amplification, 10 % du volume réactionnel de la transcription inverse a été utilisé comme matrice. Cet ADNc matrice a été utilisé dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant du tampon (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), un mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration de 0,2 mM de chaque dNTP, les amorces FW-proglucagon et RV-proglucagon à une concentration de 0,2 µM chacune, et 1 unité de l'enzyme Platinum Taq polymérase (Invitrogen). La réaction d'amplification par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable d'AB Applied Biosystems (Gene Amp PCR system 9700). La réaction a été précédée par une étape de dénaturation de 15 minutes à 94 °C. Les paramètres expérimentaux au cours du cycle d'amplification ont été choisis comme suit : dénaturation de l'ADN matrice pendant 30 secondes à 94 °C, appariement des amorces à l'ADN matrice dénaturé pendant 30 secondes à 46 °C et extension, par la Taq polymérase, des amorces pendant 1 minute à 72 °C. Ce cycle a été répété 30 fois et suivi d'une étape d'extension de 10 minutes à 72 °C qui a permis d'obtenir des amplicons de pleines longueurs. Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

Le produit PCR a été purifié en utilisant un filtre microcon®PCR (Millipore, Canada). Le produit PCR, placé dans un filtre, a été filtré suite à une centrifugation à 1 000 ×g pendant 15 minutes. Le produit PCR purifié a été récupéré en ajoutant 20 µl d'eau stérile sur le filtre et en centrifugeant le filtre à 1 000 ×g pendant 2 minutes en position inversée dans un tube collecteur. Le fragment d'ADN purifié a été conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation ultérieure.

5.3. Clonage du fragment d'ADN codant pour le proglucagon dans le vecteur pCR®2.1

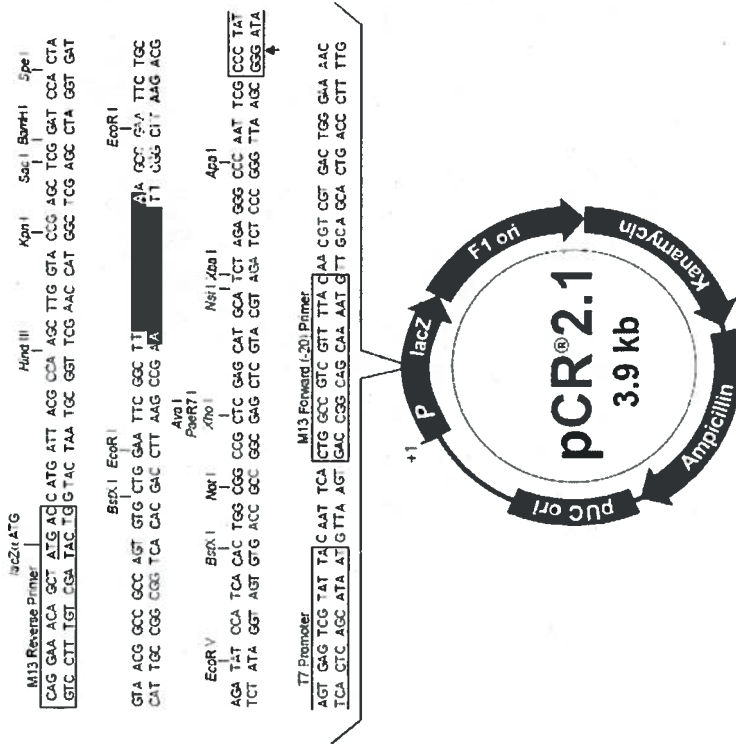
Le fragment amplifié a été cloné dans le vecteur pCR®2.1 (Invitrogen Corporation) (figure 9 a) afin de conserver sa stabilité et son intégrité et de faciliter son sous-clonage dans le vecteur d'expression pVax. Ainsi, le fragment d'ADN amplifié a été cloné dans le vecteur de clonage pCR®2.1, en utilisant le système de clonage TA cloning®Kit d'Invitrogen Corporation.

L'amplicon a été cloné dans le vecteur de clonage pCR®2.1 (Invitrogen Corporation) à l'aide de l'enzyme T4 ADN ligase qui forme des liaisons phosphodiester entre les extrémités 3'OH et les extrémités 5'phosphate de deux nucléotides. Ainsi, 10 ng d'ADN amplifié et 50 ng d'ADN plasmidique ont été mélangés en présence de tampon de ligation (Tris-HCl 6 mM (pH 7,5), MgCl₂ 6 mM, NaCl 5 mM, BSA (1mg/ml), β-mercaptoéthanol 7 mM, l'ATP 0,1 mM, DDT 2 mM, spermidine 1 mM) et en présence de 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase dans un volume final de 10 µl. Le mélange a été incubé pendant 18 heures dans un bain à 14°C afin de permettre la ligation de l'amplicon et du vecteur pCR®2.1. Le produit de ligation a été ensuite conservé à 4°C jusqu'à l'étape de la transformation des cellules bactériennes compétentes.

Figure 9 : Vecteurs de clonage et d'expression

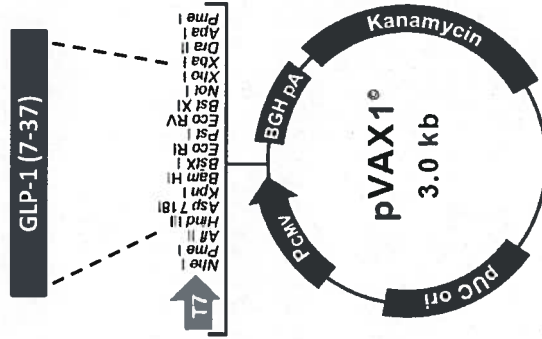
- a) Clonage du gène proglucagon dans le vecteur de clonage PCR 2.1
- b) Clonage du GLP-1 (7-37) et ses variantes dans le vecteur d'expression eucaryotique pVax1.

a)



- Gène LacZα: bases 1-545
- Site d'amorçage M13 reverse: bases 205-221
- Promoteur T7: bases 362-381
- Site d'amorçage M13 Forward: bases 389-404
- Origine f1: bases 546-983
- Gène de résistance à la kanamycine: bases 1317-2111
- Gène de résistance à l'ampicilline: bases 2129-2989
- Origine de réplication (pUC ori): bases 3134-3807

b)



- Promoteur cytomégalo virus (pCMV): bases 137-724
- Promoteur T7/site d'amorçage: bases 664-683
- Site de clonage multiple: bases 696-811
- Site d'amorçage BGH reverse: bases 823-840
- Signal de polyadénylation du BGH: bases 829-1053
- Gène de résistance à la kanamycine: bases 1226-2020
- Origine de réplication (pUC ori) : bases 2320-2993

5.3.1. Transformation des cellules bactériennes *E. coli* (INV α F')

La réaction de transformation des cellules bactériennes *E. coli* INV α F' compétentes a été réalisée en utilisant le système « TA cloning®Kit » d'Invitrogen Corporation. Ainsi, 50 μ l de bactéries *E. coli* INV α F' compétentes « One Shot™ » (Invitrogen Corporation) et 2 μ l du produit de ligation ont été incubés pendant 30 minutes sur glace puis soumis à un choc thermique pendant 30 secondes à 42 °C pour permettre la pénétration de l'ADN dans les bactéries. La régénération des parois bactériennes s'est faite durant une incubation de 60 minutes à 37 °C avec agitation (150 rpm) dans 250 μ l de milieu SOC (2,0% p/v tryptone, 0,5 % p/v extrait de levure, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ · 6H₂O, 20 mM glucose). Après ce temps de récupération, des volumes de 20 μ l, 50 μ l et 150 μ l de la suspension de bactéries transformées ont été étalés sur une gélose L-B Luria-Broth (1 % (p/v) bactro-tryptone, 0,5 % (p/v) d'extrait de levure, 1 % (p/v) NaCl, 1,5 % (p/v) d'Agar) contenant 100 μ g/ml d'antibiotique ampicilline et 40 mg/ml du substrat de sélection colorimétrique bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) (Invitrogen Corporation). Les géloses ont été, par la suite, incubées en position inversée pendant 18 heures à 37 °C à l'abri de la lumière avant le début de la sélection des colonies recombinantes.

5.3.2. Sélection des colonies recombinantes et purification de l'ADN plasmidique

Le vecteur pCR®2.1 possède comme marqueur de sélection, le gène de résistance à l'ampicilline. Ainsi, seules les bactéries ayant incorporé le plasmide pCR®2.1 peuvent croître sur un milieu contenant l'ampicilline. La sélection des clones recombinants est basée sur la couleur des colonies (blanches/bleues) découlant de la présence ou non de l'enzyme β -galactosidase fonctionnelle. En fait, la souche bactérienne utilisée possède une mutation au niveau du gène lacZ, elle synthétise donc une β -galactosidase inactive dépourvue de la séquence du peptide α . La séquence du gène LacZ α , présente sur le

plasmide pCR®2.1, code pour le peptide α et permet l' α -complémentation (Ullman *et al.* 1967) de la β -galactosidase. Ainsi, les bactéries ayant incorporées le pCR®2.1 peuvent cliver le substrat X-gal par l'activité de la β -galactosidase et produire un produit bleu (colonie bleue). L'insertion d'un fragment d'ADN dans le vecteur pCR®2.1 interrompt le cadre de lecture du gène codant pour le peptide α , empêcher l' α -complémentation et prohibe la dégradation du substrat X-gal (colonie blanche).

Ainsi, des colonies bactériennes recombinantes, transformées par le vecteur recombinant PCR2.1/proglucagon, ont été collectées etensemencées dans 3 ml de milieu de culture bactérien LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. Après une incubation de 18 heures à 37°C, 1,5 ml de chaque culture bactérienne a été utilisé pour l'extraction de l'ADN plasmidique en utilisant le système « QIA prep ® Miniprep » de Qiagen. Les volumes prélevés de chaque culture bactérienne ont été centrifugés à 13 000 \times g pendant 1 minute. Les surnageants ont été éliminés et les culots bactériens ont été resuspendus dans 250 μ l de tampon de suspension (Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8,0)) contenant 0,1 mg/ml de ribonucléase A. Les parois bactériennes ont été digérées avec 250 μ l de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1 % SDS (p/V) durant 5 minutes à la température de la pièce. Les lysats bactériens ont été par la suite neutralisés avec 350 μ l de tampon de neutralisation (3 M acétate de potassium (pH 5,5)). Après une centrifugation à 10 000 \times g pendant 10 minutes pour précipiter l'ADN génomique, les débris cellulaires et le SDS, les surnageants ont été transférés sur des filtres composés d'une membrane de gel-Silice (Qiagen). Les filtres ont été insérés dans un tube collecteur puis centrifugé à 10 000 \times g pendant 1 minute. Ils ont été ensuite lavés deux fois avec 750 μ l de solution de lavage (75% éthanol) suivit d'une centrifugation à 10 000 \times g pendant 1 minute. L'ADN plasmidique a été élué du filtre en ajoutant 50 μ l d'eau puis récupéré suite à une centrifugation de 1 minute à 10 000 \times g.

La présence du gène codant pour le proglucagon à l'intérieur des plasmides recombinants a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les

enzymes de restriction *Hind* III et *Xho* I (Invitrogen Corporation). Pour ce faire, 3 µl (0,2 µg) d'ADN plasmidique purifié a été incubé en présence de 10 unités de l'enzyme de restriction *Xho* I et *Hind* III et de tampon de digestion « react®2 » (5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM MgCl₂, 5 mM NaCl) (Invitrogen Corporation) dans un volume total de 20 µl, pendant 60 minutes à 37 °C. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Des plasmides recombinants PCR2.1-proglucagon ont été séquencés par la technique de Sanger (Sanger, 1977) (service de séquençage du laboratoire de Génome Québec) pour s'assurer de l'intégrité de la séquence du gène codant pour le proglucagon. Le séquençage a nécessité l'utilisation d'une amorce sens (amorce universelle T7) et une amorce antisens (amorce universelle Sp6) complémentaire aux séquences situées en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur d'expression pCR2.1. L'analyse des séquences générées a été réalisée en utilisant le logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics, USA).

6. Clonage des séquences d'ADN codant pour le GLP-1 et ses formes variantes

Lors de cette étape du projet, la séquence d'ADN codant pour la forme active du GLP-1, soit le GLP-1 (7-37) a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pVax. Des formes variantes du GLP-1 (7-37) ont été aussi générées afin d'accroître leur résistance à la dégradation par le DPP-IV et augmenter leur demi-vie biologique [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)]. De plus, un site de reconnaissance de la furine a été incorporé dans la séquence recombinante pour générer un résidu histidine en position N-terminale (His⁷) nécessaire à l'activité insulinothropique du GLP-1.

6.1. Amplification par PCR des séquences d'ADN codant pour le GLP-1 et ses formes variantes

L'amplification de la séquence codante pour le peptide GLP-1 (7-37) a été réalisée en effectuant deux réactions PCR successives. Pour la première réaction PCR, les amorces oligonucléotidiques utilisées ont été choisies en se basant sur la séquence décrite par (Fehmann & Habener 1992). L'amorce sens (FW-GLP-1 (7-37)) était composée de 27 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5' AGA AGC AGA AGA CAT GCT GAA GGG ACC 3') était identique à la séquence en 5' de la séquence codante pour le peptide GLP-1 (7-37) et à la séquence en 3' de la séquence codante pour le site de reconnaissance de la furine. Des nucléotides, correspondant au site de clivage reconnu par la furine, ont été ajoutés en amont de l'amorce sens. Ce site permettra de cliver la méthionine située en N-terminal du GLP-1 recombinant lors de son passage dans l'appareil de Golgi et permettra la production d'une forme active du GLP-1 (7-37). Pour sa part, l'amorce antisens (RV-GLP-1(7-37)) était composée de 21 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5'GCT CGA GCT ATC CTC GGC CTT TCA 3') était identique à la séquence, en 3', codante pour le peptide GLP-1. Les séquences correspondantes au gène GLP-1, utilisées pour le choix des amorces sont présentées à la figure 7. Des nucléotides, correspondant au site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction *Xho* I, ont été ajoutés en aval de l'amorce antisens. Pour générer les formes variantes du GLP-1, l'amorce (FW-GLP-1(7-37)) a été remplacée par l'amorce Fw- [Ser⁸] (5' AGA AGC AGA AGA CAT TCT GAA GGG ACC 3') ou FW-[Tyr⁹] (5' AGA AGC AGA AGA CAT GCT TAT GGG ACC 3'). Les acides nucléiques en gras correspondent aux nouveaux nucléotides composant les variantes du GLP-1 (7-37).

Pour la première réaction d'amplification, 10 ng du plasmide recombinant PCR2.1/proglucagon a été utilisé dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant du tampon (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), un mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM de chaque dNTP, les amorces FW-GLP-1(7-37) (ou Fw- [Ser⁸] ou FW-[Tyr⁹]) et RV-GLP-1(7-37) à une concentration de

40 pmoles chacune, et 1,5 unité de l'enzyme Taq polymérase (Stratagen). La réaction d'amplification par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable d'AB Applied Biosystems (Gene AmPCRsystem 9700). La réaction a été précédée par une étape de dénaturation de 5 minutes à 94 °C. Les paramètres expérimentaux au cours du cycle d'amplification ont été choisis comme suit : dénaturation de l'ADN matrice pendant 15 secondes à 94 °C, appariement des amorces à l'ADN matrice dénaturé pendant 30 secondes à 60 °C et extension des amorces, par la Taq polymérase, pendant 30 secondes à 72°C. Ce cycle a été répété 30 fois et suivit d'une étape d'extension de 10 minutes à 72 °C qui a permis d'obtenir des amplicons de pleine longueur. Les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. Le produit PCR a été purifié en utilisant un filtre microcon®PCR (Millipore) tel que décrit dans la section 5.2 de ce chapitre.

Pour la seconde réaction PCR, L'amorce sens (FWGLP-1.2) était composée de 28 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5' G AAG CTT ACC ATG AGA AGC AGA AGA CAT 3') était identique à la séquence reconnue par la furine et aux trois premiers nucléotides en 5' de la séquence codante pour le peptide GLP-1 (7-37). Des nucléotides, correspondant au site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction *HindIII*, à la séquence de Kozak (ACC) (Kozak 1987), et au site d'initiation (ATG) ont été ajoutés en amont de l'amorce sens. L'amorce anticensée RV-GLP-1 (7-37), employée pour la première réaction PCR et contenant le site de restriction reconnu par l'enzyme *XhoI*, a été réutilisée pour la seconde réaction PCR.

Pour la seconde réaction d'amplification, 10 ng de l'amplicon de l'étape précédente a été utilisé comme matrice. Les paramètres expérimentaux au cours du cycle d'amplification étaient les mêmes que ceux de la première réaction PCR.

6.2. Clonage des fragments d'ADN codant pour le peptide GLP-1 et ses formes variantes dans le vecteur pCR@2.1

Afin de stabiliser l'ADN synthétisé, les fragments d'ADN codant pour le peptide GLP-1 (7-37) et ses formes variantes ont été clonés dans le PCR2.1, tel que décrit à la section 5.3 de ce chapitre, pour obtenir les plasmides recombinants PCR2.1/GLP-1

6.3. Sous clonage des fragments codant pour le peptide GLP-1 et ses formes variantes dans le vecteur d'expression pVax.

Les fragments d'ADN codant le peptide GLP-1 (7-37) ou ses formes variantes [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)] ont été sous clonés dans le vecteur d'expression eucaryotique pVax.1 (Invitrogen Corporation) (figure 9 b). Ce vecteur d'expression est pourvu d'une origine de croissance ColE1 qui lui permet de se répliquer en nombreuses copies dans les bactéries *E.Coli*. La transcription du gène d'intérêt, inséré dans le site de clonage multiple du vecteur, est assurée par la présence d'un promoteur du cytomégalo virus humain (CMV) à haut niveau transcriptionnel. De plus, une séquence de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH), située en aval du site de clonage multiple, stabilise les ARNm transcrits. Le gène de résistance à la kanamycine permet la sélection des bactéries transformées.

Le vecteur d'expression pVax (1 µg) et les plasmides recombinants PCR2.1/GLP-1 ont été digérés aux sites de reconnaissances des endonucléases de restriction *Hind*III et *Xho*I situés respectivement en amont et en aval de la séquence codante pour le GLP-1 (7-37) et ses variantes [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)]

Suite à la migration sur gel d'agarose des produits de la digestion, les bandes d'ADN correspondant au vecteur d'expression pVax (3 000 pb) et au gène codant pour le peptide GLP-1 (7-37) et ses formes variantes (125 pb) ont été séparément excisées et extraites du gel d'agarose en utilisant le système sephaglasTM BandPrep (Amersham Pharmacia Biotech inc., Canada). Les gels d'agarose contenant l'ADN d'intérêt ont été dissous par

une incubation avec 250 µl de tampon contenant de l'iodure de sodium (Amersham Pharmacia Biotech inc.), pendant 10 minutes à 60 °C. L'ADN du gel d'agarose dissous a été incubé en présence de 5 µl d'une solution de billes de Sephaglas BP (20 % (p/v) Sephaglas, 0,15 % Kathon™ CG/ICP Biocide) (Amersham Pharmacia Biotech inc.) pendant 5 minutes à la température de la pièce en mélangeant toutes les minutes. L'ADN lié aux billes de Sephaglas a été centrifugé deux fois pendant 30 secondes à 13 000 ×g et lavées trois fois dans le tampon de lavage (20 mM Tris-HCl (pH8,0), 1 mM EDTA et 0,1 mM NaCl, 70 % éthanol) (Amersham Pharmacia Biotech inc.). L'ADN a été élué des billes de Sephaglas en incubant le mélange pendant 5 minutes à la température de la pièce en présence de 10 µl de tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl (pH8,0), 1 mM EDTA) (Amersham Pharmacia Biotech inc.). L'ADN a été récupéré en centrifugeant la suspension à 13 000 ×g pendant 30 secondes et en prélevant le surnageant. Les ADN, correspondant au vecteur d'expression pVax et au gène codant pour le peptide GLP-1 (7-37) et ses formes variantes, extraits du gel ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose de 0,8 %.

La réaction de ligation a été effectuée en incubant 30 ng du vecteur pVax, 60 ng du fragment codant pour le peptide GLP-1 (7-37) et 4 unités T4 ADN ligase dans 10 µl de tampon de ligation (6 mM Tris-HCl PH 7,5, 6 mM MgCl₂, 5 mM NsCl, 0.1 mg BSA, 7 mM β-mercaptoéthanol, 0,1 mM ATP, 2 mM DDT, 1 mM spermidine) pendant 18 heures à 14 °C.

6.3.1. Transformation des cellules bactériennes *E. coli* XL-1Blue

Le produit de ligation a été utilisé pour transformer les cellules bactériennes *E. coli* XL1-Blue compétentes par choc thermique selon la technique tel que décrit dans la section 5.3.1 de ce chapitre. Les cellules bactériennes *E. coli* XL1-Blue compétentes ont été choisies préférentiellement aux cellules bactériennes INVαF' pour permettre une plus grande répliation du plasmide recombinant. Les cellules bactériennes transformées ont étéensemencées sur une gélose LB agar contenant de la kanamycine (50 µg/ml).

6.3.2. Sélection des bactéries *E. coli* XL1-Blue recombinantes

Seules les bactéries transformées peuvent croître sur une gélose LB contenant de l'ampicilline, et ce, grâce au gène de résistance à la kanamycine du vecteur pVax. Des colonies recombinantes ont été ensemencées dans 3 ml de milieu LB liquide contenant 50 µg/ml de kanamycine puis incubées à 37 °C pendant 18 heures. Les plasmides recombinants ont été extraits des bactéries en utilisant le système « mini prep® » de Qiagen. La présence du gène codant pour le peptide GLP-1 à l'intérieur des plasmides recombinants a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction *Hind*III et *Xho*I. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %.

Des plasmides recombinants ont été séquencés par la technique de Sanger (Sanger, 1977) (service de séquençage du laboratoire de Génome Québec) pour s'assurer de la séquence et du cadre de lecture du gène recombinant. Le séquençage nécessite l'utilisation d'une amorce sens (amorce universelle T7) et une amorce anti-sens (amorce universelle BGH reverse) complémentaire aux séquences situées en amont et en aval du site de clonage multiple du vecteur d'expression pVax. L'analyse des séquences générées a été réalisée en utilisant le logiciel « Gene Work 2.5 » (Intelligenetics, USA).

7. Production à grande échelle du plasmide pVax et des plasmides recombinants pVax-GLP-1

La production à grande échelle des plasmides pVax et des plasmides recombinants pVax/GLP-1 a été réalisée à l'aide du système « QIAGEN EndoFree® Plasmid Purification ». Les colonies bactériennes *E. coli* XL1-Blue transformées avec les plasmides recombinants ont été ensemencées dans 3 ml de milieu LB liquide contenant 50 µg/ml de kanamycine puis ont été incubées à 37 °C sous agitation pendant 8 heures. Un volume de 1 ml a été ensemencé dans 500 ml de milieu LB contenant de la kanamycine puis a été incubé 12 heures à 37 °C sous agitation constante à 250 rpm. Les

cultures bactériennes ont été centrifugées à 3 500 ×g pendant 30 minutes à 4 °C. Les culots bactériens ont été délicatement resuspendus dans 50 ml du tampon de suspension (50 mM Tris-HCl, (pH 8,0), 10 mM Na₂EDTA·2H₂O, 100 µg/ml de RNase A). Les parois bactériennes ont été digérées avec 50 ml de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS) pendant 5 minutes. Les lysats bactériens ont été neutralisés suite à une incubation de 20 minutes sur glace avec 50 ml de tampon de neutralisation (acétate de potassium 3 M, (pH 5,5)). Les lysats ont été déposés sur des filtres (QIAFilter) branchés à une pompe sous vide. Les lysats ont été incubés à la température de la pièce durant 10 minutes pour permettre aux débris cellulaires et aux protéines de remonter à la surface. Les lysats ont été ensuite filtrés sous vide. Un volume de 50 ml d'une solution d'acétate de potassium (1 M (pH5,0)) a été ajouté sur chaque filtre afin de récupérer le maximum de lysat. Un volume de 12,5 ml d'une solution de dilution (contenant de l'isopropanol, du polyéthylène glycol et de l'octylphényl éther) a été ajouté au filtrat qui contient l'ADN plasmidique, le mélange a été ensuite incubé durant 30 minutes sur glace. Ce mélange a été appliqué sur une colonne de résine « QIAGEN-tip 10 000 » (Qiagen) préalablement équilibrée avec un tampon à pH neutre (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, (pH 7,0), 15% (v/v) isopropanol). La colonne a été lavée par l'ajout de 200 ml de tampon de lavage (NaCl 1 M, MOPS 50 mM (pH 7,0), 15 % (v/v) isopropanol). Ensuite, l'ADN plasmidique a été élué de la colonne par l'ajout de 35 ml de tampon d'éluion (1,4 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % (v/v) isopropanol) puis précipité par l'addition de 12,3 ml d'isopropanol à la température de la pièce suivit d'une centrifugation à 13 000 ×g pendant 45 minutes à 4 °C. Le culot d'ADN plasmidique obtenu a été lavé avec 7 ml d'éthanol 70% et centrifugé à 13 000 ×g pendant 20 minutes. Le culot contenant l'ADN plasmidique a été resuspendu dans un volume de 1 ml d'eau stérile et sans endotoxine. La quantité et la pureté des ADN plasmidiques extraits lors de la production à grande échelle ont été estimées en mesurant la densité optique des échantillons d'ADN à des longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm.

La présence du gène codant pour le peptide GLP-1 (7-37) à l'intérieur du plasmide recombinant pVax/GLP-1 a été confirmée par une double digestion de l'ADN plasmidique par les endonucléases de restriction *Hind*III et *Xho*I. L'ADN du plasmide

pVax a été digéré par l'endonucléase de restriction *Hind*III afin de confirmer la taille des vecteurs et l'absence d'insert. Les produits de la digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %.

8. Analyse des nanocomplexes thérapeutiques pVax-GLP-1/chitosane (NCT) par microscopie électronique à balayage

Les NCT pVax-GLP-1/chitosane ont été préparés tel que décrit dans la section 2.2 de ce chapitre. Les nanocomplexes ont été vaporisées sur une surface de silicium de 1 cm² puis enrobé d'or à l'aide d'un appareil Agar sputter Coater (MARIVAC inc). Les échantillons préparés ont été placés dans la chambre d'observation d'un microscope électronique à balayage de type environnementale «environmental scanning electron microscope» (ESEM, Quanta 200 FEG, FEI Company Hillsboro, OR, USA). Les échantillons ont été observés au mode «High Vacuum».

9. Détermination du potentiel zêta et de la taille des NCT pVax-GLP-1/chitosane

Le potentiel zêta et la taille hydrodynamique des nanocomplexes ont été déterminés en utilisant l'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument). L'appareil Zetasizer détermine la taille hydrodynamique en mesurant le mouvement Brownian des particules dans un échantillon en utilisant la diffusion dynamique de la lumière. Ensuite la taille hydrodynamique est interprétée par l'utilisation de théories établies. Le mouvement Brownian est défini comme le mouvement aléatoire des particules dans un liquide dû aux chocs avec les particules du milieu environnant. Les petites particules bougent plus rapidement comparativement aux grosses particules. Le mouvement est déterminé en mesurant la position des particules à 2 temps différents par exemple, avec un intervalle de temps de 100 µs. Lorsque les particules sont grosses, le mouvement est minimal, ainsi la position des particules est similaire entre les deux intervalles de temps. Dans le cas de petites particules, le mouvement des particules est rapide et leurs positions sont très différentes entre les deux intervalles de temps. C'est en utilisant cette connaissance et

cette relation entre la vitesse de diffusion et la taille que la taille hydrodynamique des particules a été déterminée.

Le potentiel zêta représente l'importance de la répulsion ou de l'attraction entre les particules. Le potentiel zêta est mesuré en utilisant une combinaison de techniques de mesure : l'électrophorèse et la vélocimétrie à rayons laser à effet Doppler. Cette méthode détermine la vitesse en mesurant la vitesse des mouvements des particules dans un liquide lorsqu'on applique un champ électrique. Une fois la vitesse des particules connue, et le champ électrique appliqué, il est possible de déterminer le potentiel zêta en utilisant certaines constantes de l'échantillon tel que la viscosité et la constante diélectrique.

Pour déterminer la taille et le potentiel zêta, les nanocomplexes ont d'abord été préparés tel que décrit dans la section 2.2 de ce chapitre. Une fois les nanocomplexes formés, un volume de 50 µl a été transféré dans une cuvette standard (Fisher) contenant 450 µl d'une solution de resuspension (10 mM NaCl). La taille des nanoparticules a été déterminée en plaçant la cuvette à l'intérieur de l'appareil Zetasizer Nano ZS. L'évaluation de la taille a été réalisée en triplicata et chaque valeur obtenue correspond à 10 mesures différentes du même échantillon. Ensuite, la solution de complexe a été récupérée et mélangée avec 400 µl de la même solution de resuspension (10 mM NaCl). Ce mélange a été transféré dans une cuvette conçue pour déterminer le potentiel zêta (Zetasizer Nano Series, Malvern). Ensuite, la cuvette a été placée dans l'appareil Zetasizer Nano ZS. L'évaluation du potentiel zêta a été réalisée en triplicata et chaque valeur obtenue correspond à 15 différentes mesures du même échantillon.

10. Protection, contre la digestion par la DNaseI, des NCT à base de chitosane

Les nanocomplexes sont formés de chitosane qui enrobe l'ADN, ainsi l'ADN peut être protégé des nucléases présentes dans le milieu environnant. La DNase I, par exemple, est une exoenzyme qui hydrolyse les liaisons phosphodiester et catalyse l'hydrolyse des acides désoxyribonucléiques en nucléotides ou polynucléotides. Pour

utiliser le chitosane comme vecteur de livraison, il est nécessaire d'étudier l'effet protecteur de ce dernier sur l'ADN. Ainsi des nanocomplexes formés du pVax-GLP-1 et des formulations de chitosane 92-10, 80-10 et 80-80 à différents ratio N :P ont été soumis à des doses différentes de DNase I.

10.1. Digestion des NCT pVax-GLP-1/chitosane par la DNase I et par la chitosanase

Les nanocomplexes chitosane/pVax-GLP-1 ont été préparés tel que décrit dans la section 2.2 de ce chapitre. Pour vérifier la protection de l'ADN par le chitosane, 6 µl de nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane ont été utilisés dans un volume réactionnel final de 20 µl contenant du tampon MES- MgCl₂ (20 mM MES, 1 mM MgCl₂, (pH 6,5)) et 0, 0,5, 1, 2, 5 ou 10 Unités de DNase I (Sigma). Les échantillons ont été incubés durant 30 minutes à 37°C et la réaction a été arrêtée en ajoutant 2 µl d'EDTA (50 mM) qui a pour effet de chélater le MgCl₂ nécessaire au fonctionnement de la DNase I.

Une fois la DNase I inactivée, la réaction de digestion du chitosane, formant les nanocomplexes, par la chitosanase est initiée par la chitosanase du *Streptomyces Griseus* (Sigma) afin de libérer le pVax-GLP-1 et d'analyser son intégrité par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %. La chitosanase catalyse l'endohydrolyse de la liaison β-1,4 entre les résidus de D-glucosamine (GlcN-GlcN) du chitosane. Pour digérer le chitosane, 1 unité de chitosanase/ µmol de chitosane a été ajoutée directement à la solution contenant les nanocomplexes et la solution a été incubée durant 90 minutes à 37 °C. Les produits de la digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %.

10.2. Analyses par électrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % (p/v). Les échantillons d'ADN à analyser ainsi que le marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (Invitrogen Corporation) ont été dilués dans le tampon de charge (7 % (p/v) de sucrose). Un volume de 12 µl de chaque échantillon (0,1 µg ADN plasmidique) a été chargé dans

les puits du gel d'agarose disposés dans une cellule électrophorétique horizontale (HorizonTM 11.14 BRL, Life Technologie inc.). Après une électrophorèse de 45 minutes dans un tampon TAE sous voltage constant de 100 V, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (10 µg/ml). Les bandes d'ADN ont été visualisées, sous les rayons UV d'un transilluminateur «Bio-Vision 3000» (Montréal Biotech, Canada). La longueur des fragments d'ADN a été déterminée en comparant leur distance de migration sur le gel avec celles des fragments du marqueur de poids moléculaire 1 kb plus (invitrogen).

11. Analyse, par microscopies confocale, de l'internalisation des NCT pVax-GLP-1/chitosane *in vitro*.

Le marquage du chitosane et/ou de l'ADN avec un marqueur fluorescent est un outil largement utilisé pour étudier la distribution, le métabolisme et l'internalisation du chitosane, d'ADN ou des complexes ADN/chitosane dans les cellules. (Onishi & Machida 1999; Ishii *et al.* 2001; Yamada *et al.* 2001; Huang *et al.* 2002). Le but de ces expériences était d'analyser l'internalisation cytoplasmique des NCT pVax-GLP-1/chitosane et la libération des pVax-GLP-1 dans cellules humaines.

11.1. Marquage de l'ADN plasmidique et du chitosane

Le système «Label IT® Nucleic Acid labeling» (Mirus) a été utilisé pour marquer à la fluorescéine, l'ADN plasmidique (pVax-GLP-1). La fluorescéine est un fluorochrome possédant une excitation et une émission maximales à des longueurs d'onde de 494 nm et de 518 nm respectivement. Le réactif de ce système marque les molécules d'ADN par une liaison covalente du fluorochrome aux bases d'acides nucléiques de l'ADN plasmidique. Pour le marquage de l'ADN plasmidique, une quantité de 50 µg d'ADN a été utilisé dans un volume réactionnel de 500 µl de tampon (200 mM MOPS, pH 7,5) contenant 10 µl de fluorescéine «label IT®» (Mirus). Le ratio (volume de réactif : µg ADN) de cette préparation était de (0,20 :1). Ensuite, le mélange a été incubé durant 3 heures à 37 °C, pour permettre la réaction complète du marquage de l'ADN. Afin d'éliminer le réactif de marquage non utilisé, l'ADN marqué a été précipité à l'éthanol. Pour ce faire, la solution

d'ADN marqué a été mélangée avec 50 µl de chlorure de sodium (3 M) (0,1 volume) et 1 ml d'éthanol 100% froid (2 volumes). Le mélange a été incubé durant 1 heure à 70 °C puis centrifugé à 12 000 ×g durant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant a été éliminé puis le culot a été lavé en ajoutant 500 µl d'éthanol à 70 % et en répétant une centrifugation à 12 000 ×g durant 20 minutes à 4 °C. Ensuite, l'ADN a été resuspendu dans 50 µl d'eau déionisée stérile.

L'ADN marqué a été quantifié par spectrométrie à une longueur d'onde de 260 nm. La pureté a été vérifiée par le ratio des densités optiques 260 nm/280 nm. Le nombre de bases nucléotides marquées sur une molécule d'ADN a été déterminé en mesurant l'absorbance de l'ADN à 260 nm et l'absorbance maximale de la fluorescéine à 494 nm. La quantité de bases nucléotides marquées a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Bases marquées} = (A_{\text{base}} * \epsilon_{\text{marqué}}) / (A_{\text{marqué}} * \epsilon_{\text{bases}})$$

$$A_{\text{base}} = A_{260} - (A_{\text{marqué}} * CF_{260})$$

Les valeurs A_{260} et $A_{\text{marqué}}$ correspondent aux densités optiques de l'ADN obtenu à une longueur d'onde de 260 nm et 494 nm respectivement. Le $\epsilon_{\text{marqué}}$ est le coefficient d'extinction de l'acide nucléique liée à la fluorescéine qui est de 30 000 M⁻¹cm⁻¹. Le ϵ_{bases} correspond au coefficient d'extinction de l'acide nucléique de l'ADN double brin qui est de 6 600 M⁻¹cm⁻¹. Le CF_{260} est le facteur de correction à 260 nm et qui est de 0,32 pour la fluorescéine.

Le chitosane marqué au fluorochrome rhodamine-B isothiocyanate (B-ITC) a été fourni par le laboratoire du Dr Buschmann de l'École polytechnique de Montréal. La rhodamine B est un fluorochrome possédant une excitation et une émission maximales à des longueurs d'onde de 540 nm et 625 nm respectivement.

11.2. Transfection des cellules HepG2 avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane marqués

Les cellules HepG2 ont été mises en culture dans des petits plateaux de type «glassbottompetri» (Matek) de 1,9 cm de diamètre. Au total 3,8×10⁵ cellules ont été

mises en culture par plateau. Après 24 heures d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, les cellules ont été transfectées tel que décrit dans la section 2.3 de ce chapitre.

Après 4 heures et 24 heures suivant la transfection, différentes sections optiques des cellules transfectées ont été observées par microscopie confocale «Zeiss LSM 510 META confocale Axioplan 200 microscope» (Carl Zeiss AG, Feldbach, Switzerland) en positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon. La superposition des différentes sections optiques a permis de déterminer la section qui correspond à la cellule coupée transversalement en son centre.

12. Quantification, par test ELISA, de l'expression du GLP-1 recombinant par les cellules HepG2 transfectées avec NCT

Les cellules HepG2 ont été transfectées avec les NCT pVax-GLP-1 (7-37)/chitosane, les NCT pVax/[Ser⁹-GLP-1 (7-37)]/chitosane ou avec les pVax/[Tyr⁹-GLP-1 (7-37)]/chitosane tel que décrit dans la section 2.3 de ce chapitre. Environ 48 heures après la transfection, le milieu des cellules transfectées a été prélevé et utilisé pour réaliser un test ELISA spécifique au GLP-1 (7-37).

Le système ELISA GLP-1 (active) (Linco), a été utilisé pour quantifier le GLP-1 recombinant. Ce système comprend des plateaux de 96 puits qui ont des anticorps monoclonaux immobilisés dans les puits. Ces anticorps sont spécifiques à la molécule GLP-1 active. Les puits ont été lavés en ajoutant 300 µl/puits de tampon de lavage, puis les plateaux ont été incubés durant 5 minutes à la température de la pièce. Le GLP-1 sous forme active a été capturé en ajoutant d'abord 100 µl/puits de tampon puis 100 µl/puits du milieu cellulaire. Le plateau a été incubé durant 24 heures à 4 °C, et pour enlever le matériel non lié aux anticorps, les puits ont été lavés 3 fois en ajoutant 300 µl/puits de tampon de lavage. Pour marquer les molécules de GLP-1 immobilisées, 200 µl/puits d'anticorps anti-GLP-1 conjugués à la phosphatase alcaline ont été ajoutés et incubés pendant 2 heures à température de la pièce. Ensuite, les puits ont été lavés 3 fois avec 300 µl/puits de tampon de lavage et un volume de 200 µl/puits du substrat a été ajouté. Les

plateaux ont été incubés 20 minutes à la température de la pièce et à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 50 µl de la solution Stop, puis la fluorescence relative des puits a été mesurée à une excitation/émission de longueur d'onde de 355nm/460 nm. La quantité de GLP-1 recombinant est proportionnelle à la valeur de l'émission et est déterminée en ng/L à partir d'une courbe standard de GLP-1 (7-37).

13. Expériences, *in vivo*, chez les rats ZDF

Les expériences sur les animaux ont été réalisées en suivant un protocole approuvé par le comité Institutionnel des Soins aux Animaux et de leur Utilisation (CISAU) de L'INRS-Institut Armand-Frappier. Comme pour les expériences réalisées par Oh son équipe, le modèle animal choisi pour la réalisation de ce projet était le rat ZDF (Zucker diabetic fatty) (Oh *et al.* 2003; River 2010). Ce modèle animal diabétique est idéal, car il présente plusieurs similitudes avec l'humain atteint du diabète de type 2 (River 2010). Ainsi, les rats mâles ZDF de la lignée homozygote (ZDF/GmiTm-fa/fa) développent le diabète à l'âge de 10 semaines suite à une période prédiabétique durant laquelle les rats sont obèses et résistants à l'insuline, mais avec une concentration normale de glucose dans le sang. Les NCT sont livrés au modèle animal diabétique sous forme de nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane.

13.1. Protocoles d'injections des rats ZDF avec les NCT

Les expériences ont été réalisées chez 45 rats ZDF mâles âgés de 12 semaines réparties en 3 groupes de 15 rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, CA). Le premier groupe de rats ont reçu des injections sous-cutanées et les rats du second groupe ont reçu des injections intramusculaires. Chacun des groupes était divisé en 5 sous-groupes. Le premier sous-groupe de rats a été injecté avec du pVax seul (contrôle négatif). Les rats du deuxième, troisième et quatrième sous-groupe ont été injectés respectivement avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5, NCT pVax-GLP-1/80-10-10 et NCT pVax-GLP-1/80-80-5. Les rats du dernier sous-groupe ont été injectés avec le pVax-GLP-1 seul (non complexé au chitosane).

Tous les rats ont été injectés six fois avec 1 ml de NCT contenant 165 µg de pVax-GLP-1 par voie intramusculaire au niveau du quadriceps caudal des pattes postérieures (500 µl/pattes) à l'aide d'une aiguille 26G ou par voie sous-cutanée à l'aide d'une aiguille 25G5/8 aux jours 0, 7, 14, 21, 35, 49 et 63. Le poids des rats est mesuré tous les 5 jours.

13.2. Quantification de l'expression du GLP-1 recombinant par test ELISA

Pour évaluer l'expression du gène codant pour le GLP-1 *in vivo*, le plasma des rats a été analysé par des tests ELISA. Tout d'abord, le sang des rats a été prélevé au niveau de la veine jugulaire aux jours 0, 7, 35, 49, 63 et 77. Pour récupérer le plasma, 1 ml de sang a été collecté dans des tubes vacutainer EDTA-plasma placés sur la glace. Immédiatement, 10 µl de l'inhibiteur de DPP-IV (Linco) par ml de sang ont été ajoutés et mélangés par inversion. Les tubes ont été centrifugés durant 10 minutes à 1000 ×g à 4 °C et le plasma récupéré a été conservé à -70 °C. Le système ELISA GLP-1 (active) (Linco), a été utilisé pour quantifier le GLP-1 recombinant tel que décrit dans la section 12 de ce chapitre.

13.3. Test de tolérance au glucose

Les rats ZDF ont été soumis à une période de jeûne d'environ 15 heures, suite à laquelle 2 g de glucose par kg du poids de l'animal leur a été administré par injection intrapéritonéale. Le sang (~20µl) a été prélevé au niveau de la veine de la queue avant l'injection et 30, 60, 120 et 180 minutes suivant l'injection afin d'analyser le taux du glucose mesuré avec un appareil de type «OneTouch» (LIFESCAN). Ce test a été réalisé aux jours 77, 82, 87, 92 et 97 pour analyser la capacité et l'efficacité des cellules cibles à capter le glucose circulant et par conséquent sur le rôle potentialisateur du GLP-1 recombinant sur la libération de l'insuline.

13.4. Quantification de la sécrétion d'insuline, par test ELISA, chez les rats traités avec les NCTpVax-GLP-1/chitosane

Pour évaluer la quantité d'insuline sécrétée *in vivo*, le plasma des rats a été analysé par des tests ELISA. Le système ELISA insuline (rat/souris) (Linco), a été utilisé pour quantifier l'insuline *in vivo* suite aux traitements des rats ZDF avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5. Ce système comprend des plateaux 96 puits qui ont des anticorps monoclonaux titrés et immobilisés dans les puits. D'abord, les puits ont été lavés 3 fois avec 300 µl/puits de tampon de lavage. L'insuline a été capturée en ajoutant d'abord 10 µl/puits de tampon puis 10 µl/puits du plasma des rats ZDF. Pour marquer les molécules d'insulines immobilisées, 80 µl/puits d'anticorps polyclonaux biotinylés anti-insuline ont été ajoutés puis les plateaux ont été incubés durant 2 heures à la température de la pièce. Les puits ont été lavés 3 fois avec 300 µl/puits de tampon de lavage. Afin de lier l'enzyme raifort peroxidase aux anticorps biotinylés immobilisés, 100 µl/puits de l'enzyme raifort peroxidase ont été ajoutés. Après une incubation de 30 minutes à la température de la pièce, les puits ont été lavés 6 fois avec 300 µl/puits de tampon de lavage. Pour quantifier les anticorps conjugués à l'enzyme, un volume de 100 µl/puits du substrat (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine) a été ajouté. Les plateaux ont été incubés durant 15 minutes à la température de la pièce, à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 µl de la solution stop, puis l'activité enzymatique a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm et corrigée à une longueur d'onde de 590 nm (référence). La quantité d'insuline est proportionnelle à la valeur de l'absorbance et est déterminée en ng/ml par interpolation à partir d'une courbe standard.

13.5. Analyse histologique aux sites d'injections des nanocomplexes thérapeutiques (NCT) pVax-GLP-1/chitosane.

Un groupe d'animaux (n=12) ayant reçu une seule injection a été sacrifié, 1, 3 ou 14 jours suivant l'injection sous-cutanée (SC) ou intramusculaire (IM) de nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane en utilisant une chambre d'euthanasie à CO₂. La peau du dos des souris injectées (SC) a été prélevée avec un scalpel et a été agrafée sur une surface rigide. La patte postérieure complète de l'animal injectée par voie intramusculaire a été coupée à l'aide d'un scalpel au niveau de la hanche. La peau et la patte ont été fixées dans 10 % de formaline tampon neutre (NBF) (Fisher Scientific) à 4°C durant 5 jours. Les tissus ont été découpé de façon à garder uniquement le muscle du quadriceps de la cuisse et la peau qui correspondent aux sites d'injections. Les échantillons ont été déshydratés à l'alcool et enrobés dans la paraffine. Des sections de 4-6 µm d'épaisseur ont été préparées à l'aide du microtome Leica RM 2155 (Leica Microsystems, Deerfield, IL) et ont été collectées sur une lame de microscope. Préalablement à la coloration, les sections ont été déparaffinées et réhydratées.

Pour la coloration au Safranine-O/Vert-intense/Hématoxyline de fer, les sections ont été séquentiellement immergées dans une solution d'hématoxyline de fer de Weigert (Sigma), dans 0,04 % (w/v) de vert intense (Sigma) et 1 % de safranine O (Sigma, Oakville, Canada) puis dans l'eau. Des images des sections colorées ont été prises avec un microscope Zeiss Axiolab combiné à une caméra analogue Hitachi NV-F22. Le logiciel Northern Eclipse a été utilisé pour l'analyse histologique.

14. Préparation des duplex d'ADN (ODN) mimant les siARN

Pour développer et étudier des systèmes de livraisons pour les ARN interférents (siARN), nous avons utilisé des duplex d'ADN mimant la forme des siARN. Les duplex d'ADN sont utilisés comme alternative lors de la caractérisation physico-chimique des nanocomplexes siARN-DPP4/chitosane, car ils sont plus faciles à manipuler et moins

coûteux à produire comparativement aux siARN synthétiques. Les duplex ont été préparés suite à l'hybridation de deux brins d'ADN de 21 nucléotides complémentaires. L'oligonucléotide sens (GAA GTT ATA CTC CTT AAG ATT) et l'oligonucléotide anti sens (GGA ATC TTA AGG AGT ATA ACT) ont été synthétisés au service d'invitrogen de façon à ce que le duplex formé comporte des extrémités avec deux nucléotides dépassants de chaque côté. Pour former les duplex, 50 nmol de chacun des oligonucléotides ont été mélangés dans un volume réactionnel final de 200 µL de tampon STE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA). La réaction d'hybridation a été effectuée dans un thermocycleur programmable d'AB Applied Biosystems (Gene AmPCRSYSTEM 9700). Les paramètres expérimentaux ont été choisis comme suit : dénaturation des oligonucléotides pendant 3 minutes à 94 °C, appariement des oligonucléotides complémentaires pendant 15 minutes à 65 °C, 1 minute à 60 °C et 1 minute à 55 °C. La diminution graduelle de la température d'hybridation assure un appariement spécifique des oligonucléotides. Le produit réactionnel a été ensuite incubé durant 20 minutes à la température de la pièce. Pour éliminer les sels du tampon STE, les duplex ont été précipités à l'éthanol. Pour ce faire, 20 µl (0,1 volume) d'acétate de sodium (3 M) et 500 µl (2,5 volumes) d'éthanol 100 % froid ont été ajoutés et mélangés à la solution de duplex. Le mélange a été incubé durant une heure à -70 °C puis centrifugé à 12 000 rpm durant 20 minutes à 4 °C. Le culot obtenu contenant les duplex a été lavé en ajoutant 400 µl d'éthanol à 70 %. Les duplex ont été centrifugés à 12 000 rpm durant 12 minutes à 4°C. Le culot a été séché sous une enceinte biologique puis resuspendu dans de l'eau stérile. Les duplex produits ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%). Pour simplifier leur appellation, les duplex d'ADN sont nommés oligodésoxynucléotides (ODN).

15. Analyse des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane par électrophorèse sur gels de polyacrylamide.

Des techniques d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ont été développées pour la première fois afin d'analyser et de caractériser la formation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane où l'ODN mime les siARN qui inhibent ou réduisent l'expression du

gène codant pour l'enzyme DPP-IV. Cette technique a pour but de déterminer la quantité de chitosane nécessaire pour condenser la totalité des ODN en fonction du pH de la solution et de déterminer la stabilité des nanocomplexes à différents pH. Ces nanocomplexes ont d'abord été formés tel que décrit dans la section 2.2 de ce chapitre. Les nanocomplexes ont été incubés pendant 30 minutes, 4 heures ou 20 heures à la température de pièce. Les échantillons à analyser ainsi que le marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (Invitrogen Corporation) ont été dilués dans la solution de charge (7 % (p/v) de sucrose). Une quantité de 1 µg d'ODN a été chargée dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 13 % disposé dans une cellule électrophorétique verticale (BioRad). Le sucrose a été choisi comme solution de chargement en raison de son pH neutre et de l'absence d'interaction possible avec le chitosane. Les gels de polyacrylamide ont été préparés tel que décrit par (Sambrook *et al.* 1989) en utilisant différents tampons afin de vérifier l'effet du pH sur la formation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane et le relâchement des ODN. Le tampon MES (20 mM MES, 8 mM d'acétate de sodium) a été utilisé pour produire des gels de polyacrylamide à pH 5,0, 6,0 et 6,5. Le tampon BPTE (10 mM PIPES, 30 mM Bis-Tris) a été utilisé pour préparer des gels à pH 7. Le tampon TAE (40 mM tris, 2 mM acide acétique) a été utilisé pour préparer des gels de polyacrylamide à pH de 8,0 et 9,0.

16. Observation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane par microscopie électronique à balayage

Les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane ont été observés en microscopie électronique à balayage de type environnemental (ESEM) tel que décrit dans la section 8 de ce chapitre.

17. Détermination du potentiel zêta et de la taille des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane

Le potentiel zêta et de la taille hydrodynamique des nanocomplexes ont été évalués en utilisant l'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument) tel que décrit dans la section 9 de ce chapitre.

18. Étude de la protection, par le chitosane, des ODN-DPP4 dans les nanocomplexes contre la digestion par la DNase I.

Pour utiliser le chitosane comme vecteur de livraison des siARN, il est nécessaire d'étudier l'effet protecteur de ce dernier sur siARN. Ainsi des nanocomplexes formés d'ODN (mimant les siARN) et des formulations de chitosane 92-10, 80-10 et 80-80 à différents ratio N :P ont été soumis à des doses de DNase I tel que décrit dans la section 10 de ce chapitre. Les analyses par électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées sur gel d'agarose à 13 % (p/v). Les échantillons d'ODN à analyser ainsi que le marqueur de poids moléculaire de 10 pb (Invitrogen Corporation) ont été dilués dans le tampon de charge (7 % (p/v) de sucrose). Un volume de 12 µl des échantillons (0,2 µg ODN) a été chargé dans les puits d'un gel d'agarose disposé dans une cellule électrophorétique horizontale (Horizon™ 11.14 BRL, Life Technologie inc.).

19. Analyse, par microscopie confocale de l'internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane *in vitro*.

Dans ce projet, le marquage du chitosane et des ODN-DPP4 dans les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane a permis d'étudier l'internalisation cytoplasmique et la libération des ODN-DPP4 dans différentes lignées cellulaires humaines. Les cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 ont été choisies pour être transfectées par les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane, car elles expriment l'enzyme DPP-IV. Les expériences d'analyse de l'internalisation en microscopie confocale ont été réalisées selon les méthodes décrites dans la section 11 de ce chapitre à l'exception du marquage des ODN-DPP-4 par la fluorescence où le ratio volume du réactif de fluorescence : µg ADN était de (1 :1). Les

molécules d'ODN sont composées d'une quantité inférieure de nucléotides par rapport aux molécules d'ADN plasmidique (utilisée à la section 11), alors il était important d'augmenter la quantité de réactif à la fluorescéine afin d'assurer le marquage de toutes les molécules ODN-DPP4.

De plus, lors de cette analyse, les membranes cytoplasmiques des cellules transfectées avec les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane ont été colorées au rouge foncé avec le système CellMaskTM (invitrogen). Ce colorant est composé d'un fluorochrome qui possède une excitation et une émission maximales à des longueurs d'onde de 649 nm et 644 nm respectivement. La coloration des membranes cytoplasmiques a permis de déterminer, avec plus de précision, les contours des cellules et a facilité l'observation de l'internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane par microscopie confocale. La solution colorante CellMaskTM a été diluée dans le milieu DMEM à une concentration finale de 2,5 µg/ml. Le milieu des cellules a été aspiré puis 300 µl de la solution colorante ont été ajoutés sur les cellules. Les cellules recouvertes de la solution colorante ont été incubées pendant 5 minutes à 37 °C. Ensuite, les cellules ont été lavées 3 fois en ajoutant 300 µl de tampon PBS 1x. Suite à la coloration, les cellules ont été observées par microscopies confocale.

20. Silencage, *in vitro*, du gène DPP-IV par l'utilisation de siARN-DPP4

La livraison efficace des siARN est critique pour inhiber l'expression d'un gène. Même un très puissant siARN peut sembler non fonctionnel sans un système de livraison efficace. Dans cette étude, des systèmes de livraison utilisant le chitosane et un lipide (le DharmaFect) ont été testés pour livrer des siARN synthétiques.

20.1. Synthèse de siARN-DPP4

Les siARN-DPP4, ayant pour cible le gène qui code pour l'enzyme DPP-IV, ont été synthétisés chimiquement au service de la compagnie Dharmacon. La synthèse chimique permet la production de siARN purs et en grande quantité. La synthèse des siARN est critique afin de diminuer le nombre de séquences à tester pour leur efficacité. Le choix de

la séquence des siARN a été déterminé à partir de l'algorithme SMARTselection™ (Dharmacon) considéré comme la stratégie la plus fiable pour la production des siARN à cible spécifique.

Les expériences ont inclus des siARN sans-cible spécifique afin de contrôler les effets non spécifiques de siARN. Les siARN sans-cible spécifique ont été synthétisés de façon à ne pas être spécifiques pour aucune séquence du génome humain. Un changement au niveau de l'ARNm ou de la protéine pour les cellules traitées avec ces siARN sans-cible indiquerait une réponse cellulaire non spécifique de base qui peut être comparée avec le niveau obtenue pour des cellules traitées avec des siARN à cibles spécifiques.

20.2. Transfection *in vitro* des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 avec les NCT siARN-DPP-4/chitosane

Le silençage du gène DPP-IV a été étudié dans trois lignées cellulaires humaines (Caco-2, HepG2 et HT-29) exprimant l'enzyme DPP-IV en utilisant trois différentes formulations de chitosane (92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5) pour livrer les siARN-DPP4.

Les siARN-DPP4 ont été resuspendus dans de l'eau distillée, dépourvue de DNase et RNase, à une concentration de 50 µg/ml. Dans un tube contenant 25 µl de siARN à 50 µg/ml, 25 µl d'une formulation de chitosane (92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5) ont été ajoutés et la solution a été mélangée immédiatement en pipettant vigoureusement. Le mélange a été incubé durant 30 minutes à la température de la pièce afin d'assurer la formation complète des NCT siARN/chitosane.

Les expériences de transfection des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 avec les siARN ont été réalisées dans des plateaux 96 puits contenant $2,5 \times 10^5$ cellules/ puits. La préparation du milieu de transfection a été faite séparément dans un plateau stérile de 35 mm de diamètre (Corning), où 16,2 µl de NCT siARN-DPP4/chitosane ont été ajoutés à 283,8 µl de milieu DMEM (MES 5mM, NaHCO₃ 10 mM) sans sérum préalablement équilibré à pH 6.5 avec du HCL 1N de façon à obtenir un volume final de 300 µl de

milieu de transfection. Ce milieu de transfection a été incubé à 37 °C et 5 % de CO₂ durant 10 minutes. Le milieu des plateaux contenant les cellules a été enlevé puis remplacé par 100 µl/puits du milieu de transfection. La quantité de siARN ajoutée aux cellules correspond à 10 pmoles/ puits. Les plateaux contenant les cellules et le milieu de transfection ont été incubés durant 4 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Ensuite, 50 µl/puits de milieu DMEM (MES 5 mM, NaHCO₃ 10 mM) contenant 15 % de sérum à pH 6.5 a été ajouté, puis les cellules ont été incubées durant 20 heures à 37 °C et 5 % de CO₂. Ces cellules transfectées ont été utilisées soit pour quantifier l'ARNm des enzymes DPP-IV par des réactions d'amplification en temps réel (qRT-PCR), soit pour quantifier l'activité enzymatique du DPP-IV par des tests enzymatiques. Dans ce dernier cas, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet frais 24 après la transfection puis les cellules ont été réincubées durant 24 heures supplémentaires à 37 °C et 5 % de CO₂.

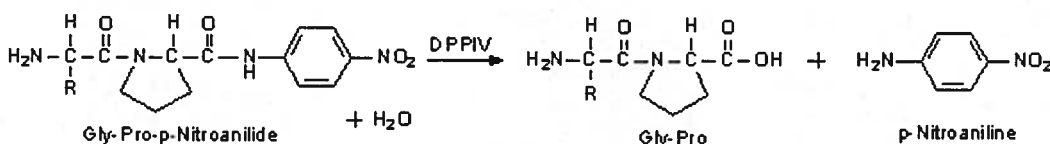
20.3. Transfection *in vitro* des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 avec les lipoplexes (siARN-DPP4/lipide)

Le lipide DharmaFect 1, produit par la compagnie Dharmacon, a été utilisé comme contrôle positif lors des transfections cellulaires avec les siARN-DPP4 et siARN-sans-sible. D'abord, les cellules ont été mises en culture à 2,5 10⁵ cellules/puits dans des plateaux 96 puits (Corning). Pour la préparation des lipoplexes siARN-DPP4/lipide, 5 µl de siARN à 2 µM (10 pmol de siARN) ont été mélangés dans un tube eppendorf avec 5 µL de milieu de culture sans sérum. Dans un second tube eppendorf, 0,4 µl de lipide DharmaFect 1 (Dharmacon) a été mélangé avec 9,6 µl de milieu de culture sans sérum. Les tubes ont été incubés séparément durant 5 minutes à température de la pièce puis ont été mélangés ensemble par pipetage. Le mélange a été incubé durant 20 minutes à la température de la pièce afin d'assurer la formation complète des lipoplexes siARN/lipide. Une fois l'incubation terminée, 80 µl de milieu complet avec sérum ont été ajoutés aux lipoplexes siARN/DharmaFect puis mélangés délicatement par pipetage. Le milieu des plateaux contenant les cellules à transfecter a été enlevé puis remplacé par 100 µl/puits de milieu de transfection. Les plateaux ont été incubés durant 24 heures ou 48 heures à 37 °C et 5 % de CO₂.

L'efficacité de transfection a été ensuite évaluée en vérifiant la présence de la protéine DPP-IV par des tests enzymatiques et par la quantification des ARNm des DPP-IV par des réactions d'amplification en temps réel qRT-PCR.

20.4. Test enzymatique de l'activité de la DPP-IV *in vitro*

L'activité de la DPP-IV a été mesurée par un test enzymatique basé sur la réaction suivante :



Où la DPP-IV catalyse l'hydrolyse de son substrat le Gly-Pro-p-Nitroanilide en deux produits le Gly-Pro et le p-Nitroaniline. L'activité de l'enzyme DPP-IV est déterminée en mesurant l'absorbance du produit p-Nitroaniline à une longueur d'onde de 405 nm. Ainsi, les valeurs de l'absorbance sont proportionnelles à l'activité de l'enzyme DPP-IV.

Les cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 ont été transfectées tel que décrit dans la section 20.2 de ce chapitre. 48 heures après la transfection des cellules dans les plateaux 96 puits, le milieu des cellules a été aspiré et 200 µl/puits de PBS ont été ajoutés et aspirés pour laver les puits. Ensuite, 200 µl/puits de tampon 100 mM Tris pH 8,0 contenant 1 mM Gly-Pro-p-nitroanilide hydrochloride (sigma), ont été ajoutés et les cellules ont été incubées durant 1 heure à 37 °C et 5 % de CO₂. Un volume de 100 µl de chacun des puits a été transféré dans un nouveau plateau 96 puits et la l'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 405 nm. Les données d'absorbances obtenues ont été converties en nmole de 4-nitroaniline/min. Les valeurs d'absorbances finales des échantillons traités avec les nanocomplexes siARN-DPP4/chitosane ont été comparées avec les valeurs d'absorbance des échantillons traités avec les siARN sans cibles/chitosane et les résultats ont été exprimés en pourcentage de la réduction de l'activité enzymatique de la DPP-IV.

20.5. Quantification, par qRT-PCR, de l'ARNm du DPP-IV dans les cellules transfectées avec NCT (siARN-DPP4/chitosane)

20.5.1. Extraction de l'ARN total

Pour faire la réaction d'amplification en temps réel (qRT-PCR), l'extraction de l'ARN total des cellules transfectées avec les siARN-DPP4/chitosane a été réalisée à l'aide du système «NucleoSpin® RNA XS» de Macherey-Nagel (BioLynx). Ce système prévient la dégradation de l'ARN par l'utilisation d'une grande quantité d'ions chaotropiques qui inactivent les RNase et permet d'avoir les conditions appropriées pour que l'ARN soit absorbé à une membrane de silice. L'ADN contaminant, qui se lie aussi à la membrane est éliminé par l'utilisation de DNase.

Le chitosane utilisé pour former les NCT se dissocie des siARN suite à la transfection des cellules avec les nanocomplexes siARN-DPP4/chitosane. Le chitosane se retrouve libre dans le milieu de culture, sur les membranes des cellules et à l'intérieur des cellules. Le chitosane étant chargé positivement, il se lie à l'ARN chargé négativement lors de l'ajout d'un tampon de lyse normalement acide. La liaison du chitosane à l'ARN lors de la lyse cellulaire empêche l'extraction de l'ARN nécessaire pour les réactions d'amplification par qRT-PCR. Une faible extraction de l'ARN ou dégradation de cet ARN peut fausser les résultats de la réaction d'amplification par qRT-PCR. Ainsi, lors de ce projet, nous avons mis au point une nouvelle technique qui consiste à digérer le chitosane par la chitosanase pour permettre l'extraction de l'ARN et afin de le quantifier par qRT-PCR (Jean et al, soumis 2009). Ainsi, le milieu de transfection des cellules a été remplacé par 100 µl/puits de milieu DMEM (sans sérum) à pH 6,5 contenant de la chitosanase (1 unité/umole chitosane). Après 60 minutes d'incubation des cellules, transfectées en présence de chitosanase à 37 °C et 5 % de CO₂, le milieu a été aspiré puis 100 µl/puits de tampon de lyse ont été ajoutés. Les cellules lysées ont été transférées séparément dans un tube eppendorf et 2 µl d'agent réducteur TCEP (tris-(2-carboxyéthyl) phosphines) ont été ajoutés puis les échantillons ont été vortexés vigoureusement afin de

permettre l'homogénéisation des cellules lysées. Ensuite, 5 µl d'une solution contenant l'ARN (ARN (poly(A) RNA : poly (A) sel de potassium) a été ajouté afin d'optimiser les liaisons de l'ARN à la membrane de silice. Un volume de 100 µl d'éthanol 100% a été ajouté puis les échantillons ont été transférés sur une colonne «Nucleospin® RNA XS» pourvue d'une membrane de silice et d'un tube collecteur puis ont été centrifugés durant 30 secondes à 11 000 ×g. Pour permettre une activité optimale de la DNase, les sels ont été retirés de la membrane en ajoutant 100 µl de tampon de dessalage et en effectuant une centrifugation de 30 secondes à 11 000 ×g. Ensuite, 25 µl d'une solution DNase ont été ajoutés au centre de la membrane et une incubation de 15 minutes à la température de la pièce a été effectuée pour permettre la digestion complète de l'ADN contaminant. Les membranes ont été lavées 3 fois dans le tampon de lavage et l'ARN a été élué des membranes de silice en ajoutant 20 µl H₂O distillée (sans RNase). L'ARN a été collecté dans un tube dépourvu de RNase par centrifugation à 11 000 ×g durant 30 secondes.

20.5.2. Détermination de la qualité et de la quantité de l'ARN total

À cause de l'omniprésence des RNase et l'instabilité des ARN totaux extraits, il était essentiel de vérifier l'intégrité de l'ARN et de quantifier les échantillons d'ARN totaux avant leur utilisation pour les expériences de transcription inverse et d'amplification en temps réel (qRT-PCR). L'analyse de l'intégrité des échantillons d'ARN a été réalisée avec l'appareil Bioanalyzer « modèle 2100» (Agilent) en utilisant les puces «Nano 6000» (Agilent). Ces puces à ARN contiennent des micros canaux interconnectés ensemble et sont utilisées pour la séparation des fragments d'acide nucléique par le principe d'électrophorèse, en fonction de leur taille.

Brièvement, les échantillons d'ARN totaux extraits ont été dénaturés à 70 °C pendant 10 minutes puis 1 µl de chacun des échantillons ont été chargé sur les puces «Nano 6000» préalablement remplis d'un gel contenant un colorant spécifique pour les acides nucléiques «Nano 600 kit» (Agilent). La puce a été placée dans un adaptateur «IKA Vortexer» (Agilent) et a été vortexée à l'horizontale à 2'400 rpm durant 1 minute avant d'être transférée dans l'appareil Bioanalyzer. Cet appareil permet de déterminer

l'intégrité de l'ARN en fonction du profil électrophorétique général de l'échantillon d'ARN. Les résultats ont été analysés avec le logiciel algorithme «2100 Bioanalyzer Expert» (Agilent). Le 2100 Bioanalyzer couplé au logiciel algorithme génère pour chaque échantillon un nombre d'intégrité de l'ARN (RIN), fournit la concentration de l'ARN et calcule le ratio ribosomal de l'ARN total. La valeur RIN permet de sélectionner uniquement les échantillons d'ARN ayant une bonne intégrité pour les étapes d'analyse de l'expression du gène DPP-IV. En effet, il a été démontré que la valeur RIN est la méthode la plus fiable pour déterminer l'intégrité de l'ARN (Schroeder *et al.* 2006) et pour produire des résultats de qRT-PCR significatifs et reproductibles (Imbeaud *et al.* 2005). Ainsi, seuls les échantillons d'ARN ayant un RIN entre 8.0 et 10 ont été utilisés pour analyser l'expression du gène DPP-IV.

20.5.3. Réaction de transcription inverse à partir de l'ARN total

Pour synthétiser l'ADNc, l'ARN total a d'abord été dénaturé par une incubation à 60 °C pendant 10 minutes. L'ADNc a été synthétisé en utilisant le système «transcriptor first-strand cDNA transcriptor» (Roche). Ainsi, 300-500 ng d'ARN total a été utilisé dans un volume réactionnel final de 20 µL contenant du tampon de synthèse d'ADNc, 2 µl d'un mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration de 10 mM de chaque dNTP (concentration finale 1mM pour chaque dNTP), des oligo(dT) à une concentration finale de 2,5 µM, 0,5 µl d'inhibiteur d'RNase (20 U) et 0,5 µl de l'enzyme transcriptase inverse (10 U). La réaction de transcription inverse par PCR a été effectuée dans un thermocycleur programmable Rotor-gene 6000® de Corbet life science. La réaction de transcription inverse a été effectuée à une température de 55 °C pendant 30 minutes puis l'enzyme a été inactivée par une incubation à 85 °C pendant 5 minutes. L'ADNc produit a été conservé jusqu'à son utilisation pour l'amplification du gène de la DPP-IV.

20.5.4. Amplification en temps réel (qRT-PCR) du gène de la DPP-IV

Avant d'amplifier le gène de la DPP-IV, nous avons d'abord procédé au choix d'un contrôle endogène exprimé de manière stable par les cellules transfectées. Le niveau d'expression pour le contrôle endogène «house keeping» a été déterminé en utilisant le système d'expression pré-évalué de taqman (Applied Biosystems). Les réactions de qRT-PCR pour un plateau de 384 puits ont été réalisées en utilisant 1,5 µl d'échantillon ADNc (25 ng), 5µl du mélange «Fast Universal qPCR MasterMix» (Applied Biosystems), 0,5 µl du système taq gene expression (20x) contenant les amorces spécifiques du contrôle endogène et 2,5 µL d'eau dans un volume total de 10 µl. Ces premiers essais ont été réalisés en utilisant les contrôles endogènes GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), TBP (TATA binding protein), HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase), ACTB (Beta-actin). Le contrôle endogène HPRT a montré l'expression la plus stable dans les cellules HepG2 lors de nos expériences préliminaires, alors nous l'avons choisi comme contrôle endogène.

Le niveau d'expression du gène DPP-IV a été déterminé en utilisant une sonde universelle de la banque de Roche (www.universalprobelibrary.com). Ce logiciel propose des amorces et des sondes spécifiques au gène d'intérêt disponible dans la banque de Roche. Cette technologie utilise des courtes sondes hydrolysées de 8 ou 9 bases. Des bloqueurs d'acides nucléiques «Locked Nucleic Acid» (LNA) permettent à ces sondes de rester hybridées de façon spécifique à sa séquence d'ADN complémentaire. Les amorces ont été conçues pour amplifier une partie du gène qui correspond à la jonction entre deux exons suite à l'épissage de l'intron. Au total trois sondes universelles ont été analysées (sonde n°21, n°51 et n° 71). La sonde 71, qui a démontré la plus grande spécificité pour l'ARNm du DPP-IV, a été choisie et utilisée pour l'ensemble des expériences de qRT-PCR. L'amorce sens (FWqRT PCR-DPP4) était composée de 23 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5' ACT GGG AAC ATT TGA AGT TGA AG 3') correspondait aux positions 2352 – 2374 de l'ARNm du DPP-IV. Pour sa part, l'amorce antisens (RVqRT PCR-DPP4) était composée de 21 nucléotides et la séquence de ces nucléotides (5'TTG TTG TCC ACA AAT CCC ATT 3') correspondait aux positions

2406 – 2426 de l'ARNm du DPP-IV L'ADN amplifié par qRT-PCR en utilisant ces amorces était de 75 acides nucléotidiques. Les réactions de qRT-PCR pour un plateau de 384 puits ont été réalisées en utilisant 2 µl d'échantillon ADNc (25 ng), 5 µl du mélange «Fast Universal qPCR MasterMix» (Applied Biosystems), 2 µM de chacune des amorces et 1 µM de la sonde universelle 71 dans un volume total de 10 µl.

L'appareil «ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System» (Applied Biosystems) a été utilisé pour détecter le niveau d'amplification de l'ADN. Le programme a été initié avec une étape de dénaturation de l'ADN amplifié à 95 °C durant 3 minutes, suivit de 45 cycles de : 5 secondes à 95 °C, 30 secondes à 60 °C. Toutes les réactions ont été réalisées en triplicata et la moyenne des valeurs obtenues au cycle seuil (threshold cycle) (Ct) ont été utilisés pour la quantification de l'ADN amplifié. Le gène HPRT a été utilisé comme contrôle endogène.

La valeur du Ct du gène DPP-IV a été normalisée au gène du HPRT endogène ($\Delta CT = Ct \text{ DPP-IV} - Ct \text{ HPRT}$) et comparé avec un calibrateur (échantillon non traités) : pour déterminer la valeur $\Delta\Delta CT = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ Calibrateur}$. L'expression relative (RQ) du gène DPP-IV a été calculée en utilisant le logiciel «the Sequence Detection System» (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) selon la formule suivante $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. Les valeurs ont été exprimées en pourcentage d'expression du gène DPP-IV en accordant une expression de 100 % dans les échantillons traités avec les siARN sans cible.

21. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme d'une moyenne \pm l'écart-type. L'exploitation statistique des résultats a comporté une analyse de type «one-way» ANOVA and «main effect» ANOVA suivit d'un test post-hoc Newman-keuls. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Statistica 9.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Les valeurs de p inférieures à 0,05 (*p) ou à 0,01 (**p) ont été considérées respectivement comme statistiquement différentes ou statistiquement très différentes.

RÉSULTATS

1. Évaluation de l'efficacité de transfection et de l'expression de gènes recombinants *in vitro* en utilisant le chitosane

Au début de notre projet de recherche, nous avons voulu déterminer l'efficacité de transfection et d'expression de gènes recombinants, *in vitro*, en utilisant le chitosane comme système de livraison. Deux plasmides recombinants, le pEGFPLuc et le pVaxLacZ codant respectivement pour la luciférase et la β -galactosidase ont été utilisés pour former des nanocomplexes (pEGFPLuc/chitosane et le pVaxLacZ/chitosane) et pour la transfection de 3 lignées cellulaires soit HepG2, HT-29 et Caco-2. Les formulations de chitosanes utilisées pour produire les nanocomplexes sont [92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 (DD-M_n-N :P)]. Des lipoplexes (pEGFPLuc/lipofectamine et pVaxLacZ/lipofectamine) ont été également produits et utilisés comme contrôle positifs lors des transfusions cellulaires. La lipofectamine est effectivement l'un des systèmes de livraison d'ADN les plus efficaces pour la transfection des cellules et l'expression de gènes recombinants dans une large variété de cellules de mammifères. L'efficacité de la transfection et la quantification de l'expression des gènes recombinants ont été déterminées par des tests enzymatiques spécifiques aux protéines recombinantes.

1.1. Expression du gène EGFPLuc codant pour la luciférase

Les résultats des tests enzymatiques de la luciférase ont montré une augmentation de l'expression du gène codant pour la luciférase dans les cellules transfectées avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane comparativement aux cellules traitées avec le pEGFPLuc seul. En effet, l'expression de la luciférase dans les cellules HepG2 transfectées avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane était plus élevée ($1,2 \times 10^7$ RLU/min*mg protéine) comparativement aux cellules HepG2 transfectées avec le pEGFPLuc/seul ($9,8 \times 10^4$ RLU/min*mg protéine) (figure 10 a). L'expression de la luciférase dans les cellules HepG2 transfectées avec les nanocomplexes pEGFPLuc/92-10-5 était également 2 fois supérieure à celle obtenue avec le lipoplexe pEGFPLuc/lipofectamine ($6,1 \times 10^6$ RLU/min*mg protéine) (figure 10 a). Le chitosane 92-10-5 est celui qui permet la plus forte expression de la luciférase, suivit du chitosane 80-10-10 puis du chitosane 80-80-5. En doublant la quantité de

nanocomplexes pour transfecter les cellules HepG2, on observe une augmentation significative de l'expression de la luciférase dans le cas des nanocomplexes 80-10-10 et 80-80-5 variant de $1,1 \times 10^6$ à $2,4 \times 10^6$ RLU/min*mg protéine, et de $1,2 \times 10^5$ à $5,1 \times 10^5$ RLU/min*mg protéine. Le traitement des cellules HepG2 avec le plasmide pEGFP_{Luc} seul permet l'expression de la luciférase ($9,8 \times 10^4$ RLU/min*mg protéine) due à la transfection spontanée des cellules avec le plasmide recombinant seul. Toutefois, cette transfection reste faible comparativement aux cellules transfectées avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane ou avec les lipoplexes.

La transfection des cellules Caco-2 avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/92-10-5 augmente également de manière importante l'expression de la luciférase ($1,7 \times 10^7$ RLU/min*mg protéine) par rapport au traitement avec le pEGFP_{Luc} seul ($2,0 \times 10^3$ RLU/min*mg protéine) (figure 10 b). Encore une fois, la formulation de chitosane 92-10-5 est celle qui permet la plus forte expression du gène de la luciférase ($1,7 \times 10^7$ RLU/min*mg protéine). La quantité de luciférase exprimée avec l'utilisation de cette formulation est légèrement inférieure à celle obtenue avec le pEGFP_{Luc}/lipofectamine ($4,6 \times 10^7$ RLU/min*mg protéine). En général, la quantité de luciférase exprimée par les cellules Caco-2 après la transfection avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc} /chitosane est semblable à celle exprimée par les cellules HepG2 transfectées avec les mêmes nanocomplexes. En doublant la quantité de nanocomplexes utilisés pour la transfection des cellules Caco-2, on observe une augmentation significative de l'expression de la luciférase dans le cas des nanocomplexes composés des formulations de chitosane 92-10-5 et 80-80-5 variant de $8,2 \times 10^6$ RLU/min*mg protéine à $7,1 \times 10^7$ RLU/min*mg protéine et de $7,1 \times 10^5$ RLU/min*mg protéine à $3,2 \times 10^6$ RLU/min*mg protéine respectivement.

La transfection des cellules HT-29 avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane ne permet pas d'augmenter significativement l'expression de la luciférase par rapport au traitement avec le pEGFP_{Luc} seul ($1,1 \times 10^5$ RLU/min*mg protéine) (figure 11 a). Seule la transfection avec le lipoplexe pEGFP_{Luc}/lipofectamine (contrôle positif) augmente l'expression de la luciférase à ($1,4 \times 10^6$ RLU/min*mg protéine) par rapport au traitement avec le pEGFP_{Luc} seul. Cette augmentation de l'expression du gène de la luciférase dans les

cellules HT-29 demeure faible comparativement à celles obtenues dans les cellules Caco-2 et HepG2.

Les cellules HEK 293 ont été utilisées comme contrôle positif. Effectivement, il a été démontré que des nanocomplexes formés de chitosane pouvaient transférer efficacement cette lignée cellulaire (Lavertu *et al.* 2006b). Tel qu'attendu, la transfection des cellules HEK 293 avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane et avec le lipoplexe pEGFPLuc/lipofectamine (contrôle positif) entraîne une forte augmentation de l'expression du gène de la luciférase ($1,5 \times 10^9$ RLU/min*mg protéine) par rapport aux cellules traitées avec le pEGFPLuc seul ($5,4 \times 10^5$ RLU/min*mg protéine) (figure 11 b). L'expression du gène de la luciférase dans les cellules HEK 293 transfectées avec les nanocomplexes contenant du chitosane 92-10-5 et 80-10-10 était plus importante que l'expression observée chez les cellules Caco-2 et HepG2 transfectées avec les mêmes nanocomplexes.

Figure 10: Expression de l'enzyme luciférase par les cellules HepG2 et Caco-2 transfectées avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane

Les cellules ont été transfectées à une confluence de 50% en ajoutant 1,3 ou 2,6 μg de pEGFPLuc/cm². Les tests enzymatiques de la luciférase ont été réalisés 48 heures après la transfection. Les résultats sont présentés sous forme de RLU/min*mg protéine qui représente les unités relatives de lumière émise par l'activité de la luciférase par minute et qui ont été standardisées avec la quantité de protéines cellulaires totales dans chacun des échantillons. Les valeurs RLU/min*mg de protéines sont proportionnelles à la quantité de luciférase exprimée par les cellules transfectées. Les cellules transfectées avec les nanocomplexes pEGFP/chitosane composés de différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD- M_n- ratio N:P)] ont été comparées aux cellules transfectées avec le pEGFPLuc seul (ADN). Les cellules transfectées avec le pEGFPLuc en utilisant la lipofectamine ont été utilisées comme contrôle positif. Expression de l'enzyme luciférase dans les cellules transfectées : a) cellules HepG2, b) cellules Caco-2.

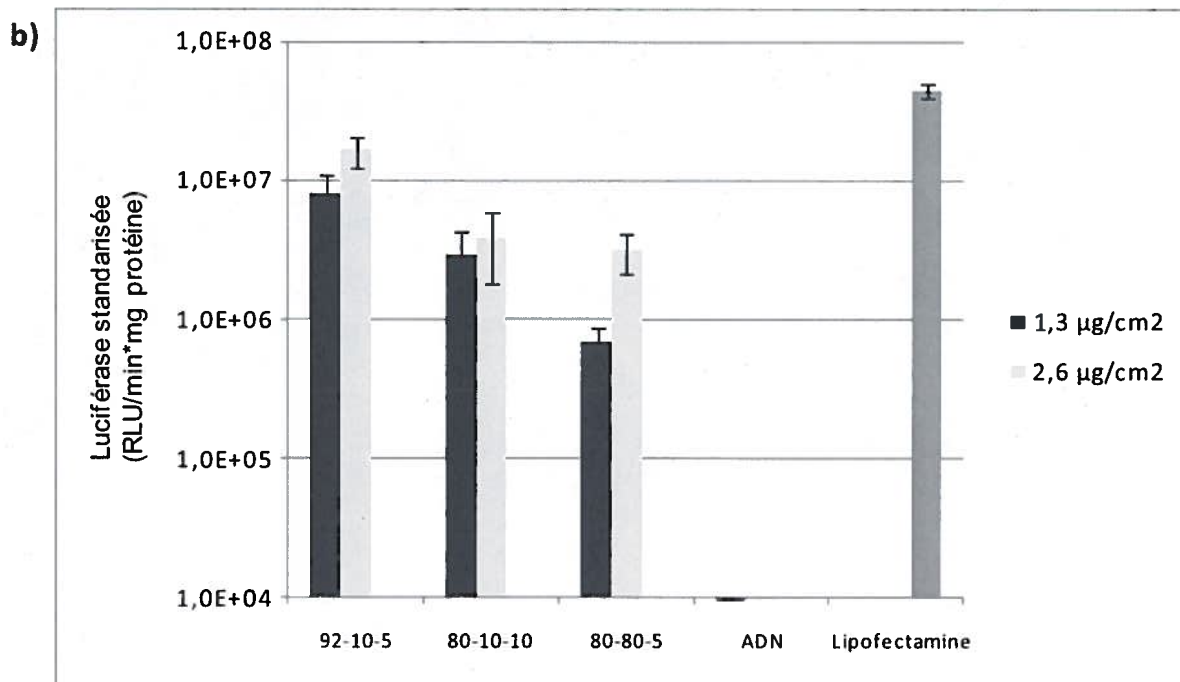
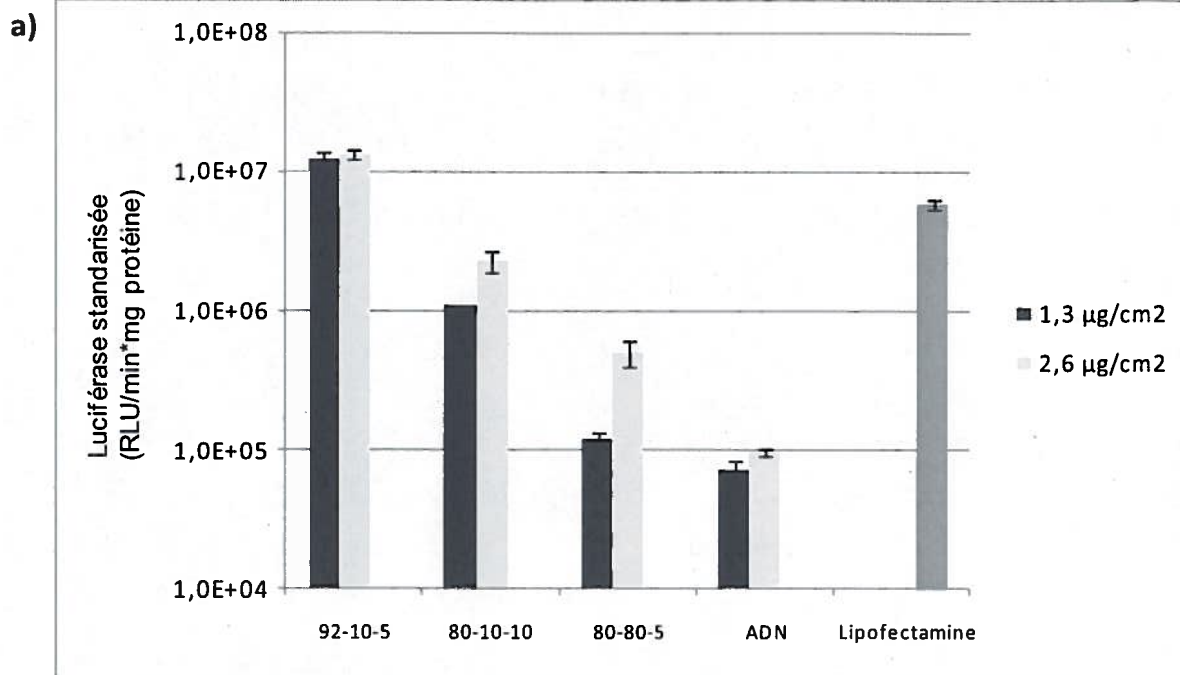
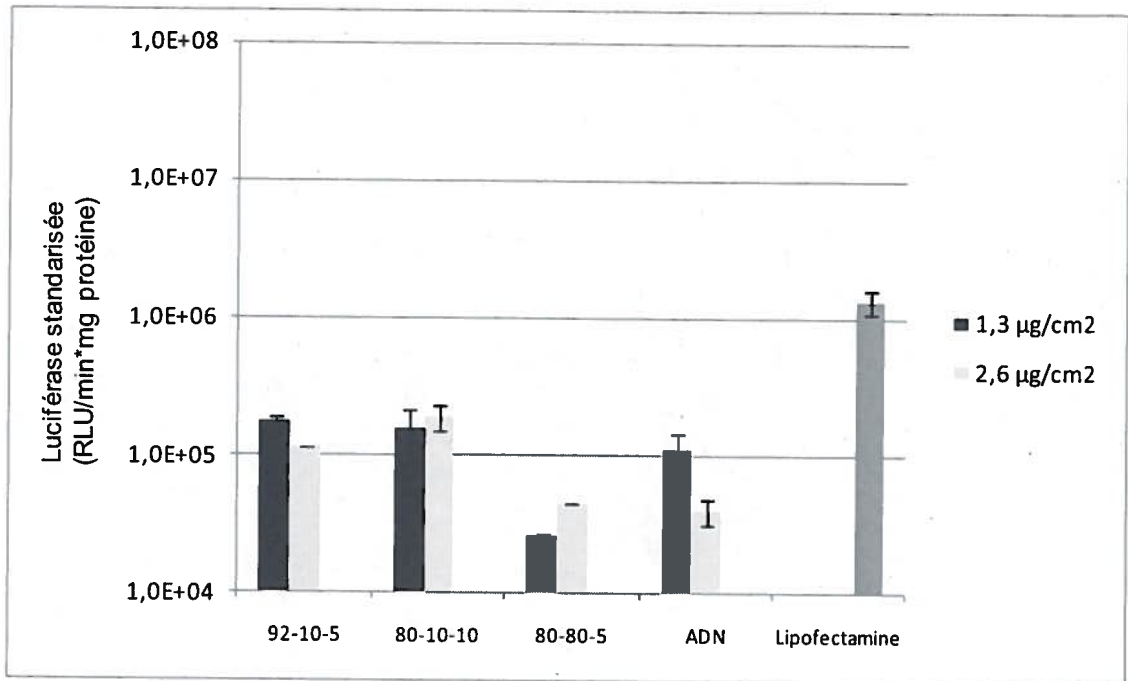


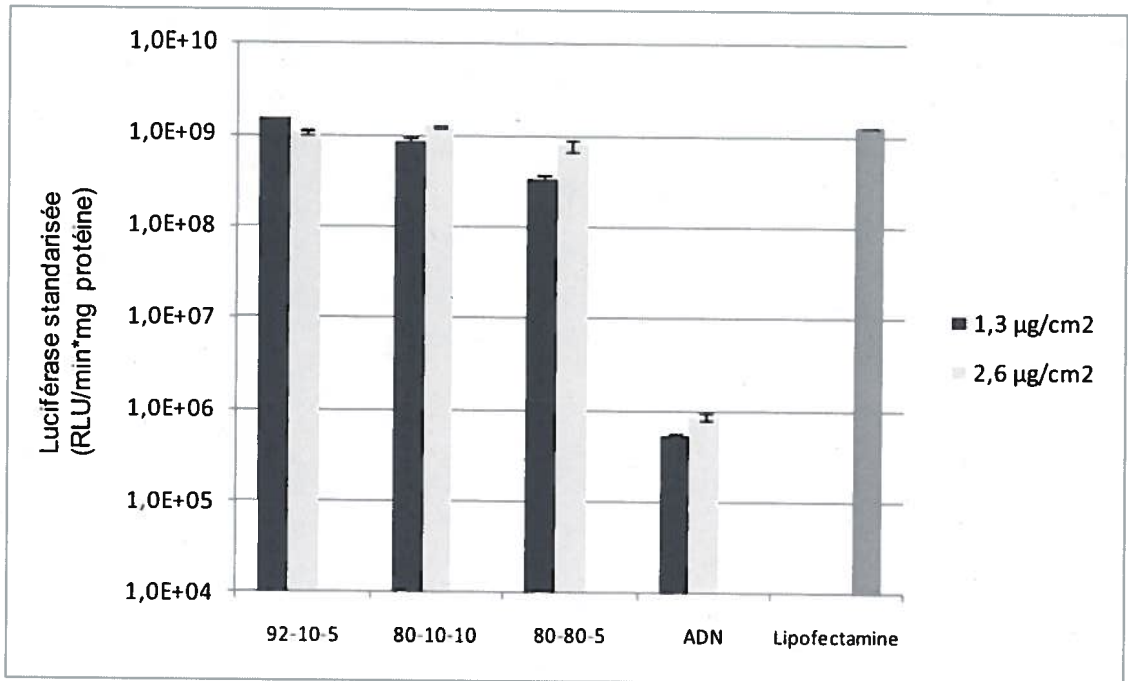
Figure 11: Expression de l'enzyme luciférase par les cellules HT-29 et HEK 293 transfectées avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane

Les cellules ont été transfectées à une confluence de 50 % en ajoutant 1,3 ou 2,6 µg de pEGFPLuc/cm². Les tests enzymatiques de la luciférase ont été réalisés 48 heures après la transfection. Les résultats sont présentés sous forme de RLU/min*mg protéine qui représente les unités relatives de lumière émise par l'activité de la luciférase par minute et qui ont été standardisées avec la quantité de protéines cellulaires totales dans chacun des échantillons. Les valeurs RLU/min*mg de protéines sont proportionnelles à la quantité de luciférase exprimée par les cellules transfectées. Les cellules transfectées avec les nanocomplexes pEGFP/chitosane composés de différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD- M_n- ratio N:P)] ont été comparés aux cellules transfectées avec le pEGFPLuc seul (ADN). Les cellules transfectées avec le pEGFPLuc en utilisant la lipofectamine ont été utilisées comme contrôle positif. Expression de l'enzyme luciférase dans les cellules transfectées : a) cellules HT-29, b) cellules HEK 293.

a)



b)



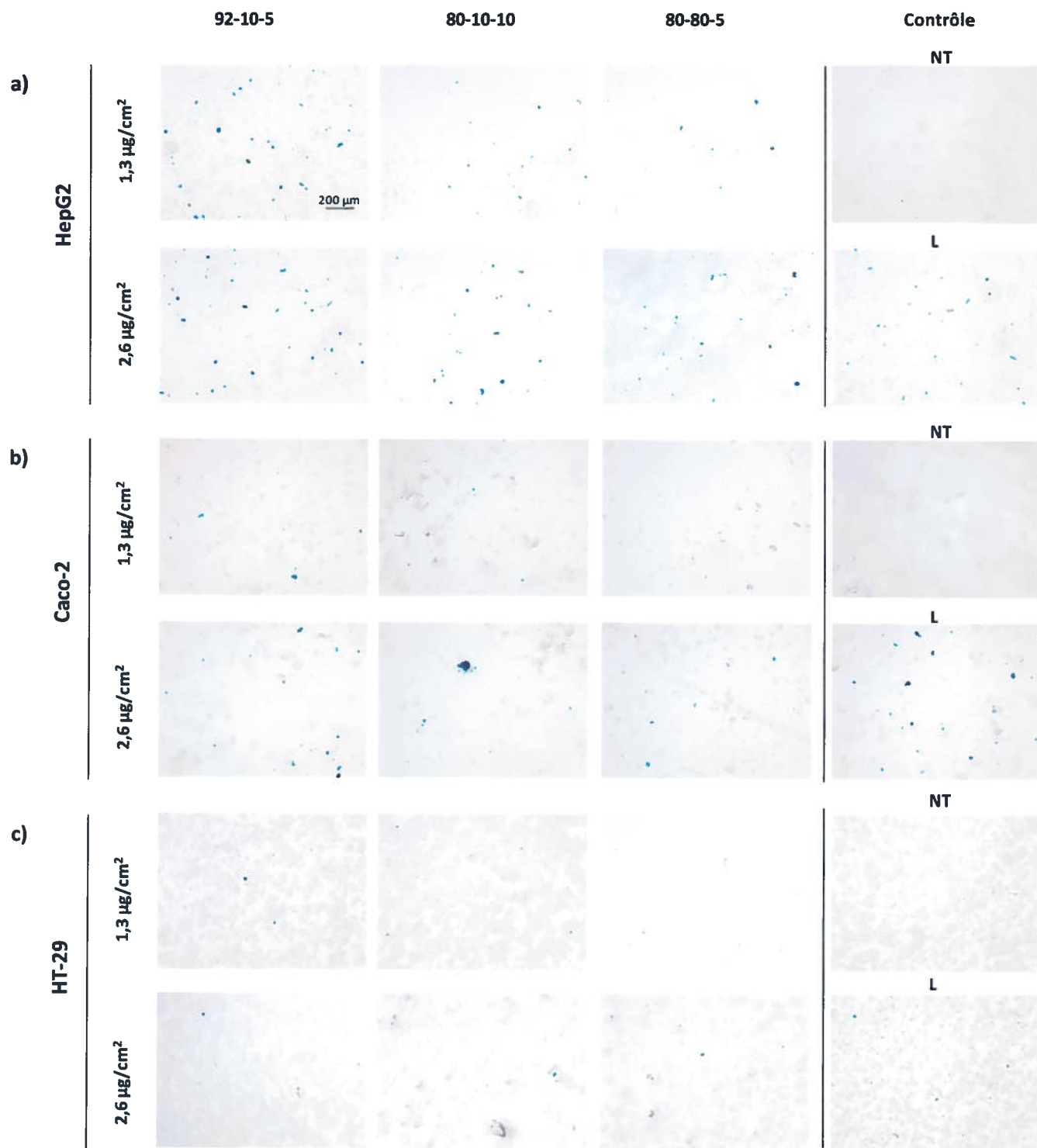
1.2. Expression du gène lac Z codant pour la β -galactosidase

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de la transfection des différentes lignées cellulaires avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane, les cellules ont été transfectées avec les nanocomplexes pVax-LacZ/chitosane. Les cellules transfectées avec le gène Lac Z expriment la β -galactosidase qui leur permet de dégrader le X-gal ajouté au milieu en un substrat qui leur confère une couleur bleue. L'expression du gène recombinant a donc été évaluée qualitativement en observant en microscopie la couleur bleue des cellules transfectées. Les lignées cellulaires HepG2 et Caco-2 traitées avec les nanocomplexes pVax-LacZ/chitosane montrent un nombre élevé de cellules transfectées comparativement aux cellules non transfectées (NT) (figure 12 a et b). Parmi les différentes formulations de chitosane testées, le chitosane 92-10-5 est celui qui permet la plus forte expression du gène de la β -galactosidase, suivit du chitosane 80-10-10 puis du chitosane 80-80-5. Dans les cellules HepG2, les nanocomplexes composés de la formulation de chitosane 92-10-5 sont plus efficaces car ils permettent une expression plus importante de la β -galactosidase relativement aux lipoplexes pVaxLacZ/lipofectamine (contrôle positif). Dans les cellules Caco-2, la formulation de chitosane 92-10-5 permet une forte expression de la β -galactosidase qui reste comparable à celle obtenue avec la lipofectamine (contrôle positif). Comparativement aux cellules HepG2 et Caco-2, les cellules HT-29 traitées avec les nanocomplexes pVax-LacZ/chitosane montrent une faible expression du gène de la β -galactosidase (figure 12 c). En général, ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de la transfection des cellules avec les nanocomplexes pEGFPLuc/chitosane pour exprimer la luciférase.

Ensemble ces résultats montrent que le chitosane est un système de livraison efficace pour l'expression de gènes recombinants, *in vitro*. Ces résultats indiquent également que dans le cas des cellules HepG2 et Caco-2, le chitosane 92-10-5 est la formulation qui présente une meilleure livraison et expression de gènes recombinants *in vitro*.

Figure 12: Expression de l'enzyme β -galactosidase par les cellules transfectées avec les nanocomplexes pVax-LacZ/chitosane

Les cellules ont été transfectées à une confluence de 50% en ajoutant 1,3 ou 2,6 μg de pVax-LacZ / cm^2 . Le test X-gal a été réalisé 48 heures après la transfection. Les cellules exprimant la β -galactosidase sont de couleur bleue. Les cellules transfectées avec les nanocomplexes pVax-LacZ/chitosane composés de différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD- M_n - ratio N:P)] ont été comparées aux cellules non transfectées (NT) utilisées comme contrôle négatif. Les cellules transfectées avec le pVax-LacZ en utilisant la lipofectamine (L) ont été utilisées comme contrôle positif. Expression de la β -galactosidase dans les cellules transfectées : a) cellules HepG2, b) cellules Caco-2, c) cellules HT-29.



2. Évaluation de la cytotoxicité du chitosane sous forme de nanocomplexe *in vitro*.

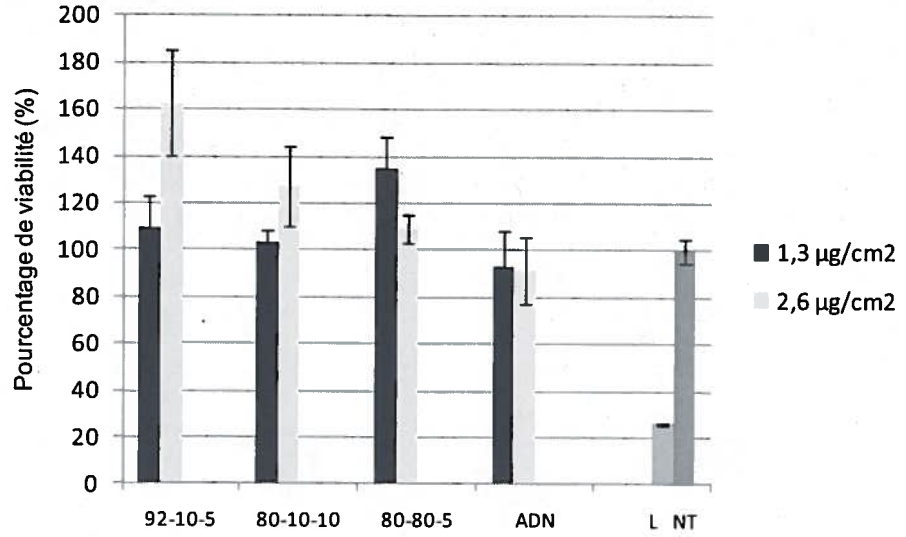
La cytotoxicité causée par les traitements avec les nanocomplexes contenant le chitosane a été évaluée *in vitro* par des tests de viabilité. Dans cette étude, les cellules non transfectées (contrôle positif) ont un pourcentage de viabilité fixé à 100 % (figure 13 a, histogramme NT). Cette étude a montré que la transfection des cellules HepG2 avec les lipoplexes pEGFP_{Luc}/ lipofectamine diminue fortement la viabilité des cellules avec un pourcentage de viabilité de seulement 26 % (figure 13 a, histogramme L). La transfection avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane n'a pas d'effet toxique pour les cellules HepG2 (figure 13 a). En effet, on observe une augmentation significative de la viabilité des cellules traitées avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosanes 92-10-5 (2,6 µg/cm²), 80-10-10 (2,6 µg/cm²) et 80-80-5 (1,3 µg/cm²). En utilisant le chitosane 92-10-5 (2,6 µg/cm²) le pourcentage de viabilité atteint 160 % par rapport aux cellules non traitées. La transfection des cellules Caco-2 avec les lipoplexes pEGFP_{Luc}/ lipofectamine entraîne une diminution de la viabilité des cellules avec un pourcentage de viabilité de 68 % (figure 13 b, histogramme L). En utilisant les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane, la viabilité des cellules Caco-2 augmente considérablement et de façon générale avec un pourcentage de viabilité allant jusqu'à 150 % (figure 13b). La transfection des cellules HT-29 avec le lipoplexes pEGFP_{Luc}/ lipofectamine diminue la viabilité des cellules avec un pourcentage de viabilité de seulement 60 % (figure 13 c, histogramme L). Les cellules HT-29 transfectées avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane ont un pourcentage de viabilité comparable aux cellules HT-29 non transfectées (figure 13 c).

Ces résultats montrent très bien que le chitosane, sous forme de nanocomplexes comparativement à la lipofectamine sous forme de lipoplexes, n'a pas d'effet toxique sur les cellules *in vitro*.

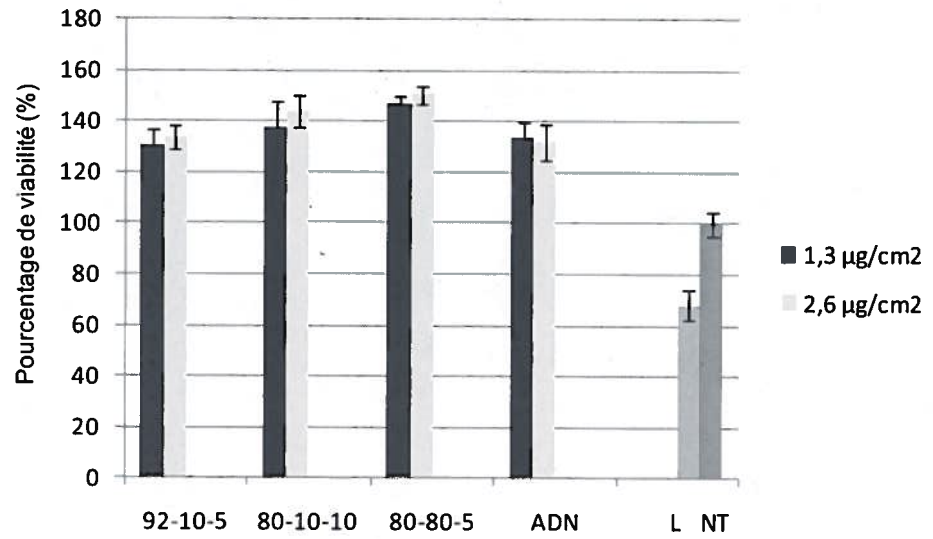
Figure 13: Niveau de viabilité des cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 après transfection avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/chitosane

Les cellules ont été transfectées en ajoutant 1,3 ou 2,6 μg de pEGFP_{Luc}/cm². Le test de viabilité a été réalisé 48 heures après la transfection en incubant les cellules avec la résazurine durant 4 heures à 37 °C. La fluorescence a été mesurée par spectrométrie en utilisant des longueurs d'onde d'excitation/émission de 560 nm/590 nm. Les niveaux de viabilité des cellules transfectées avec les nanocomplexes composés de différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD- M_n- ratio N:P)] ont été comparés à ceux des cellules traitées avec le pEGFP_{Luc} seul (ADN), des cellules transfectées avec les nanocomplexes pEGFP_{Luc}/lipofectamine (L) et des cellules non transfectées (NT). Niveau de viabilité : a) des cellules HepG2, b) des cellules Caco-2, c) des cellules HT-29.

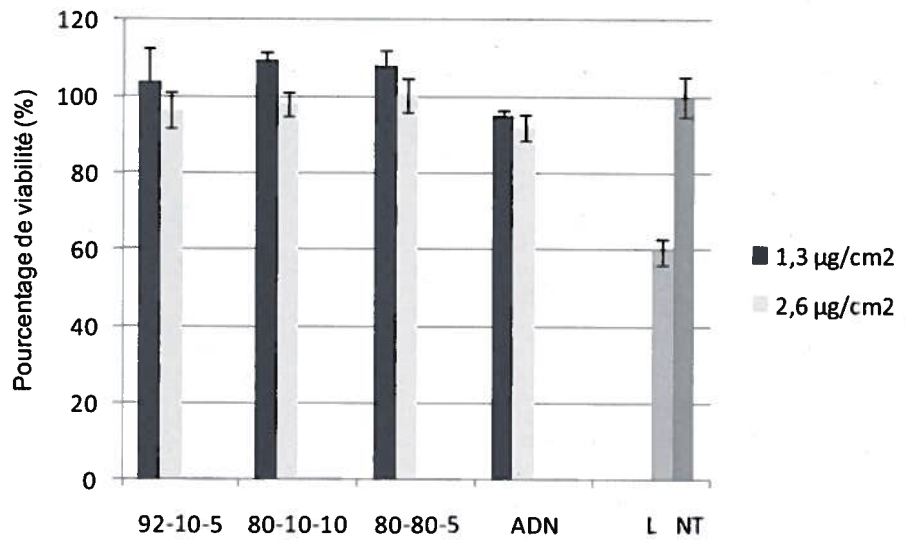
a)



b)



c)



3. Construction des vecteurs recombinants codant pour le peptide GLP-1 (7-37) et ses formes variantes.

Le premier objectif de ce projet consistait à élaborer les plasmides recombinants pVax-GLP-1 afin de produire et caractériser les nanocomplexes thérapeutiques pVax-GLP-1/chitosane (NCT). Cette étape de construction a commencé par la synthèse de l'ADNc du proglucagon par transcription inverse à partir de l'ARN total extrait de cellules intestinales de rats.

L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose de l'ARN total et de l'ADNc synthétisé, après coloration au bromure d'éthidium, montre une traînée d'ARN qui correspond à l'ARN total extrait des cellules intestinales de rats (figure 14, puits 2), et une bande d'ADN de 1 Kb qui correspond à l'ADNc du proglucagon (figure 14, puits 3). La séquence codante pour le gène du proglucagon a été purifiée puis clonée dans le vecteur de clonage pCR®2.1 afin de conserver sa stabilité et son intégrité.

Par la suite le fragment d'ADN codant pour le peptide GLP-1 (7-37) a été amplifié à partir du plasmide PCR2.1/proglucagon par PCR. Pour produire les formes variantes du GLP-1, des amorces sens contenant des mutations ont été utilisées lors de cette amplification. Ces mutations ont été introduites pour accroître leur résistance à la dégradation par la DPP-IV et pour augmenter leur demi-vie biologique.

Il est important de souligner qu'un site de reconnaissance par la furine a été ajouté en amont de la séquence codante pour le GLP-1. Ainsi après la traduction, la protéine recombinante sera clivée par la furine de façon à libérer le GLP-1 sous sa forme active GLP-1 (7-37). Le site de reconnaissance de la furine joue donc un rôle primordial dans la maturation du peptide GLP-1 en un peptide GLP (7-37) actif.

Le fragment d'ADN, amplifié et codant pour le GLP-1, a été finalement cloné dans le vecteur d'expression pVax. Le plasmide recombinant pVax-GLP-1 a été digéré par les enzymes de restrictions *HindIII* et *XhoI*, et le produit de digestion a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 15). Cette analyse sur gel d'agarose montre que la

digestion des plasmides recombinants entraîne la libération d'un fragment d'ADN de 125 pb correspondant à la séquence codante pour le peptide recombinant GLP-1 (7-37) renfermant le site de reconnaissance par la furine (figure 15).

Le plasmide recombinant pVax/GLP-1 et les plasmides recombinants codant pour les formes variantes du GLP-1 (pVax/[Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et pVax/[Tyr⁹-GLP-1 (7-37)]) ont été séquencés afin de comparer leur séquence en acides nucléiques avec celles du site de reconnaissance par la furine et du GLP-1 (7-37) disponible dans la banque de données GenBank. Cette analyse a montré que le plasmide recombinant contenait une séquence en acides nucléiques homologue à 100 % avec celle du site de reconnaissance par la furine et du GLP-1 (7-37). La figure 16 montre le schéma du plasmide recombinant pVax-GLP-1 et des séquences codantes pour le GLP-1 (7-37) et ses formes variantes.

Figure 14: Profil électrophorétique de l'ARN total extrait de cellules intestinales et de l'ADNc du proglucagon.

Puits 1 : Standard de poids moléculaire 1kb

Puits 2 : ARN total extrait de cellules intestinales de rat

Puits 3 : l'ADNc de 1 kb correspondant au proglucagon, cet ADNc a été synthétisé à partir de l'ARN total par transcription inverse.

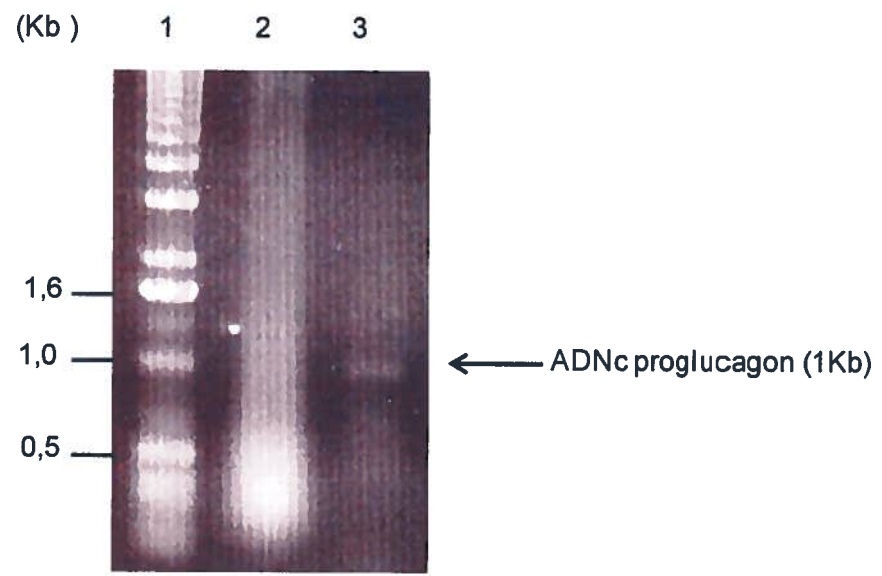


Figure 15 : Profil électrophorétique du plasmide recombinant contenant le gène codant pour le GLP-1, avant et après une digestion avec les endonucléases *XhoI* et *HindIII*

La digestion du plasmide recombinant pVax-GLP-1 par les endonucléases *XhoI* et *HindIII* montre la présence dans ce plasmide de l'Insert d'environ 125 pb correspondant au gène recombinant GLP-1 (7-37).

Puits 1 : Standard de poids moléculaire 1 Kb.

Puits 2 : pVax-GLP-1 digéré par les endonucléases *XhoI* et *HindIII*.

Puits 3 : pVax-GLP-1 non digéré.

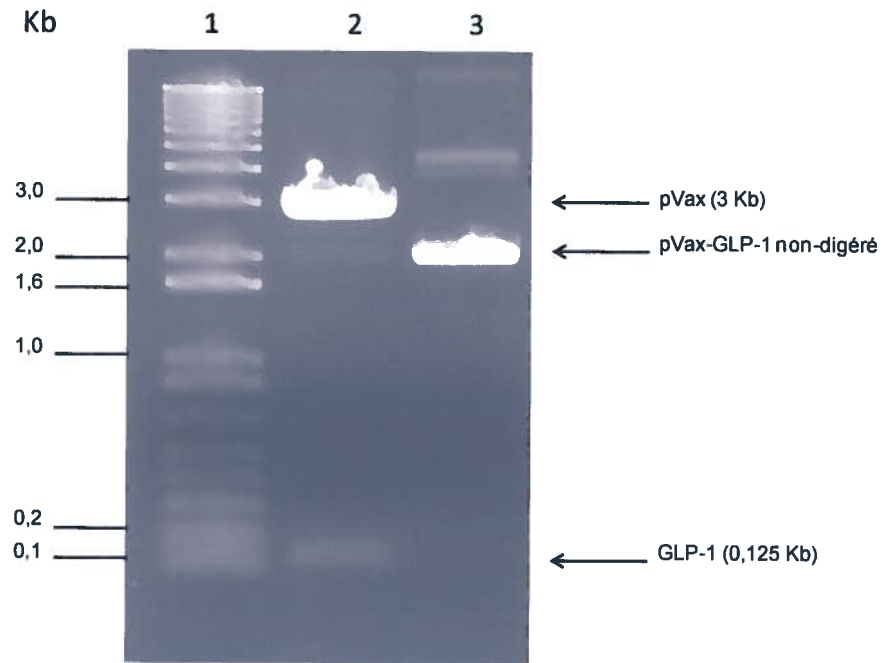
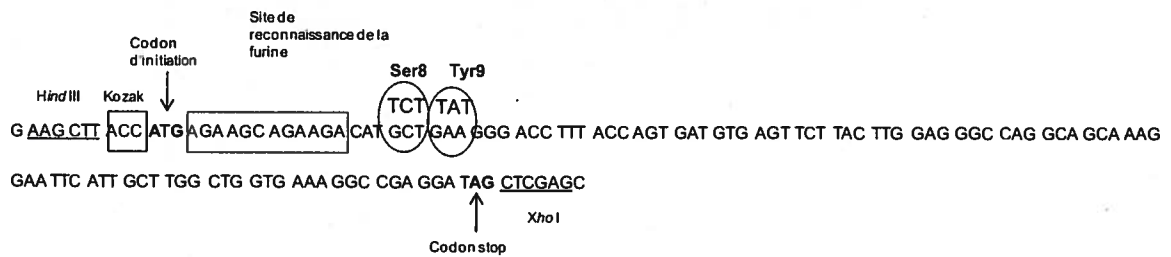
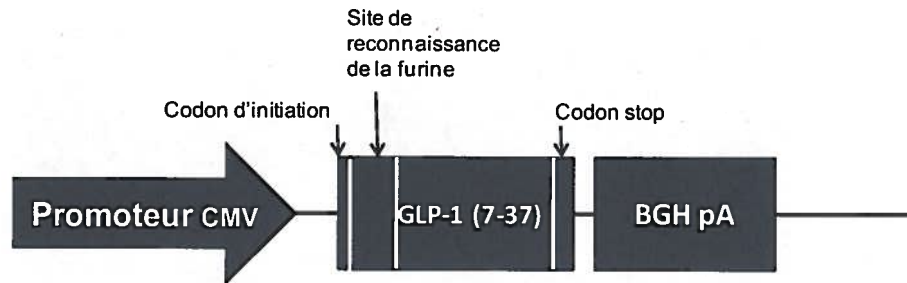


Figure 16: Schéma de la construction du plasmide recombinant pVax-GLP-1 (7-37) et ses formes variantes.

La séquence de kozak, le codon d'initiation et le site de reconnaissance de la furine ont été ajoutés en amont de la séquence codante pour le GLP-1 (7-37) et un codon de terminaison (codon-stop) a été ajouté en aval de cette séquence. Les sites de restrictions *Hind*III et *Xho*I ajoutés à chacune des extrémités ont permis le clonage de la séquence codante pour le GLP-1 (7-37) recombinant au niveau du site de clonage multiple du plasmide eucaryotique pVax.1. La transcription du gène recombinant est assurée par la présence d'un promoteur du cytomégalovirus (CMV) à haut niveau transcriptionnel. La séquence de polyadénylation de l'hormone de croissance (BGH) située en aval du site de clonage stabilise les ARNm transcrits. Des variantes du GLP-1 ont été générées par des techniques de PCR et de mutagenèse par PCR afin de les rendre résistantes à la dégradation par la DPP-IV. Ces variantes [Ser⁸-GLP-1(7-37) et Tyr⁹-GLP-1(7-37) pourront augmenter la durée de vie du GLP-1 lors de l'application en thérapie génique.



4. Caractérisation des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane (NCT)

Le plasmide recombinant pVax-GLP-1 exprimant la forme active du GLP-1 (7-37) et les plasmides recombinants exprimant les formes variantes du GLP-1 ont été complexés avec les trois formulations de chitosane le 92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (% DD, Mn, ratio N:P) pour produire 6 nanocomplexes thérapeutiques pVax-GLP-1/chitosane (NCT).

4.1. Analyse, par microscopie électronique, des NCT (pVax-GLP-1/chitosane)

La caractérisation de la forme des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane a été réalisée par microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM). Cette analyse a montré que les nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane ont une forme principalement sphérique (figure 17). Les nanocomplexes formés des chitosanes (92-10-5 et 80-10-10) ont des diamètres variants entre 50 à 150 nm (figure 17 a et b). Les nanocomplexes les plus gros ont un diamètre d'environ 200 nm et sont observés principalement avec la formulation de chitosane 80-80-5 (figure 17 c).

4.2. Détermination du potentiel zêta et de la taille des NCT (pVax-GLP-1/chitosane)

Le potentiel zêta et la taille des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane ont été déterminés en utilisant l'appareil Zetasizer Nano ZS par des techniques de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Cette analyse a montré que la taille des nanocomplexes pVax-GLP-1 varie de 163 à 246 nm. Les valeurs déterminées du potentiel zêta des nanocomplexes varient entre 26 à 32 mV (tableau IV). Ces résultats montrent que la taille et le potentiel zêta des nanocomplexes varient selon le type de chitosane utilisé.

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les nanocomplexes contenant des formes variantes de GLP-1.

Figure 17: Images des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane en microscopie électronique.

L'analyse par microscopie électronique à balayage (ESEM) montre la forme et la taille des nanocomplexes: a) pVax-GLP-1/92-10-5, b) pVax-GLP-1/80-10-10, c) pVax-GLP-1/80-80-5.

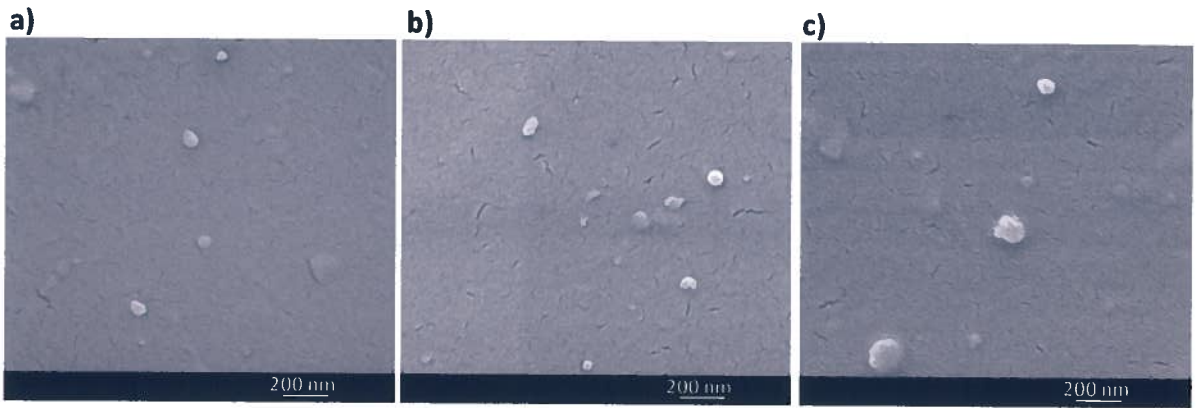


Tableau IV: Valeurs de la taille et du potentiel zêta des nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane.

Échantillon	taille (nm)	Potentiel Zeta (mV)
pVax-GLP-1/92-10-5	235 ±48	32,0±3,4
pVax-GLP-1/80-10-10	163±22	26,7±3,9
pVax-GLP-1/80-80-5	246±30	31,1±1,3

5. Protection, contre la digestion par la DNaseI, des NCT (pVax-GLP-1) à base de chitosane

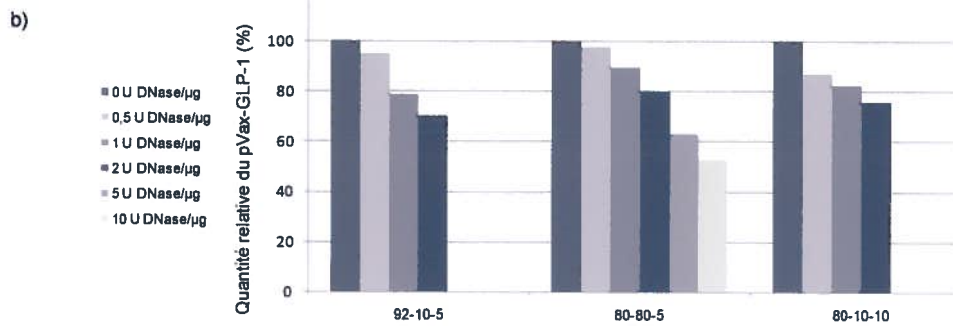
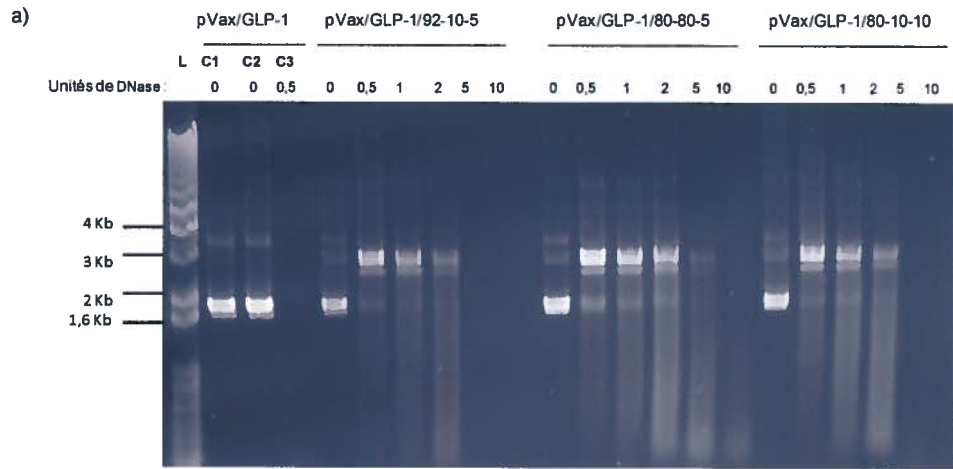
L'effet protecteur que confère le chitosane au plasmide recombinant a été évalué afin de déterminer son potentiel à être utilisé comme système de livraison *in vivo*. Ainsi, les nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane (92-10-5, 80-80-80 ou 80-10-10) ont été traités d'abord avec différentes doses de DNase I suivit de la chitosanase afin de libérer le plasmide recombinant pVax-GLP-1. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 18). Cette analyse a montré que le pVax-GLP-1 seul était complètement digéré avec seulement 0,5 unités de DNase I/ μg d'ADN alors que le pVax-GLP-1 complexé à différentes formulations des chitosanes n'était que partiellement digéré à des concentrations aussi grandes que 5 unités de DNase I/ μg d'ADN. Toutes les formulations de chitosane testées ont démontré leur potentiel à protéger le plasmide recombinant pVax-GLP-1. Plus la concentration de DNase I est importante, plus le chitosane protège difficilement le pVax-GLP-1 qui devient complètement dégradé avec des concentrations élevées (10 unités de DNase I/ μg d'ADN). L'analyse de l'intensité des bandes d'ADN obtenues sur le gel d'agarose a montré que le chitosane 80-80-5 est la formulation qui confère la plus grande protection au pVax-GLP-1(figure 18 b). Dans leur ensemble, ces résultats montrent que le chitosane protège plus de 70 % du pVax-GLP-1 recombinant contre la dégradation par des concentrations élevées de DNase I (2 unités/ μg d'ADN) (figure 18).

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les nanocomplexes contenant des formes variantes de GLP-1.

Figure 18: Protection, contre la digestion par la DNaseI, des NCT (pVax-GLP-1) à base de chitosane

a) Les nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD- M_n - ratio N:P)] ont été incubés en présence de différentes concentrations de DNase I (0, 0,5, 1, 2, 5 unités de DNase par μg d'ADN plasmidique) durant 90 minutes à 37 °C. La DNase I a été inactivée puis le chitosane des nanocomplexes a été digéré par la chitosanase afin de permettre la libération du plasmide recombinant pVax-GLP-1. Les bandes correspondantes aux plasmides recombinants incubés en présence de la DNase I sont comparées aux contrôles (C1, C2, C3). C1 : pVax-GLP-1 incubé sans la DNase I et sans chitosanase. C 2 : pVax-GLP-1 incubé sans la DNase I et avec la chitosanase. C3 : pVax-GLP-1 incubé avec 0,5 unité de DNase I et la chitosanase. L : Standard de poids moléculaire 1Kb plus.

b) Pour chacun des chitosanes, la quantité relative du pVax-GLP-1 (%) est déterminée en comparant l'intensité des bandes d'ADN de l'échantillon incubé avec la DNase I avec l'intensité des bandes d'ADN du même échantillon incubé en absence de la DNase I (100%).



6. Étude de l'internalisation des NCT pVax-GLP-1/chitosane *in vitro*

Les NCT pVax-GLP-1/chitosane marqués à la fluorescéine (pVax-GLP-1 en vert) et à la rhodamine (chitosane en rouge), ont été utilisés pour transférer les cellules HepG2 afin d'étudier l'internalisation des nanocomplexes (en jaune) par microscopie confocale. À ce stade de notre étude, notre choix s'est arrêté sur la lignée cellulaire HepG2 (modèle *in vitro*) car elle exprime des récepteurs pour l'insuline et l'insuline-like growth factor II (IGF II). Les images obtenues en microscopie confocale montrent que les nanocomplexes pVax-GLP-1/92-10-5 (en jaune) sont fortement internalisés dans les cellules HepG2, 4 heures après leur transfection avec les nanocomplexes (figure 19 a, photo 4). À ce moment, le chitosane et le plasmide pVax-GLP-1 demeurent sous forme de nanocomplexes (en jaune) à l'intérieur de la cellule (figure 19 a, photo 4). C'est seulement 24 heures plus tard que le pVax-GLP-1 (en vert) est libéré du chitosane (en rouge) (figure 19 b, photo 4). En effet, 24 heures après la transfection, les images en microscopie confocale montrent la présence d'une quantité importante du pVax-GLP-1 (en vert) libre dans les cellules (figure 19 b, photo 4, flèches blanches).

Les cellules HepG2 ont été aussi transfectées avec les nanocomplexes pVax-GLP-1/80-10-10 et pVax-GLP-1/80-80-5. Les observations en microscopie confocale ont révélé que, comparativement aux nanocomplexes pVax-GLP-1/92-10-5, les nanocomplexes pVax-GLP-1/80-10-10 et pVax-GLP-1/80-80-5 sont faiblement internalisés dans les cellules HepG2 4 heures après la transfection des cellules et restent concentrés à la membrane cellulaire. De plus, 24 heures suivant la transfection des cellules avec les NCT pVax-GLP-1/80-10-10 et pVax-GLP-1/80-80-5 on observe un très faible relâchement des plasmides recombinants.

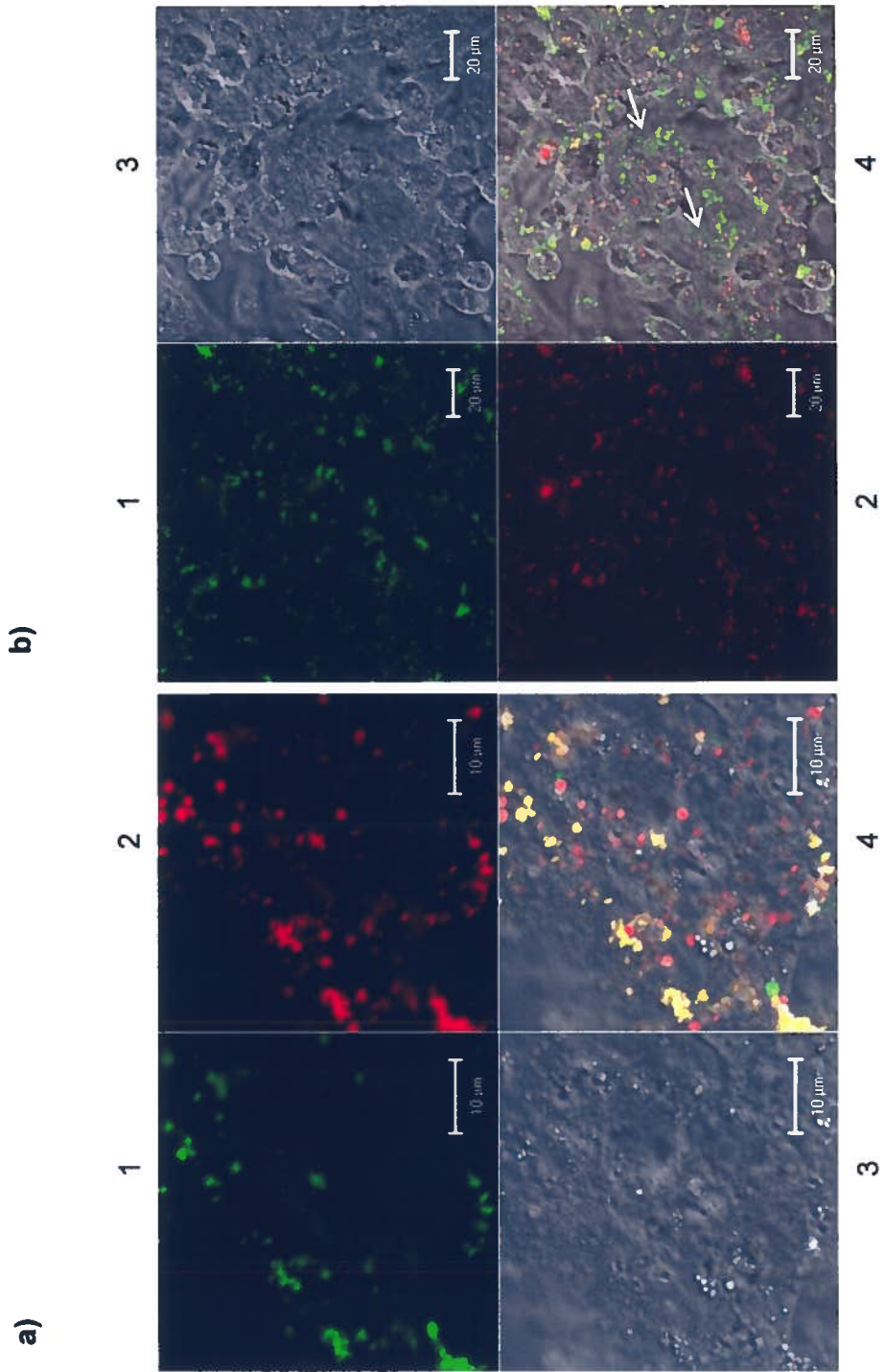
Ces résultats nous ont permis de montrer que le chitosane 92-10-5 est la formulation de chitosane qui permet une internalisation rapide et efficace des NCT et un relâchement important du pVax-GLP-1 à l'intérieur des cellules *in vitro*.

Figure 19 : Internalisation des nanocomplexes pVax-GLP-1/92-10-5 et libération du plasmide recombinant à l'intérieur des cellules HepG2.

Images obtenues par microscopie confocale des cellules HepG2 transfectées avec les NCT marqués à la fluorescéine et à la rhodamine : a) image des cellules 4 heures après la transfection, b) images des cellules 24 heures après la transfection.

1. Détection de la fluorescéine pour localiser le pVax-GLP-1 (en vert).
2. Détection de la rhodamine pour localiser le chitosane (en rouge).
3. Cellules sans détection de fluorochrome.
4. Détection de la fluorescéine et de la rhodamine. En vert : le pVax-GLP-1, en rouge : le chitosane, en **jaune** : le chitosane formant des nanocomplexes avec le pVax-GLP-1.

Les flèches montrent la libération de l'ADN dans les cellules.



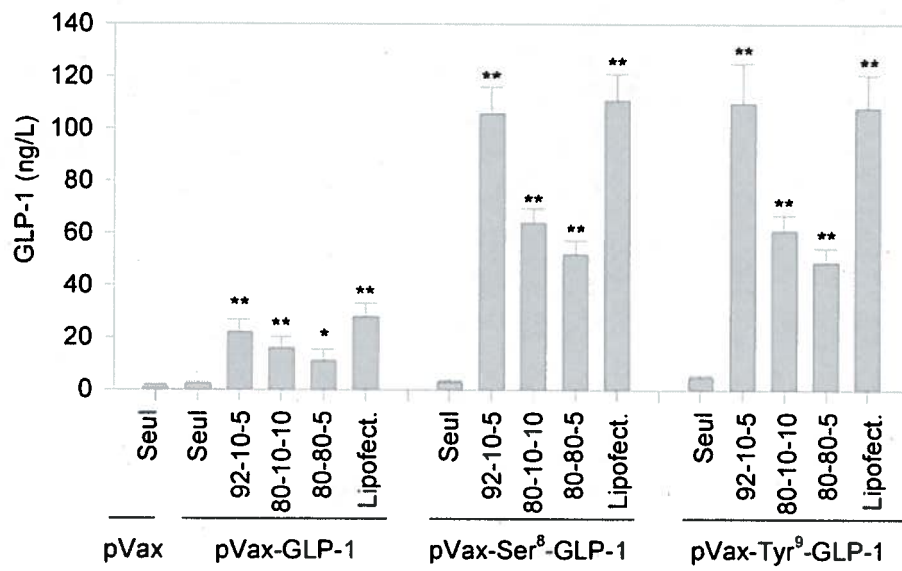
7. Évaluation de l'expression du peptide GLP-1 (7-37) et ses formes variantes *in vitro*.

Les cellules HepG2 ont été transfectées avec les NCT exprimant la forme active du GLP-1, soit le GLP-1 (7-37), ou avec les NCT exprimant les formes variantes du GLP-1 (7-37) soit le [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et le [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)]. Rappelons que ces variantes ont été modifiées pour accroître leur résistance à la dégradation par la DPP-IV et augmenter leur demi-vie biologique. La quantification de l'expression du peptide GLP-1 (7-37) et ses formes variantes *in vitro* a été déterminée par des tests ELISA. Les résultats des tests ELISA ont démontré que l'utilisation des NCT lors de la transfection cellulaire permet d'accroître l'expression du GLP-1 recombinant comparativement à la transfection avec le plasmide pVax-GLP-1 seul (figure 20). Fait très intéressant, Les NCT formés du chitosane 92-10-5 semblent être plus efficaces pour exprimer le GLP-1 recombinant et ses formes variantes (30 à 120 ng/L) en comparaison aux NCT formés des chitosanes 80-10-10 et 80-80-5 (figure 20). Ces résultats ont aussi démontré que les formes variantes du GLP-1 recombinant ([Ser⁸-GLP-1(7-37)] et [Tyr⁹-GLP-1(7-37)]) sont plus résistantes à l'enzyme DPP-IV produite par les cellules HepG2. En effet, la quantité de GLP-1 exprimé était d'environ 4 fois plus importante lorsque les cellules sont transfectées avec les NCT composés des plasmides recombinants pVax/[Ser⁸-GLP-1 (7-37)] (> 100 ng/L) ou pVax/[Tyr⁹-GLP-1 (7-37)] (> 100 ng/L) comparativement aux cellules transfectées avec les NCT composés du plasmide recombinant pVax/GLP-1 (30 ng/L) (figure 20).

Ces résultats montrent clairement que le chitosane, particulièrement la formulation 92-10-5, permet la livraison des NCT et l'expression efficace et stable du GLP-1 ainsi que ses formes variantes *in vitro*.

Figure 20: Quantification de l'expression du GLP-1 (7-37) et ses formes variantes par les cellules HepG2 transfectées avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane

Le plasmide recombinant pVax-GLP-1 exprimant la forme active du GLP-1, soit le GLP-1 (7-37), et les plasmides recombinants exprimant les formes variantes du GLP-1 (7-37) soit le [Ser⁸-GLP-1 (7-37)] et le [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)] complexés à différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD- M_n- ratio N:P)] ont été utilisés pour transfecter les cellules HepG2 à une confluence de 50% en ajoutant 1,3 ou 2,6 µg d'ADN recombinant /cm². Les tests ELISA ont été réalisés 48 heures après la transfection. Les cellules transfectées avec le pVax-GLP-1 (ou ses formes variantes) en utilisant la lipofectamine ont été utilisées comme contrôle positif et celles transfectées avec plasmide pVax seul ont été utilisées comme contrôle négatif.



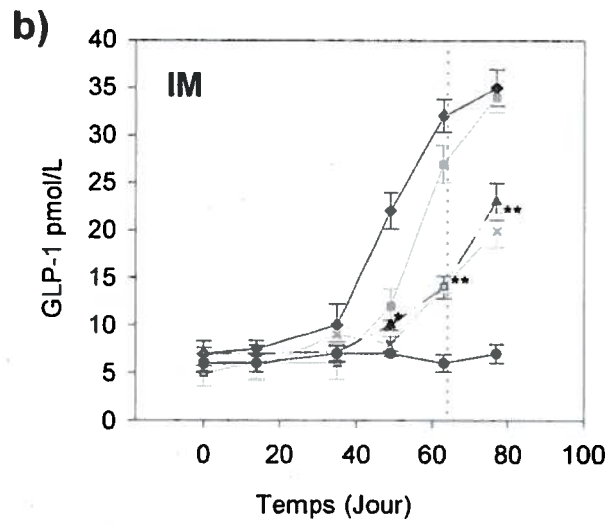
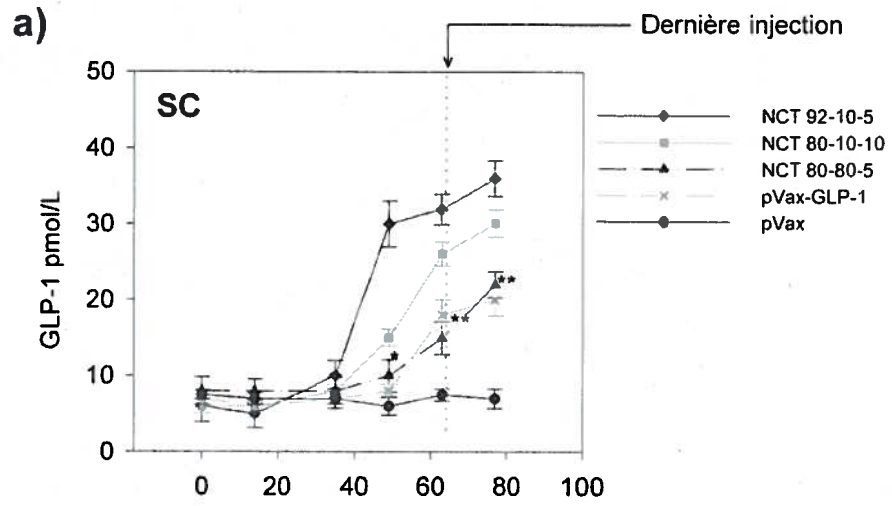
8. Évaluation de l'expression du peptide GLP-1 (7-37) chez les rats ZDF traités par l'administration des NCT (pVax-GLP-1/chitosane)

Les NCT pVax/GLP-1/chitosane ont été utilisés pour évaluer l'expression du peptide thérapeutique GLP-1 chez les rats diabétiques. L'expression du GLP-1(7-37), chez les rats ZDF injectés avec différents NCT par voie sous-cutanée (SC) ou intramusculaire (IM), a été quantifiée par des tests ELISA (figure 21). Tel qu'attendu, l'analyse des plasmas des rats injectés avec les plasmides pVax seuls (contrôle négatif) ont montré la présence d'une quantité du peptide GLP-1 (7-37) équivalente au niveau de base dans les rats non traités (5 pmol/L) (figure 21 a et b). L'analyse du plasma des rats ZDF injectés par voie SC ou IM avec le pVax-GLP-1 seul relativement aux rats ZDF contrôles négatifs, a montré une augmentation de l'expression du GLP-1(7-37) qui atteint 20 pmol/L de GLP-1 (figure 21 a et b). Ce niveau d'expression obtenu est le résultat de la transfection spontanée *in vivo* du pVax-GLP-1 seul.

Fait très intéressant, une expression plus importante du GLP-1 (7-37) chez les rats ZDF injectés par voie SC avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 ou injectées par voie IM avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 et pVax/GLP-1/80-10-10 allant jusqu'à 35 pmol/L au 77^e jour après le début du traitement des rats (figure 21 a et b). Il a été possible de démontrer que, parmi les différents NCT utilisés chez les rats ZDF, les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 administrés par voie SC ou par voie IM permettent une expression plus rapide du peptide GLP-1 (7-37) et ce à partir du jour 49. Dans leur ensemble, ces résultats montrent que l'expression du peptide GLP-1 (7-37) augmente rapidement lorsque les NCT sont administrés par voie SC comparativement à leur administration par voie IM (figure 21). Tel qu'attendu l'administration des NCT formés du chitosane 80-80-5 entraîne une plus faible expression du peptide GLP-1 (7-37) avec 20 pmol/L de GLP-1 (7-37) obtenus au dernier prélèvement (jour 77).

Figure 21: Quantification de l'expression du GLP-1(7-37) recombinant suite à l'administration des NTC pVax-GLP-1/chitosane aux rats ZDF

Le plasmide recombinant pVax-GLP-1 exprimant la forme active du GLP-1, soit le GLP-1 (7-37) complexé à différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD-M_n- ratio N:P)] a été utilisé pour être injecté aux rats ZDF. Les rats ZDF injectés avec le pVax seul ont été utilisés comme contrôle négatif. Dans chaque cas, les rats ZDF ont été injectés avec les NCT aux jours 0, 7, 14, 21, 35, 49 et 63 et l'expression du GLP-1 a été quantifiée par des tests ELISA sur les plasmas des échantillons sanguins prélevés aux jours 0, 7, 35, 49, 63 et 77 suivant le début de la première injection. Les NCT ont été administrés aux rats ZDF par voie a) sous-cutanée (SC) et b) intramusculaire (IM).



9. Test de tolérance au glucose suite au traitement des rats ZDF avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane

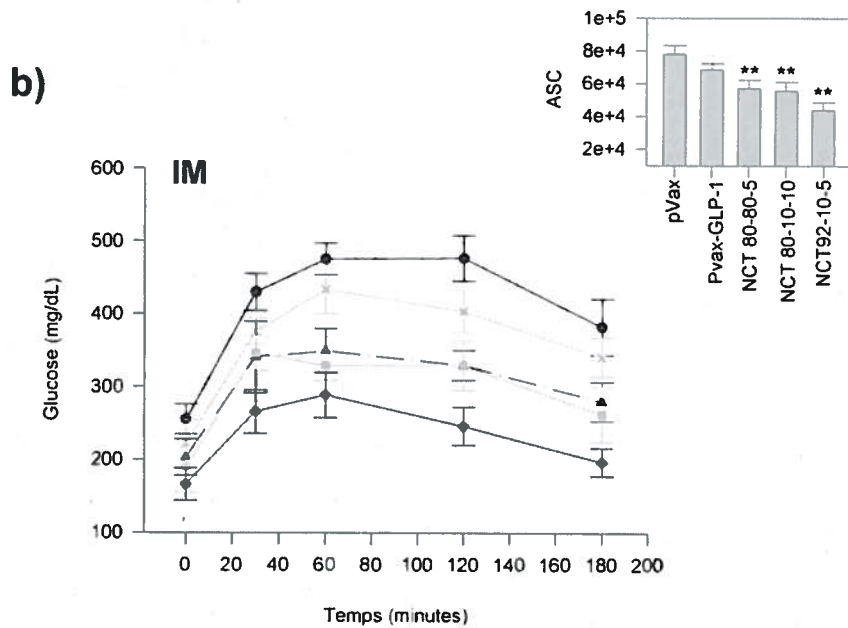
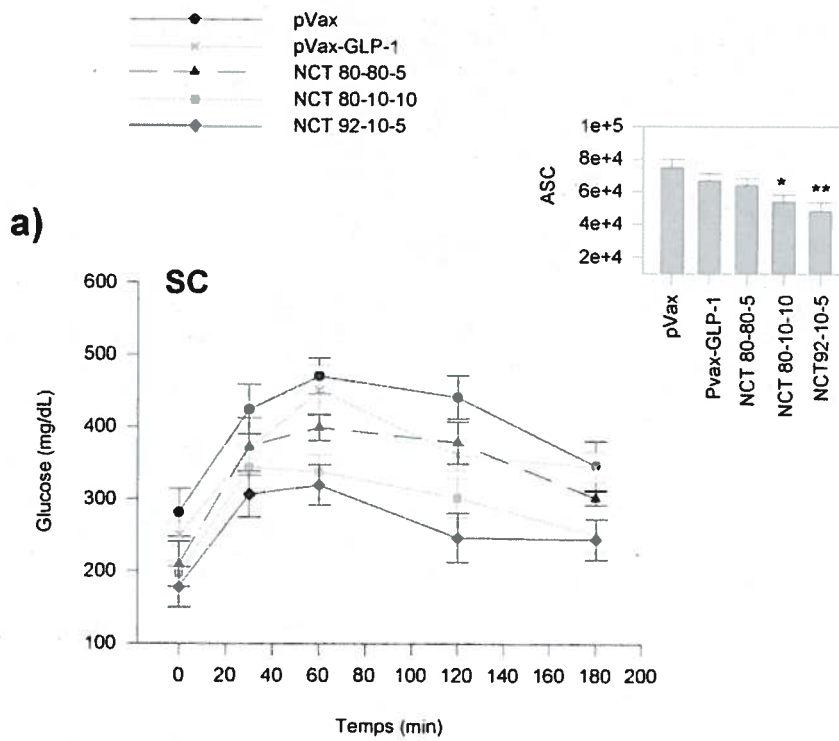
Après avoir étudié l'expression du peptide recombinant GLP-1 chez les rats ZDF traités avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane, un test de tolérance au glucose a été effectué chez ces rats traités. Le test de tolérance au glucose a été fait pour évaluer le potentiel thérapeutique des NCT *in vivo*. En effet, ce test permet de déterminer la capacité et l'efficacité des cellules cibles à capter le glucose circulant dans le sang grâce à l'expression de peptide recombinant GLP-1. Le test de glucose permet donc de déterminer la capacité du peptide GLP-1 recombinant fonctionnel à accentuer l'effet du glucose sur la sécrétion de l'insuline. Pour ce faire, à la fin du traitement par les NCT (jour 77), les rats ZDF ont été soumis à une période de jeûne d'environ 15 heures, suite à laquelle une forte dose de glucose (2g/kg du poids de l'animal) leur a été administrée par injection intrapéritonéale. Le sang a été prélevé avant l'administration du glucose (temps 0) et à différents intervalles de temps suivant son administration (temps 30, 60, 120 et 180 minutes), afin de suivre les changements des concentrations de glucose dans le sang des rats ZDF traités. Les résultats de ces expériences montrent que les rats traités avec le pVax seul ont une faible tolérance au glucose (figure 22). En effet, chez ces rats le taux de glucose était de 250 mg/dl au temps 0 et atteint jusqu'à 480 mg/dl 60 minutes suivant l'administration du glucose (figure 22). De plus, chez ces rats, les résultats montrent que l'aire sous la courbe (ASC) atteint jusqu'à $7,7 \times 10^4$. En accord avec les résultats obtenus lors de la quantification du GLP-1 (7-37), les rats ZDF traités avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 qui expriment la plus grande concentration de GLP-1 (7-37) (figure 21) sont ceux et montrent la plus grande tolérance au glucose avec une ASC de $4,4 \times 10^4$ à $4,8 \times 10^4$. En effet, le taux de glucose était de 150 mg/dl au temps 0 et d'environ 300 mg/dl à 60 minutes suivant l'administration du glucose (figure 22). Les rats ZDF traités, par voie IM, avec les NCT pVax-GLP-1/80-10-10 et les NCT pVax-GLP-1/80-80-5 ont une tolérance au glucose très significativement supérieure à celle des rats traités avec le pVax seul. Lorsque les NCT sont administrés par voie SC, les rats traités avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 et les NCT pVax-GLP-1/80-10-10 montrent respectivement une tolérance très significativement supérieur et significativement à celles des rats traités avec le pVax seul.

Ces résultats montrent que les NCT pVax-GLP-1/chitosane 92-10-5 confèrent la plus grande tolérance au glucose chez les rats diabétiques *in vivo*, en permettant l'expression du GLP-1 fonctionnel capable de stimuler la sécrétion d'insuline, comparativement aux NCT composés des chitosane 80-10-10 et 80-80-5.

Des tests préliminaires, réalisés chez des rats ZDF injectés par voie sous-cutanée (SC) avec les NCT codant pour une forme variante du GLP-1 [Tyr⁹-GLP-1 (7-37)], ont montré qu'il n'y avait pas d'amélioration de la tolérance au glucose suite au traitement. Nous avons donc concentré nos efforts, pour les étapes suivantes, sur l'évaluation du potentiel thérapeutique des NCT pVax-GLP-1 (7-37) codant pour le GLP-1 natif.

Figure 22: Test de tolérance au glucose chez les rats ZDF à la fin du traitement par les NCT pVax-GLP-1/chitosane

Le plasmide recombinant pVax-GLP-1 exprimant la forme active du GLP-1, soit le GLP-1 (7-37) complexé à différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD-M_n- ratio N:P)] a été utilisé pour être injecté aux rats ZDF. Au jour 77, à la fin du traitement, un test de tolérance au glucose a été réalisé, chez les rats ZDF traités avec les NCT, par l'injection d'une seule forte dose de glucose (2g/kg du poids de l'animal). Les taux de glucose à différents intervalles de temps suivant le début du test de tolérance au glucose ainsi que l'aire sous la courbe (ASC) chez les rats traités avec les NCT, ont été comparés avec ceux des rats traités avec le pVax seul (contrôle négatif). Le taux du glucose a été mesuré directement sur les échantillons sanguins des rats ZDF par photométrie. Test de tolérance au glucose chez les rats traités avec les NCT par voie a) sous-cutanée (SC) ou b) intramusculaire (IM).



10. Évaluation de la quantité d'insuline produite chez les rats ZDF traités avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane

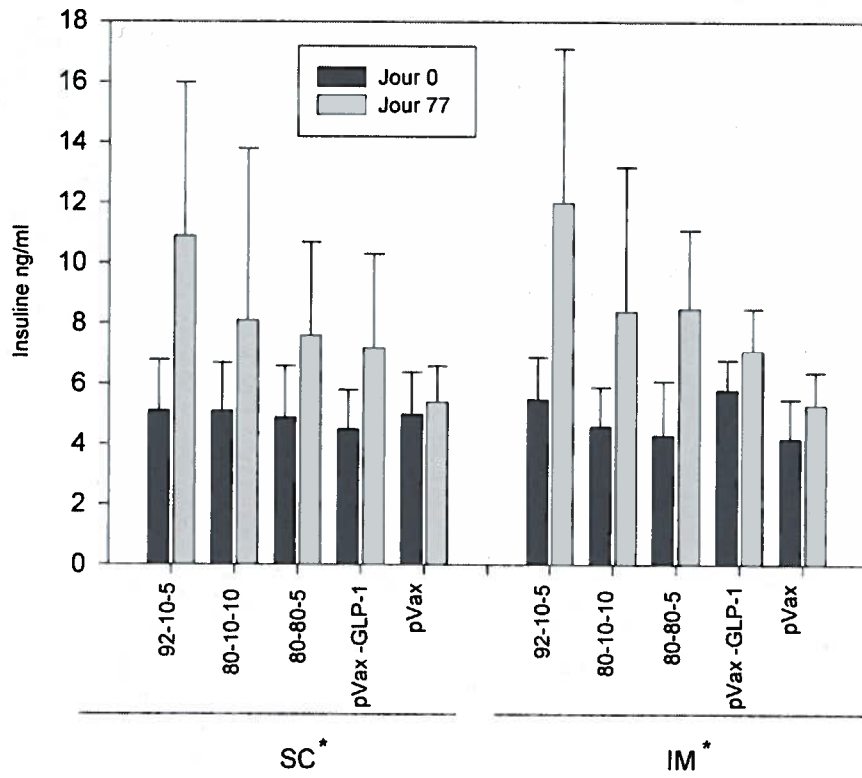
Nous avons évalué la quantité d'insuline produite chez les rats ZDF traités avec les NCT pour confirmer l'expression du GLP-1 recombinant chez ces animaux et déterminer son effet sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline.

La quantité d'insuline chez les rats ZDF injectés avec les différents NCT par voie sous-cutanée (SC) ou intramusculaire (IM), a été déterminée par des tests ELISA. Tel qu'attendu, l'analyse des plasmas des rats injectés avec les plasmides pVax seuls (contrôle négatif) et les rats avant traitement a montré la présence d'une faible quantité d'insuline (environ 5 ng/ml) (figure 23). La quantité d'insuline tend à être supérieure chez les rats injectés avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 par voie IM ou par voie SC et qui atteint respectivement 12 ng/ml ou 10,9 ng/ml après le traitement (figure 23). Les analyses statistiques ont démontré que le traitement des rats ZDF par voie IM ou SC avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane a un effet significatif sur la concentration d'insuline produite chez les rats.

Ces résultats montrent que le traitement, des rats ZDF avec NCT pVax-GLP-1/92-10-5, permet une expression du GLP-1 recombinant, *in vivo*, capable de stimuler la sécrétion de l'insuline et d'améliorer ainsi la tolérance au glucose chez les rats diabétiques. Ces NCT constituent donc un traitement potentiel pour le traitement du diabète.

Figure 23: Quantification de l'insuline avant et après le traitement des rats ZDF avec les NTC pVax-GLP-1/chitosane

Les quantités d'insuline présentes dans les plasmas des rats ZDF ont été évaluées par des tests ELISA avant et après l'administration des NCT contenant le pVax-GLP-1 complexé aux chitosanes [92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 (DD-Mn-N :P)]. Les NCT ont été injectés par voie sous-cutanée (SC) et intramusculaire (IM). Les quantités d'insuline produite chez les rats ZDF traités avec le pVax-GLP-1 seul ou avec le pVax seul (contrôle négatif) ont également été évaluées avant et après leur traitement.



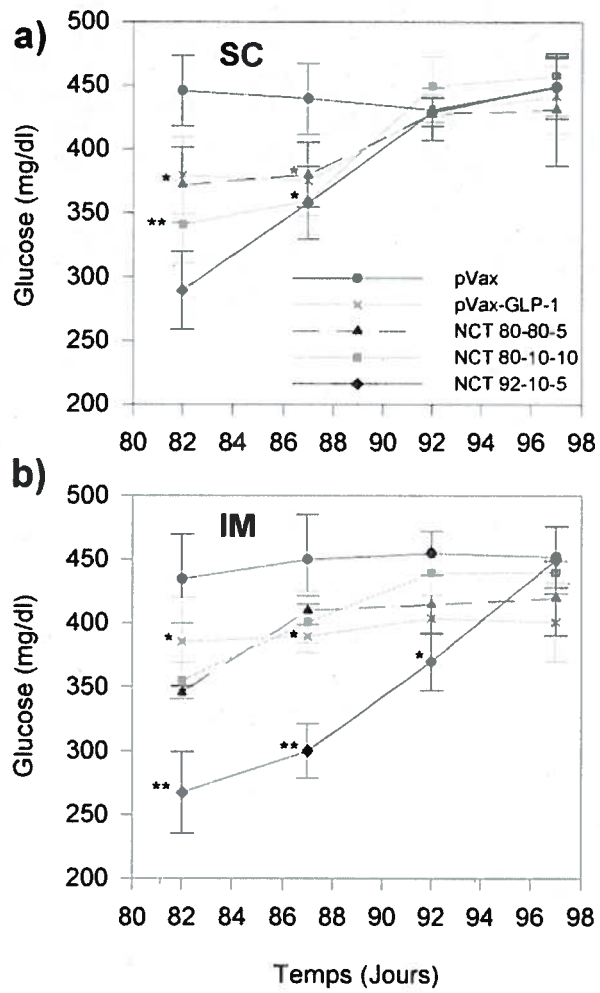
11. Détermination de la durée de l'efficacité du traitement avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane, chez les rats ZDF, par des tests successifs de tolérance au glucose.

Le but de ce test était de déterminer la durée de l'efficacité du traitement chez les rats ZDF traités avec les NCT. Il est important de rappeler que la dernière injection de NCT a été administrée au jour 63 suivant le début du traitement. Aux jours 82, 87, 92 et 97 suivant le début du traitement, les rats ZDF ont été soumis à des tests de tolérance au glucose tel que décrit précédemment. Des prélèvements ont été réalisés 60 minutes suivant l'administration successive des fortes doses de glucose afin de mesurer la concentration de glucose dans le sang des rats traités avec les NCT. Les résultats de ces expériences ont montré que l'administration des NCT pVax-GLP-1/92-10-5 aux rats permet d'améliorer leur tolérance au glucose de façon très significative durant 24 à 29 jours suivant la fin du traitement (300 à 350 mg/dl) comparativement aux rats traités avec le pVax seul (450 mg/dl) (figure 24). L'administration des NCT (pVax-GLP-1/80-10-10) et (pVax-GLP-1/80-80-5) permet d'améliorer la tolérance au glucose de façon significative durant une période plus courte de 19 à 24 jours (figure 24).

Ces résultats confirment bien que les NCT pVax-GLP-1/chitosane 92-10-5 permettent l'expression efficace et continue du peptide thérapeutique GLP-1 qui stimule la sécrétion de l'insuline pour maintenir la tolérance au glucose durant au moins 24 jours chez les rats diabétiques et constituent de ce fait des NCT potentiels pour le traitement du diabète *in vivo*.

Figure 24: Tests successifs de tolérance au glucose chez les rats ZDF à la fin du traitement avec les NTC (pVax-GLP-1/chitosane)

Le plasmide recombinant pVax-GLP-1 exprimant la forme active du GLP-1, soit le GLP-1 (7-37) complexé à différentes formulations de chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD-M_n- ratio N:P)] a été utilisé pour être injecté aux rats ZDF. Des tests successifs de tolérance au glucose ont été réalisés chez les rats ZDF par l'injection de fortes doses de glucose aux jours 82, 87, 92 et 97 suivant le début du traitement avec les NCT. Les taux de glucose, 60 minutes suivant le début de chaque test de tolérance au glucose, chez les rats traités avec les NCT ont été comparés avec ceux des rats traités avec le pVax-GLP-1 seul, et avec le pVax seul (contrôle négatif). Le taux du glucose a été mesuré directement sur les échantillons sanguins des rats ZDF par photométrie. Tests de tolérance au glucose chez les rats traités avec les NCT par voie a) sous-cutanée ou b) intramusculaire.



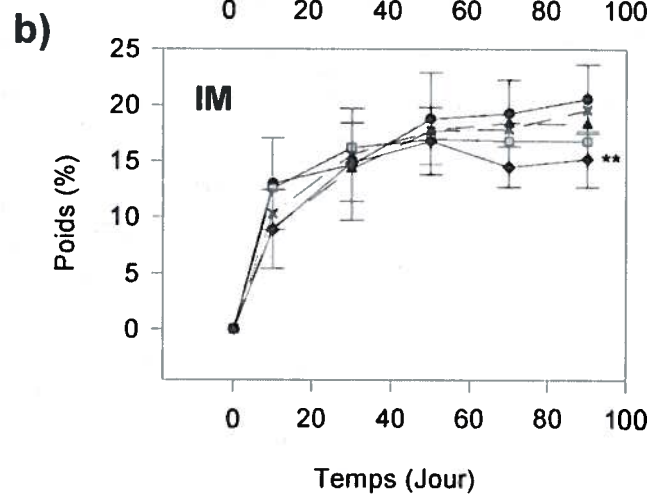
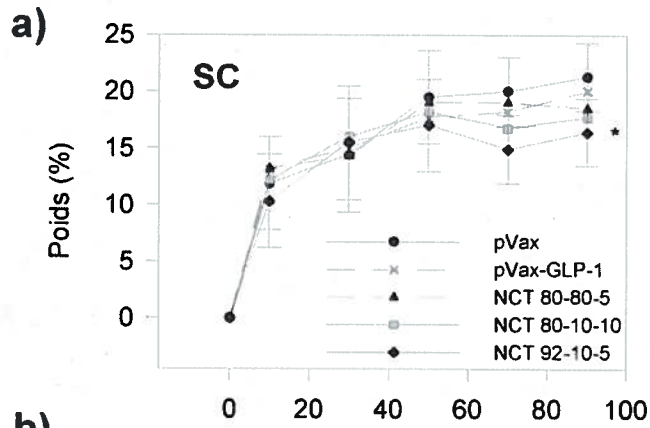
12. Évaluation du poids des rats ZDF durant le traitement avec les NCT

Nous avons évalué la variation du poids des rats ZDF traités avec les NCT pour confirmer l'expression de GLP-1 recombinant chez ces animaux et déterminer son effet sur la diminution de la prise de poids. L'évaluation du poids des rats injectés avec les plasmides pVax-GLP-1 seul et pVax seuls (contrôle négatif) a montré une augmentation du poids des rats qui atteint environ 20 % au jour 50 et qui reste relativement stable jusqu'au jour 90 (figure 26). L'évaluation du poids des rats ZDF injectés par voie SC ou IM avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5, par rapport aux rats injectés avec le pVax seul, a montré une diminution significative de la prise de poids à partir du jour 70 pour atteindre 14,9 % ou 14,5 % respectivement. Au jour 90, la prise de poids augmente légèrement chez ces rats pour atteindre environ 16 % (figure 25). Chez les rats ZDF traités avec les NCT contenant les chitosane 80-10-10 et 80-80-5, par rapport aux rats servant de contrôle négatif, on observe aucune diminution significative de la prise de poids qui varie approximativement entre 17 et 19 % au jour 70 et entre 17 et 18 % au jour 90, (figure 25).

Dans l'ensemble, le traitement des rats ZDF par voie IM ou SC avec les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 permet une légère diminution de la prise de poids. Ces résultats montrent que le traitement, des rats ZDF avec NCT pVax-GLP-1/92-10-5, permet une expression du GLP-1 recombinant, *in vivo*, capable de diminuer l'appétit des rats et ainsi diminuer la prise de poids chez ces rats diabétiques. Les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 constituent donc un traitement potentiel pour le traitement du diabète.

Figure 25: Évaluation du le poids des rats ZDF durant le traitement avec les NCT

La variation du poids (%) des rats ZDF a été évaluée durant le traitement (du jour 0 au jour 90) avec les NCT contenant le pVax-GLP-1 complexé aux chitosanes [92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 (DD-Mn-N :P)]. Le poids des rats ZDF traités avec le pVax-GLP-1 seul ou avec le pVax seul (contrôle négatif) a également été évalué durant le traitement. Les NCT ont été injectés par voie : a) sous-cutanée (SC), b) intramusculaire (IM).



13. Analyse histologique des sites d'injections des NCT pVax-GLP-1/chitosane

L'analyse histologique des sites d'injections des NCT a été faite pour déterminer les effets de l'administration des NCT sur la réponse inflammatoire. La présence d'une grande quantité de leucocytes aux sites d'injections montre que les NCT peuvent induire une réponse immunitaire. Pour se faire, les animaux ayant reçu une seule injection de NCT ont été sacrifiés un, trois ou quatorze jours suivant l'injection (SC) ou (IM). Les images en microscopie des coupes des tissus correspondant aux sites d'injections montrent que l'injection des NCT pVax-GLP-1/92-10-5 ou des NCT pVax-GLP-1/80-10-10 induit une réponse inflammatoire très faible (figure 26 et 27). C'est la présence de la coloration en mauve qui correspond aux noyaux des leucocytes qui nous indique cette réponse inflammatoire. En effet, lorsque les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 et les NCT pVax-GLP-1/80-10-10 sont administrés par voie IM, on observe une faible réponse inflammatoire aux jours 1 et 3 (figures 26 et 27, a, b, c et d). Cette réponse inflammatoire n'est observée au jour 14 (figure 26 et 27, e et f). Lorsque ces deux NCT sont administrés par voie sous-cutanée, on observe une réponse inflammatoire beaucoup plus importante particulièrement avec le NCT pVax-GLP-1/80-10-10 (figure 26 et 27, g et h). Chez les animaux injectés avec les NCT pVax-GLP-1/80-80-5, on observe une plus forte réponse inflammatoire (figure 28). En effet, la plus grande présence de leucocytes est observée au jour 1 et 3 suivant l'administration par voie IM (figure 28 a, b, c et d) et suivant l'administration par voie SC (figure 26 g et h). Il a été aussi possible d'observer la présence de chitosane non dégradé (en vert foncé) jusqu'au jour 3 suivant les injections IM et SC (figure 28, d et h).

Ces résultats montrent que les NCT composés du chitosane 92-10-5 induisent une faible réponse immunitaire comparativement aux NCT composé des chitosanes 80-10-10 ou 80-80-5 chez les animaux traités. Ces résultats viennent donc supporter et confirmer les résultats que nous avons obtenus dans une étude semblable et où nous avons démontré que les formulations de chitosanes influencent différemment la réponse immunitaire *in vivo* (Jean *et al.*, 2009).

En conclusion, l'ensemble de nos résultats révèle, et ce, pour la première fois, que les NCT pVax-GLP-1/92-10-5 seraient les candidats potentiels pour livrer de façon continue et sécuritaire *in vivo* la protéine recombinante GLP-1 à des fins thérapeutiques tout en évitant une réponse inflammatoire du système immunitaire.

Figure 26: Analyse des coupes correspondantes aux sites d'injection des NCT pVax-GLP-1/92-10-5 par voie IM ou SC.

Les tissus musculaires (a,b,c,d,e et f) et les tissus de la peau (g et h) ont été prélevés et colorés à la safranineO/vert intense/hématoxyline suite à l'administration des NCT pVax-GLP-1/92-10-5. a) et b) Tissus au site d'injection, 1 jour suivant l'administration des NCT par voie IM. c) et d) Tissus au site d'injection, 3 jours suivant l'administration des NCT par voie IM. e) et f) Tissus au site d'injection, 14 jours suivant l'administration des NCT par voie IM. g) et h) Tissus au site d'injection, 3 jours suivant l'administration des NTC par voie SC. L'administration induit une faible réponse inflammatoire évidente par la présence réduite de coloration mauve qui correspond aux noyaux des leucocytes. Le plus haut niveau de macrophage et de neutrophiles est observé au jour 1 suivant l'administration par voie SC.

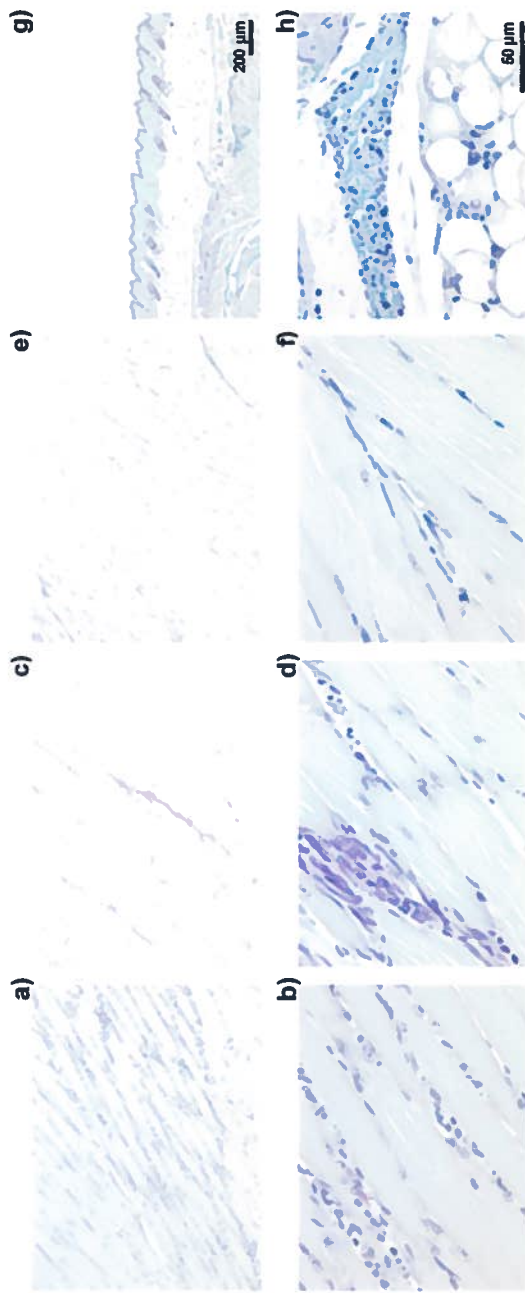


Figure 27: Analyse des coupes correspondantes aux sites d'injection des NCT pVax-GLP-1/80-10-10 par voie IM ou SC.

Les tissus musculaires (a,b,c,d,e et f) et les tissus de la peau (g et h) ont été prélevés et colorés à la safranineO/vert intense/hématoxyline suite à l'administration des NCT pVax-GLP-1/80-10-10. a) et b) Tissus au site d'injection, 1 jour suivant l'administration des NCT par voie IM. c) et d) Tissus au site d'injection, 3 jours suivant l'administration des NCT par voie IM. e) et f) Tissus au site d'injection, 14 jours suivant l'administration des NCT par voie IM. g) et h) Tissus au site d'injection, 3 jours suivant l'administration des NTC par voie SC. L'administration induit une faible réponse inflammatoire évidente par la présence réduite de coloration mauve qui correspond aux noyaux des leucocytes. Le plus haut niveau de macrophage et de neutrophiles est observé au jour 1 suivant l'administration par voie SC.

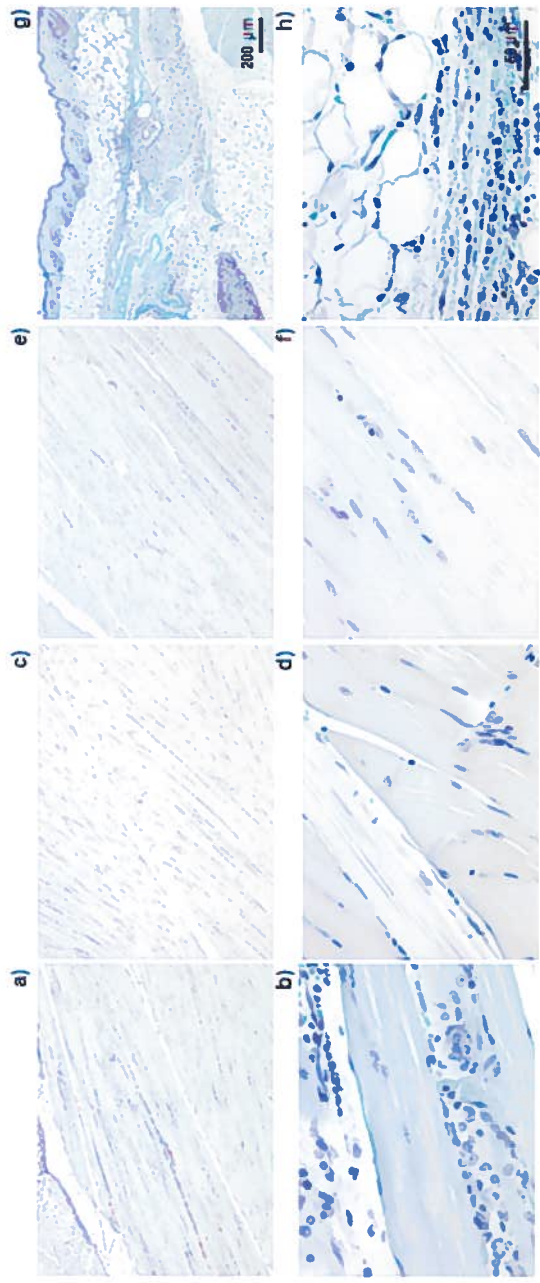
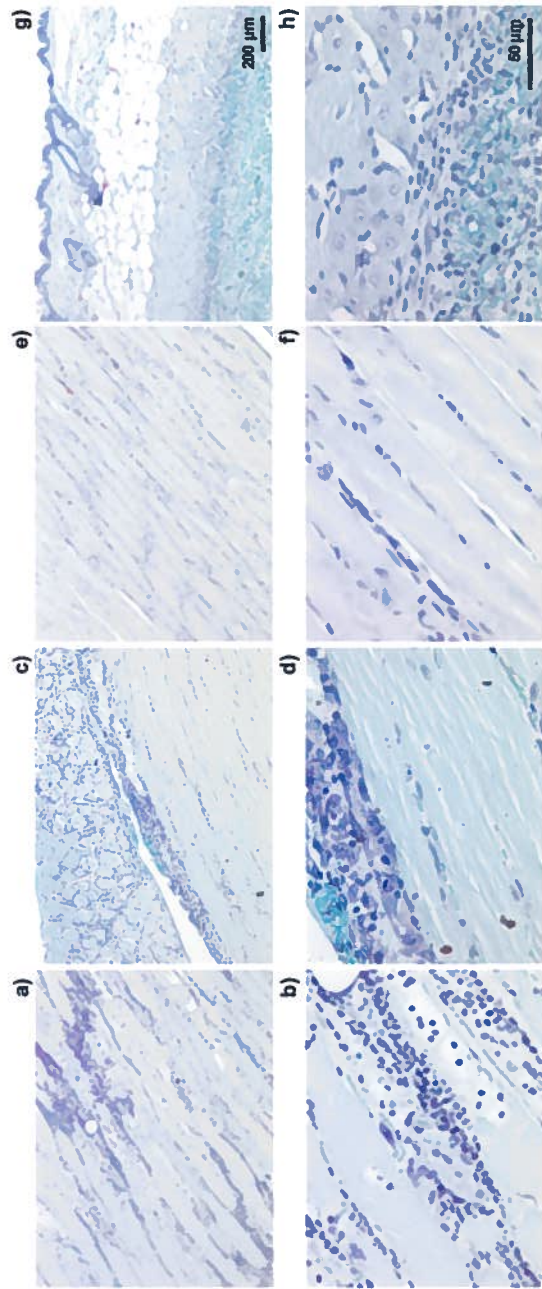


Figure 28: Analyse des coupes correspondantes aux sites d'injection avec les NCT pVax-GLP-1/80-80-5 par voie IM ou SC.

Les tissus musculaires (a,b,c,d,e et f) et les tissus de la peau (g et h) ont été prélevés et colorés à la safranineO/vert intense/hématoxyline suite à l'administration des NCT pVax-GLP-1/80-80-5. a) et b) Tissus au site d'injection, 1 jour suivant l'administration des NTC par voie IM. c) et d) Tissus au site d'injection, 3 jours suivant l'administration des NTC par voie IM. e) et f) Tissus au site d'injection, 14 jours suivant l'administration des NTC par voie IM. g) et h) Tissus au site d'injection, 3 jours suivant l'administration des NTC par voie SC. L'administration induit une forte réponse inflammatoire évidente par la présence importante de coloration mauve qui correspond aux noyaux des leucocytes. Le plus haut niveau de macrophage et de neutrophiles est observé au 1 jour et 3 suivant l'administration par voie IM a),b), c) et d) et suivant l'administration par voie SC g) et h).



14. Élaboration des nanocomplexes ODN –DPP4 /chitosane

Les ODN-DPP4 sont des oligodésoxynucléotides qui miment la structure des siARN-DPP4. Les ODN-DPP4 ont été utilisés dans ce projet pour produire des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane afin de caractériser les propriétés physico-chimiques des NCT siARN-DPP4/chitosane.

14.1. Étude de la Stabilité des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane par électrophorèse sur gels à pH variable

Lors de la formation des nanocomplexes (ODN-DPP4/chitosane), nous avons mis au point une technique simple qui permet de déterminer rapidement le ratio N:P à utiliser pour éviter des excès de chitosane et d'ODN tout en évitant un relargage précoce des ODN. Cette technique consiste à analyser les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10, ayant des ratios N:P variable pour le chitosane, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (13%) à des pH variant de 5 à 9. Les résultats montrent que le ratio N:P du chitosane 92-10 et le pH du gel de polyacrylamide influencent la libération des ODN (figure 29 a) et la quantité de chitosane libre (figure 29 b). En effet, les gels de polyacrylamide à faible pH (pH5-6) (figure 29 a) montrent que la totalité de l'ODN est utilisée pour former des nanocomplexes lorsque le chitosane possède un ratio N:P de 1,5 et plus. Cette analyse a également démontrée que plus le pH du gel de polyacrylamide augmente plus le ratio N:P doit augmenter pour éviter la libération des ODN. Cependant, à un pH 9, un ratio N:P élevé à 10 ne suffit pas pour garder les ODN sous forme de nanocomplexes avec le chitosane (figure 29 a). Lors de l'analyse du chitosane libre (figure 29 b), les gels de polyacrylamide à des pH de 5 à 8 montrent que le chitosane, ayant un ratio de 0,5 à 1,5, est entièrement utilisé pour former des nanocomplexes avec les ODN. Aux mêmes pH, le chitosane, ayant un ratio de 2 à 10, est partiellement utilisé pour former des nanocomplexes avec les ODN. À pH9, le chitosane n'est plus en mesure de former des complexes avec les ODN. De plus, en raison de sa faible charge positive, on remarque que ce chitosane migre difficile sur le gel de polyacrylamide.

Le second objectif de cette expérience était de déterminer la stabilité des complexes ODN-DPP4/chitosane à différent pH et à des intervalles de temps différents suivant leur formation. L'étude du relargage des ODN permet de prédire en partie le comportement des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane, *in vivo*, dans un modèle animal. Le chitosane 92-10 préparé à différent ratio N : P à été mélangé aux ODN-DPP4 afin de former des nanocomplexes. Ensuite, les nanocomplexes ont été incubés entre 30 minutes à 20 heures dans un tampon MES à pH 6,5 ou dans un tampon TAE à pH8. Les échantillons ont été analysés sur un gel de polyacrylamide (13 %) préparé dans des solutions tampons identiques à celles utilisées pour l'incubation des complexes. Les résultats de cette analyse montrent clairement que les nanocomplexes relâchent les ODN-DPP4 lors d'une incubation à un pH 8,0 comparativement à une incubation à un pH de 6,5 (figure 30 a). Les nanocomplexes formés du chitosane 92-10 avec un ratio supérieur à 1 sont stables lorsqu'ils sont incubés dans un tampon à pH 6,5. En augmentant le ratio N:P, on observe une meilleure stabilité des nanocomplexes à pH 8,0 (figure 30 a). Les nanocomplexes formés à un ratio N:P de 10 sont les seuls nanocomplexes stables durant au moins 20 heures d'incubation à pH 6,5 et pH 8,0. Cependant, on observe un excès de chitosane, au ratio N:P 10 à pH 6,5 et pH 8,9 aux différents intervalles de temps suivant la formation des naopacomplexes (figure 30 b).

Tout d'abord, ces résultats montrent que pour étudier la stabilité des nanocomplexes ODN/chitosane par électrophorèse sur gel, il est important de tenir compte du pH du gel afin d'éviter d'estimer inadéquatement la quantité de chitosane nécessaire pour former des nanocomplexes stables. De plus, nos résultats confirment que la stabilité des nanocomplexes et la libération des ODN dans le temps sont influencées par le pH de son milieu environnant. Plus l'environnement des nanocomplexes est basique, plus les nanocomplexes seront instables et libéreront les ODN-DPP4 rapidement. En augmentant le ratio N:P du chitosane ≥ 10 , il est possible d'augmenter la durée de stabilité des nanocomplexes dans un environnement basique à pH 8.

Figure 29 : Profils électrophorétiques des nanocomplexes ODN-DPP4 /chitosane 92-10.

Les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10 (N) formés de chitosane à différent ratio N:P et les chitosanes seuls (C) on été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (13 %) à pH variable (pH 5 à 9), a) gels de polyacrylamide colorés au bromure d'éthidium montrant la libération des ODN, b) gels de polyacrylamide colorés au bleu de coomassie montrant le chitosane libre. L : Standard de poids moléculaire.

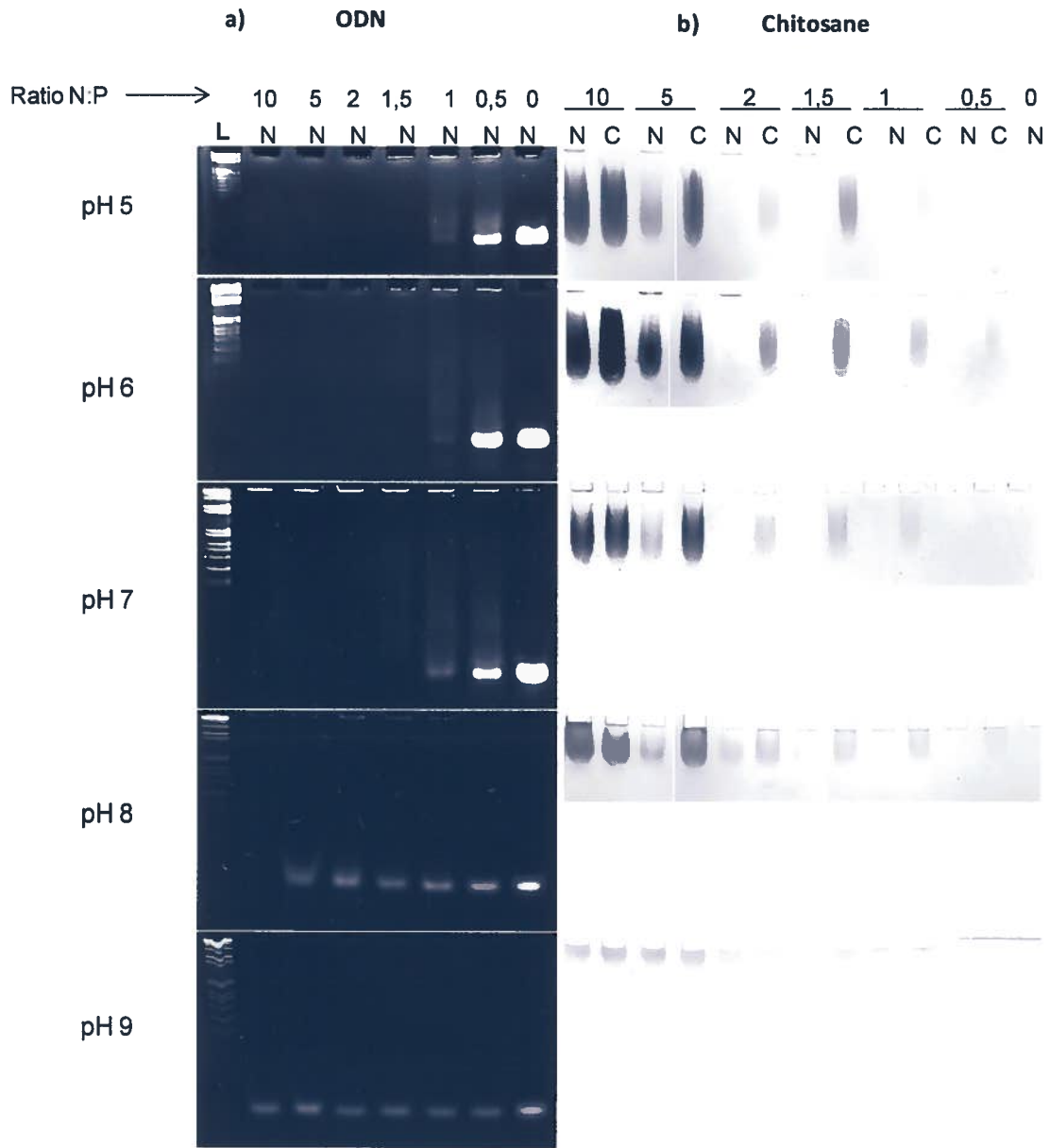
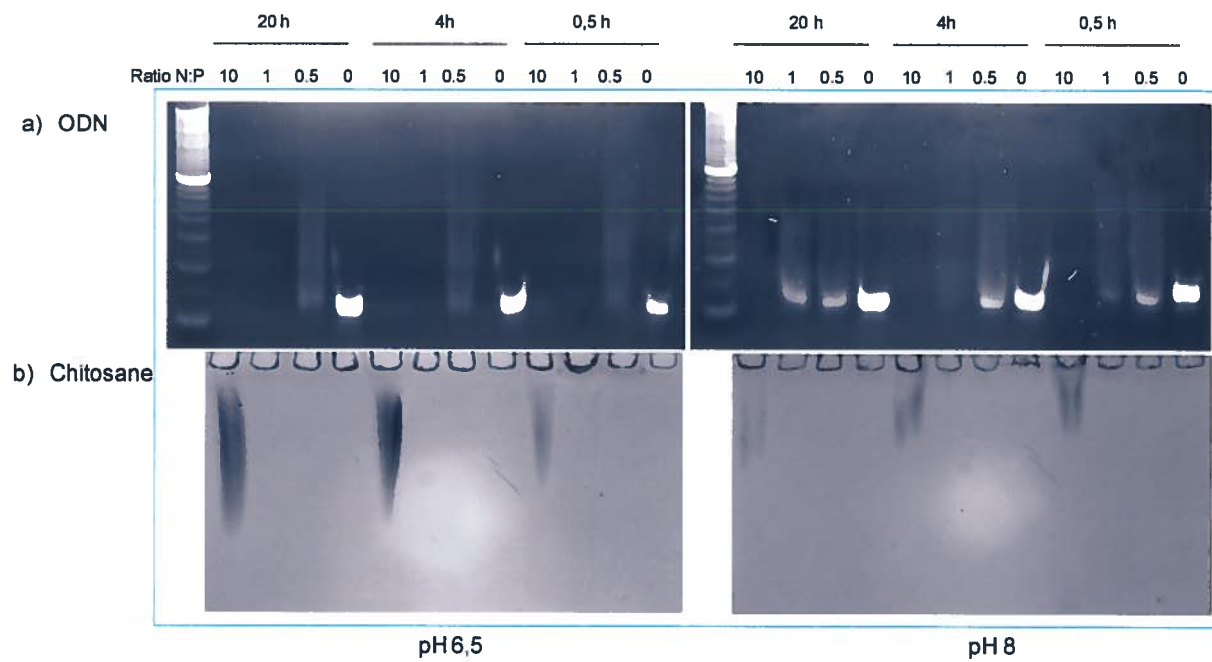


Figure 30: Stabilité des nanocomplexes ODN - DPP4 /chitosane 92-10.

Les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10 ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (13 %) à différents intervalles de temps (20h, 4h et 0,5h) suivant la formation des nanocomplexes à des pH de 6.5 et 8. a) gels de polyacrylamide colorés au bromure d'éthidium montrant la libération des ODN, b) gels de polyacrylamide colorés au bleu de coomassie montrant le chitosane libre.



15. Caractérisation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane

15.1. Analyse par microscopie électronique des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane

La caractérisation de la forme des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane a été réalisée par microscopie électronique à balayage (ESEM). Cette analyse a montré que les nanoparticules ODN-DPP4/chitosane ont une forme sphérique et homogène (figure 31). Les nanocomplexes formés des chitosanes 92-10-5 et 80-10-10 ont des diamètres variés entre 50-90 nm (figure 31, a, b, c, et d). Les nanocomplexes les plus gros ont un diamètre d'environ 125 nm et sont observés avec la formulation de chitosane 80-80-5 (figure 31, e et f).

15.2. Détermination du potentiel zêta et de la taille des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane

Le potentiel zêta et la taille des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane ont été déterminés en utilisant l'appareil Zetasizer Nano ZS par des techniques de diffusion de la lumière (DLS). Cette analyse a montré que la taille hydrodynamique des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane variait de 71 à 111 nm (tableau V). La valeur déterminée du potentiel zêta des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane varie entre 16 à 20 mV (tableau V). Ces résultats montrent que la taille et le potentiel zêta des nanoparticules varient selon le type de formulation de chitosane utilisé.

Figure 31: Images des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane en microscopie électronique.

L'analyse par microscopie électronique à balayage (ESEM) montre les différentes formes des nanocomplexes a) et b) ODN-DPP4/92-10-5, c) et d) ODN-DPP4/80-10-10, e) et f) ODN-DPP4/80-80-5.

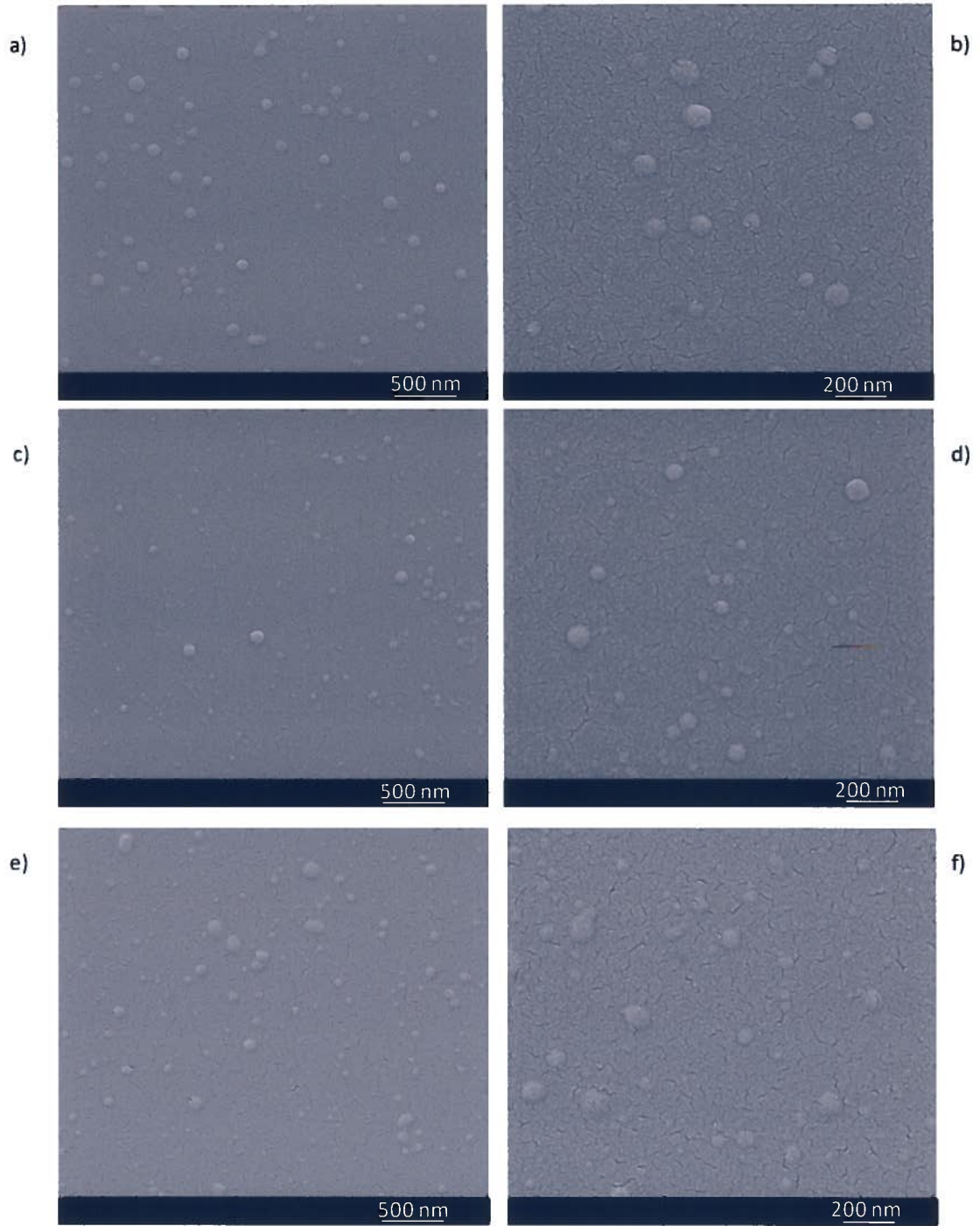


Tableau V : Valeurs de la taille et du potentiel zêta des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane.

Échantillon	taille (nm)	Potentiel Zeta (mV)
ODN-DPP4/92-10-5	71±7	18,2±2,0
ODN-DPP4/80-10-10	81±5	16,2±1,9
ODN-DPP4/80-80-5	111±12	19,5±2,2

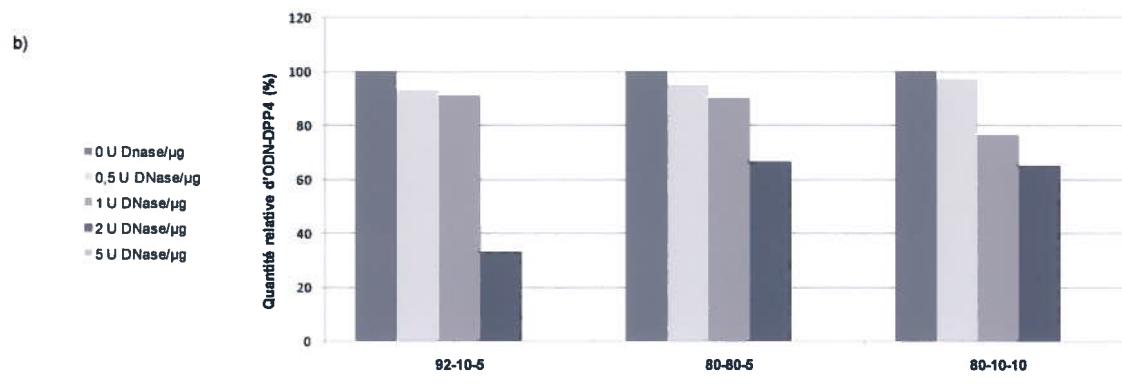
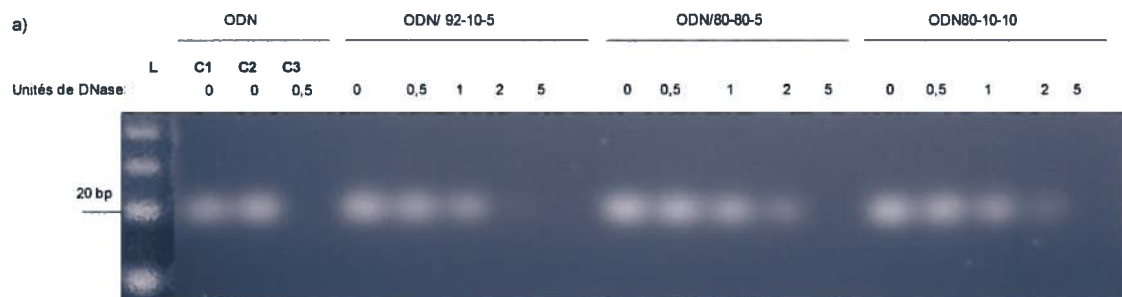
16. Protection, contre la digestion par la DNaseI, des ODN-DPP4 formant des nanocomplexes avec le chitosane

L'effet protecteur que confère le chitosane aux ODN synthétisés de façon à mimer les siARN a été évalué afin de déterminer son potentiel à être utilisé comme système de livraison des siARN *in vivo*. Ainsi, les nanocomplexes formés d'ODN-DPP4/chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10) ont été traités d'abord avec la DNase I suivit de la chitosanase afin de libérer les ODN-DPP4. Les produits de digestion ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 32). Cette analyse a montré que l'ODN-DPP4 seul est complètement digéré avec seulement 0,5 unité de DNase I/ μg d'ODN. La protection, contre la DNase I, des ODN-DPP4 augmente considérablement lorsqu'ils sont complexés au chitosane (figure 32). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que le chitosane protège au-delà de 70% des ODN contre la dégradation par des concentrations élevées de DNase I (1 unité/ μg d'ADN). À des concentrations aussi importantes que 5 unités de DNase I/ μg d'ODN, le chitosane confère une protection partielle aux ODN-DPP4. Toutes les formulations de chitosane testées ont démontré leur potentiel à protéger les ODN. En analysant l'intensité des bandes d'ODN obtenues sur le gel d'agarose, il est possible de déterminer que les chitosanes 80-10-10 et 80-80-5, à de fortes concentrations de DNase I, fournissent une plus grande protection aux ODN-DPP4 (figure 32 b).

Figure 32: Protection, contre la digestion par la DNase I, des ODN-DPP4 formant des nanocomplexes avec le chitosane

a) Les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane [92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD- M_n - ratio N:P)] ont été incubés en présence de différentes concentrations de DNase I (0, 0,5, 1, 2, 5 unités de DNase par μg d'ODN) durant 90 minutes à 37 °C. La DNase I a été inactivée puis le chitosane des nanocomplexes a été digéré par la chitosanase afin de permettre la libération des ODN. Les bandes correspondantes aux ODN-DPP4 incubés en présence de la DNase I sont comparées aux contrôles (C1, C2, C3). C1 : ODN-DPP4 incubé sans la DNase I et sans chitosanase. C 2 : ODN-DPP4 incubé sans la DNase I et avec la chitosanase. C3 : ODN-DPP4 incubé avec 0,5 unité de DNase I et la chitosanase. L : Standard de poids moléculaire 10 pb.

b) Pour chacun des chitosanes, la quantité relative d'ODN (%) est déterminée en comparant l'intensité des bandes d'ODN de l'échantillon incubé avec la DNase I avec l'intensité des bandes d'ODN du même échantillon incubé en absence de la DNase I (100%).



17. Étude de l'internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane *in vitro*

Les nanocomplexes, formés d'ODN-DPP4 marqués à la fluorescéine (en vert) et de chitosane marqué à la rhodamine (en rouge), ont été utilisés pour transférer les cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 afin d'étudier l'internalisation des nanocomplexes par microscopie confocale. Les images obtenues en microscopie confocale montrent que les nanocomplexes (ODN-DPP4/92-10-5) ont été fortement internalisés et que les ODN-DPP4 (en vert) sont relâchés abondamment dans les cellules HepG2, 24 heures suivant leur transfection (figure 33, a et b). Les nanocomplexes formés des chitosanes 80-10-10 et 80-80-5 montrent un niveau d'internalisation légèrement plus faible dans les cellules HepG2, 24 heures suivant la transfection comparativement aux nanocomplexes formés du chitosane 92-10-5 (figure 34 a et b). Ce fait s'observe par un relâchement des ODN-DPP-4 (en vert) légèrement moins important dans les cellules transfectées (figure 34 a et b).

Les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5 ont été utilisés ensuite afin d'étudier l'internalisation des nanocomplexes dans les lignées cellulaires Caco-2 et HT-29. Les résultats de ces expériences ont démontrés que les nanocomplexes sont fortement internalisés dans les cellules Caco-2 et que les ODN-DPP-4 sont relâchés 24 heures suivant leur transfection, alors que l'internalisation et le relâchement des ODN-DPP-4 sont pratiquement inexistantes dans les cellules HT-29.

Figure 33 : Internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5 et libération du des ODN-DPP4 à l'intérieur des cellules HepG2.

Images obtenues par microscopie confocale des cellules HepG2, 24 heures après leur transfection avec les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5 marqués à la fluorescéine et à la rhodamine : a) image en plan éloigné des cellules transfectées, b) zoom appliqué sur des cellules transfectées.

1. Détection de la fluorescéine pour localiser les ODN (en vert).
2. Détection de la rhodamine pour localiser le chitosane (en rouge).
3. Cellules sans détection de fluorochrome.
4. Détection des membranes cellulaires (en bleu)
5. Détection de la fluorescéine, de la rhodamine et des membranes cellulaires. En vert : les ODN, en rouge : le chitosane, en bleu : les membranes cellulaires, en jaune : le chitosane formant des nanocomplexes avec les ODN.

Les flèches montrent la libération de l'ADN dans les cellules.

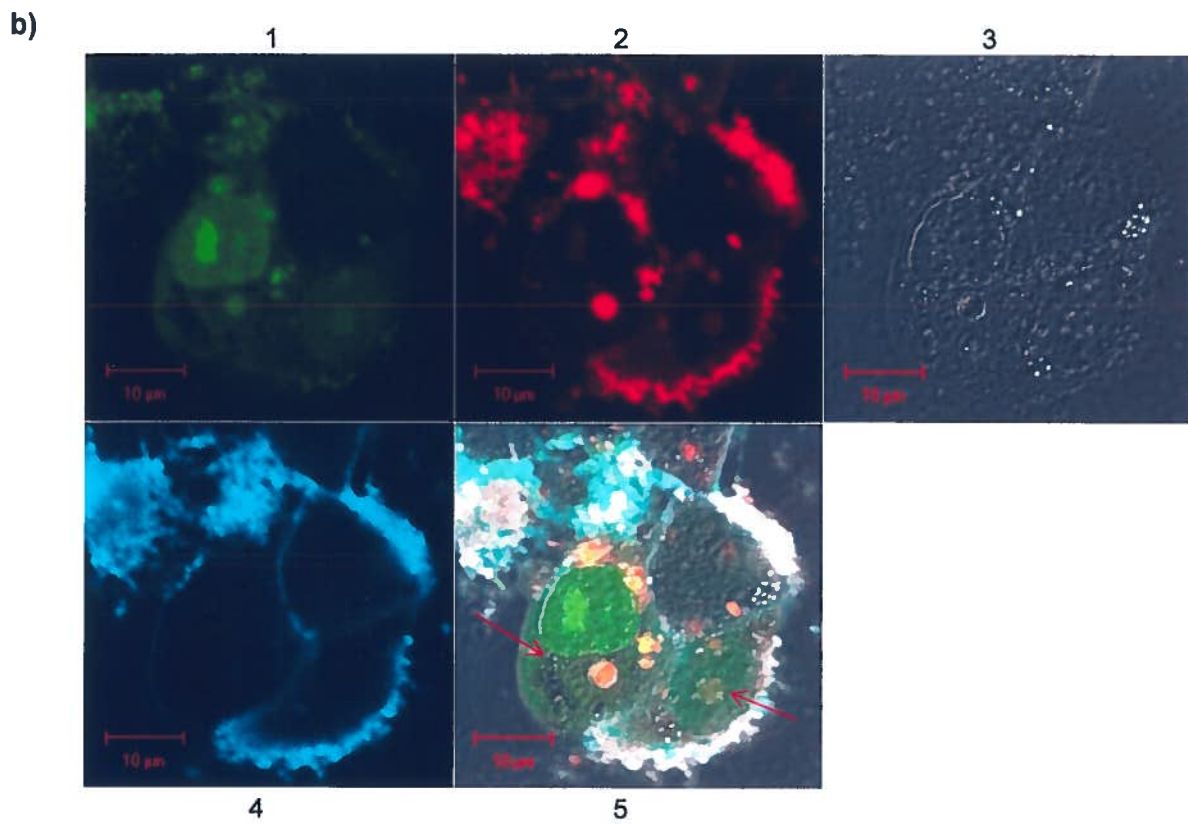
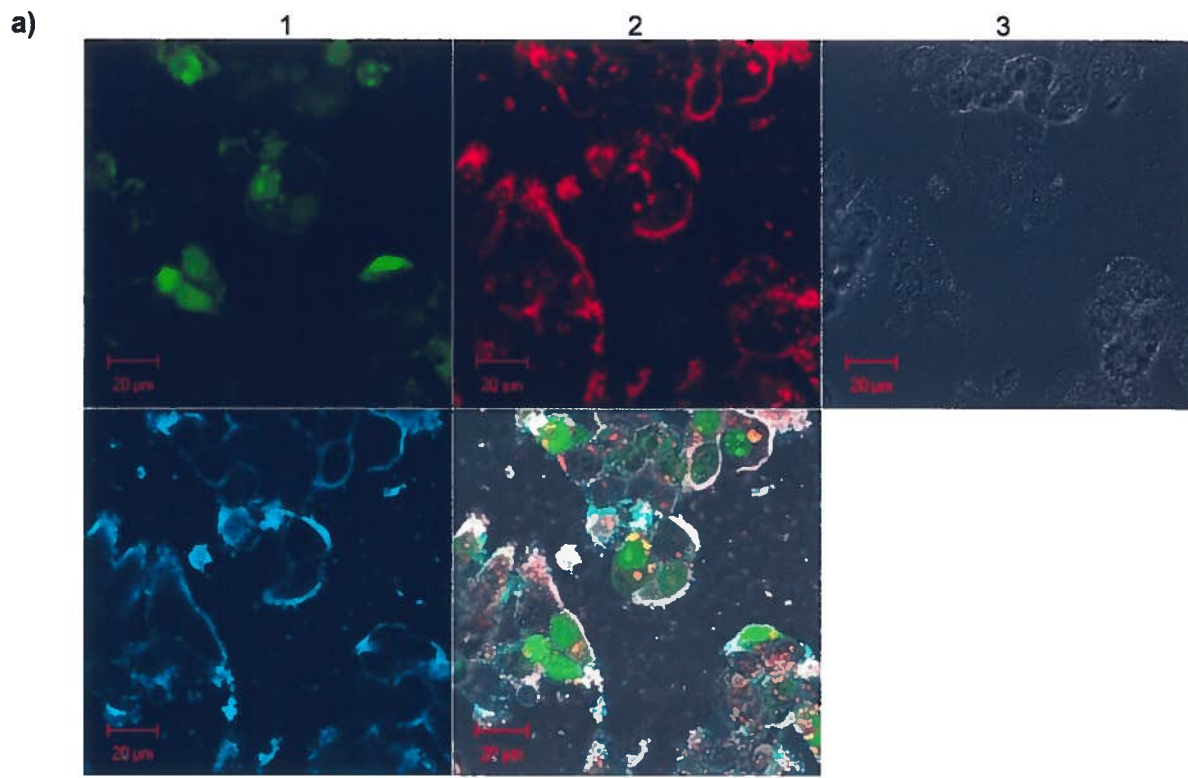
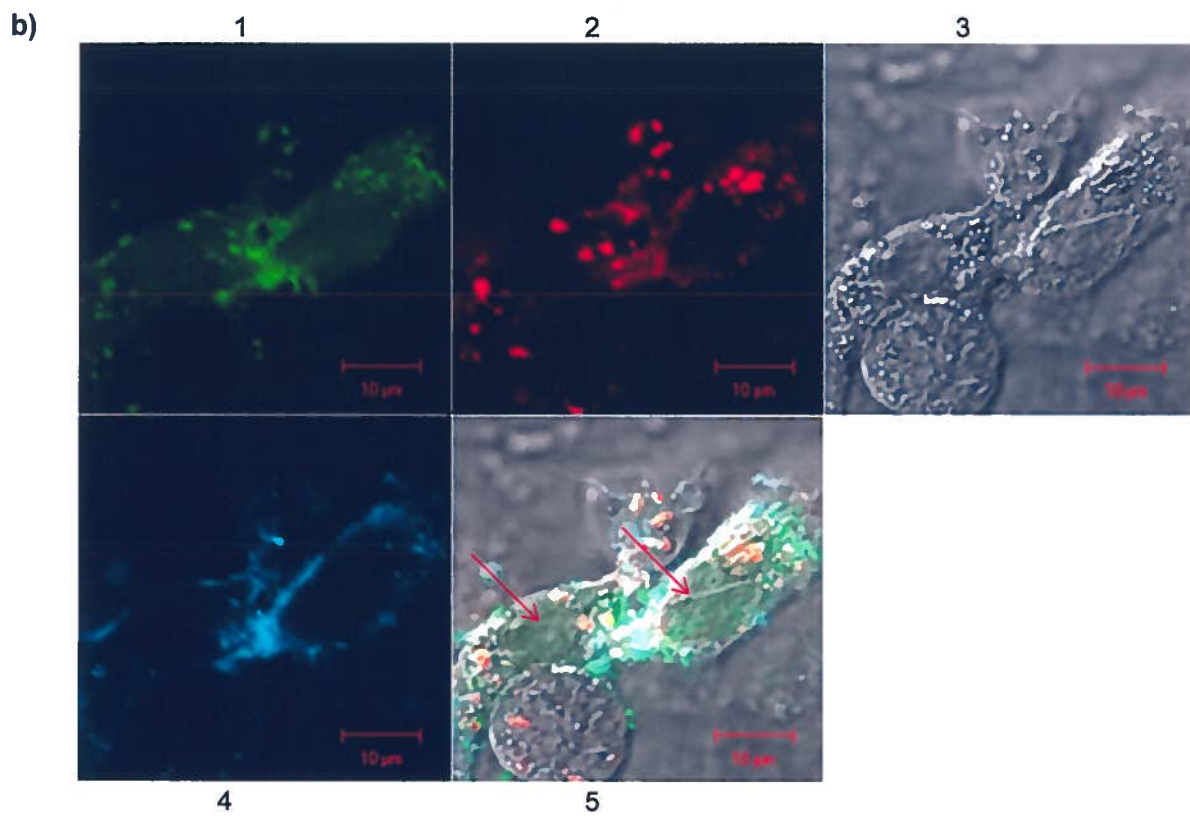
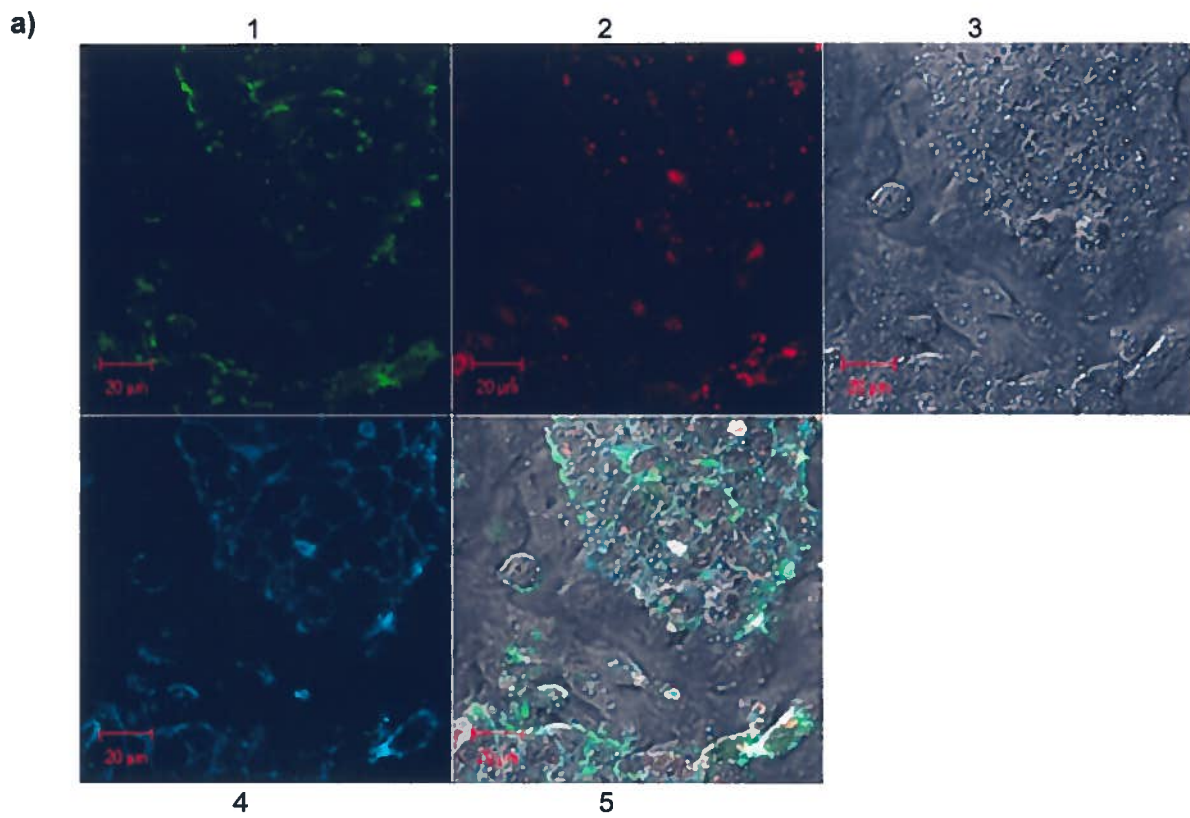


Figure 34 : Internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/80-10-10 et libération du des ODN-DPP4 à l'intérieur des cellules HepG2.

Images obtenues par microscopie confocale des cellules HepG2, 24 heures après leur transfection avec les nanocomplexes ODN-DPP4/80-10-10 marqués à la fluorescéine et à la rhodamine : a) image en plan éloigné des cellules transfectées, b) zoom appliqué sur des cellules transfectées.

1. Détection de la fluorescéine pour localiser les ODN (en vert).
2. Détection de la rhodamine pour localiser le chitosane (en rouge).
3. Cellules sans détection de fluorochrome.
4. Détection des membranes cellulaires (en bleu)
5. Détection de la fluorescéine, de la rhodamine et des membranes cellulaires. En vert : les ODN, en rouge : le chitosane, en bleu : les membranes cellulaires, en jaune : le chitosane formant des nanocomplexes avec les ODN.

Les flèches montrent la libération de l'ADN dans les cellules.



18. Cinétique d'internalisation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane *in vitro*

Afin de déterminer à quel moment débute l'internalisation des nanoparticules, les cellules HepG2 ont été observées en microscopie confocale à différent temps suivant leur transfection avec les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5. Les images en microscopies confocales montrent clairement qu'il y a une internalisation rapide des nanocomplexes (en jaune) une heure seulement suivant leur ajout aux cellules (figure 35 a). Seulement deux heures plus tard, on observe une progression de l'internalisation des nanoparticules et un relâchement des ODN-DPP4 (en vert diffus) débutant dans le cytoplasme des cellules transfectées (figure 35 b). 4 et 6 heures après la transfection, on observe l'internalisation de nombreux nanocomplexes et le relâchement important des ODN-DPP4 qui se localisent principalement au niveau du cytoplasme des cellules transfectées. À ce moment, les images montrent la présence de plusieurs nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5 sur les membranes cellulaires. 24 heures après la transfection, on observe une augmentation importante du nombre de cellules transfectées (figure 33). Les ODN-DPP4 relâchés (en vert) sont localisés au niveau du cytoplasme et du noyau des cellules. Le nombre de nanocomplexes sur les membranes cellulaires est alors réduit. À 30 heures le nombre de cellules transfectées semble relativement stable par contre la quantité d'ODN-DPP4 dans le noyau a augmentée dans les cellules transfectées.

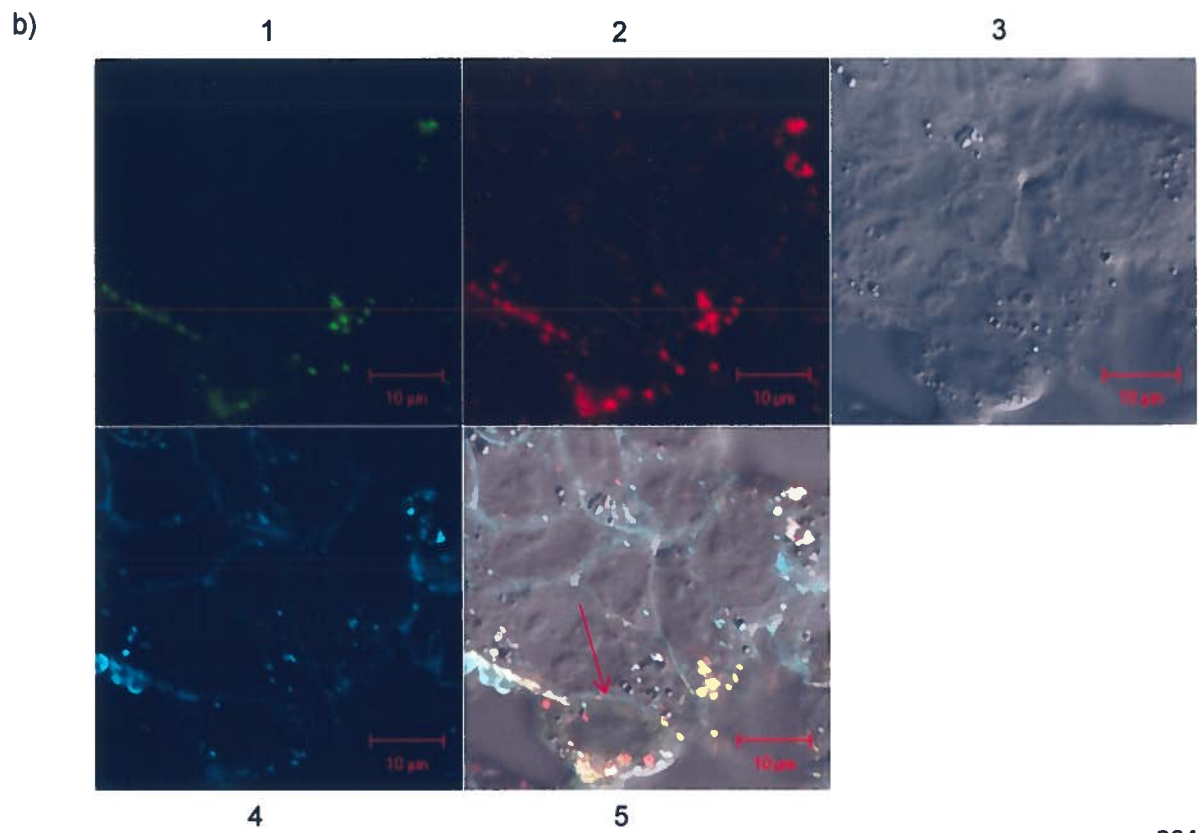
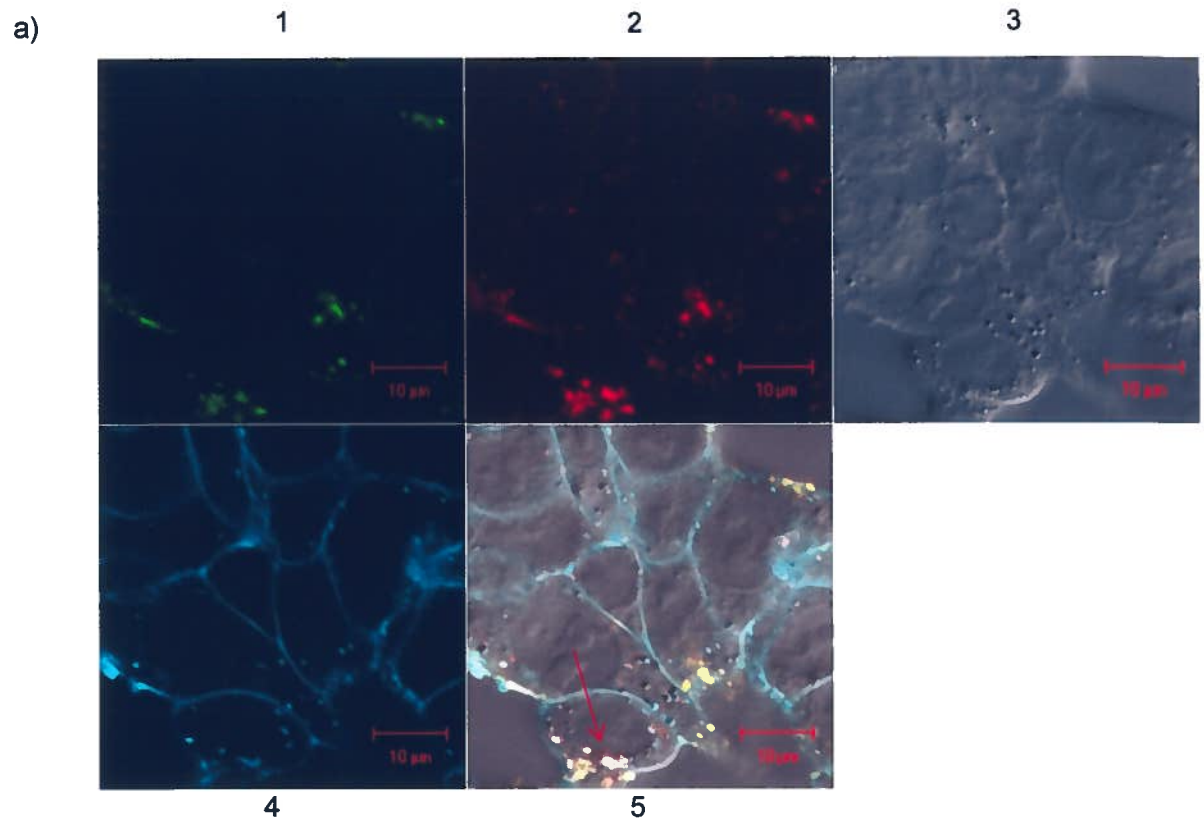
L'ensemble de ces résultats montre clairement que les nanocomplexes (ODN-DPP4/chitosane), et particulièrement les nanocomplexes formés du chitosane 92-10-5, permettent la transfection et l'internalisation rapide à l'intérieur des cellules *in vitro* et le relâchement des ODN-DPP4 de manière efficace.

Figure 35: Images en microscopie confocale des cellules HepG2, 1 et 2 heures suivant l'ajout des nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5.

Images obtenues par microscopie confocale. La flèche indique une cellule transfectée avec les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10-5 marqués à la fluorescéine et à la rhodamine : a) 1 heure suivant la transfection, b) 2 heures suivant la transfection.

1. Détection de la fluorescéine pour localiser les ODN (en vert).
2. Détection de la rhodamine pour localiser le chitosane (en rouge).
3. Cellules sans détection de fluorochrome.
4. Détection des membranes cellulaires (en bleu)
5. Détection de la fluorescéine, de la rhodamine et des membranes cellulaires. En vert : les ODN, en rouge : le chitosane, en bleu : les membranes cellulaires, en jaune : le chitosane formant des nanocomplexes avec les ODN.

Les flèches montrent l'entrée des nanocomplexes puis la libération de l'ADN dans la cellule.



19. Silencage du gène de la DPP-IV par l'utilisation des NCT siARN-DPP4/chitosane

Les expériences précédentes ont démontré que les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane, mimant les NCT (siARN DPP4/chitosane), possèdent des caractéristiques physico-chimiques propres aux nanocomplexes couramment utilisées en thérapie génique. De plus, ces expériences ont démontré clairement que nos nanocomplexes ont la capacité de transférer des cellules *in vitro*, ils ont donc un potentiel intéressant comme système de livraison des siARN pour le silencage de gènes. À cette étape du projet de recherche, le but des expériences était d'inhiber partiellement l'expression du gène de la DPP-IV en utilisant les NCT siARN-DPP4/chitosane. Pour se faire, les NCT siARN-DPP4/chitosane ont été formés de la même façon que leurs mimes (ODN-DPP4/chitosane), puis ils ont été utilisés pour transférer les cellules *in vitro*.

19.1. Activité enzymatique de la DPP-IV dans les cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 traitées avec les NCT siARN-DPP4/chitosane.

Quarante-huit heures suivant la transfection des cellules Caco-2 et HepG2 avec les NCT siARN-DPP4/chitosane, des tests enzymatiques ont été réalisés afin de mesurer l'expression de l'enzyme DPP-IV. Le pourcentage de l'activité enzymatique a été déterminé en attribuant une activité de 100 % aux cellules transfectées avec les siARN sans cible/chitosane (contrôles négatifs). Les résultats de ces tests ont montré que les NCT formés du chitosane 92-10-5 permettent le silencage du gène DPP-IV. En effet, on observe une inhibition d'environ 50 % de l'activité enzymatique de la DPP-IV dans les cellules HepG2 et Caco-2 traitées avec les NCT siARN-DPP4/92-10-5 (figure 36). Cette inhibition est similaire à celle obtenue avec les lipoplexes formés de siARN/lipide (figure 36). En utilisant les NCT formés des chitosanes 80-10-10 et 80-80-5, on observe une légère diminution de l'activité enzymatique du DPP-IV (figure 36). Encore une fois, et en accord avec les observations réalisées en microscopie confocale, les cellules HT-29 ne semblent pas être transfectées par les NCT, et par conséquent l'activité enzymatique du DPP-IV demeure stable dans ces cellules (figure 36).

19.2. Évaluation de la cytotoxicité des NCT siARN-DPP4/chitosane

La cytotoxicité causée par les traitements avec les NCT siARN-DPP4/chitosane a été évaluée *in vitro* par des tests de viabilité. Dans cette étude, les cellules non transfectées (contrôle positif) ont un pourcentage de viabilité fixé à 100 % (figure 37 a, histogramme NT). Cette étude a montré que la transfection des cellules HepG2 avec les lipoplexes siARN-DPP4/Lipide et les NCT siARN-DPP4/chitosane diminue très peu la viabilité des cellules comparativement aux cellules non-transfectées (figure 37 a). Toutefois, la transfection avec les NCT siARN-DPP4/80-80-5 réduit de façon significative la viabilité des cellules HepG2. La viabilité des HepG2 transfectées NCT siARN-DPP4/80-80-5 est comparable à celle des cellules incubées en présence de 10% de DMSO (contrôle négatif) (figure 37 a, histogramme DMSO).

Ces résultats montrent très bien qu'à l'exception des NCT siARN-DDP4/80-80-5, les NCT siARN-DPP4/chitosane, n'ont pas d'effet toxique sur les cellules HepG 2 *in vitro*.

19.3. Quantification du niveau d'expression de l'ARNm de gène de la DPP-IV par qRT-PCT

Le but de cette expérience était de confirmer le silençage du gène DPP-IV causé par les NCT siARN-DPP4/chitosane en quantifiant l'ARNm correspondant à l'enzyme DPP-IV. Ainsi, 24 heures suivant la transfection des cellules HepG2 avec les NCT siARN-DPP4/chitosane, l'ARN total des cellules a été extrait et analysé afin d'entreprendre des techniques de PCR en temps réel (qRT-PCR) pour quantifier l'ARNm correspondant au DPP-IV. Le pourcentage d'expression a été déterminé en attribuant une expression de 100 % aux échantillons contrôles négatifs (siARN sans cible/chitosane). Les lipoplexes siARN/lipide ont été utilisés comme contrôles positifs. Les résultats ont démontré que les NCT formés du chitosane 92-10-5 sont ceux qui permettent la plus grande réduction de l'expression de l'ARNm correspondant au DPP-IV. Par rapport aux échantillons provenant des cellules

HepG2 traitées avec les NTC siARN sans cible, on observe une diminution de 65 % de la quantité de l'ARNm correspondant au DPP-IV dans les cellules traitées avec les NCT siARN-DPP4/92-10-5. Cette inhibition se rapproche de celle obtenue avec le contrôle positif (siARN/lipide) (figure 37 b). Ces résultats ont aussi démontré que la quantité d'ARNm correspondant au gène de la DPP-IV diminue de façon importante, soit d'environ 55 %, lors de l'utilisation des chitosanes 80-10-10 et 80-80-5 (figure 37 b).

L'ensemble de ces résultats démontre qu'*in vitro*, les NCT siARN-DPP4/chitosane peuvent réduire l'activité de l'enzyme DPP4 qui dégrade le GLP-1 et sont donc des candidats potentiels pouvant être utilisés en thérapie génique pour traiter le diabète de type 2.

Figure 36: Activité enzymatique de la DPP-IV dans les cellules HepG2, Caco-2 et HT-29 traités avec les NCT siARN-DPP4/chitosane.

Les cellules ont été soumises des tests enzymatiques spécifiques pour la DPP-IV, 48 heures suivant leur transfection avec les nanocomplexes siARN-DPP4/chitosane. Le pourcentage d'expression a été déterminé par comparaison en attribuant une expression de 100 % aux échantillons contrôles négatifs siARN sans cible/chitosane (non présenté). Les nanocomplexes siARN/lipide ont été utilisés comme contrôles positifs.

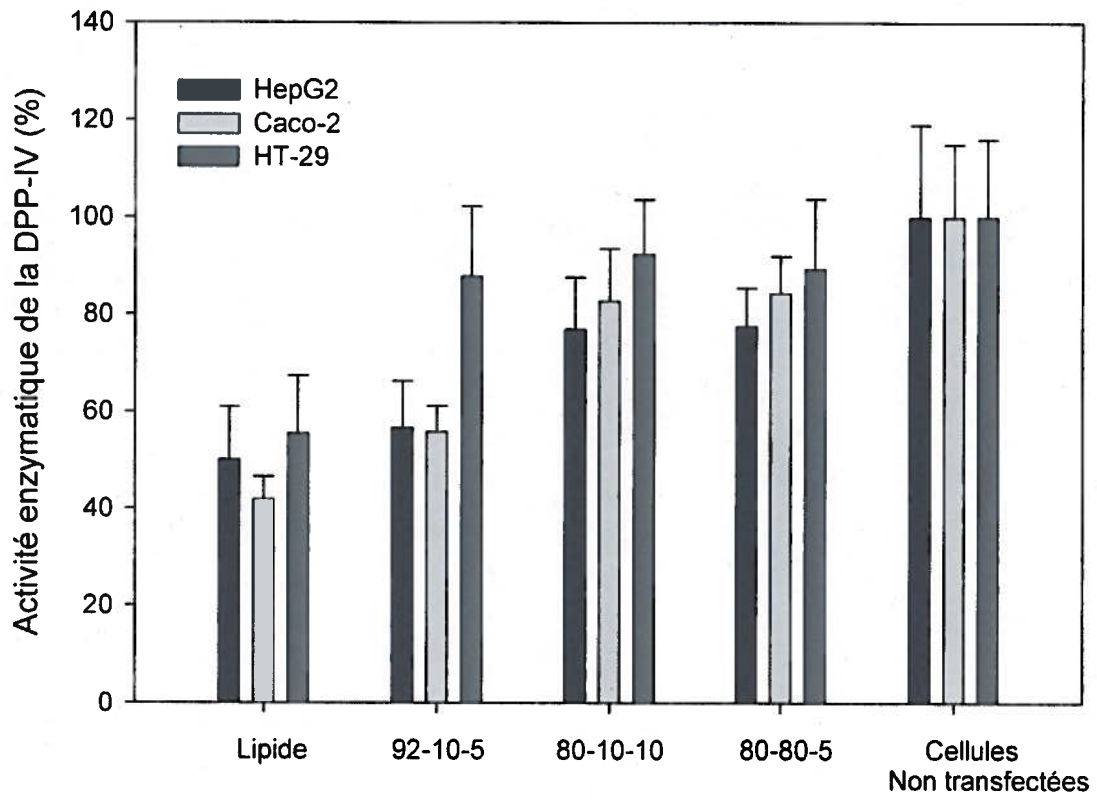
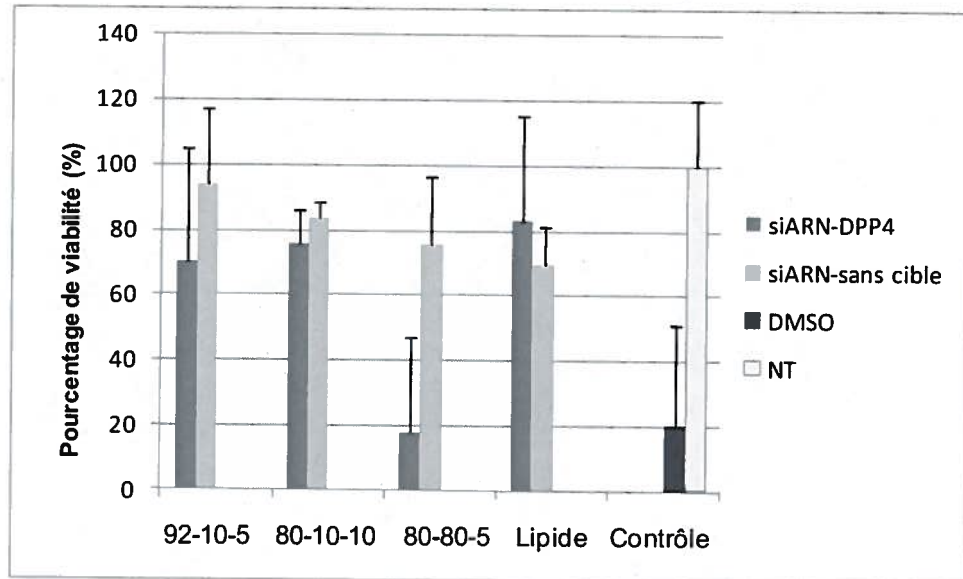


Figure 37: Niveau de viabilité et quantification relative du niveau d'expression d'ARNm du gène de la DPP-IV qRT-PCR dans les cellules HepG2 traitées avec les NCT siARN-DPP4/chitosane

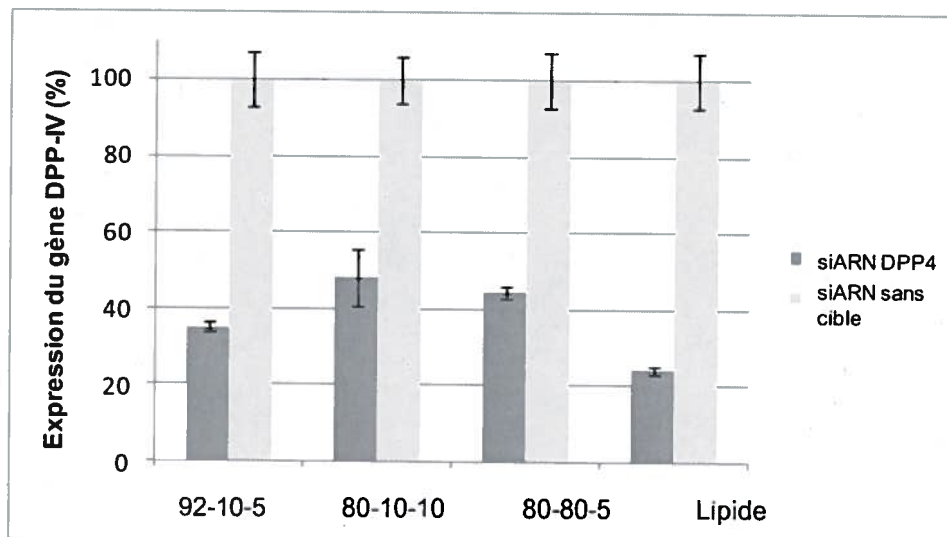
a) Le test de viabilité a été réalisé 48 heures après la transfection en incubant les cellules avec la résazurine durant 4 heures à 37 °C. La fluorescence a été mesurée par spectrométrie en utilisant des longueurs d'onde d'excitation/émission de 560 nm/590 nm. Les niveaux de viabilité des cellules transfectées avec les NCT ont été comparés à ceux des cellules traitées avec le siARN/Lipide, des cellules incubés en présence de DMSO (10%) et des cellules non transfectées (NT).

b) Les cellules HepG2 ont été soumises à l'extraction de l'ARN total, 24 heures suivant leur transfection avec les nanocomplexes siARN-DPP4/chitosane. Après la vérification de la qualité de l'ARN total et la rétrotranscription, le silençage du gène DPP-IV a été mesuré par des techniques de qRT-PCR. La valeur du Ct du gène DPP-IV a été normalisée au gène du HPRT endogène et comparé avec les échantillons non traités. Le pourcentage d'expression a été déterminé en attribuant une expression de 100 % aux échantillons contrôles (siARN sans cible/chitosane). Les lipoplexes siARN/lipide ont été utilisés comme contrôles positifs.

a)



b)



DISCUSSION

L'objectif principal de ce projet consistait à mettre au point de nouveaux nanocomplexes thérapeutiques (NTC) (pADN/chitosane) permettant la synthèse continue et contrôlée du GLP-1 sous sa forme active et la mise au point de NTC siARN/chitosane permettant le silençage du gène codant pour l'enzyme DPP-IV responsable de l'inactivation du GLP-1.

Évidence de l'efficacité accrue de formulations spécifiques à base de chitosane pour la livraison d'acide nucléique et de l'influence combinée du DD et du M_n sur l'efficacité de transfection des cellules.

Notre groupe de recherche a publié les résultats d'une étude systématique de l'influence du DD et du poids moléculaire (M_n) du chitosane sur son efficacité de transfection (Lavertu *et al.* 2006a). Afin d'évaluer les effets de ces deux paramètres sur la transfection, nous avons produit des chitosanes de divers DD (98, 92, 80 et 72%) et nous les avons dépolymérisés à l'acide nitreux afin d'obtenir divers M_n (150, 80, 40, 10 kDa). Nous avons produit 64 formulations de complexes chitosane/ADN (16 chitosanes, 2 ratios amine : phosphate (N : P) (5 : 1 et de 10 : 1) et 2 pH du milieu de transfection (6.5 et 7.1)) dont nous avons caractérisé la taille et la charge et que nous avons testées en transfection *in vitro* sur des cellules HEK 293. Plusieurs formulations ont produit des niveaux d'expression du transgène élevés et deux conditions 92-10-5 et 80-10-10 [DD - M_n - N : P] à pH 6.5 étaient similaires aux contrôles positifs, i.e. des formulations à base de phospholipides cationiques (figure 11b), niveaux qui n'avaient pas été atteints dans la littérature. C'était la première fois que cet effet combiné du degré de désacétylation (DD) et de la masse molaire (M_n) du chitosane sur son efficacité de transfection était reporté dans la littérature. Dans cette publication, nous avons émis l'hypothèse que cet effet combiné était le résultat d'une modulation de la stabilité des polyplexes, cette propriété étant déterminante pour l'efficacité de transfection. Cette hypothèse a été validée par calorimétrie isotherme à titration

Préparation/stabilisation des nanocomplexes thérapeutiques

Nous avons d'abord démontré, *in vitro*, le potentiel du chitosane comme système de livraison de l'ADN plasmidique pour différentes lignées cellulaires humaines. Les plasmides commerciaux pEGFP_{Luc} et pVax_{LacZ} codant respectivement pour la luciférase et la β -galactosidase ont été complexés avec trois différentes formulations de chitosane soit le [92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 (DD-Mn-N : P)]. Ainsi, les six nanocomplexes pADN/chitosane formés ont été utilisés pour transfecter les cellules hépatocytes HepG2, les cellules du colon Caco-2 et HT-29 et les cellules de reins embryogéniques HEK 293.

Les HepG2 sont des cellules du foie et proviennent d'un carcinome hépatocellulaire. Ces cellules possèdent des récepteurs pour l'insuline et l'insuline-like growth factor II (IGF II). Les cellules Caco-2 sont des cellules adénocarcinome du colon capables de se différencier en cellules intestinales matures comme des entérocytes. Ces cellules forment un outil intéressant pour les études liées à la différenciation et aux fonctions des cellules intestinales. Les cellules HT-29 sont des cellules adénocarcinome du colon pouvant exprimer une différenciation caractéristique des cellules intestinales telles des cellules caliciformes. Les cellules HEK 293 sont des cellules rénales embryonnaires humaines qui peuvent être transfectées avec les nanocomplexes ADN/chitosane (Lavertu *et al.* 2006b). Les cellules HEK 293 ont été utilisées comme contrôle positif.

Le niveau d'expression de la luciférase et de la β -galactosidase a été fortement accru dans les cellules humaines transfectées avec les nanocomplexes pDNA/chitosane comparativement aux cellules transfectées avec l'ADN plasmidique nu. Les formulations de chitosanes utilisées pour former les nanocomplexes soit le 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 sont dans l'ordre décroissant d'efficacité comme système de livraison des gènes *in vitro*. Tous les nanocomplexes ont démontré un potentiel à transfecter différentes lignées cellulaires humaines. Parmi les différentes lignées cellulaires testées, les cellules HEK 293 transfectées avec les nanocomplexes pADN/chitosane et l'ADN plasmidique nu sont celles qui montrent le niveau d'expression du transgène le plus élevé. Les niveaux d'expressions de la luciférase dans les cellules HEK 293 transfectées en utilisant différents chitosanes sont comparables à

ceux obtenus par Lavertu et al, 2006. Les HEK 293 sont des cellules humaines bien caractérisées et utilisées depuis longtemps (Graham *et al.* 1977). Il s'agit d'une lignée cellulaire connue pour être simple à mettre en culture et sa transfection est particulièrement facile. En raison de ses caractéristiques, la lignée cellulaire HEK 293, ne se présente pas comme un bon modèle pour des études fondamentales sur des cellules normales ou des cellules cancéreuses. D'où l'importance d'étudier l'efficacité de transfection des nanocomplexes pADN/chitosane dans différentes lignées cellulaires. Nous avons démontré que les cellules HepG2 d'origine hépatique et les cellules Caco-2 issue du colon, deux lignées cellulaires utilisées largement en recherche, expriment fortement les transgènes lorsque transfectées avec les nanocomplexes pDNA/chitosane. Le niveau d'expression du transgène de la luciférase dans les cellules Caco-2 transfectées avec les nanocomplexes pDNA/92-10-5 est de loin supérieur (1 000 fois) à celui obtenu en utilisant des oligomères de chitosane ou des oligomères de chitosane triméthylés (Thanou *et al.* 2002). Les formulations choisies lors de ce projet ont donc un rôle important dans l'efficacité de la transfection de cette lignée cellulaire.

Parmi les lignées cellulaires étudiées, seule la lignée HT-29 semble difficile à transfecter avec les nanocomplexes pDNA/chitosane. La très faible expression du transgène dans les HT-29 soumise à une transfection est en accord avec les analyses en microscopie confocale où l'internalisation des nanocomplexes pDNA/chitosane et la libération de l'ADN dans les cellules étaient quasi inexistantes. Pour expliquer ces résultats, nous croyons que le milieu de culture DMEM à pH 6,5 utilisé dans la composition du milieu de transfection n'était pas adéquat pour les cellules HT-29 qui sont mises normalement en culture dans un milieu Mc Coy's.

Formulations thérapeutiques

Nous avons réussi à développer deux nouvelles formulations de chitosane pour la livraison de plasmides. La première formulation (92-10-5) non inflammatoire a été développée pour la livraison des plasmides dont l'expression génique se traduit par la production et l'accumulation de protéines thérapeutiques (voir section 4.3). La deuxième formulation (80-80-5) inflammatoire a été développée spécifiquement pour la livraison de

plasmides dont l'expression génique se traduit par la production de protéines recombinantes facilement prise en charge et apprêtée par les cellules présentatrices de l'antigène pour la mise en place d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique. Ce système (80-80-5) peut s'avérer utile, voire capital, dans le développement de vaccin thérapeutique et/ou prophylactique. Nos résultats sont supportés par de nombreuses études *in vivo* qui ont démontré l'efficacité de l'expression de transgènes en utilisant le chitosane pour condenser l'ADN et le livrer aux cellules. Les chitosanes avec divers Mw et DD ont été utilisés avec succès lors d'administration de plasmide d'ADN par voie systémique (Lee *et al.* 2005), intramusculaire (Yoo *et al.* 2005; Jean *et al.* 2009), sous-cutanée, intra trachéale (Koping-Hoggard *et al.* 2001; Koping-Hoggard *et al.* 2004; Issa *et al.* 2006; Jean *et al.* 2009), orale (Chen *et al.* 2004), topique (de la Fuente *et al.* 2008) et intestinal (MacLaughlin *et al.* 1998).

Nous avons utilisé avec succès le chitosane 80-80-5 comme système de livraison pour les vaccins (immunisation génétique). En effet nous avons démontré, dans une étude utilisant les facteurs de croissance FGF-2 et PBGF-BB, que nos nanoparticules de chitosane peuvent être utilisées pour l'immunisation intramusculaire et sous-cutanée en induisant une réponse immunitaire spécifique (Jean *et al.* 2009). Le chitosane stimulerait la prolifération et l'activité cytotoxique des leucocytes mononucléés spléniques chez la souris et amorcerait l'augmentation du nombre de cellules CD3, CD3/NK, I-AK (MHC II), et H-2Db (MCH I) (Ghendon *et al.* 2009). L'objectif de cette étude était d'exprimer les gènes du PDGF-BB et du FGF-2 chez la souris en utilisant des nanoparticules de chitosane-pADN pour contrôler la livraison du matériel génétique d'une façon spécifique, efficace et sécuritaire. Les gènes codants pour le PDGF-BB et pour le FGF-2 ont été amplifiés à partir de tissus humains par des techniques de rétrotranscription suivis par des réactions en chaîne de polymérisation (RT-PCR). Afin d'augmenter la sécrétion du FGF-2, un gène recombinant 4sFGF-2 a été construit en utilisant les huit acides aminés correspondants au peptide signal du FGF-4. Les produits PCR ont été insérés dans le vecteur d'expression pVax1 afin de produire les plasmides recombinants pVax1-4sFGF2 et pVax1-PDG-BB. Ces plasmides recombinants ont été injectés aux souris BALB/C sous forme de nanocomplexes polyélectrolytes composés de chitosanes spécifiques avec des DD et des masses moléculaires contrôlés, incluant le 92-10, 80-10 et le 80-80 (DD-Mn). Les sérums des souris, analysés par des tests ELISA, ont montré

que les protéines recombinantes PDGF-BB et FGF-2 étaient exprimées de façon efficace et qu'il y avait présence d'anticorps spécifiques à ces protéines dont le niveau de production dépendait de la formulation du chitosane utilisée. Nous avons démontré que les chitosanes avec un fort DD et une faible masse moléculaire étaient efficaces pour permettre l'expression de protéines recombinantes avec une production faible ou nulle d'anticorps neutralisants. À l'inverse, l'utilisation de chitosane avec un faible DD a mené à une plus forte production d'anticorps et par conséquent à une faible détection de la protéine recombinante. Les analyses histologiques ont corroboré avec ces résultats en révélant une plus forte infiltration inflammatoire avec les chitosanes à faible DD qui produisaient un titre d'anticorps plus élevé. De façon générale, on a observé une livraison des plasmides plus efficace avec des injections par voie sous-cutanée comparativement aux injections par voie intramusculaire. Des chitosanes spécifiques ont été identifiés soit comme des systèmes de livraison non toxiques pour des gènes thérapeutiques ou soit comme étant des vecteurs adaptés pour la vaccination à ADN. Il est connu que les mucopolysaccharides sont dégradés par l'hydrolyse d'enzyme telle que les lysozymes. Des études rapportent que la dégradation du chitosane est plus rapide *in vivo* qu'*in vitro*. Le chitosane sous forme de gel peut-être dégradé en trois jours, *in vitro*, par les lysozymes. Selon kyoto kofuji la dégradation de gel de chitosane sous forme de lit (haut poids moléculaire) est accélérée lorsque degré de désacétylation (DD) diminue. Ainsi, des expériences *in vivo* chez la souris ont démontré que les chitosanes sous forme de lit injecté dans des airs bag était dégradé a une journée pour DD 70% et a en moins de 3 jours pour les DD 80%. Toutefois, Jameela et Jayakrishnan ont démontré le chitosane modifié par des cross-linked glutaraldéhyde, n'était pas dégradé avant 12 semaines dans les muscles des rats (Jameela *et al.* 1994). Tomihata et Ikada on rapporter les chitosanes administrés SC à des rats sous forme de films pouvait prendre jusqu'à 3 semaines pour être dégradé dans le cas des chitosanes ayant un DD de 68.8% et plus de 12 semaines pour les chitosanes ayant DD de 73 % (Tomihata & Ikada 1997). La dégradation du chitosane pourrait être affectée par les enzymes présents *in vivo*, les constituants de l'organisme, les conditions d'application, la structure du gel matrice (lit ou nanoparticules) et la concentration du chitosane. Dans notre projet et en accord avec nos études précédentes (Jean *et al.* 2009), nous avons démontré que la formulation de chitosane 92-10-5 semblait plus rapidement (moins de

1 jour) dégradé par rapport au chitosane 80-10-10 (plus d'un jour) et le chitosane 80-80-5 (plus de 3 jours).

Les études histologiques nous ont permis d'évaluer d'une part le potentiel inflammatoire de chacun des NCT et d'autre part, leur cinétique de biodégradabilité. Ainsi, les NTC pVax-GLP-1/92-10-5, suite leur administration, se sont avérés peu inflammatoire et leur dégradation est complété en moins de 1 jour comparativement aux NCT pVax-GLP-1/80-80-5. Ces derniers étaient moins biodégradables et ont suscité une plus grande mobilisation des leucocytes aux sites d'injections. Ces résultats révèlent que les NTC composés du chitosane 92-10-5 seraient les candidats potentiels pour livrer de façon continue, *in vivo*, la protéine recombinante GLP-1 à des fins thérapeutiques tout en évitant une réponse immunitaire qui pourrait être néfaste pour l'organisme et nuisible pour le traitement du diabète de type 2.

Développement de nanocomplexes thérapeutiques, pVax-GLP-1/chitosane, pour le contrôle du diabète de type 2.

Le diabète de type 2 est dû à une insuffisance de la capacité du pancréas à faire face à un état d'insulinorésistance. Cette affection pourrait être due à la conjonction d'une anomalie pancréatique de l'insulinosécrétion et d'une insulinorésistance des tissus cibles. Devant l'augmentation importante d'individus atteints du diabète de type 2, il est primordial d'explorer de nouvelles avenues pour la mise au point de traitements plus efficaces telle que la thérapie génique.

Le concept de la thérapie génique vise à remplacer ou compléter un allèle mutant défectif par un allèle fonctionnel ou à surexprimer une protéine recombinante dont l'activité a un impact thérapeutique ou vaccinal prophylactique (immunisation génétique). Récemment le concept de la thérapie génique s'est élargi d'avantage afin d'inclure le phénomène d'ARN d'interférence et «gene silencing» qui a rapidement été reconnu comme étant un outil puissant dans le domaine thérapeutique qui permet de cibler certains gènes ayant un rôle direct dans des maladies incurables comme le cancer, le diabète et certaines maladies virales et dégénératives (Burkhardt *et al.* 2006; Cejka *et al.* 2006; Devi 2006). Cependant, la thérapie

génique, chez le modèle animal, utilisant l'ADN nu ou l'ARNi nu s'est avérée peu efficace en raison de son élimination rapide (Kawabata *et al.* 1995; Takakura *et al.* 2001; Soutschek *et al.* 2004). En plus, l'ADN nu n'a pas une biodistribution spécifique et a un faible rendement d'internalisation suite à une livraison systémique. Toutefois, la traduction de la thérapie génique en une réalité clinique courante ne sera possible qu'en surmontant le premier obstacle majeur qui est le développement de vecteurs de livraison efficaces et sécuritaires (Ichim *et al.* 2004; Takeshita & Ochiya 2006; Vorhies & Nemunaitis 2007a).

Actuellement au-delà de 400 essais cliniques en thérapie génique ont été réalisés sur plus de 4000 patients. Ces essais cliniques utilisent des molécules d'ADN soit pour la production de protéines recombinantes soit pour l'immunisation génétique. Ils concernent le cancer à 64 %, les maladies infectieuses à 8%, les maladies héréditaires monogéniques à 15 %, le marquage cellulaire à 10 % et autres à 3%. La majorité de ces essais cliniques ont été réalisés avec des vecteurs de transfert de gènes d'origine virale. Ces virus comprennent les rétrovirus, adénovirus, adéno-associés virus, herpes simplex virus, picornavirus et alphavirus (Ali *et al.* 1994; Flotte & Carter 1995; Glorioso *et al.* 1995; Smith 1995; Prince 1998; Robbins & Ghivizzani 1998). Les méthodes virales sont connues pour leur efficacité dans la livraison des gènes, par contre elles entraînent fréquemment une stimulation du système immunitaire (Lowenstein *et al.* 2007; Alexander *et al.* 2008; Hasbrouck & High 2008) et certains virus causent des intégrations mutagéniques (Daniel & Smith 2008).

Pour surmonter les inconvénients des méthodes virales, des structures non-virales ont été envisagées. Les premiers systèmes de livraison non-virale sont le diéthyleaminoéthyle (DEAE) dextrane (Lopata *et al.* 1984) et le phosphate de calcium (Chen & Okayama 1987). Par la suite, les recherches ont mené à l'élaboration d'une variété de formulations pouvant être utilisé comme système de livraison (Felgner & Ringold 1989; Gao & Huang 1991; Bennett *et al.* 1997; Pitard *et al.* 1997; Sternberg *et al.* 1998; Godbey *et al.* 1999; Dai *et al.* 2005). Ces formulations peuvent être classées en deux grandes catégories : les lipoplexes et les polyplexes. Les lipoplexes sont des vecteurs à base de lipide généralement cationique. Les polyplexes sont des formulations de polymères comme les polypeptides, les polycations et les dendrimères. Le PEIP (polyéthylènimine), les liposomes polycationiques, et le chitosane ont montré une grande efficacité tant *in vivo* qu'*in vitro* sans toxicité élevée

(Lavertu *et al.* 2006b; Futami *et al.* 2008). Le PEI par exemple, a été utilisé pour le transfert de gènes au niveau de la rétine (Liao & Yau 2007), des mélanomes (Jeudy *et al.* 2008), des carcinomes colorectaux, pancréatique (Futami *et al.* 2008) et prostatique (Moffatt *et al.* 2006) ou dans une tentative pour le contrôle du diabète (Kumar *et al.* 2007). Le chitosane, a connu un succès important au niveau de la transfection *in vivo* dans les carcinomes hépatocellulaire et gastrique (Qi *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2008). Ce succès s'est traduit par un intérêt élevé quant à la recherche et au développement de formulations à base de chitosane plus efficaces. En effet, les chitosanes ayant différents Mw et DD ont été utilisés avec succès comme systèmes de livraison de l'ADN plasmidique chez la souris par voie systémique (Lee *et al.* 2005), intramusculaire (Yoo *et al.* 2005) et orale (Chen *et al.* 2004). Les études portant sur le chitosane comme système de livraison de l'ADN ont été réalisées principalement en utilisant des gènes rapporteurs comme le gène de la luciférase et le gène de l'EGFP. Le DD et le Mw du chitosane influencent fortement ses propriétés biologiques. Le chitosane est largement utilisé dans le domaine biomédical en raison de son abondance, sa biodégradabilité, sa biocompatibilité, son innocuité et sa propriété d'adhérer aux cellules (Shigemasa & Minami 1996). Le chitosane est un polyélectrolyte cationique et lorsqu'il est mis en présence d'un polyélectrolyte anionique tel que l'ADN et l'ARN, des polyplexes ou nanoparticules se forment instantanément par attraction électrostatique. Le chitosane peut donc condenser un acide nucléique et être utilisé comme vecteur de livraison (MacLaughlin *et al.* 1998; Roy *et al.* 1999).

Le GLP-1 est un peptide qui stimule la sécrétion de l'insuline et inhibe la sécrétion du glucagon, une hormone antagonisme de l'insuline. Il a été démontré que GLP-1 permet la normalisation des concentrations de glucose chez les diabétiques de type 2. Par contre, le GLP-1 doit être administré de façon continue à cause de l'inactivation rapide de ce dernier par l'enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Nous avons donc mis au point de nouveaux nanocomplexes thérapeutiques afin de les utiliser en thérapie génique pour le traitement du diabète de type 2. La production de protéines recombinantes et le niveau de tolérance au glucose sont parmi les indicateurs biologiques qui ont été mesurés pour évaluer l'efficacité et le potentiel thérapeutique des différents traitements du diabète de type 2 mis au point.

Les nanocomplexes thérapeutiques élaborés sont composés d'un plasmide eucaryotique recombinant codant pour le peptide GLP-1 (7-37) ou ses formes variantes (ser⁸GLP-1(7-37) et Tyr⁹GLP-1(7-37)), complexés avec le chitosane 92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD, Mn, ratio N : P). L'interaction des charges entre le chitosane et le plasmide recombinant a permis la formation de nanoparticules ayant des tailles de 163 à 246 nm, des formes principalement sphérique (figure 17), et des potentiels Zeta de 27 à 32 mV (tableau IV). Nos études *in vitro*, utilisant les cellules HepG2 ont démontré que les nanocomplexes sont internalisés 24 heures suivant leur application sur les cellules (figure 19), et que le peptide recombinant et ses formes variantes étaient fortement exprimé 48 heures suivant la transfection (figure 20). Le chitosane 92-10-5 était la formulation de chitosane qui permet une internalisation rapide et efficace des NCT et un relâchement important du pVax-GLP-1 à l'intérieur des cellules *in vitro*, ainsi que l'expression efficace et stable du peptide thérapeutique recombinant GLP-1 et ses formes variantes.

Nous avons aussi démontré que le chitosane confère une protection efficace aux plasmides recombinants contre la DNase I (figure 18). Nos résultats ont démontré que l'administration des NCT pVax-GLP-1/chitosane à un modèle animal diabétique (rat ZDF) permet une augmentation jusqu'à 7 fois plus grande de l'expression de GLP-1 (7-37) comparativement aux rats ZDF non traités (figure 21). L'expression du peptide GLP-1(7-37) a augmenté rapidement lorsque les NCT étaient administrés par voie sous-cutanée (SC) comparativement à leur administration par voie intramusculaire (IM) (figure 21). Nos résultats sont supportés par une de nos études *in vivo* qui ont démontré que la livraison des plasmides exprimant les facteurs de croissance FGF-2 et PBGF-BB en utilisant des chitosanes avec un fort DD et une faible masse moléculaire tel que le chitosane 92-10-5, étaient plus efficaces avec des injections par voie SC comparativement aux injections par voie IM (Jean *et al.* 2009). De plus, l'augmentation de l'expression du GLP-1 sous sa forme active permet une plus grande tolérance au glucose chez les rat ZDF, l'intolérance au glucose étant un symptôme associé au diabète de type 2 (figure 22). Ces résultats nous ont permis de démontrer la capacité et l'efficacité des cellules cibles *in vivo*, chez les rats ZDF traités avec les NCT (pVax-GLP-1/chitosane), à capter le glucose circulant dans le sang grâce à l'expression du peptide recombinant fonctionnel GLP-1. Ce peptide confère la tolérance à un

taux élevé de glucose dans le sang en stimulant la sécrétion de l'insuline (figure 23). La tolérance au glucose chez les rats ZDF traités avec les NTC pVax-GLP-1/chitosane 92-10-5 était maintenue durant plus de 24 jours (figure 24). L'expression du GLP-1 fonctionnel chez les rats ZDF traités avec les NCT, a donc permis de stimuler la sécrétion de l'insuline et d'améliorer ainsi la tolérance au glucose chez ces rats diabétiques. Le traitement des rats ZDF par voie SC ou IM avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane 92-10-5 entraîne une légère diminution de la prise de poids (figure 25), ce qui montre que ce traitement permet une expression de GLP-1 recombinant, *in vivo*, capable de diminuer l'appétit des rats et ainsi diminuer la prise de poids chez ces rats diabétiques.

Les travaux de Oh *et al.* ont montré une augmentation de la concentration du GLP-1 recombinant chez les rats ZDF, 7 jours suivant l'administration, par voie intraveineuse, du complexe PEI/p β GLP-1. Une concentration maximale de GLP-1, correspondant à deux fois la concentration basale (7 pmol/L), est atteinte 14 jours post-administration pour ensuite diminuer de façon constante jusqu'au jour 28. Il a été observé que taux de glucose diminue avec l'augmentation de GLP-1 recombinant. L'évolution des concentrations d'insuline chez les rats traités est similaire aux concentrations de GLP-1 avec une augmentation 2,5 fois le niveau basal (150 pmol/L). Les rats contrôles injectés avec le plasmide p β GLP-1 nu n'ont montré aucun changement significatif au niveau de leur concentration de GLP-1 par rapport aux rats non-traités (Oh *et al.* 2003).

Choi *et al.* ont réussi à augmenter de 3 fois la concentration normale du GLP-1 suite à l'administration, par intraveineuse, de 200 μ g de plasmide recombinant chez le modèle murin obèse, souris DOI (Diet Induced Obesity) (Choi *et al.* 2005). Alors que Young-Sun lee et al., 2007 ont montré une concentration de GLP-1 de 11 fois supérieure à la concentration normale suite à l'administration par intraveineuse de $4,9 \times 10^9$ pfu «plaque-forming unit» d'adénovirus recombinant (rAd-GLP-1) chez la souris diabétique ob/ob. Chez ce modèle animal, la glycémie a été normalisée durant plus de 60 jours suivant l'administration de l'adénovirus rAd-GLP-1. Y. Lee *et al.*, 2007 ont réussi, en utilisant un vecteur adénoviral Ad-ILGLP-1 chez les rats ZDF, à exprimer le GLP-1 à une concentration 20 fois supérieure à la concentration basale (1,2 pmol/L) et ce 4 jours suivant l'administration par intraveineuse de

2×10^{12} particules virales. Lors de cette étude, la tolérance au glucose a été maintenue durant 15 jours suivant l'administration du virus recombinant en dépit de la diminution rapide du GLP-1 recombinant. Les auteurs ont aussi démontré que 4 jours suivant l'administration du virus recombinant, les rats traités présentaient une perte de poids moyenne de 8% comparativement aux rats non-traités qui affichaient un gain de poids de 2,5%.

Le GLP-1 agit au niveau de l'apport alimentaire en retardant le vidage gastrique, en inhibant la sécrétion d'acide gastrique et en réduisant l'appétit (Chaudhri *et al.* 2006). Nos résultats montrent une réduction significative du gain de poids chez les rats traités avec les NCT (pVax-GLP-1/92-10-5), ce qui est en accord avec les données déjà rapportées (Hui *et al.* 2002; Lee *et al.* 2007; Parsons *et al.* 2007). L'effet anorexigène du GLP-1 prend place au niveau du système nerveux central et s'exprime par une forte expression des récepteurs GLP-1 dans le noyau arqué de l'hypothalamus au niveau de la région occupée par les neurones pro-opiomelanocortine dont l'activation est responsable de la suppression de l'appétit (Ma *et al.* 2007).

Des études histologiques ont montré que les nanocomplexes pVax-GLP-1/92-10-5 induisent une faible réponse inflammatoire aux sites d'injections comparativement aux nanocomplexes pVax-GLP-1/80-80-5 qui augmentent de façon drastique la mobilisation des leucocytes aux sites d'injection (figures 26, 27 et 28). Ces résultats confirment et supportent ceux obtenus lors d'une étude semblable où nous avons montré une forte infiltration des cellules inflammatoires avec le chitosane à faible DD tel que le chitosane 80-80-5 (Jean *et al.* 2009).

Nous avons mis au point, et ce, pour la première fois, des NCT formés de pVax-GLP-1 et du chitosane 92-10-5 afin d'exprimer fortement *in vivo* la protéine recombinante GLP-1 à des fins thérapeutiques tout en évitant une réponse immunitaire inflammatoire qui pourrait être néfaste pour l'organisme et nuisible pour le traitement. La protéine recombinante thérapeutique GLP-1 ainsi exprimée de façon contrôlée et sécuritaire *in vivo*, peut agir en stimulant la sécrétion d'insuline pour permettre la normalisation du taux de glucose chez les patients atteints du diabète de type 2.

Inhibition de l'expression du gène codant pour la DPP-IV à l'aide des siARN

La régulation génique a pris un essor considérable à la fin des années 1990 avec la découverte du phénomène d'ARN interférents (ARNi) chez le nématode *C. elegans* (Fire *et al.* 1998). Ce phénomène a été rapidement reconnu comme étant un outil puissant dans ce domaine. Le principe de l'utilisation des ARN interférents pour l'inhibition de l'expression des gènes consiste à introduire un ARN double brin dans les cellules pour provoquer la dégradation de l'ARNm du gène cible. Les ARN interférents thérapeutiques se présentent comme un nouveau traitement pour des maladies jusqu'à présent incurables par les techniques de médicaments disponibles. La livraison des siARN vers l'ARNm du gène cible est la clé pour le développement d'ARN interférents thérapeutiques cliniquement pertinents. Les nanocomplexes polymériques, formés par autoassemblage de chitosane avec les siARN, peuvent servir pour la livraison extracellulaire, l'absorption cellulaire et le trafic intracellulaire et ainsi devenir une stratégie pour améliorer le potentiel thérapeutique des siARN. Le chitosane combiné à d'autres composants tel que le polyéthylèneimine (PEI), et le polyéthylène glycol (PEG) ont été utilisés dans des nanocomplexes pour la livraison efficace d'ARN interférents (Duan *et al.* 2008; Jere *et al.* 2009).

L'enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) est responsable de l'inactivation du peptide GLP-1 qui joue un rôle important dans la régularisation du taux de glucose chez les diabétiques de type 2. Ainsi, la réduction de l'expression de la DPP-IV a pour effet de prolonger la durée de vie du GLP-1 et d'améliorer les symptômes associés au diabète de type 2. Le développement de vecteurs non viraux -nanoparticule PEGylé, polymères, polycations et lipoplexes s'est avéré très prometteur quant à la livraison des siARN. Par contre, plusieurs questions surgissent quant à leur cytotoxicité. Par exemple, les liposomes PEGylé provoquent des réactions d'hypersensibilité aiguë (Ishida *et al.* 2006). De même, l'administration répétée de lipoplexes peut causer une phospholipidémie (Reasor & Kacew 2001). En outre, l'inhibition de l'ApoB chez la souris et les primates (Zimmermann *et al.* 2006)– gène ayant un rôle dans l'hypercholestérolémie– en utilisant les SNALPs s'est avérée efficace, mais induit une augmentation de 20 fois les taux sériques des transaminases (AST, ALT) indiquant ainsi une hépatonécrose aiguë à la dose efficace. En fait, presque toutes les formulations liposomales ont été démontrées comme étant inductrices de l'inflammation (IL-6, TNF- α ,

IFN- γ) (Tousignant *et al.* 2000) ce qui limite leur usage dans le but thérapeutique. En vue de réduire la toxicité et l'efficacité des nanocomplexes, les chercheurs ont commencé par tester des formulations modifiées. À titre d'exemple, les nouvelles formulations du PEI linéaire démontrent une toxicité moins élevée due à des réponses inflammatoires atténuées (Bonnet *et al.* 2008). Cet exemple met en exergue le potentiel des polycations à éluder le problème de toxicité.

Ainsi dans la deuxième partie de notre projet de recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'inhibition de l'expression *in vitro* du gène de l'enzyme DPP-IV responsable de la dégradation de GLP-1 en utilisant des nanocomplexes thérapeutiques composés d'ARN interférents (siARN) dirigés contre l'ARNm du gène de la DPP-IV et de chitosane 92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5 (DD, Mn, Ratio N :P).

Nous avons donc mis au point de nouveaux nanocomplexes thérapeutiques afin de les utiliser en thérapie génique seuls ou combinés aux nanocomplexes pVax-GLP-1/chitosane pour le contrôle du diabète de type 2. La caractérisation des nanocomplexes siARN DPP4/chitosane a été facilitée en utilisant des ODN-DPP-4 qui sont des oligodesoxyribonucléotides qui miment la structure des siARN-DPP-4. L'interaction des charges entre le chitosane et les ODN ont permis la formation de nanocomplexes sphériques de 71 à 111 nm ayant un potentiel Zeta de 16 à 20 mV (tableau V).

Lors de la formation des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane, nous avons mis au point une technique simple qui permet de déterminer rapidement le ratio N :P à utiliser pour éviter des excès de chitosane et d'ODN tout en évitant un relargage précoce des ODN. Cette technique consistait à analyser les nanocomplexes ODN-DPP4/92-10, à des ratios N :P variables, par électrophorèse à des pH variant de 5 à 9. Nos résultats ont montré que le ratio N :P du chitosane 92-10 et le pH du gel influencent la libération des ODN et la quantité de chitosane libre (figure 29). L'étude du relargage des ODN nous a permis de prédire en partie le comportement des nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane, *in vivo*. Ainsi, les nanocomplexes relâchent les ODN-DPP4 lors d'incubation à un pH 8,0 comparativement à une incubation à un pH 6,5 (figure 30). En augmentant le ratio N :P, on observe une meilleure stabilité des nanocomplexes à pH 8,0. Pour étudier la stabilité des nanocomplexes ODN-

DPP4/chitosane par électrophorèse sur gel, il est important de tenir compte du pH du gel afin d'éviter d'estimer inadéquatement la quantité de chitosane nécessaire pour former des nanocomplexes de siARN stables. De plus, nos résultats confirment que la stabilité des nanocomplexes et la libération des ODN dans le temps sont influencées par le pH de son milieu environnant. Ainsi, plus l'environnement des nanocomplexes est basique, plus les nanocomplexes seront instables et libéreront rapidement les ODN-DPP4. En augmentant le ratio N.P du chitosane (≥ 10), il serait possible d'augmenter la durée de stabilité des nanocomplexes dans un environnement basique.

Des études sur les cellules HepG2, utilisant la microscopie confocale, ont démontré que les nanocomplexes ODN-DPP4 sont internalisés 1 heure suivant leur application sur les cellules et que les ODN sont relâchés du chitosane à partir de 4 heures jusqu'à 30 heures suivant la transfection des cellules HepG2 (figure 35). L'internalisation et le relâchement des nanocomplexes formés des chitosanes 80-10-10 et 80-80-5 étaient légèrement moins importants dans les cellules HepG2 transfectées. Il a été aussi démontré que le chitosane confère une protection très efficace aux ODN contre la DNase I (figure 32).

Nous avons démontré que les nanocomplexes ODN-DPP4/chitosane mimant les NTC siARN-DPP4/chitosane, possèdent les caractéristiques physico-chimiques propres aux nanocomplexes couramment utilisées en thérapie génique. De plus, nos expériences ont démontré que nos nanocomplexes ont la capacité de transférer des cellules *in vitro*, et ont donc un potentiel intéressant comme système de livraison des siARN pour le silençage de génique. A cette étape de notre projet de recherche, nous avons utilisé des NTC siARN-DPP4/chitosane qui ont été formés de la même façon que leurs mimes ODN-DPP4/chitosane pour transférer les cellules *in vitro*. Les résultats obtenus avec les tests enzymatiques ont démontré que la transfection des cellules HepG2 et des cellules caco avec les NTC siARN-DPP4/92-20-5 entraîne une inhibition d'environ 50% de l'activité enzymatique de la DPP-IV (figure 36). Ces résultats ont été confirmés par la quantification du niveau d'expression de l'ARNm correspondant à l'enzyme DPP-IV par des techniques de PCR en temps réel (qRT-PCR). Ces résultats ont démontré que les NCT à base de chitosane 92-10-5 sont ceux qui permettent la plus grande réduction de l'expression de l'ARNm correspondant au DPP-IV

avec une diminution de 65% (figure 37). Cette réduction de l'expression est comparable à celle obtenue avec les nanoparticules siARN-DPP-4/Lipide-DharmaFect.

En se basant sur les travaux documentés dans la littérature, nous avons identifié plusieurs faiblesses dans la production de chitosane comme vecteur de livraison des siARN tant *in vitro* qu'*in vivo*. Par exemple, nous avons remarqué l'utilisation d'un immense excès du ratio N : P (> 50 :1). Ce biais se traduit en problème de dosage, de toxicité et d'effet non spécifique du chitosane en excès. Cela dit, une formulation de chitosane ayant un faible excès de chitosane libre tout en maintenant l'efficacité de transformation et de libération réduirait considérablement les effets non spécifiques et serait un système de livraison cliniquement acceptable. Nos formulations - 92-10 et 80-80 - remplissent ce critère avec excellence et sont ainsi d'une grande importance pour des applications cliniques tant au niveau de la livraison de plasmides qu'au niveau potentiel pour la livraison des siARN *in vivo*. Nos données préliminaires suggèrent que ces deux formulations fonctionnent parfaitement dans un modèle cellulaire. En l'occurrence, nos résultats d'inhibition du gène dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) dans la lignée HepG2 supportent le fait que nos deux formulations livrent efficacement les siARN dans différentes lignées.

Nos résultats démontrent que les NCT siARN-DPP-4/chitosane peuvent réduire l'activité de l'enzyme DPP-IV qui dégrade le GLP-1 et sont donc des candidats potentiels pouvant être utilisés en thérapie génique seuls ou combinés aux NCT pVax-GLP-1/ chitosane pour le traitement du diabète de type 2.

CONCLUSION

Le GLP-1 (glucagon-like peptide 1) est un dérivé du proglucagon sécrété par les cellules L des muqueuses de l'intestin grêle. Le GLP-1 stimule la sécrétion de l'insuline et inhibe la sécrétion du glucagon, une hormone antagoniste de l'insuline. Des injections intraveineuses de GLP-1 ont permis la normalisation des concentrations de glucose chez les diabétiques de type 2. Par contre, le GLP-1 doit être administré de façon continue à cause de l'inactivation rapide de ce dernier par l'enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Au cours de ce travail, nous avons développé, et ce pour la première fois des nanocomplexes thérapeutiques (NCT pVax-GLP-1/chitosane) qui permettent de livrer et d'exprimer *in vitro* et *in vivo*, la protéine thérapeutique GLP-1 de façon continue et contrôlée.

Nos travaux de recherches ont montré que le traitement de rats diabétiques ZDF avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane induit l'expression importante du peptide recombinant GLP-1. Ce peptide est capable de stimuler la sécrétion de l'insuline et par le fait même, confère la tolérance à un taux élevé de glucose, et ce durant 24-29 jours. L'utilisation des NCT pVax-GLP-1/chitosane 92-10-5 se sont avérées peu inflammatoires et leur dégradation était complétée plus rapidement que les autres NCT contenant le chitosane 80-80-10. Ces derniers étaient moins biodégradables et ont suscités une plus grande mobilisation des leucocytes aux sites d'injections. Ces résultats révèlent que les NCT composés de chitosane 92-10-5 sont des candidats potentiels pour livrer et exprimer de façon continue la protéine recombinante GLP-1 fonctionnelle à des fins thérapeutiques tout en évitant une réponse immunitaire néfaste pour l'organisme et nuisible lors d'une intervention pour le contrôle du diabète de type 2.

Nous avons également développé des NCT siARN-DPP-4/chitosane pour diminuer l'expression de l'enzyme DPP-IV responsable de la dégradation du GLP-1. L'activité du DPP-IV et la présence d'ARNm de ce gène sont parmi les indicateurs biologiques qui ont été mesurés pour évaluer l'efficacité et le potentiel thérapeutique des NCT siARN-DPP-4 *in vitro*. Nos travaux ont démontré que l'utilisation des NCT siARN-DPP4/chitosane permet de réduire l'expression génique de l'enzyme DPP-IV dans les cellules HepG2 et Caco-2 avec une inhibition de l'ordre de 65%.

Nous avons mis au point des NCT pVax-GLP-1/chitosane qui expriment le GLP-1 sous sa forme active et qui agit en stimulant la sécrétion de l'insuline, en diminuant la prise

de poids et en conférant une meilleure tolérance au glucose chez les rats diabétiques. Ces NCT représentent donc un matériel novateur indispensable dans le développement d'une thérapie génique, qui permettra la production continue et contrôlée du GLP-1 à l'intérieur même de l'organisme, et constitue par le fait même, une avenue novatrice pour le contrôle du taux de glucose chez les patients atteints de diabète de type 2.

Dans la poursuite logique de nos travaux, il serait important d'évaluer le potentiel thérapeutique des NCT siARN-DPP-4 *in vivo*, pour le traitement des symptômes associés au diabète de type 2. Le développement d'une thérapie génique utilisant des traitements avec les NCT pVax-GLP-1/chitosane seuls ou combinés aux NCT siARN-DPP4/chitosane pour le contrôle du diabète de type 2 est d'une importance primordiale dans ce champ d'études.

RÉFÉRENCES

- Adoop (2007). GLP-1 Secretion and Metabolism.: (<http://www.adoop.cn/medical-insurance/show-24620-1.html>, ed^eds).
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JPt, Boyd AE, 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J , Nelson DA (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*. **268**, 423-426.
- Ahren B (2007). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: clinical data and clinical implications. *Diabetes Care*. **30**, 1344-1350.
- Ahren B, Holst JJ, Martensson H , Balkan B (2000). Improved glucose tolerance and insulin secretion by inhibition of dipeptidyl peptidase IV in mice. *Eur J Pharmacol*. **404**, 239-245.
- Ahren B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson PA, Sandqvist M, Bavenholm P, Efendic S, Eriksson JW, Dickinson S , Holmes D (2002). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. **25**, 869-875.
- Alexander IE, Cunningham SC, Logan GJ , Christodoulou J (2008). Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gene Ther*. **15**, 831-839.
- Ali M, Lemoine NR , Ring CJ (1994). The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther*. **1**, 367-384.
- Andersen MO, Howard KA, Paludan SR, Besenbacher F , Kjems J (2008). Delivery of siRNA from lyophilized polymeric surfaces. *Biomaterials*. **29**, 506-512.
- Anonyme (2009a). American diabetes association
- Anonyme (2009b). Diabète Québec. <http://www.diabete.qc.ca>.
- Anonyme (2010). Charles River. <http://www.criver.com/fr-CA/pages/home.aspx>.
- Arulmozhi DK , Portha B (2006). GLP-1 based therapy for type 2 diabetes. *Eur J Pharm Sci*. **28**, 96-108.
- Balkan B, Kwasnik L, Miserendino R, Holst JJ , Li X (1999). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with NVP-DPP728 increases plasma GLP-1 (7-36 amide) concentrations and improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats. *Diabetologia*. **42**, 1324-1331.

- Beguin P, Nagashima K, Nishimura M, Gono T , Seino S (1999). PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J.* **18**, 4722-4732.
- Bell GI, Santerre RF , Mullenbach GT (1983). Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature.* **302**, 716-718.
- Bennett MJ, Aberle AM, Balasubramaniam RP, Malone JG, Malone RW , Nantz MH (1997). Cationic lipid-mediated gene delivery to murine lung: correlation of lipid hydration with in vivo transfection activity. *J Med Chem.* **40**, 4069-4078.
- Blickle JF (2006). Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials. *Diabetes Metab.* **32**, 113-120.
- Bonnet ME, Erbacher P , Bolcato-Bellemin AL (2008). Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharm Res.* **25**, 2972-2982.
- Boyce N (2001). Trial halted after gene shows up in semen. *Nature.* **414**, 677.
- Braconnot H (1811). Sur la nature des champignons. *Ann.Chim.Phys.* **79**, 265-304.
- Bregenholt S, Moldrup A, Blume N, Karlsen AE, Nissen Friedrichsen B, Tornhave D, Knudsen LB , Petersen JS (2005). The long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, liraglutide, inhibits beta-cell apoptosis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* **330**, 577-584.
- Burkhardt BR, Lyle R, Qian K, Arnold AS, Cheng H, Atkinson MA , Zhang YC (2006). Efficient delivery of siRNA into cytokine-stimulated insulinoma cells silences Fas expression and inhibits Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett.* **580**, 553-560.
- Buteau J, Roduit R, Susini S , Prentki M (1999). Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia.* **42**, 856-864.
- Capeau J (2003). [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris).* **19**, 834-839.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL , Fischer A (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* **288**, 669-672.
- Cejka D, Losert D , Wacheck V (2006). Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond).* **110**, 47-58.

- Chappelow AV , Kaiser PK (2008). Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies. *Drugs*. **68**, 1029-1036.
- Chaudhri O, Small C , Bloom S (2006). Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **361**, 1187-1209.
- Check E (2002). A tragic setback. *Nature*. **420**, 116-118.
- Chen C , Okayama H (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*. **7**, 2745-2752.
- Chen J, Yang WL, Li G, Qian J, Xue JL, Fu SK , Lu DR (2004). Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium in vivo mediated by oral delivery of chitosan-DNA nanoparticles. *World J Gastroenterol*. **10**, 112-116.
- Cheng H, Li YY, Zeng X, Sun YX, Zhang XZ , Zhuo RX (2009). Protamine sulfate/poly(L-aspartic acid) polyionic complexes self-assembled via electrostatic attractions for combined delivery of drug and gene. *Biomaterials*. **30**, 1246-1253.
- Chew JL, Wolfowicz CB, Mao HQ, Leong KW , Chua KY (2003). Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen, Der p 1 for oral vaccination in mice. *Vaccine*. **21**, 2720-2729.
- Choi S, Baudys M , Kim SW (2004). Control of blood glucose by novel GLP-1 delivery using biodegradable triblock copolymer of PLGA-PEG-PLGA in type 2 diabetic rats. *Pharm Res*. **21**, 827-831.
- Choi S, Oh S, Lee M , Kim SW (2005). Glucagon-like peptide-1 plasmid construction and delivery for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther*. **12**, 885-891.
- Creutzfeldt W , Ebert R (1985). New developments in the incretin concept. *Diabetologia*. **28**, 565-573.
- Crini G, Badot P-M , Guibal É (2009). Chitine et chitosane du biopolymère à l'application. In *Université de Franche-Comté*. (Pud Franche-Comté, eds). France-Comté.
- Dai C, Wang B, Zhao H , Li B (2005). Factors affecting protein release from microcapsule prepared by liposome in alginate. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **42**, 253-258.
- Daniel R , Smith JA (2008). Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. *Hum Gene Ther*. **19**, 557-568.
- de Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J , Lieberman J (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. **6**, 443-453.

- de la Fuente M, Seijo B , Alonso MJ (2008). Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Ther.* **15**, 668-676.
- de Martimprey H, Bertrand JR, Fusco A, Santoro M, Couvreur P, Vauthier C , Malvy C (2008). siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma. *Nucleic Acids Res.* **36**, e2.
- Deacon CF , Holst JJ (2002). Dipeptidyl peptidase IV inhibition as an approach to the treatment and prevention of type 2 diabetes: a historical perspective. *Biochem Biophys Res Commun.* **294**, 1-4.
- Deacon CF, Hughes TE , Holst JJ (1998). Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes.* **47**, 764-769.
- Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B , Holst JJ (1995). Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes.* **44**, 1126-1131.
- Demeneix B, Behr J, Boussif O, Zanta MA, Abdallah B , Remy J (1998). Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev.* **30**, 85-95.
- Devi GR (2006). siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* **13**, 819-829.
- Dillin A (2003). The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 6289-6291.
- Ding X, Saxena NK, Lin S, Gupta NA , Anania FA (2006). Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology.* **43**, 173-181.
- Dodane V, Amin Khan M , Merwin JR (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm.* **182**, 21-32.
- Dornhorst A (2001). Insulinotropic meglitinide analogues. *Lancet.* **358**, 1709-1716.
- Duan Y, Guan X, Ge J, Quan D, Zhuo Y, Ye H , Shao T (2008). Cationic nano-copolymers mediated IKKbeta targeting siRNA inhibit the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in vitro. *Mol Vis.* **14**, 2616-2628.

- Duguid JG, Li C, Shi M, Logan MJ, Alila H, Rolland A, Tomlinson E, Sparrow JT, Smith LC (1998). A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophys J.* **74**, 2802-2814.
- Dumortier M, Brandou F, Perez-Martin A, Fedou C, Mercier J, Brun JF (2003). Low intensity endurance exercise targeted for lipid oxidation improves body composition and insulin sensitivity in patients with the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* **29**, 509-518.
- Egan JM, Montrose-Rafizadeh C, Wang Y, Bernier M, Roth J (1994). Glucagon-like peptide-1(7-36) amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: one of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology.* **135**, 2070-2075.
- Ehrlich M, Sarafyan LP, Myers DJ (1976). Interaction of microbial DNA with cultured mammalian cells. Binding of the donor DNA to the cell surface. *Biochim Biophys Acta.* **454**, 397-409.
- Ehnes JA, Pelech SL, Pederson RA, McIntosh CH (2002). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide activates the Raf-Mek1/2-ERK1/2 module via a cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase/Rap1-mediated pathway. *J Biol Chem.* **277**, 37088-37097.
- Fehmann HC, Habener JF (1992). Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology.* **130**, 159-166.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 7413-7417.
- Felgner PL, Ringold GM (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* **337**, 387-388.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391**, 806-811.
- Flotte TR, Carter BJ (1995). Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther.* **2**, 357-362.
- Follenzi A, Santambrogio L, Annoni A (2007). Immune responses to lentiviral vectors. *Curr Gene Ther.* **7**, 306-315.
- Fraley R, Subramani S, Berg P, Papahadjopoulos D (1980). Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem.* **255**, 10431-10435.

- Futami K, Kumagai E, Makino H, Sato A, Takagi M, Shimamoto A , Furuichi Y (2008). Anticancer activity of RecQL1 helicase siRNA in mouse xenograft models. *Cancer science*. **99**, 1227-1236.
- Gallwitz B (2005). Glucagon-like peptide-1 as a treatment option for type 2 diabetes and its role in restoring beta-cell mass. *Diabetes Technol Ther*. **7**, 651-657.
- Gao S, Dagnaes-Hansen F, Nielsen EJ, Wengel J, Besenbacher F, Howard KA , Kjems J (2009). The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol Ther*. **17**, 1225-1233.
- Gao X , Huang L (1991). A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **179**, 280-285.
- Ghendon Y, Markushin S, Krivtsov G , Akopova I (2008). Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines. *Arch Virol*. **153**, 831-837.
- Ghendon Y, Markushin S, Vasiliev Y, Akopova I, Koptiaeva I, Krivtsov G, Borisova O, Ahmatova N, Kurbatova E, Mazurina S , Gervazieva V (2009). Evaluation of properties of chitosan as an adjuvant for inactivated influenza vaccines administered parenterally. *J Med Virol*. **81**, 494-506.
- Ghosn B, Kasturi SP , Roy K (2008). Enhancing polysaccharide-mediated delivery of nucleic acids through functionalization with secondary and tertiary amines. *Curr Top Med Chem*. **8**, 331-340.
- Glorioso JC, DeLuca NA , Fink DJ (1995). Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Annu Rev Microbiol*. **49**, 675-710.
- Godbey WT, Wu KK, Hirasaki GJ , Mikos AG (1999). Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther*. **6**, 1380-1388.
- Gomez E, Pritchard C , Herbert TP (2002). cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. **277**, 48146-48151.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC , Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. **36**, 59-74.

- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* **118**, 3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* **302**, 415-419.
- Hagesaether E, Hiorth M, Sande SA (2009). Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: an in vitro and ex vivo study. *Eur J Pharm Biopharm.* **71**, 325-331.
- Halimi S (2005). [The glitazones]. *Rev Med Interne.* **26**, 54-57.
- Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ (1999). Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology.* **140**, 5356-5363.
- Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A (2008). Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res.* **132**, 1-14.
- Hasbrouck NC, High KA (2008). AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects. *Gene Ther.* **15**, 870-875.
- Heinrich G, Gros P, Habener JF (1984). Glucagon gene sequence. Four of six exons encode separate functional domains of rat pre-proglucagon. *J Biol Chem.* **259**, 14082-14087.
- Henner WD, Kleber I, Benzinger R (1973). Transfection of Escherichia coli spheroplasts. 3. Facilitation of transfection and stabilization of spheroplasts by different basic polymers. *J Virol.* **12**, 741-747.
- Hensley SE, Giles-Davis W, McCoy KC, Weninger W, Ertl HC (2005). Dendritic cell maturation, but not CD8+ T cell induction, is dependent on type I IFN signaling during vaccination with adenovirus vectors. *J Immunol.* **175**, 6032-6041.
- Herweijer H, Wolff JA (2007). Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther.* **14**, 99-107.

- Hoffman RM , Li L (2008). Targeted expression of GFP in the hair follicle using ex vivo viral transduction. *J Vis Exp*.
- Hoffmann IS, Jimenez E , Cubeddu LX (2001). Urinary albumin excretion in lean, overweight and obese glucose tolerant individuals: its relationship with dyslipidaemia, hyperinsulinaemia and blood pressure. *J Hum Hypertens*. **15**, 407-412.
- Hoffmann J , Spengler M (1997). Efficacy of 24-week monotherapy with acarbose, metformin, or placebo in dietary-treated NIDDM patients: the Essen-II Study. *Am J Med*. **103**, 483-490.
- Holst JJ , Deacon CF (1998). Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes*. **47**, 1663-1670.
- Holz GGt, Kuhlreiber WM , Habener JF (1993). Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*. **361**, 362-365.
- Howard KA, Paludan SR, Behlke MA, Besenbacher F, Deleuran B , Kjems J (2009). Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF-alpha knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model. *Mol Ther*. **17**, 162-168.
- Howard KA, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MO, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F , Kjems J (2006). RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther*. **14**, 476-484.
- Huang M, Ma Z, Khor E , Lim LY (2002). Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. *Pharm Res*. **19**, 1488-1494.
- Hui H, Farilla L, Merkel P , Perfetti R (2002). The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects. *Eur J Endocrinol*. **146**, 863-869.
- Hutvagner G , Zamore PD (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. **297**, 2056-2060.
- Ichim TE, Li M, Qian H, Popov IA, Rycerz K, Zheng X, White D, Zhong R , Min WP (2004). RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics. *Am J Transplant*. **4**, 1227-1236.

- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A , Auffray C (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* **33**, e56.
- Iqbal M, Lin W, Jabbal-Gill I, Davis SS, Steward MW , Illum L (2003). Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine.* **21**, 1478-1485.
- Ishida T, Ichihara M, Wang X, Yamamoto K, Kimura J, Majima E , Kiwada H (2006). Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release.* **112**, 15-25.
- Ishii T, Okahata Y , Sato T (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta.* **1514**, 51-64.
- Issa MM, Koping-Hoggard M, Tommeraas K, Varum KM, Christensen BE, Strand SP , Artursson P (2006). Targeted gene delivery with trisaccharide-substituted chitosan oligomers in vitro and after lung administration in vivo. *J Control Release.* **115**, 103-112.
- Jameela SR, Misra A , Jayakrishnan A (1994). Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. *J Biomater Sci Polym Ed.* **6**, 621-632.
- Jean M, Smaoui F, Lavertu M, Methot S, Bouhdoud L, Buschmann MD , Merzouki A (2009). Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Ther.* **16**, 1097-1110.
- Jere D, Jiang HL, Kim YK, Arote R, Choi YJ, Yun CH, Cho MH , Cho CS (2009). Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. *Int J Pharm.* **378**, 194-200.
- Jeudy G, Salvadori F, Chauffert B, Solary E, Vabres P , Chluba J (2008). Polyethylenimine-mediated in vivo gene transfer of a transmembrane superantigen fusion construct inhibits B16 murine melanoma growth. *Cancer Gene Ther.* **15**, 742-749.
- Jiang HL, Xu CX, Kim YK, Arote R, Jere D, Lim HT, Cho MH , Cho CS (2009). The suppression of lung tumorigenesis by aerosol-delivered folate-chitosan-graft-polyethylenimine/Akt1 shRNA complexes through the Akt signaling pathway. *Biomaterials.* **30**, 5844-5852.
- Jooss K , Chirmule N (2003). Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther.* **10**, 955-963.

- Kahn SE (2000). The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* **108 Suppl 6a**, 2S-8S.
- Kawabata K, Takakura Y , Hashida M (1995). The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res.* **12**, 825-830.
- Kawaguchi Y, Okuda T, Ban T, Danjo K , Okamoto H (2009). [Evaluation of the binding affinity and RNA interference of low-molecular-weight chitosan/siRNA complexes using an imaging system]. *Yakugaku Zasshi.* **129**, 475-484.
- Kharidia R, Friedman KA , Liang JF (2008). Improved gene expression using low molecular weight peptides produced from protamine sulfate. *Biochemistry (Mosc).* **73**, 1162-1168.
- Khatri K, Goyal AK, Gupta PN, Mishra N , Vyas SP (2008). Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *Int J Pharm.* **354**, 235-241.
- Kieffer TJ, McIntosh CH , Pederson RA (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* **136**, 3585-3596.
- Kim DH , Rossi JJ (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet.* **8**, 173-184.
- Knudsen LB , Pridal L (1996). Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *Eur J Pharmacol.* **318**, 429-435.
- Koltover I, Salditt T, Radler JO , Safinya CR (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science.* **281**, 78-81.
- Kong X, Zhang W, Lockey RF, Auais A, Piedimonte G , Mohapatra SS (2007). Respiratory syncytial virus infection in Fischer 344 rats is attenuated by short interfering RNA against the RSV-NS1 gene. *Genet Vaccines Ther.* **5**, 4.
- Koping-Hoggard M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Varum KM , Artursson P (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther.* **8**, 1108-1121.

- Koping-Hoggard M, Varum KM, Issa M, Danielsen S, Christensen BE, Stokke BT , Artursson P (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther.* **11**, 1441-1452.
- Kozak M (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol.* **196**, 947-950.
- Kreymann B, Williams G, Ghatei MA , Bloom SR (1987). Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet.* **2**, 1300-1304.
- Kumar M, Hunag Y, Glinka Y, Prud'homme GJ , Wang Q (2007). Gene therapy of diabetes using a novel GLP-1/IgG1-Fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice. *Gene Ther.* **14**, 162-172.
- Kurita K (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)*. **8**, 203-226.
- Lai CM, Lai YK , Rakoczy PE (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol.* **21**, 895-913.
- Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N , Buschmann MD (2006a). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials.* **27**, 4815-4824.
- Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N , Buschmann MD (2006b). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials.* **27**, 4815-4824.
- Lawrence CL, Proks P, Rodrigo GC, Jones P, Hayabuchi Y, Standen NB , Ashcroft FM (2001). Gliclazide produces high-affinity block of KATP channels in mouse isolated pancreatic beta cells but not rat heart or arterial smooth muscle cells. *Diabetologia.* **44**, 1019-1025.
- Lee DW, Yun KS, Ban HS, Choe W, Lee SK , Lee KY (2009). Preparation and characterization of chitosan/polyguluronate nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release.*
- Lee MK, Chun SK, Choi WJ, Kim JK, Choi SH, Kim A, Oungbho K, Park JS, Ahn WS , Kim CK (2005). The use of chitosan as a condensing agent to enhance emulsion-mediated gene transfer. *Biomaterials.* **26**, 2147-2156.
- Lee Y, Kwon MK, Kang ES, Park YM, Choi SH, Ahn CW, Kim KS, Park CW, Cha BS, Kim SW, Sung JK, Lee EJ , Lee HC (2008). Adenoviral vector-mediated glucagon-like peptide 1 gene therapy improves glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J Gene Med.* **10**, 260-268.

- Lee YS, Shin S, Shigihara T, Hahm E, Liu MJ, Han J, Yoon JW , Jun HS (2007). Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes*. **56**, 1671-1679.
- Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlcke K, Eckert HG, Fehse B , Baum C (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*. **296**, 497.
- Liao HW , Yau KW (2007). In vivo gene delivery in the retina using polyethylenimine. *Biotechniques*. **42**, 285-286, 288.
- Lin EH, Rutter CM, Katon W, Heckbert SR, Ciechanowski P, Oliver MM, Ludman EJ, Young BA, Williams LH, McCulloch DK , Von Korff M (2009). Depression and Advanced Complications of Diabetes: a Prospective Cohort Study. *Diabetes Care*.
- Lin SW, Hensley SE, Tatsis N, Lasaro MO , Ertl HC (2007). Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8+ T cells in mice. *J Clin Invest*. **117**, 3958-3970.
- Liu HK, Green BD, Gault VA, McCluskey JT, McClenaghan NH, O'Harte FP , Flatt PR (2004). N-acetyl-GLP-1: a DPP IV-resistant analogue of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with improved effects on pancreatic beta-cell-associated gene expression. *Cell Biol Int*. **28**, 69-73.
- Liu R, He M, Su R, Yu Y, Qi W , He Z (2009). Insulin amyloid fibrillation studied by terahertz spectroscopy and other biophysical methods. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Lopata MA, Cleveland DW , Sollner-Webb B (1984). High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res*. **12**, 5707-5717.
- Lopez LC, Frazier ML, Su CJ, Kumar A , Saunders GF (1983). Mammalian pancreatic preproglucagon contains three glucagon-related peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**, 5485-5489.
- Lowenstein PR, Mandel RJ, Xiong WD, Kroeger K , Castro MG (2007). Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions. *Curr Gene Ther*. **7**, 347-360.
- Ma X, Bruning J , Ashcroft FM (2007). Glucagon-like peptide 1 stimulates hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci*. **27**, 7125-7129.

- MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M , Rolland AP (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release*. **56**, 259-272.
- Malhotra M, Kulamarva A, Sebak S, Paul A, Bhathena J, Mirzaei M , Prakash S (2009). Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells. *Drug Dev Ind Pharm*. **35**, 719-726.
- Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT , Leong KW (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*. **70**, 399-421.
- Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribet U, Watanabe T, Drucker DJ , Wagtmann N (2000). Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 6874-6879.
- Marshall E (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*. **286**, 2244-2245.
- Marshall E (2000). Human genome. Rival genome sequencers celebrate a milestone together. *Science*. **288**, 2294-2295.
- Matulis D, Rouzina I , Bloomfield VA (2002). Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: roles of electrostatics and hydrophobicity. *J Am Chem Soc*. **124**, 7331-7342.
- McIntyre N, Holdsworth CD , Turner DS (1965). Intestinal factors in the control of insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. **25**, 1317-1324.
- McManus MT , Sharp PA (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. **3**, 737-747.
- Meister G , Tuschl T (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. **431**, 343-349.
- Mentlein R (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. **85**, 9-24.
- Mentlein R, Gallwitz B , Schmidt WE (1993). Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem*. **214**, 829-835.
- Mest HJ (2006). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors can restore glucose homeostasis in type 2 diabetics via incretin enhancement. *Curr Opin Investig Drugs*. **7**, 338-343.

- Mingozzi F, Hasbrouck NC, Basner-Tschakarjan E, Edmonson SA, Hui DJ, Sabatino DE, Zhou S, Wright JF, Jiang H, Pierce GF, Arruda VR, High KA (2007). Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood*. **110**, 2334-2341.
- Moffatt S, Papasakelariou C, Wiehle S, Cristiano R (2006). Successful in vivo tumor targeting of prostate-specific membrane antigen with a highly efficient J591/PEI/DNA molecular conjugate. *Gene Ther*. **13**, 761-772.
- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF (1986). Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem*. **261**, 11880-11889.
- Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*. **629**, 141-158.
- Muzzarelli R, Tarsi R, Filippini O, Giovanetti E, Biagini G, Varaldo PE (1990). Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother*. **34**, 2019-2023.
- Nagakura T, Yasuda N, Yamazaki K, Ikuta H, Yoshikawa S, Asano O, Tanaka I (2001). Improved glucose tolerance via enhanced glucose-dependent insulin secretion in dipeptidyl peptidase IV-deficient Fischer rats. *Biochem Biophys Res Commun*. **284**, 501-506.
- Nauck MA, Wollschlager D, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Willms B (1996). Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia*. **39**, 1546-1553.
- NEUROtiker (2008). schematic drawing of the enzymatic synthesis of Chitosan. In http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitosan_Synthese.svg.ed^eds.
- Oh S, Lee M, Ko KS, Choi S, Kim SW (2003). GLP-1 gene delivery for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther*. **7**, 478-483.
- Onishi H, Machida Y (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*. **20**, 175-182.
- Onsoyen E, Skaugrud O (1990). Metal recovery using chitosan. *J Chem Technol Biotechnol*. **49**, 395-404.
- Orskov C, Andreasen J, Holst JJ (1992). All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. **74**, 379-384.

- Orskov C, Wettergren A , Holst JJ (1993). Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes*. **42**, 658-661.
- Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y , Seino S (2000). cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol*. **2**, 805-811.
- Pala L, Mannucci E, Pezzatini A, Ciani S, Sardi J, Raimondi L, Ognibene A, Cappadona A, Vannelli BG , Rotella CM (2003). Dipeptidyl peptidase-IV expression and activity in human glomerular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **310**, 28-31.
- Palmer DJ , Ng P (2008). Methods for the production of first generation adenoviral vectors. *Methods Mol Biol*. **433**, 55-78.
- Parsons GB, Souza DW, Wu H, Yu D, Wadsworth SG, Gregory RJ , Armentano D (2007). Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes. *Gene Ther*. **14**, 38-48.
- Paul S, Calmels B , Acres RB (2002). Improvement of adoptive cellular immunotherapy of human cancer using ex-vivo gene transfer. *Curr Gene Ther*. **2**, 91-100.
- Pederson RA, White HA, Schlenzig D, Pauly RP, McIntosh CH , Demuth HU (1998). Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide. *Diabetes*. **47**, 1253-1258.
- Pedroso de Lima MC, Neves S, Filipe A, Duzgunes N , Simoes S (2003). Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications. *Curr Med Chem*. **10**, 1221-1231.
- Perfetti R, Zhou J, Doyle ME , Egan JM (2000). Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*. **141**, 4600-4605.
- Pfeifer A , Hofmann A (2009). Lentiviral transgenesis. *Methods Mol Biol*. **530**, 391-405.
- Philippe J (2009). [Why is managing diabetic patients so difficult?]. *Rev Med Suisse*. **5**, 1243-1244.
- Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S , Polonsky KS (1998). Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*. **47**, 358-364.

- Pille JY, Li H, Blot E, Bertrand JR, Pritchard LL, Opolon P, Maksimenko A, Lu H, Vannier JP, Soria J, Malvy C, Soria C (2006). Intravenous delivery of anti-RhoA small interfering RNA loaded in nanoparticles of chitosan in mice: safety and efficacy in xenografted aggressive breast cancer. *Hum Gene Ther.* **17**, 1019-1026.
- Pitard B, Aguerre O, Airiau M, Lachages AM, Boukhnikachvili T, Byk G, Dubertret C, Herviou C, Scherman D, Mayaux JF, Crouzet J (1997). Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 14412-14417.
- Pospisilik JA, Stafford SG, Demuth HU, Brownsey R, Parkhouse W, Finegood DT, McIntosh CH, Pederson RA (2002). Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and beta-cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats. *Diabetes.* **51**, 943-950.
- Pratley RE, Weyer C (2001). The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia.* **44**, 929-945.
- Prince HM (1998). Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology.* **30**, 335-347.
- Qi L, Xu Z, Chen M (2007). In vitro and in vivo suppression of hepatocellular carcinoma growth by chitosan nanoparticles. *Eur J Cancer.* **43**, 184-193.
- Reasor MJ, Kacew S (2001). Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Exp Biol Med (Maywood).* **226**, 825-830.
- Reaven GM (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* **37**, 1595-1607.
- Ritter T, Nosov M, Griffin MD (2009). Gene therapy in transplantation: Toward clinical trials. *Curr Opin Mol Ther.* **11**, 504-512.
- River C (2010). Research Models: ZDF Rat. http://info.criver.com/research_models_and_services/research_models/ZDF.html.^{eds}
- Riviere C, Danos O, Douar AM (2006). Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther.* **13**, 1300-1308.
- Robbins PD, Ghivizzani SC (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* **80**, 35-47.

- Rojanarata T, Opanasopit P, Techaarpornkul S, Ngawhirunpat T , Ruktanonchai U (2008). Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharm Res.* **25**, 2807-2814.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL , et al. (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med.* **323**, 570-578.
- Roy K, Mao HQ, Huang SK , Leong KW (1999). Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med.* **5**, 387-391.
- Saltiel AR , Kahn CR (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* **414**, 799-806.
- Sambrook J, Fritsch EF , Maniatis T (1989). *Molecular cloning*. New York.
- Schepp W, Schmidtler J, Dehne K, Schusdziarra V , Classen M (1992). Pertussis toxin-sensitive and pertussis toxin-insensitive inhibition of parietal cell response to GLP-1 and histamine. *Am J Physiol.* **262**, G660-668.
- Schepp W, Schmidtler J, Riedel T, Dehne K, Schusdziarra V, Holst JJ, Eng J, Raufman JP , Classen M (1994). Exendin-4 and exendin-(9-39)NH₂: agonist and antagonist, respectively, at the rat parietal cell receptor for glucagon-like peptide-1-(7-36)NH₂. *Eur J Pharmacol.* **269**, 183-191.
- Schjoldager BT, Mortensen PE, Christiansen J, Orskov C , Holst JJ (1989). GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Dig Dis Sci.* **34**, 703-708.
- Schmidt WE, Siegel EG , Creutzfeldt W (1985). Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia.* **28**, 704-707.
- Schmidtler J, Dehne K, Schusdziarra V, Classen M , Schepp W (1993). Pertussis toxin-sensitive inhibition of glucagon-like peptide 1-stimulated acid production by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in rat parietal cells. *Eur J Pharmacol.* **246**, 59-66.
- Schmidtler J, Schepp W, Janczewska I, Weigert N, Furlinger C, Schusdziarra V , Classen M (1991). GLP-1-(7-36) amide, -(1-37), and -(1-36) amide: potent cAMP-dependent stimuli of rat parietal cell function. *Am J Physiol.* **260**, G940-950.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M , Ragg T (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* **7**, 3.

- Seino S, Welsh M, Bell GI, Chan SJ , Steiner DF (1986). Mutations in the guinea pig preproglucagon gene are restricted to a specific portion of the prohormone sequence. *FEBS Lett.* **203**, 25-30.
- Sharp PA , Zamore PD (2000). Molecular biology. RNA interference. *Science.* **287**, 2431-2433.
- Shigemasa Y , Minami S (1996). Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev.* **13**, 383-420.
- Simberg D, Danino D, Talmon Y, Minsky A, Ferrari ME, Wheeler CJ , Barenholz Y (2001). Phase behavior, DNA ordering, and size instability of cationic lipoplexes. Relevance to optimal transfection activity. *J Biol Chem.* **276**, 47453-47459.
- Skalhegg BS , Tasken K (1997). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* **2**, d331-342.
- Smisterova J, Wagenaar A, Stuart MC, Polushkin E, ten Brinke G, Hulst R, Engberts JB , Hoekstra D (2001). Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *J Biol Chem.* **276**, 47615-47622.
- Smith AE (1995). Viral vectors in gene therapy. *Annu Rev Microbiol.* **49**, 807-838.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ , Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**, 76-85.
- Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P , Lieberman J (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med.* **9**, 347-351.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M , Vornlocher HP (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* **432**, 173-178.
- Sternberg B, Hong K, Zheng W , Papahadjopoulos D (1998). Ultrastructural characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo. *Biochim Biophys Acta.* **1375**, 23-35.

- Sternberg B, Sorgi FL , Huang L (1994). New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* **356**, 361-366.
- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF , Egan JM (2000). Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes.* **49**, 741-748.
- Stuhlmann H, Jaenisch R , Mulligan RC (1989a). Construction and properties of replication-competent murine retroviral vectors encoding methotrexate resistance. *Mol Cell Biol.* **9**, 100-108.
- Stuhlmann H, Jaenisch R , Mulligan RC (1989b). Transfer of a mutant dihydrofolate reductase gene into pre- and postimplantation mouse embryos by a replication-competent retrovirus vector. *J Virol.* **63**, 4857-4865.
- Sudre B, Broqua P, White RB, Ashworth D, Evans DM, Haigh R, Junien JL , Aubert ML (2002). Chronic inhibition of circulating dipeptidyl peptidase IV by FE 999011 delays the occurrence of diabetes in male Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes.* **51**, 1461-1469.
- Suhonen J, Ray J, Blomer U, Gage FH , Kaspar B (2006). Ex vivo and in vivo gene delivery to the brain. *Curr Protoc Hum Genet.* **Chapter 13**, Unit 13 13.
- Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, Takeuchi H , Kawashima Y (2008). Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *Int J Pharm.* **354**, 210-216.
- Takakura Y, Nishikawa M, Yamashita F , Hashida M (2001). Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Sci.* **13**, 71-76.
- Takeshita F , Ochiya T (2006). Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* **97**, 689-696.
- Tan WB, Jiang S , Zhang Y (2007). Quantum-dot based nanoparticles for targeted silencing of HER2/neu gene via RNA interference. *Biomaterials.* **28**, 1565-1571.
- Thanou M, Florea BI, Geldof M, Junginger HE , Borchard G (2002). Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. *Biomaterials.* **23**, 153-159.
- Thomas M , Klibanov AM (2003). Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol.* **62**, 27-34.
- Thorens B (2003). [Gluco-incretin hormones in insulin secretion and diabetes]. *Med Sci (Paris).* **19**, 860-863.

- Tielmans A, Virally M, Coupaye M, Laloi-Michelin M, Meas T, Guillausseau PJ (2007). [Drug treatment in type 2 diabetes (part 2)]. *Presse Med.* **36**, 467-474.
- Toft-Nielson M, Madsbad S, Holst JJ (1996). The effect of glucagon-like peptide I (GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones. *Diabetes.* **45**, 552-556.
- Tomihata K, Ikada Y (1997). In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials.* **18**, 567-575.
- Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2002). Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes.* **51**, 1443-1452.
- Tousignant JD, Gates AL, Ingram LA, Johnson CL, Nietupski JB, Cheng SH, Eastman SJ, Scheule RK (2000). Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice. *Hum Gene Ther.* **11**, 2493-2513.
- Tuschl T (2002). Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol.* **20**, 446-448.
- Ullman A, Jacob F, Monod J (1967). Characterisation by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. M. B.* **24**, 339-343.
- Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI (1993). Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology.* **133**, 2861-2870.
- Valverde I, Merida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Penacarrillo ML (1993). Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36) amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology.* **132**, 75-79.
- Van Tendeloo VF, Van Broeckhoven C, Berneman ZN (2001). Gene-based cancer vaccines: an ex vivo approach. *Leukemia.* **15**, 545-558.
- Vila A, Sanchez A, Janes K, Behrens I, Kissel T, Vila Jato JL, Alonso MJ (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur J Pharm Biopharm.* **57**, 123-131.
- Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001). Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* **50**, 609-613.

- Vorhies JS , Nemunaitis J (2007a). Nonviral delivery vehicles for use in short hairpin RNA-based cancer therapies. *Expert review of anticancer therapy*. **7**, 373-382.
- Vorhies JS , Nemunaitis JJ (2007b). Nucleic acid aptamers for targeting of shRNA-based cancer therapeutics. *Biologics*. **1**, 367-376.
- Wadhwa MS, Collard WT, Adami RC, McKenzie DL , Rice KG (1997). Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug Chem*. **8**, 81-88.
- Wagner E, Cotten M, Foisner R , Birnstiel ML (1991). Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 4255-4259.
- Wang SL, Yao HH, Guo LL, Dong L, Li SG, Gu YP , Qin ZH (2009). Selection of optimal sites for TGFBI gene silencing by chitosan-TPP nanoparticle-mediated delivery of shRNA. *Cancer Genet Cytogenet*. **190**, 8-14.
- Wang X, Xu W, Mohapatra S, Kong X, Li X, Lockey RF , Mohapatra SS (2008). Prevention of airway inflammation with topical cream containing imiquimod and small interfering RNA for natriuretic peptide receptor. *Genet Vaccines Ther*. **6**, 7.
- Weber AE (2004). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *J Med Chem*. **47**, 4135-4141.
- Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J , Holst JJ (1993). Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci*. **38**, 665-673.
- Weyer C, Bogardus C, Mott DM , Pratley RE (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. **104**, 787-794.
- White MF (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **283**, E413-422.
- Xu G, Stoffers DA, Habener JF , Bonner-Weir S (1999). Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. **48**, 2270-2276.
- Yamada T, Onishi H , Machida Y (2001). In vitro and in vivo evaluation of sustained release chitosan-coated ketoprofen microparticles. *Yakugaku Zasshi*. **121**, 239-245.

- Yang Y, Jooss KU, Su Q, Ertl HC , Wilson JM (1996). Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther.* **3**, 137-144.
- Yoo HS, Lee JE, Chung H, Kwon IC , Jeong SY (2005). Self-assembled nanoparticles containing hydrophobically modified glycol chitosan for gene delivery. *J Control Release.* **103**, 235-243.
- Yuan Y, Tan J, Wang Y, Qian C , Zhang M (2009). Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vehicles based on atomic force microscopy study. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* **41**, 515-526.
- Zander M, Madsbad S, Madsen JL , Holst JJ (2002). Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet.* **359**, 824-830.
- Zhang DY, Shen XZ, Wang JY, Dong L, Zheng YL , Wu LL (2008). Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice. *World J Gastroenterol.* **14**, 3554-3562.
- Zhou J, Wang X, Pineyro MA , Egan JM (1999). Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes.* **48**, 2358-2366.
- Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP , MacLachlan I (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* **441**, 111-114.
- Zuhorn IS, Oberle V, Visser WH, Engberts JB, Bakowsky U, Polushkin E , Hoekstra D (2002). Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency. *Biophys J.* **83**, 2096-2108.

ANNEXES

Publications (auteure principale)

Jean, M., Smaoui F, Lavertu M, Methot S, L. Bouhdoud, Buschmann MD, Merzouki A . Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Therapy*. 2009 Sep;16(9):1097-110.

Alameh M*, **Jean, M***, J.Lopez D., Buschmann M.D., Merzouki, A. Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *International Journal of Nanomedicine* 2010:5 473–481.

***Contribution égale**

Jean, M., Buschmann M.D., Merzouki A. Effective and Safe Gene-Base Delivery of GLP-1 Using Chitosan/Plasmid-DNA Therapeutic Nanocomplexes In an animal model of type 2 Diabetes. *Molecular therapy*. Soumis.

Jean, M., M. Alameh, E. Bebawi, M. Thibault, M.D. Buschmann, A. Merzouki. IPGE: A Novel and Rapid Method to Study the Release Properties of Chitosane/ODN Nanospheres. (*en préparation*)

Publications (coauteure)

Merzouki A, **Jean, M.**, Alameh M., Buschmann M.D. Spécific DDA and MW Chitosane Nanoparticles to deliver Nucleic Acids Therapeutics (Nanomedicine:Nanotechnology, biology and Medicine). (*En attente d'un brevet par EPT*)

Communications (auteur principale)

Jean M., Buschmann M., Benzerhdoud F., Smaoui F. et Merzouki A.. Utilisation des nanoparticules d'ARN d'interférences pour l'inhibition de l'expression du gène DPP IV responsable de la dégradation du GLP-1. Colloque Nano2007 organisé par NanoQuébec, 7 février 2007, Hyatt regency, Montréal.

Jean M., Benzerhdoud F., Smaoui F., Buschmann M. et Merzouki A. L'inhibition du gène dipeptidyl peptidase IV (DDP IV) par l'utilisation d'ARN d'interférence (ARNi). Congrès de La FEINRS, 16, 17 novembre 2006 à la bibliothèque nationale du Québec à Montréal.

Jean M., Smaoui F., Guertin C., Buschmann M., Bouhdoud L., Henrichon M., et Merzouki A. Inhibition, par des ARN d'interférences, de l'expression du gène DPP IV responsable de la dégradation du GLP-1 impliquée dans le contrôle de la glycémie. Congrès ACFAS, Octobre 2006, McGill University, Montréal.

Communications (co-auteurs)

Methot, S., M. Lavertu, J. Sun, F. Smaoui, **M. Jean**, A. Merzouki, M.D. Buschmann. Efficient in vivo gene delivery using chitosan/DNA nanoparticles for applications in cartilage repair. International Cartilage Research Society (ICRS, Pologne, 2007.

Smaoui F., **Jean M.**, Bouhdoud L., Buschmann M., Methot S., Guertin C., et Merzouki A. Nanovecteurs recombinants pour l'expression des facteurs angiogéniques FGF-2 et PDGF-bb. Colloque Nano2007 organisé par NanoQuébec, 7 février 2007, Hyatt regency, Montréal.

Smaoui F., **Jean M.**, Bouhdoud, L., Buschmann, M., Methot, S., Guertin, C. et Merzouki, A. Potentiel thérapeutique des molécules FGF-2 et PDGF-bb dans la réparation des tissus cartilagineux. Congrès de La FEINRS, 16, 17 novembre 2006 à la bibliothèque nationale du Québec à Montréal.

Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of Type 2 Diabetes

Jean Myriam¹, Alameh Mohamad¹, Buschmann Michael D¹, Merzouki Abderrazzak^{1*}

*Correspondence should be addressed to A.M. abderrazzak.merzouki@polymtl.ca

¹ Institute of Biomedical Engineering
Department of Chemical Engineering
École Polytechnique
P.O. BOX 6079, Station Centre-ville
Montréal (QC) Canada H3C 3A7

Abderrazzak Merzouki, Ph.D.
Institute of Biomedical Engineering,
Department of Chemical Engineering
École Polytechnique
P.O. BOX 6079, Station Centre-ville, Montréal (Quebec) Canada H3C 3A7
Tel. : 514-340-5121, ext. 4799;
Fax : 514-340-5227
E-mail: abderrazzak.merzouki@polymtl.ca

Running title:

Chitosan gene-based delivery of GLP-1

Summary

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is an incretin hormone that regulates blood glucose level postprandially. It has been proposed that GLP-1 can be used in Type 2 diabetes mellitus treatment because of its insulinotropic action. Despite its remarkable advantages, GLP-1 suffers the disadvantage of an extremely short half life due to its degradation by the DPP-IV protease. One means of overcoming this drawback is GLP-1 gene delivery. Here we demonstrate effective and safe gene-based delivery of Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes (TNCs) in Zucker diabetic fatty (ZDF) animal model of type 2 diabetes.

The expression plasmid fused the GLP1 gene to a Furin cleavage site and was driven by a CMV promoter/enhancer. TNCs were prepared by mixing this plasmid with chitosans of specific molecular weight (MW), degree of deacetylation (DDA) and ratio of chitosan amine to DNA phosphate (N:P ratio). Animals injected with the TNC chitosan 92-10-5 (DDA-MW-N:P) showed GLP-1 plasma levels of about 5 fold higher than non-treated animals and the insulinotropic effect of recombinant GLP-1 was demonstrated by a 3-fold increase in plasma insulin concentration when compared to untreated animals. Intraperitoneal glucose tolerance tests revealed an efficacious decrease of blood glucose compared to controls for up to 24 days after treatment, where injections of this formulation allowed near-normalization of blood glucose level.

Introduction

The pathogenesis of Type 2 diabetes (T2D) is multifactorial and heterogeneous in origin, involving both genetic and environmental factors. T2D is a disease of relative rather than absolute insulin deficiency, in which the pancreatic beta-cells become progressively less able to secrete sufficient insulin to maintain normal carbohydrate and lipid homeostasis [1]. The failure of insulin to regulate fatty acid release from fat cells results in elevated levels of circulating fat in the blood stream. Metabolic abnormalities associated with T2D are caused in part by inadequate insulin action and changes in gene expression in skeletal muscle [2]. Recent data [3] has linked some cases of T2D to mutations in the gene *IDX-1*, that plays a role in beta cell development and insulin gene activation.

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), is a gut derived incretin hormone that lowers circulating glucose levels postprandially, in a glucose-dependent manner, avoiding hyperglycemia [4]. GLP-1 originates from enzymatic processing of the glucagon precursor, pro-glucagon, a 180 amino acid peptide. This conversion is catalyzed by the protein convertase PC3 to yield an active GLP-1 [5]. The glucose lowering effect induced by GLP-1 is mediated by a potent insulin-releasing action as well as the inhibition of glucagon secretion and gastric emptying, increased satiety, stimulation of glucose-uptake, and gluconeogenesis [6, 7]. Multiple mammalian studies, including human, have demonstrated insulinotropic responses to exogenous administration of GLP-1, particularly GLP-1 (7-36) NH₂ and GLP-1 (7-37) [8-11]. A 6-week subcutaneous infusion of GLP-1 in patients with type 2 diabetes, achieving plasma levels of GLP-1 in the 60–70 pmol/L range, produced substantial improvements in insulin secretory capacity, insulin sensitivity, and reduction in HbA_{1c} (glycosylated haemoglobin) of 1-2% and modest weight loss [12]. However, it has been demonstrated that the half life of GLP-1 is very short and that less than 10% of administered GLP-1 is intact and biologically active just a few minutes after injection [13, 14]. This short circulating half-life is mainly due to the action of the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) that cleaves the His :Ala :Glu sequence at the N-terminal region of GLP-1 [15]. Therapeutic approaches for enhancing incretin action thus include degradation-resistant GLP-1 receptor agonists, and inhibitors of dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV) activity (incretin enhancers). For example, the incretin GLP-1 mimetic and DPP-IV resistant agonist, exenatide 4, has a half life of 60 to 90 minutes and reduces fasting and postprandial glucose concentrations, plasma HbA_{1c}, and weight gain in phase III clinical trials [16-18]. Orally administered DPP-IV inhibitors, such as sitagliptin and vildagliptin, reduce HbA_{1c} by 0.5–1.0%, with few adverse effects and no weight gain [19, 20]. The major drawback of GLP-1 analogs is their requirement for daily administration by subcutaneous injection. An alternative means of sustaining GLP-1 activity is by gene delivery to host cells to provide extended synthesis of the peptide in an active form. Most of the gene delivery methods attempted to date use viral vectors to achieve high levels of cellular transfection. The alternative is non-viral gene delivery which benefits from greater safety margins. One class of non-viral systems exploits the natural ability of cationic polymers to condense plasmid DNA by electrostatic binding to form nanoparticles or nanocomplexes that protect the plasmid from nuclease attack [21].

Chitosans are natural polymers composed of glucosamine and N-acetyl-glucosamine whose relative amounts are expressed by the degree of deacetylation, or DDA, which is the % of monomers that are glucosamine. Since glucosamine in chitosan is protonatable with a pK_a near 6.5, and its acetylated version is not, increasing DDA results in increasing positive charge density of the polymer and thus increasing binding affinity to anionic nucleic acids [22]. Increasing DDA also results in reduced degradability since acetyl groups promote chitosan degradation by enzymes [23]. Our previously developed highly efficient chitosan/plasmid-DNA gene delivery systems relied on our ability to produce a library of chitosans with a range of specific DDA (72% to 98%) and a range of specific molecular weights (10kDa to 150kDa) [24, 25]. We found that an intermediate stability of chitosan-DNA binding, attained through appropriate choice of DDA and MW [22], produced the most efficient delivery vectors that are

stable enough to condense and protect DNA extracellularly but with low enough affinity to permit intracellular release of DNA cargo [26]. Thus, as the only natural polysaccharide with positive charge, chitosan has several unique properties as a carrier for gene therapy since chitosan: 1) is safe, non-toxic and biodegradable 2) provides tunable electrostatic binding to negatively charged DNA 3) is mucoadhesive to permit interaction between the delivered macromolecule and membrane epithelia and 4) can open intercellular tight junctions to facilitate transport into cells. Compared to other cationic polymers such as polylysine and polyethyleneimine, chitosan is less toxic and has better tolerability. Compared to cationic phospholipid systems, chitosan is also less toxic and has greater formulation stability. In this study, we have focused on three of our chitosan/GLP-1-plasmid-DNA therapeutic nanocomplex (TNC) systems: 92-10-5, 80-10-5, 80-80-5, where the first number represents DDA, the second the molecular weight in kDa, and the third is the mixing ratio of chitosan to DNA in terms of chitosan amine groups to DNA phosphate groups (N:P ratio). We recently found that some of these specific chitosan formulations could achieve a level of transfection *in vitro* similar to that of commercial phospholipids systems [25] using HepG2, Caco-2, HT29, LS174T, HeLa and HEK293 cells [27]. We have also used these specific formulations *in vivo* to deliver FGF-2 and PDGF-BB therapeutic proteins or to induce neutralizing antibody production in Balb/c mice depending on formulation specifics [24].

Here we show that injection of specific chitosan/GLP-1 therapeutic nanocomplexes (TNCs) results in an increase of plasma GLP-1 concentration to five fold higher than non-treated groups. We also demonstrate a concomitant increase in plasma insulin concentration by three fold compared to non-treated, probably due to the anti-apoptotic effect of GLP-1. Moreover, we show that ZDF rats treated with specific TNCs showed a decrease of blood glucose in glucose tolerance tests to near-normalized concentrations for more than 24 days post treatment. Taken together, these results delineate a safe and efficacious means of administering recombinant GLP-1 for type 2 Diabetes using a polymeric plasmid delivery system.

Results

Construction of eukaryotic expression plasmids pVax1-GLP-1 (7-37)

pVAX1, a plasmid fulfilling the Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (FDA CBER) regulations for vectors to be used in DNA vaccination protocols and clinical trials, was selected to construct vectors expressing recombinant GLP-1 and its variants. GLP-1 originates from enzymatic processing of the glucagon precursor, pro-glucagon, a 180 amino acid peptide. This conversion is catalyzed by protein convertase PC1/3 to yield GLP-1 [28]. GLP-1 has a very short half-life (2-11 min) due its degradation by a ubiquitous serine protease, dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV). It has been demonstrated that the N-terminal histidine residue (His⁷) is very important for insulinotropic activity of GLP-1. For this reason, we incorporated downstream of the start codon a sequence coding for Arg-Ser-Arg-Arg, a signal for precursor cleavage catalyzed by furin. The consensus recognition sequence for furin proteases is X-Arg-X-Lys/Arg-Arg-X with the protein cleaved between the final Arg and X residues [29]. In our construct, the final X is His for this recombinant GLP-1 (7-37)[30, 31]. The cloning strategy that we adopted is represented in Supplementary Material (Supplement 1 Figure) where the recombinant GLP-1 gene and its variants were cloned into the eukaryotic pVax-1 vector.

Characterization of chitosan/pDNA nanocomplexes

All formulations of pDNA–chitosan nanoparticles were in the range of 150–250 nm, as measured by DLS and ESEM (Table 1 and Supplemental Figure 2). As expected, the excess chitosan in all formulations resulted in positively charged nanoparticles as shown by measured zeta potentials in Table 1. The pH of the formulations ranged from 3.7 to 4.8 and the osmolality ranged from 20 to 30 mOsm kg (Table 1).

Nuclease protection assay

For effective gene expression, the DNA in the delivery vehicle should be protected from degradation by enzymes such as serum nucleases [32]. The ability of chitosan-based nanocomplexes to protect the plasmid DNA (pVax1-GLP-1) sequences was assessed using DNase I (Supplemental Figure 3). Our results demonstrate the capacity of chitosan formulations to protect plasmid DNA. Upon incubation with DNase I, naked pVax1-GLP-1 (control) was completely degraded [lane C3]. In contrast, pVax1-GLP-1 recovered from therapeutic nanocomplexes remained intact after DNase I treatment up to 2 U of DNase per μg DNA. The protection is considerable and preserved intact approximately 70% of the complexes when using 2 units of DNase I per μg of DNA to attack NTCs, whereas the negative control was completely digested when only 0.5 units of DNase I per μg of DNA was used [33-35].

Therapeutic protein production following *in vitro* pVax1-GLP-1 transfection into HepG2 cells

To evaluate *in vitro* transfection efficiency, the hepatocellular carcinoma derived cell line- HepG2- was transfected with NTCs containing pVax1-GLP-1 (Fig. 1). Naked pVax1 and pVax1-GLP-1 both served as negative control in these experiments, whereas pVax1/Lipofectamine served as positive control to monitor transfection and expression efficiency. Naked pVax1-GLP-1 showed an expression level similar to that of the GLP-1 lacking vector (pVax1), indicating low transfection efficiency. Chitosan delivered pVax1-GLP-1 showed a considerable increase in GLP-1 expression levels demonstrating a several fold increase in transfection efficiency compared to the negative control (0.7 pmol/L GLP-1). The chitosan-based TNCs reached transfection levels similar to the commercially available liposome (Lipofectamine/positive control) with the specific 92-10-5 chitosan formulation (6.6 pmol/L GLP-1).

Delivery of GLP-1 through subcutaneous (SC) injections of TNCs resulting in improved glycemic control *in vivo*.

The ability of biodegradable polymers to facilitate uptake and expression of nanoparticle-associated DNA plasmid by APCs has attracted attention [36, 37] and work in our laboratories [22, 25] presented here and found in preclinical data from our previous study continues to yield promising results for polymer-based formulations [24]. In this study, after 49 days, we observed a significant increase of active GLP-1 in the plasma of animals injected SC.(Fig. 2a). Animals injected with the most efficient nanocomplexes (GLP-1(7-37)/chitosan 92-10-5) showed GLP-1 levels of about four fold higher than the controls (Fig 2a) reaching a maximum concentration of 34 pmol/L active GLP-1 in the plasma 14 days post treatment (day 77) which indicates that GLP-1 expression was maintained for at least 14 days following the last injection. These levels were also significantly higher ($p<0.01$) by two fold compared to the same GLP-1 plasmid without a chitosan based delivery system (Fig 2a). Here again, these results concur with those described below for IM administration in which the chitosan 92-10-5 is the most effective delivery agent for the therapeutic protein, increasing protein levels by more than two fold compared to the uncomplexed plasmid.

Delivery of GLP-1 through intramuscular (IM) injections of TNCs resulting in improved glycemic control *in vivo*.

Our results show the production and the accumulation of recombinant GLP-1 associated with IM administration of different formulations of chitosan complexed to pVax1-GLP-1 plasmids (Fig. 2b). After 49 days, we observed a significant increase of active GLP-1 in the plasma of animals injected with nanocomplexes via IM, the most efficient being 92-10-5 (Fig. 2b). Animals injected with nanocomplexes ([native-GLP-1(7-37)]/92-10-5) showed GLP-1 levels of about five fold higher (IM injection) than non-GLP-1 controls (Fig. 2b) with a maximum concentration in plasma of active GLP-1 of 36 pmol/L (IM) at 14 days post-treatment (day 77), indicating that GLP-1 expression was maintained for at least 14 days following the last injection. These levels were also significantly higher ($p < 0.01$) by two fold compared to the same GLP-1 plasmid without a chitosan based delivery system (Fig 2b). Gene expression levels produced by formulation 80-80-5 were similar to naked pVax-GLP-1 indicating low transfection levels consistent with previous *in vivo* results of this formulation [24].

Efficacy and longevity of therapeutic effect of chitosan-based nanocomplexes

The area under the concentration-time curve (AUC), integrated from 0-180 min after intraperitoneal Glucose Tolerance Test (ipGTT), is a quantitative indicator of glucose tolerance efficiency to evaluate anti-diabetic agents. Glucose tolerance evaluation in Figure 3 was performed 14 days after the last injection on day 63, of TNCs in Zucker Diabetes Fatty rats (ZDF) and monitored for 180 min following glucose injection. Chitosan delivered TNCs reduced the blood glucose rise compared to controls, maintaining quasi normoglycemic levels, 180 min following ipGTT. In particular the specific chitosan 92-10-5 once again showed the most efficient and significant ability to abrogate rising blood glucose compared to other chitosan formulations (80-10-10 and 80-80-5) and negative controls (Fig. 3). An effective longevity of treatment was found by assessing blood glucose rise at 60 minutes at days 82, 87, 92 and 98 corresponding to 19, 24, 29 and 35 days after the last injection (Fig 4). Here we found that animals treated with the chitosan 92-10-5/GLP-1 nanocomplexes maintained an improved glucose tolerance for more than 24 days after treatment (Fig 4), where intramuscular injections of this formulation allowed near-normalization of blood glucose level, while subcutaneous injections were less effective. Other chitosan formulations produced a sustained improvement in glucose tolerance for a shorter period of time (19 days) compared to chitosan 92-10-5 (Fig. 4).

Insulin production, following chitosan-based TNC injection, was increased by two fold when compared to untreated rats. According to our statistical analysis, the treatment (formulation) had a significant effect on insulin levels observed on Day 77 (Fig 5). We also found a specific although non-significant trend ($p = 0.08$) for increased insulin expression with chitosan 92-10-5/pVax1-GLP-1 nanocomplexes treated animals (12 ng/L) compared to pVax-GLP-1 without chitosan (7 ng/L) (Fig 5). These statistical results are consistent with the higher expression level of pVax1-GLP-1 with the chitosan 92-10-5 formulation in figures 1 and 2 as well as improved glucose tolerance in figures 3 and 4, suggesting that chitosan-pVax1-GLP-1 formulations permit GLP-1 expression which increases insulin production.

Reduction in Food Intake and Body Weight Gain

To test the NTCs anorectic effect, we measured the weight of ZDF treated rats during and after the chitosan/pVax1-GLP-1 treatment, for a total of 90 days. Our results show that untreated and naked-pVax1 treated rats increased in weight by 20% during the first 50 days of the study and remained at this plateau for 40 days (Fig 6). The most effective chitosan-based formulation, 92-10-5/pVax1-GLP-1, resulted in a weight increase of only 15%, 5% lower than the untreated rats at 70 days, and statistically significant for IM injections. A less effective inhibition of weight gain (3% less than the untreated rats) was observed

with chitosan 80-80-5, consistent with the lower expression of GLP-1 compared to the 92-10-5 chitosan formulation (Fig. 6). The reduced weight gain in ZDF treated rats correlated with a reduction in food intake (data not shown). These effects are consistent with the ability of GLP-1 to reduce food intake by decreasing gastric emptying and increasing satiety [38-42]. The reduced sensation of appetite was reported not only in the postprandial state but also in the fasting state and before meal ingestion in humans [39]. This suggests that mechanisms other than decreased gastric emptying also contribute to body weight reduction. It has been shown that the central administration of GLP-1 inhibits food intake in rodents [41]. Since circulating GLP-1 can access GLP-1 receptors in the brain, it may participate in the neural regulation of appetite [40]. It is also possible that gastric distension activates GLP-1-containing neurons so it can act as an inhibitor of food intake [42].

***In Vitro* and *In Vivo* Toxicity of NTCs**

In addition to assessing the therapeutic effect of chitosan/GLP-1 TNCs *in vivo*, we performed *in vitro* toxicity studies in HepG2, Caco-2 and HT-29 cell lines. Our results show no decrease in cellular viability when compared to untreated cells whereas the commercially available liposomal plasmid delivery system, Lipofectamine, induced a significant reduction in cell viability (35%) (Data not shown). These results are one indication of the safety of the developed TNCs for *in vivo* use. In further support of this finding, no deleterious systemic side effects were elicited *in vivo* by exogenous administration of chitosan/pDNA complexes in ZDF rats, as the assessment of a variety of clinical and histological parameters (including mortality, behavioral or physical abnormalities indicating systemic or neurological toxicity [43] and necropsy of the major organs as heart, kidney, and liver) showed no gross or microscopic changes between the injected and non-injected groups. Taken together, these results support the general safety of these chitosan-based polymeric gene delivery systems.

Histological and systemic evaluation

The histological examination of IM and SC injection sites showed the presence of chitosan with no specific abnormalities in the injected tissues. For the IM injection sites, the area of injection revealed an early mobilization of inflammatory cells surrounding chitosan, 1 day after injection (Fig. 7a,b,e,f), and then decreasing over time until a mostly complete resolution of this acute inflammatory response 14 days post injection of the high DDA /low MW chitosan 92-10-5 (data not show). In contrast, the lower DDA and higher MW chitosan 80-80-5 displayed the most sustained inflammatory infiltrate. Moreover, we have found that the SC inflammatory response displayed a similar dependence on chitosan type (DDA, Mn and N:P ratio) as previously shown in a murine study [24].

Discussion

In this study, we delivered GLP-1 containing plasmids using the polymeric gene carrier chitosan, a cationic polysaccharide known for low immunogenicity, high safety, ease of preparation, with no gene sequence limitations and a potential to be used repeatedly [44]. To this end, a novel plasmid (pVax1-GLP-1) was constructed and condensed with three specific chitosan formulations which resulted in sustaining increased levels of circulating GLP-1(7-37) *in vivo* for several weeks. The plasmid we constructed was driven by the cytomegalovirus promoter and contained a furin recognition site to ensure post translational processing bearing an N-terminal histidine residue (His⁷) [31].

The therapeutic effect of chitosan based nanoparticles containing the pVax1-GLP-1 plasmid was examined via two routes of administration, IM and SC, in the ZDF rat, a common animal model for type II diabetes, at the age of 12 weeks when overt diabetes mellitus had developed fully [45]. At day 49 after

5 injections on days 0, 7, 14, 21, and 35, we observed a significant increase of active GLP-1 in the plasma of nanocomplexes injected animals, the most efficient being 92-10-5. We have previously demonstrated that the route of administration using the same chitosan formulation can affect the recombinant protein expression level and the type of immune response [24]. Animals injected with nanocomplexes ([native-GLP-1(7-37)]/92-10-5) showed GLP-1 levels of about five fold higher (IM and SC injection) than non-treated animals. The increase in plasma GLP-1 was faster and more efficient with SC versus IM injection producing a rapid expression of the protein product (Fig 2). A possible explanation is that inflammatory responses induced by injury of the muscle tissues, following TNC injection, diminishes cellular uptake of plasmid DNA when compared to subcutaneous injection, resulting in a faster expression of the transgene in subcutaneous tissues. Another possible explanation can be that skin is a major source of phagocytic APCs, and uptake of particles at this site may result in a significant number of transfected cells thus a faster expression of the delivered DNA encoding plasmid. This result is in accordance with our previously published study where the two growth factors expressing plasmids, pVax1-PDGF-BB and pVax1-FGF-2, complexed with chitosan such as 92-10-5 (DDA-Mn-N:P) were shown to be expressed more efficiently when injected subcutaneously compared to intramuscular injection [24]. GLP-1 expression level at later times was not affected by the mode of administration of the TNCs since the two methods of delivery yielded approximately the same amount of GLP-1 in the plasma at day 77 of treatment.

GLP-1 produces several biological responses in the pancreas including stimulation of glucose-dependent insulin secretion [4, 46, 47]. The binding of GLP-1 to its specific receptor (GLP-1R) on pancreatic β -cells leads to activation of adenylate cyclase activity and production of cAMP. Subsequently, GLP-1 stimulates insulin secretion via mechanisms that include an increase in intracellular Ca^{2+} levels resulting from GLP-1 dependent influx of extracellular Ca^{2+} through voltage-dependent Ca^{2+} and direct effects on β -cell insulin storage granule exocytosis that occurs downstream to ATP and intracellular Ca^{2+} increase. GLP-1 plays an important role in insulin secretion and synthesis as well as β -cell proliferation and prevention of apoptosis [48]. Insulin concentration in ZDF treated rats increased more than two fold when compared to untreated rats (Fig. 5). Insulin expression remained high 14 days following the last injection of chitosan/pVax1-GLP-1 nanocomplex. This sustained increase in insulin correlated with a sustained GLP-1 expression in plasma (Fig. 2) and improved glucose tolerance. It has also been reported that GLP-1 could stabilize insulin mRNA and increase insulin transcription, consistent with recent results where increased serum insulin levels were demonstrated in GLP-1/IgG1-Fc-treated db/db mice [49] and our pVax1-GLP-1 treated ZDF rats. However, there have been several reports demonstrating that serum insulin levels in GLP-1-treated animals decreased because of an improvement in insulin sensitivity [48, 50]. These contrasting observations might result from the different properties of diabetic animal models such as the severity of diabetes and the preserved function of β -cells. Furthermore, increased insulin plasma levels in our study may be also due to the proliferative/anti-apoptotic effect of GLP-1 on pancreatic β -cells. The proliferative effect of GLP-1 has been demonstrated in previous studies where GLP-1 treatment increased β -cell mass by two fold in normal and diabetic mice [51-53].

Chitosan 92-10-5 delivery of pVax1-GLP-1 demonstrated the most elevated plasma GLP-1 and insulin levels and glucose tolerance when compared to other formulations consistent with the greatest expression in HepG2 cells *in vitro* and without any apparent toxicity both *in vitro* and *in vivo*. We have previously investigated the coupling effect of chitosan DDA and MW for plasmid delivery and found that maximum transgene expression occurs for DDA: MW values that run along a diagonal from high DDA/ low MW to low DDA/high MW [25]. Our results here for GLP-1 are in general agreement with our previous *in vitro* [25, 26, 54] and *in vivo* [24] studies where chitosan 92-10-5 and 80-10-10 showed highest level of transfection efficiency and transgene expression whereas the chitosan 80-80-5 showed the poorest expression level and was associated with the generation of neutralizing antibodies *in vivo* to FGF-2 and PDGF-BB [24]. We have previously determined that the latter formulation is suitable for DNA vaccination where it induces the highest antibody production against human FGF-2 and PDGF-BB in

Balb/c mice [24]. Our consistent findings indicate that IM and SC delivery provide a long-term presence of chitosan/DNA expressing vectors and prolongs transgene expression from day 14 to day 63, in general agreement with earlier vaccination studies using other delivery methods [55-57].

Insulin action includes regulation of glucose transport channel family of proteins (GLUT) resulting in plasma glucose uptake [58]. Following treatment, we performed intraperitoneal glucose tolerance tests where the glucose level showed a marked decrease in the 92-10-5 system compared to control to reach a quasi-normoglycemic level within 3 h following nanocomplexes injection. Glucose tolerance tests were additionally performed every 5 or 6 days after treatment to evaluate the efficacy and the longevity of recombinant GLP-1 (Fig. 4). Animals treated with TNC (chitosan 92-10-5) showed a sustained improvement in glucose tolerance for more than 24 days after treatment, where intramuscular injections of this formulation allowed near-normalization of blood glucose level while subcutaneous injections displayed less of the sustained effect. These results are remarkable in terms of therapeutic efficacy and intriguing as well, given the similar levels of circulating GLP-1 for the two injection pathways. Taken together, the above results indicate that the approach of chitosan/plasmid-DNA GLP-1 delivery permits GLP-1 expression thereby increasing insulin production and probably β -cell proliferation as indicated by previous studies [51-53]. Moreover, the proliferative/anti-apoptotic effect of GLP-1 was characterized at the molecular level where the binding of GLP-1 to its receptor activates the PI3-K pathway leading to the activation of Akt and p44MAPK cell survival/proliferation pathways [59].

It has been previously shown that the intramuscular injection of a plasmid expressing a GLP-1/IgG-Fc fusion construct significantly lowered fasting blood glucose levels in db/db mice and enhanced beta-cell mass in streptozocin induced diabetes type 1 [49]. Adenoviral expression vectors, encoding GLP-1 linked to a leader sequences, have also been developed and have produced a promising re-establishment of homeostatic glucose levels in diabetic animal models such as ZDF, db/db mice and NOD/SCID mice [50, 60]. When compared with these previous studies, chitosan mediated gene delivery of recombinant GLP-1 showed an enhanced longevity of expression and glucose normo-regulation. For example, adenovirus delivered GLP-1 showed a normal blood glucose level for 20 days [50, 60], a shorter time pattern than our observed results with specific chitosan formulations (92-10-5) (>24 days). Although viral gene delivery is associated with an increased risk of immunogenicity and chromosomal integration, they bear the advantage of a faster onset of the therapeutic response.

The action of GLP-1 related to food intake includes delay of gastric emptying, inhibition of gastric acid secretion and reduction of appetite [61]. Previous reports have shown that GLP-1 gene therapy induces a decrease in food intake and a reduction of body-weight gain [48, 50, 62], consistent with our data (Fig. 6). Furthermore, we found that rats injected with NTCs demonstrated less weight gain by 5% compared with untreated rats. This effect was most pronounced when plasma GLP-1 level was at a peak. The anorectic effect of GLP-1 is considered to take place in the central nervous system, supported by the finding that mRNA for the GLP-1 receptor is densely expressed in the hypothalamic arcuate nucleus and precisely overlaps the area occupied by pro-opiomelanocortin neurons, whose activation can suppress appetite [63]. However, several reports indicate an absence of anorectic effects for several GLP-1 analogs in spite of a clear insulnotropic glucose lowering effects [53]. For example, treatment with Ex-4, along lasting GLP-1R agonist in db/db mice, did not induce any change in body weight nor in peripheral insulin sensitivity [64] Here we demonstrate the ability of specific chitosan formulation to deliver a native recombinant GLP-1 via the plasmid rather than a modified peptide sequence *in vivo* in a diabetic model thus restoring quasi normo-glycemic levels as well additional biological functions regulated via GLP-1 in a pleiotropic manner. This ability of chitosan to effectively deliver GLP-1 via plasmid condensation is mainly due to the fine balance achieved by these systems when precisely formulated to that of the 92-10-5 example studied here. This system possesses high nuclease protection ability but efficient endosomal release without any evident toxicity or immunogenic effect therefore improving therapeutic efficiency via

delivery of native recombinant GLP-1. In summary, this study demonstrated the ability of specific chitosan formulation to efficiently deliver GLP-1 and consequently: 1) enhance insulin secretion 2) sustain an improved glucose tolerance and 3) limit weight gain.

Materials and methods

The plasmid pVax1[®] (Cat #V260-20), pCR[®]2.1 from *TA cloning[®] Kit* (Cat #45-0046), competent INV α F' cells (Cat # 44-0007), sterile Tris-EDTA (TE) buffer solution pH7.4 (Cat # 60191) and the PureLink[™] HiPure Plasmid DNA purification kit (Cat # K2100-14) were from Invitrogen. Glucagon-like peptide-1 (Active) ELISA Kit (Cat # EGLP-35K), Rat/Mouse Insulin ELISA (Cat # EZRMI-13K) were from Millipore (Linco).

pVax1-GLP-1 (7-37) plasmid constructs

We constructed a plasmid expressing GLP-1 in eukaryotic pVax1 plasmid driven by a potent cytomegalovirus promoter. A furin cleavage site was fused between a Kozak sequence and the GLP-1-coding region (amino acids 7-37) to generate an active form of GLP-1 followed by an hGH poly A signal to transcription termination (Figure 1). pVax-GLP-1 [GLP-1(7-37)] sequences were generated by PCR and PCR-based mutagenesis techniques. The plasmid construction was confirmed by DNA sequencing.

Preparation of chitosan/pVax-GLP-1 nanoparticles

Depolymerised chitosans were dissolved overnight on rotary mixer at 0.5% (w/v) in hydrochloric acid using a glucosamine: HCl ratio of 1:1. Chitosan solutions were then diluted with deionized water to reach the desired amine (deacylated groups) to phosphate ratio when 100 μ L of chitosan would be mixed with 100 μ L of plasmid, the latter always at 0.33 μ g/ μ L in endotoxin-free TE. Diluted chitosan solutions were sterile filtered with a 0.2 μ m syringe filter. Nanopcomplexes were then prepared by adding 100 μ l of sterile diluted chitosan solution to 100 μ L of pVax-GLP-1 (0,33 μ g/ μ L) at room temperature, pipetting rapidly up and down. The mixed solution was incubated 30 minutes for nanopcomplex formation. The recombinant vectors (pVax/GLP-1) were complexed with three distinct and well characterized formulations of chitosan [92-10-5, 80-10-10 and 80-80-5 (DDA-MW-N:P)] to create therapeutic nanopcomplexes (TNCs) that were tested for transfection and expression efficiency *in vitro* and *in vivo*.

Nanoparticle size and surface charge analysis

The size of pVax-GLP-1/chitosan complexes was determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer Nano Zs (Malvern, Worcestershire, UK). Samples were measured in triplicate using the refractive index and viscosity of pure water in calculations. The zeta potential was measured in duplicate with laser Doppler velocimetry at 25 °C on the same instrument, and with the viscosity and dielectric constant of pure water used for calculations. For both of the above measurements, nanoparticles were diluted 1:10 in NaCl 10mM.

Scanning electron microscopy

Nanopcomplexes was sprayed on silicon wafer substrate, and then sputter-coated with gold (Agar Manual Sputter Coater, Marivac Inc.) as described previously [65]. Observations were performed at 20 kV in the high vacuum mode of an environmental scanning electron microscope (Quanta 200 ESEM FEG, FEI Company Hillsboro, OR, USA).

Protection of condensed DNA against nuclease digestion

pVax-GLP-1/Chitosan nanocomplexes (6 μ l, equivalent to 1 μ g DNA) were incubated with 0.5, 1, 2, 5 or 10 units of DNase I in 20 μ l of MES-MgCl₂ buffer (20 mM MES, 1mM MgCl₂, pH6.5) for 30 min at 37°C. The reactions were stopped by adding 2 μ l of EDTA (50 mM). Following DNase I treatment, chitosan forming nanocomplexes were digested with *Streptomyces Griseus* chitosanase (1 U/ μ mol of chitosan) for 90 minutes at 37°C. The integrity of the plasmid DNA was then analyzed by agarose gel electrophoresis (0.8%) prepared with TAE buffer (1 \times). Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 100V (HorizonTM 11.14 BRL, Life Technologie inc.) for 45 minutes. DNA bands were visualized under a UV transilluminator (Bio-Vision 3000, Montréal Biotech, Canada) and captured images were analyzed using Vision-Capt software (V.15.06, Vilber Lourmat, Cedex, France).

***In vitro* transfection of HepG2 cells with chitosan/pVax-GLP-1 therapeutic nanocomplexes**

HepG2 cells were cultured in MEM medium supplemented with 10% FBS at 37°C and at 5% CO₂. Cells were subcultured according to ATCC recommendations without any antibiotics. For transfection, cells were plated at 300,000 cells/well in 24 well plates using 500 μ L/well of complete medium and incubated at 37°C, 5% CO₂. The cells were transfected the next day at 50% confluency in complete medium at pH 6.5. One day before transfection DMEM HG media was prepared with 0.976 g/L of MES and 0.84 g/L of NaHCO₃ and supplemented with 10% FBS. This complete transfection medium was equilibrated overnight at 37°C, 5% CO₂. Prior to transfection, pH adjustment of DMEM HC equilibrated media was performed with 1N sterile HCl and distributed in 24 well ghost plates (500 μ L/wells). Chitosan/pVax-GLP-1 complexes were prepared as described above, 30 minutes before use. Then nanocomplexes were incubated in the above medium at a final concentration of 2.5 μ g pDNA/well, and equilibrated in a ghost plate for 10 minutes at 37°C, 5% CO₂. Medium over cells was aspirated and replenished with 500 μ L per well of the equilibrated transfection medium containing nanocomplexes. GLP-1 concentration was determined by an ELISA technique that measured biologically active GLP-1 (Linco research).

Animals Models

Males, 12-week-old Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat, a model which spontaneously develops type 2 diabetes were purchased from Charles River and housed in a room controlled for temperature, humidity and light (21-23°C), 12h:12h light/dark cycle. All animal experiments were approved by Institutional Animal Care & Use Committee. Thirty ZDF rats were used in this study. Animal weight was measured every 5 days.

***In vivo* gene transfection**

Nanocomplexes were administrated to ZDF rats either by subcutaneous dorsal injection (dose of 165 μ g of DNA) or by intramuscular injection in both hind legs (total dose of 165 μ g of DNA) at days 0, 7, 14, 21, 35, 49 and 63.

Quantitative determination of GLP-1 concentration in sera

Biologically active GLP-1 [native-GLP-1(7-37)] in plasma was measured by ELISA (Linco Research) using a monoclonal antibody to the N-terminal region. An anti GLP-1-alkaline phosphatase detection conjugate was used to bind to the immobilized GLP-1 and quantify it by adding MUP (methyl umbelliferyl phosphate) to form the fluorescent product umbelliferone. The concentration of active GLP-1 in the plasma sample is derived by interpolation from reference standards of known concentrations of active GLP-1.

Intraperitoneal glucose tolerance test

An intraperitoneal glucose tolerance test was performed on each treated animal to evaluate the ability of the animals to tolerate a standard glucose load. After 12 hrs fasting, 2g/kg glucose was administered intraperitoneally to rat. Blood was obtained from the tail before administration, at 30, 60, 120 and 180 minutes after administration and analyzed for glucose with glucose photometer «OneTouch» (LIFESCAN). Intraperitoneal glucose tolerance test was performed and blood glucose was monitored every five days after treatment (i.e. starting at day 82) to evaluate the efficacy and the longevity of recombinant GLP-1.

Histological and systemic evaluation

The group of animals that received single injections (n=12) were sacrificed one, three or fourteen days following subcutaneous (SC) or intramuscular (IM) injection of chitosan/pDNA nanoparticles using CO₂ euthanasia chambers. Tissues were fixed in 10% NBF (Fisher Scientific, Québec, Canada) at room temperature for 1 week and trimmed to keep only the area of the injection site. Samples were alcohol-dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 4-6 µm thickness were prepared on a Leica RM 2155 microtome (Leica Microsystems, Deerfield, IL) and collected on microscope slides. Paraffin sections were deparaffinized and rehydrated prior to Safranin-O/Fast-Green/Iron-Hematoxylin staining. Digital images of stained sections were acquired with a Zeiss Axiolab microscope equipped with a Hitachi HV-F22 analog camera. Software for histology analyses included Northern Eclipse (Mississauga, Ontario, Canada).

Statistical Analysis

The data were expressed as means ± s.d. and analyzed using Statistica 9.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Statistical analyses were performed using the General Linear Model and Contrast Analysis. Differences were considered significant at * p<0.05 and very significant at **p<0.01.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the National Science and Engineering Research Council (NSERC) and by the Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB). We are grateful to Dr. Vincent Darras for the production of chitosans, Dr Monica Nelea for the SEM analyses, and Viorica Lascau and Genevieve Picard for assistance with histological preparations.

Supplementary Materiel

Supplement 1 : Construction of GLP-1 plasmids in the eukaryotic pVax1 plasmid. A Kozak sequence, start codon and the furin recognition site were added upstream and a stop codon downstream of the sequence coding for GLP-1 (7-37). Restriction endonucleases sites for *Hind*III and *Xho*I added to each end allowed the cloning of the GLP-1 (7-37) sequence inside the eukaryotic plasmid pVax.1. Transcription of the recombinant gene was driven by the presence of the cytomegalovirus promoter (pMVC). The Bovine Growth Hormone Polyadenylation Signal (BGHpA) located downstream stabilized the transcribed mRNA.

Supplement 2 : ESEM images reveal spherical pVax-GLP-1/chitosan nanoparticles. (a) pVax-GLP-1/92-10-5 (b) pVax-GLP-1/80-10-10 (c) pVax-GLP-1/80-80-5.

Supplement 3: Nuclease protection assay of pVax1-GLP-1 plasmid complexed with different chitosans. (a) pVax1-GLP-1 Chitosan-based formulation (92-10-5, 80-10-10 and 80-80-5) were incubated in presence of different DNase I concentrations - 0, 0.5, 1, 2, 5 units of DNase I per μg of plasmid DNA. Following incubation, chitosan-plasmid nanoparticles were digested with chitosanase in order to release the recombinant plasmid pVax1-GLP-1. C1: pVax1-GLP-1 incubated without DNase I and without chitosanase. C2:pVax1-GLP-1 incubated without DNase I and with chitosanase. C3: pVax1-GLP-1 incubated with 0.5 unit of DNase I and with chitosanase. pVax1-GLP-1 released from nanocomplexes using chitosanase has a reduced electrophoretic mobility possibly due to binding of residual chitosan fragments after chitosanase digestion. (b) For each chitosan formulation, the relative amount of pVax1-GLP-1 (%) was determined by comparison of integrated signal intensity of DNase treated samples versus non-treated samples (0 Unit of DNase= 100% of intensity).

References

1. Bell, G.I. and K.S. Polonsky, *Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 788-91.
2. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1140-2.
3. Habener, J.F., *The Role of Pancreatic Duodenum Homeobox Protein-1 in the Development of Diabetes Mellitus*. Drug News Perspect, 2002. **15**(8): p. 491-497.
4. Holst, J.J., et al., *Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut*. FEBS Lett, 1987. **211**(2): p. 169-74.
5. Rouille, Y., et al., *Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32810-6.
6. Creutzfeldt, W.O., et al., *Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients*. Diabetes Care, 1996. **19**(6): p. 580-6.
7. Nauck, M.A., et al., *Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1239-46.
8. Gutniak, M., et al., *Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1992. **326**(20): p. 1316-22.
9. Nauck, M.A., et al., *Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 301-7.
10. Nauck, M.A., et al., *Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients*. Diabetologia, 1993. **36**(8): p. 741-4.
11. Thorens, B. and G. Waeber, *Glucagon-like peptide-I and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM*. Diabetes, 1993. **42**(9): p. 1219-25.
12. Zander, M., et al., *Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study*. Lancet, 2002. **359**(9309): p. 824-30.
13. Deacon, C.F., A.H. Johnsen, and J.J. Holst, *Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(3): p. 952-7.
14. Deacon, C.F., et al., *Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects*. Diabetes, 1995. **44**(9): p. 1126-31.
15. Hansen, L., et al., *Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine*. Endocrinology, 1999. **140**(11): p. 5356-63.
16. DeFronzo, R.A., et al., *Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2005. **28**(5): p. 1092-100.

17. Eng, J., et al., *Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas.* J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7402-5.
18. Chen, Y.E. and D.J. Drucker, *Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard.* J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4108-15.
19. Ahren, B., et al., *Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2078-84.
20. Herman, G.A., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses.* Clin Pharmacol Ther, 2005. **78**(6): p. 675-88.
21. Dash, P.R., et al., *Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery.* Gene Ther, 1999. **6**(4): p. 643-50.
22. Ma, P.L., et al., *New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry.* Biomacromolecules, 2009. **10**(6): p. 1490-9.
23. Heggset, E.B., et al., *Degradation of chitosans with chitinase G from Streptomyces coelicolor A3(2): production of chito-oligosaccharides and insight into subsite specificities.* Biomacromolecules, 2009. **10**(4): p. 892-9.
24. Jean, M., et al., *Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies.* Gene Ther, 2009. **16**(9): p. 1097-110.
25. Lavertu, M., et al., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation.* Biomaterials, 2006. **27**(27): p. 4815-24.
26. Thibault, M., et al., *Intracellular Trafficking and Decondensation Kinetics of Chitosan-pDNA Polyplexes.* Mol Ther, 2010 Jul 13. [Epub ahead of print].
27. Merzouki, A., et al., *Improved transfection efficiency of different cell lines using chitosan as a gene delivery system American Association of Pharmaceutical Scientists AAPS PharmSciTech 2010 (submitted).*
28. Damholt, A.B., H. Kofod, and A.M. Buchan, *Immunocytochemical evidence for a paracrine interaction between GIP and GLP-1-producing cells in canine small intestine.* Cell Tissue Res, 1999. **298**(2): p. 287-93.
29. Watanabe, T., et al., *Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway.* J Biol Chem, 1992. **267**(12): p. 8270-4.
30. Nakayama, K., *Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins.* Biochem J, 1997. **327** (Pt 3): p. 625-35.
31. Van de Ven, W.J., J.W. Creemers, and A.J. Roebroek, *Furin: the prototype mammalian subtilisin-like proprotein-processing enzyme. Endoproteolytic cleavage at paired basic residues of proproteins of the eukaryotic secretory pathway.* Enzyme, 1991. **45**(5-6): p. 257-70.
32. Quong, D. and R.J. Neufeld, *DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan- or poly-L-lysine-coated alginate beads.* Biotechnol Bioeng, 1998. **60**(1): p. 124-34.
33. Kimoto, H. and A. Taketo, *Studies on electrotransfer of DNA into Escherichia coli: effect of molecular form of DNA.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1307**(3): p. 325-30.
34. Bozkir, A. and O.M. Saka, *Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency.* J Drug Target, 2004. **12**(5): p. 281-8.
35. Bozkir, A. and O.M. Saka, *Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics.* Drug Deliv, 2004. **11**(2): p. 107-12.

36. Dodane, V., M. Amin Khan, and J.R. Merwin, *Effect of chitosan on epithelial permeability and structure*. Int J Pharm, 1999. **182**(1): p. 21-32.
37. McNeela, E.A., et al., *A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM(197)) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery*. Vaccine, 2000. **19**(9-10): p. 1188-98.
38. Gutzwiller, J.P., et al., *Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. R1541-4.
39. Gutzwiller, J.P., et al., *Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans*. Gut, 1999. **44**(1): p. 81-6.
40. Orskov, C., et al., *Glucagon-like peptide I receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide I*. Diabetes, 1996. **45**(6): p. 832-5.
41. Turton, M.D., et al., *A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding*. Nature, 1996. **379**(6560): p. 69-72.
42. Vrang, N., et al., *Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(2): p. R470-8.
43. Bos, G.W., et al., *Cationic polymers that enhance the performance of HbsAg DNA in vivo*. Vaccine, 2004. **23**(4): p. 460-9.
44. Kaiser, S. and M. Toborek, *Liposome-mediated high-efficiency transfection of human endothelial cells*. J Vasc Res, 2001. **38**(2): p. 133-43.
45. Hoshi, S., et al., *Podocyte injury promotes progressive nephropathy in Zucker diabetic fatty rats*. Lab Invest, 2002. **82**(1): p. 25-35.
46. Mojsov, S., G.C. Weir, and J.F. Habener, *Insulintropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas*. J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 616-9.
47. Kreymann, B., et al., *Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man*. Lancet, 1987. **2**(8571): p. 1300-4.
48. Lee, Y.S., et al., *Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis*. Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1671-9.
49. Kumar, M., et al., *Gene therapy of diabetes using a novel GLP-1/IgG1-Fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice*. Gene Ther, 2007. **14**(2): p. 162-72.
50. Parsons, G.B., et al., *Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes*. Gene Ther, 2007. **14**(1): p. 38-48.
51. Stoffers, D.A., et al., *Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 741-8.
52. Rolin, B., et al., *The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(4): p. E745-52.
53. Kim, J.G., et al., *Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 751-9.
54. Nimesh, S., et al., *Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum*. Mol Biotechnol, 2010 May 8. [Epub ahead of print].
55. Dupuis, M., et al., *Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2850-8.
56. Jiang, Z.L., et al., *Local high-capacity adenovirus-mediated mCTLA4Ig and mCD40Ig expression prolongs recombinant gene expression in skeletal muscle*. Mol Ther, 2001. **3**(6): p. 892-900.

57. Miller, M., et al., *The efficacy of electroporated plasmid vaccines correlates with long-term antigen production in vivo*. *Vaccine*, 2004. **22**(20): p. 2517-23.
58. Shepherd, P.R. and B.B. Kahn, *Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(4): p. 248-57.
59. Brubaker, P.L. and D.J. Drucker, *Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system*. *Endocrinology*, 2004. **145**(6): p. 2653-9.
60. Liu, M.J., et al., *Prolonged remission of diabetes by regeneration of beta cells in diabetic mice treated with recombinant adenoviral vector expressing glucagon-like peptide-1*. *Mol Ther*, 2007. **15**(1): p. 86-93.
61. Chaudhri, O., C. Small, and S. Bloom, *Gastrointestinal hormones regulating appetite*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006. **361**(1471): p. 1187-209.
62. Hui, H., et al., *The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects*. *Eur J Endocrinol*, 2002. **146**(6): p. 863-9.
63. Ma, X., J. Bruning, and F.M. Ashcroft, *Glucagon-like peptide 1 stimulates hypothalamic proopiomelanocortin neurons*. *J Neurosci*, 2007. **27**(27): p. 7125-9.
64. Wang, Q. and P.L. Brubaker, *Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice*. *Diabetologia*, 2002. **45**(9): p. 1263-73.
65. Ma, P.L., M.D. Buschmann, and F.M. Winnik, *One-step analysis of DNA/chitosan complexes by field-flow fractionation reveals particle size and free chitosan content*. *Biomacromolecules*. **11**(3): p. 549-54.

Table Legend

Table 1: Size, zeta potential, pH and osmolality values for chitosan/pVax-GLP-1 nanoparticles.

Figure Legends

Figure 1: Expression of GLP-1 (7-37) in HepG-2 transfected cells. Expression of recombinant GLP-1 (7-37) in HepG-2 transfected cells. Lipofectamine (Lipofect.) and naked plasmid (pVax alone) were used as positive and negative controls respectively, with the pVax plasmid not containing any GLP-1 sequence (pVax on the left) also as a negative control. Values are expressed as mean \pm s.d.; n=3 rats/group. *p < 0.05, ** p < 0.01 compared with pVax-GLP-1 alone (no chitosan). Statistical analyses used the General Linear Model and Contrast Analyses with Treatment (formulation) as predictor.

Figure 2: Quantification of GLP-1 (7-37) levels in blood by ELISA in ZDF rat model using different chitosan-based formulations. Nanocomplexes were administered to rats via (a) subcutaneous (SC) or (b) intramuscular injection (IM) at day 0, 7, 14, 21, 35, 49 and 63. GLP-1 expression was measured at day 0, 14, 35, 49, 63 and 77. Values are expressed as mean \pm s.d.; n=3 rats/group. *p < 0.05, ** p < 0.01 compared with pVax-GLP-1 alone (no chitosan). Statistical analyses used the General Linear Model and Contrast Analyses for each Day with Treatment as categorical predictor.

Figure 3: Glucose tolerance test in ZDF rats 14 days after completion of the pVax-GLP-1/chitosan injection schedule. (a) Subcutaneous (SC) or (b) intramuscular injection (IM). A high concentration of glucose (2g/Kg) was injected 14 days after the completion of the chitosan-based formulation injection schedule. Glucose tolerance was measured at 0.5, 1, 2 and 3 hours following the glucose injection. AUC corresponds to the area under the curve. Glucose concentration was measured directly on blood samples using photometry techniques. Values are expressed as mean \pm s.d.; n=3 rats/group. *p < 0.05, ** p < 0.01 compared with pVax-GLP-1 alone. Statistical analyses used the General Linear Model and Contrast Analyses with Treatment as predictor.

Figure 4: Efficacy and longevity of therapeutic effect of GLP-1. Intraperitoneal glucose tolerance test following treatment with different chitosan-based formulations encoding GLP-1 (7-37). The last injection of TNCs was on day 63. Glucose values measured starting 19 days after treatment on day 82 are peak values at 60 minutes post challenge expressed as means \pm s.d.; n=3 rats/group. *p < 0.05, ** p < 0.01 compared with pVax-GLP-1 alone (no chitosan). Statistical analyses used the General Linear Model and Contrast Analyses for each Day with Treatment as categorical predictor.

Figure 5: Insulin quantification before (day 0) and after (day 77) ZDF rats treatment using different chitosan-based formulations. *Statistical analyses using the General Linear Model indicated that treatment had a significant effect on insulin concentration (*p < 0.05) for both SC and IM. A specific trend for increased insulin using 92-10-5 with IM administration compared to pVax-GLP-1 with no chitosan (p=0.08) was also found.

Figure 6: Effect of recombinant GLP-1 (7-37) (in different chitosan-based formulations) on weight of treated ZDF versus untreated ZDF. Values are expressed as means \pm s.d.; n=3 rats/group. *p < 0.05 compared with pVax-GLP-1 alone. Statistical analyses used the General Linear Model and Contrast Analyses for each Day with Treatment as categorical predictor.

Figure 7: Histological examination of muscle and skin (safranin-O/fast-green/iron-hematoxylin) following TNC administration (IM and SC). (a) and (b) Tissue from the IM injection sites sampled 1 day following administration of pVax-GLP-1/92-10-5 TNC. (c) and (d) Tissue from the SC injection sites sampled 3 days following pVax-GLP-1/92-10-5 TNC administration. Administration induced a mild acute inflammatory response, evidenced by increased blue (nuclear) staining. (e) and (f) Tissue from the IM injection sites sampled 1 day following administration of pVax-GLP-1/80-80-5 TNC. (g) and (h) Tissue from the SC injection sites sampled 3 days following pVax-GLP-1/80-80-5 TNC administration. Administration of pVax-GLP-1/80-80-5 nanoparticles induced a higher level of acute inflammation than other formulations with greater infiltration of macrophages and neutrophils observed in (e), (f), (g) and (h) than (a), (b), (c), (d). Chitosan was observed (arrow) in (g) and (h).

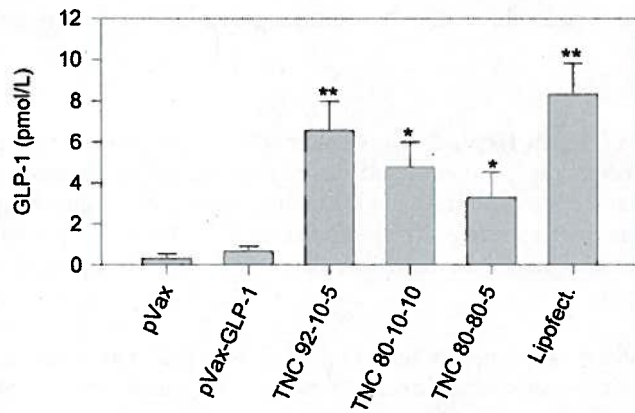


Figure 1

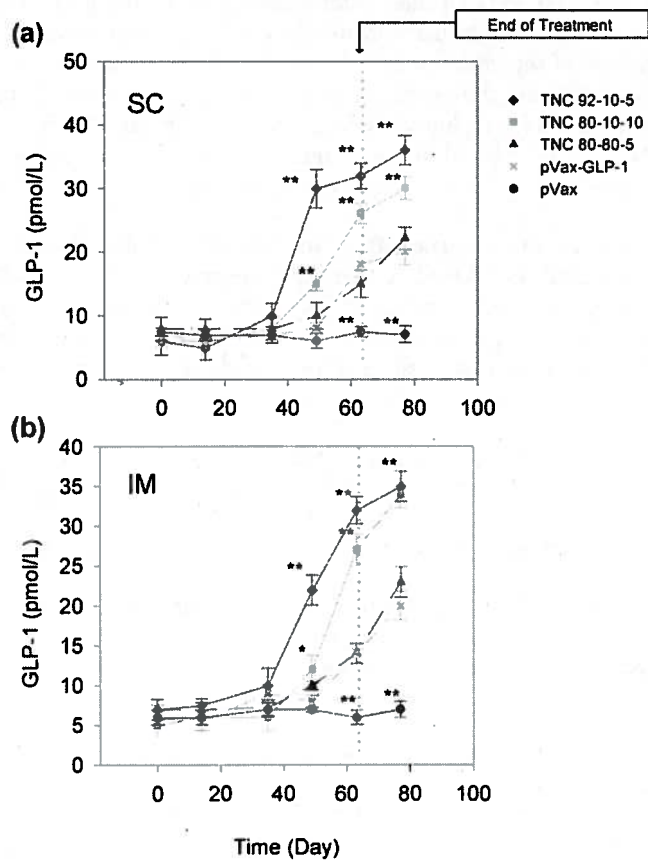


Figure 2

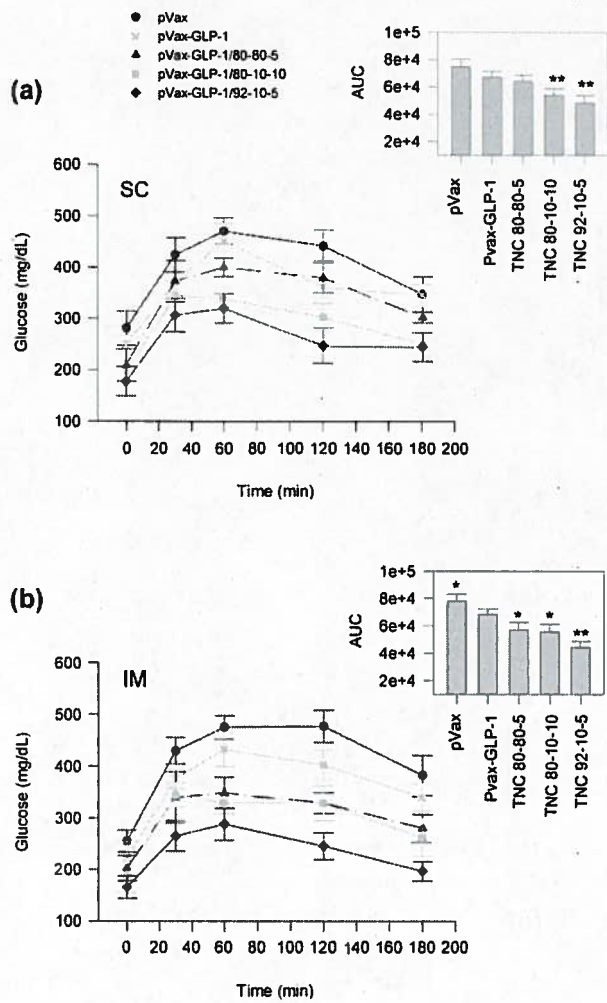


Figure 3

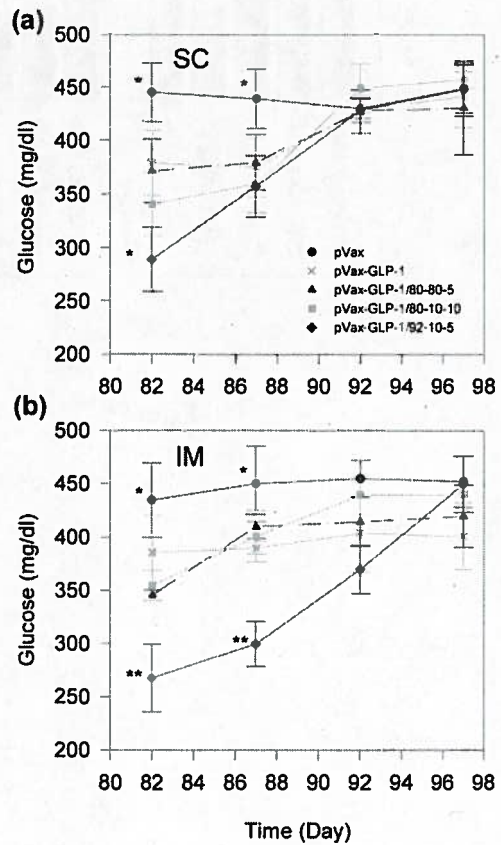


Figure 4

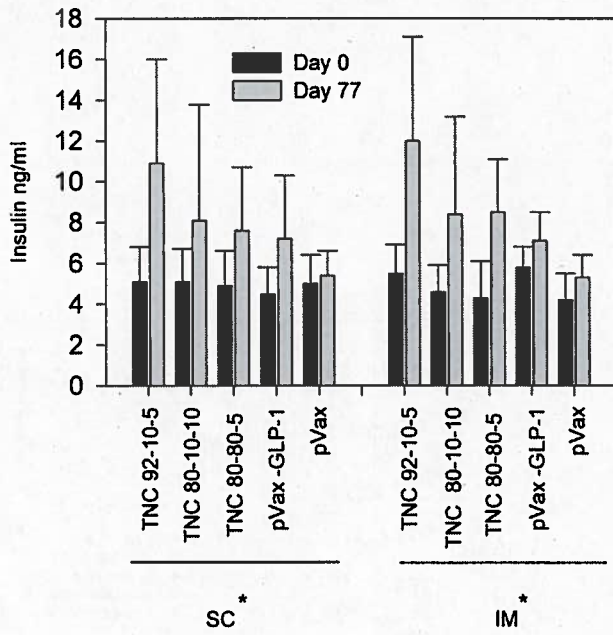


Figure 5

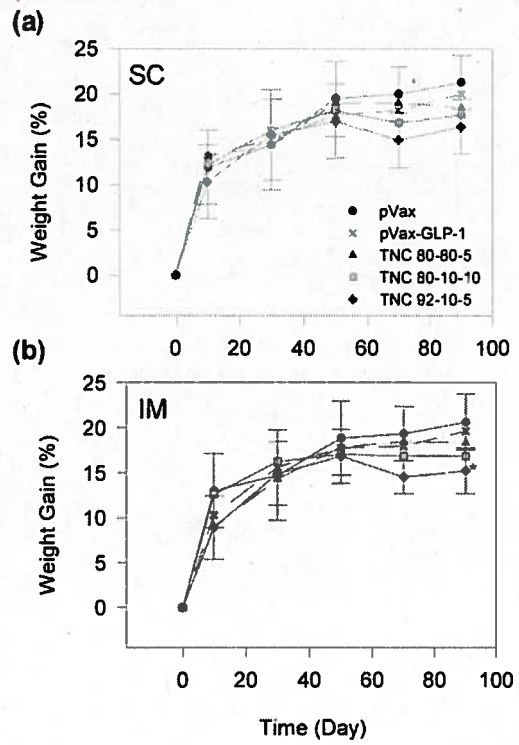


Figure 6

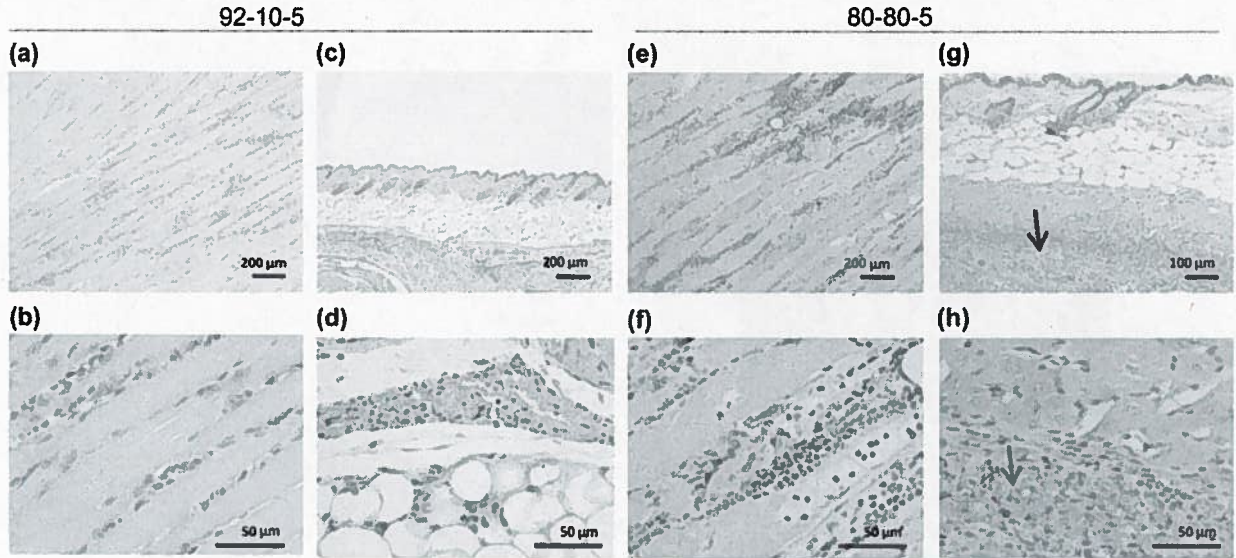
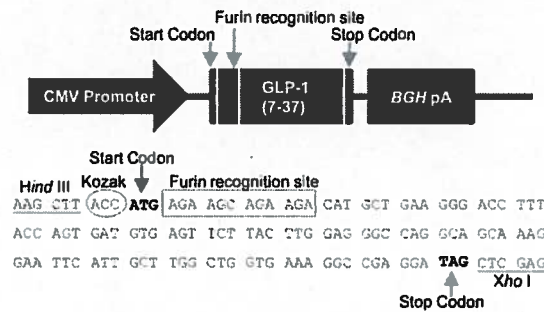


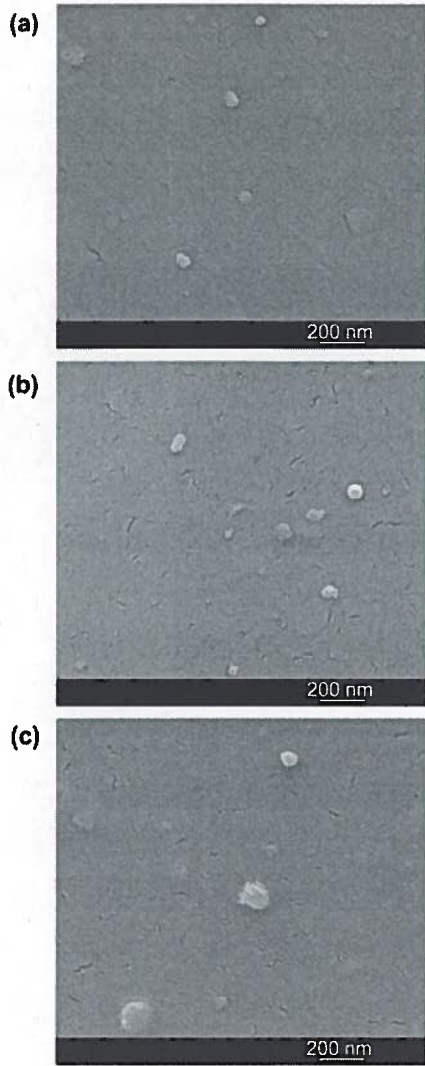
Figure 7

Table 1

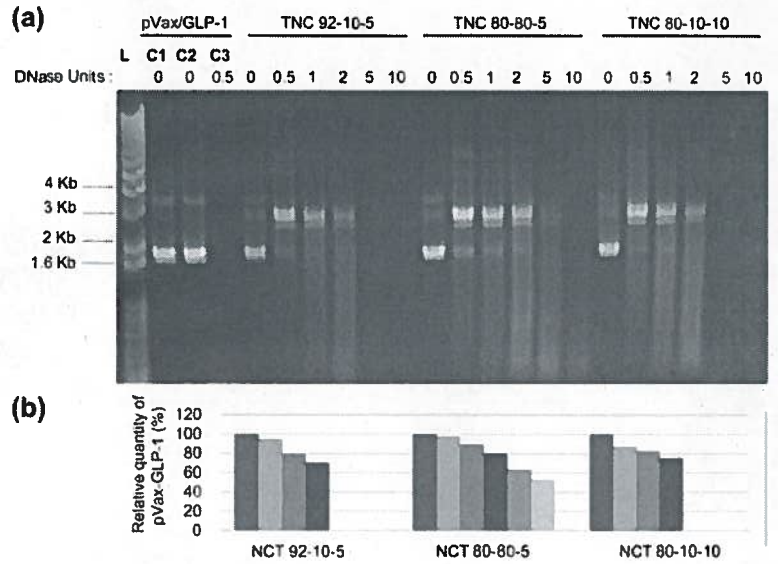
Sample	Size (nm)	Zeta potential (mV)	pH	Osmolality (mOsm/kg)
pVax-GLP-1/92-10-5	235 ±48	32.0±3.4	4.8	22
pVax-GLP-1/80-10-10	163±22	26.7±3.9	3.7	30
pVax-GLP-1/80-80-5	246±30	31.1±1.3	4.8	20



Suppl.1



Suppl.2



Suppl. 3

Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing

Mohamad Alameh
Myriam Jean
Diogo Dejesus
Michael D Buschmann
Abderrazzak Merzouki

¹Institute of Biomedical Engineering,
Department of Chemical Engineering,
École Polytechnique, Station Centre-
ville, Montréal, QC, Canada

Abstract: Chitosan, a well known natural cationic polysaccharide, has been successfully implemented *in vitro* and *in vivo* as a nonviral delivery system for both plasmid DNA and siRNA. While using chitosan/siRNA polyplexes to knock down specific targets, we have underestimated the effect of nucleic acids binding to chitosan when extracting RNA for subsequent quantitative PCR evaluation of silencing. *In vitro* transfection using chitosan/siRNA-based polyplexes reveals a very poor recovery of total RNA especially when using low cell numbers in 96 well plates. Here, we describe a method that dramatically enhances RNA extraction from chitosan/siRNA-treated cells by using an enzymatic treatment with a type III chitosanase. We show that chitosanase treatment prior to RNA extraction greatly enhances the yield and the integrity of extracted RNA. This method will therefore eliminate the bias associated with lower RNA yield and integrity when quantifying gene silencing of chitosan-based systems using quantitative real time PCR.

Keywords: chitosan, chitosanase, siRNA, DPP-IV gene silencing, RIN, qPCR

Chitosan is a natural polymer of β (1–4)-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine derived by partial deacetylation of chitin from crustacean shells.¹ Chitosan has a pKa of approximately 6.5, therefore, at lower pH values, the majority of the glucosamine residues on chitosan is cationic due to the protonation of amine groups, which enables the interaction with anionic components such as nucleic acids and cell surface macromolecules. Industrially, the process of partial deacetylation of chitin is controlled to yield specific chitosan types (or entities) characterized by their molecular weight (MW) as well as their degree of deacetylation (DDA). These two parameters have a major influence on chitosan biological and physicochemical properties.^{2,3} For example, increasing chitosan's DDA results in reduced biodegradability and biological activity given that acetyl groups promote its degradation by enzymes.

Researchers have recently demonstrated the ability of chitosan to efficiently deliver a wide variety of biologics including proteins,^{4–6} plasmid DNA,^{7–11} and siRNA,^{12–14} both *in vitro* and *in vivo*. The effectiveness of delivery is generally assessed by

Quantitative assessment of gene silencing can be performed by quantitative real time PCR analysis of targeted genes. The sensitivity and accuracy of the latter method is influenced by many variables including: 1) the quality of tissues/cells, 2) the RNA extraction method, 3) RNA integrity, and 4) the reverse transcription and polymerase

Correspondence: Abderrazzak Merzouki,
Institute of Biomedical Engineering,
Department of Chemical Engineering,
École Polytechnique, P.O. BOX 6079,
Station Centre-ville, Montréal, Québec,
Canada H3C 3A7
Tel 514-340-5121 ext 4799
Fax 514-340-5227
Email abderrazzak.merzouki@polymtl.ca

chain reaction used in RT-PCR.¹⁵⁻¹⁸ Despite the development of relative quantification techniques like the Pfaffl method¹⁹ and the $\Delta\Delta CT$ method,²⁰ RNA integrity remains an important issue for generating proper data. While using siRNA-chitosan polyplexes to knock down specific targets, we have underestimated the effect of nucleic acids binding to chitosan when extracting RNA for subsequent quantitative PCR evaluation of silencing. In fact, polysaccharide matrices (ie, agarose and alginate) used for tissue engineering have been shown to interfere with techniques required for protein analysis and with all the procedures currently used for nucleic acid purification.^{9,21,22} Moreover, our results described herein show that chitosan interferes with RNA extraction from low cell numbers. Therefore, we specifically examined this issue by delivering chitosan-siRNA nanoparticles against dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) mRNA in three different cell lines and found that siRNA-chitosan-treated cells reveal a very poor recovery of total RNA. The DPP-IV gene encodes a serine protease that cleaves the His:Ala:Glu sequence at the N-terminal region of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1). GLP-1 regulates glucose homeostasis postprandially thus decreasing its bioavailability and consequently causing a decrease in glucose level. The inhibition of DPP-IV increases GLP-1 bioavailability, hence it represents a potential therapeutic for type II diabetes.

Here, we propose a method for overcoming low RNA yield from chitosan/siRNA-transfected cells by enzymatically treating the cell lysate with *Streptomyces griseus* type III chitosanase in order to release mRNA that was bound to chitosan. In addition, we show that our technique is suitable for the removal of membrane bound chitosan for subsequent analysis by FACS of transfected cells.

Material and methods

Preparation of chitosan/siRNA polyplexes

siRNA sequences targeting the DPP-IV gene sequence were synthesized by Dharmacon (Thermo scientific, Dharmacon RNAi Technologies, USA) and are available in the On Target Plus[®] catalogue. The siRNA sequence has a dual strand modification pattern to reduce off target effects caused by both strands.

A 10 kDa MW chitosan with a degree of deacetylation (DDA) of 92% was prepared and characterized as described previously¹¹ and dissolved overnight on a rotary mixer at 0.5% (w/v) in hydrochloric acid using a glucosamine: HCl ratio of 1:1. Chitosan solutions were then diluted with deionized water to reach the desired amine (deacetylated groups) to phosphate (of the nucleic acid) ratio (N/P ratio).

Chitosan/siRNA polyplexes were formed at three different N/P ratios of 5, 10, and 20. Prior to mixing with siRNA, the diluted chitosan solutions were sterile filtered with a 0.2 μm syringe filter. Chitosan/siRNA nanoparticles were then prepared by adding 100 μL of the sterile diluted chitosan solution to 100 μL of siRNA (100 nM) and mixed by rapid pipetting. The polyplexes were allowed to form during 30 minutes incubation at room temperature before transfection.

Polyplexes were measured independently using dynamic light scattering (DLS) and environmental scanning electronic microscopy (ESEM) and it was found that they had a mean diameter of approximately 50 nm.

Cell culture

HT-29, HepG2, and Caco-2 cell lines from American Type Cell Culture (ATCC, Manassas, VA) were cultured in McCoy's media (HT-29) and Dulbecco minimum essential media (HepG2 and CaCo-2) with 1.85 g/L of sodium bicarbonate and supplemented with 10% FBS (Cedarlane Laboratories, Burlington, ON) at 37°C and 5% CO₂. These cell types were chosen since they express the DPP-IV enzyme and represent models for diabetes research. For transfection, HT-29, HepG2, and CaCo-2 cells were plated in 96-well culture plates (Corning, NY, USA) at 25,000 cells/well using 100 μL /well of complete medium. The cells were transfected the following day at ~50% confluency.

Transfection with chitosan/siRNA nanoparticle complexes

Complete transfection media (Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose, 4-morpholineethanesulfonic acid (MES), pH 6.5) was equilibrated overnight in a 5% CO₂, 37°C incubator. Prior to transfection, pH adjustment to 6.5 was performed with 1 N sterile HCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). For transfection, medium over cells was aspirated and replenished with 100 μL transfection medium (DMEM HG, MES, pH 6.5) containing chitosan/siRNA complexes at a concentration of 10 pmol or 50 pmol siRNA/well corresponding to concentrations of 100 nM or 500nM siRNA. Cells were incubated with chitosan/siRNA complexes for 24 hours until analysis. All experiments were done in triplicates, with a minimum of three separate experiments to demonstrate reproducibility.

Transfection with Dharmafect1TM

Dharmafect1TM/siRNA complexes were prepared with a 1:2 ratio (w/v) of siRNA: Dharmafect1TM according to the

control. Cells were incubated for four hours in presence of Dharmafect 1/siRNA complexes in serum-free medium then replenished with complete media (DMEM HG, 10% FBS, pH 7.4) and incubated for an additional 20 hours before analysis.

Chitosanase treatment of transfected cells and polyplexes degradation

Cells incubated with chitosan/siRNA polyplexes for 24 hours were treated with chitosanase (Sigma-Aldrich, cat # C9830) prior to RNA extraction in order to release anionic mRNA from potential binding sites on chitosan. A final concentration of 6.12 mU of chitosanase per g of chitosan in DMEM at pH 6.5 (100 μ L) or in RA1 lysis buffer (100 μ L) + 2 μ L of TCEP (Macherey-Nagel™) were used. The RA1 lysis buffer containing chitosanase was used to assess the enzyme activity in presence of guanidium thiocyanate. Chitosanase resuspended in DMEM or in the lysis buffer was directly applied onto cell monolayer. Cells were then incubated at 37°C for 60 minutes prior to RNA extraction and quantification for gene expression as described below.

A second set of experiments using chitosan/DPP-IV_{ODN} nanoparticules – with or without chitosanase treatment – were analyzed electrophoretically for the presence of chitosan and for OligoDeoxyNucleotides (ODN) release. Polyplexes were migrated for 120 minutes at 100V on a 13% polyacrylamide gel (BioRad Laboratories) in 1X MES buffer (20 mM MES, 8 mM sodium acetate, pH 6.5) and stained using coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad Laboratories) for chitosan visualization or ethidium bromide (0.5 μ g/mL) for ODN visualization. Gel documentation and analysis were carried out using the bio-vision 3000 system and the Vision-Capt software (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

FACS analysis

The cellular uptake of 5'6FAM labeled DPP-IV_{ODN} was analyzed using a BD Canto flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) 24 hours post transfection. To determine the level of DNA cellular uptake, cells were transfected with polyplexes formed with 5'6FAM labeled DPP-IV_{ODN} as described above. Following 24 hours of incubation with polyplexes, cells were incubated with chitosanase for 60 minutes to dissociate and remove cell surface-associated complexes. For flow cytometry analysis, cells were washed twice in PBS, trypsinized, and resuspended in ice-cold PBS. For each sample, 20,000 events were counted and a dot plot of the forward light scatter against the side scatter was used to establish a collection gate to exclude cell debris, dead cells, and

aggregates of cells. The 5'6FAM-positive cells were excited using a 488-nm laser line and detected using a 530/30-nm band pass filter. To distinguish between autofluorescence and fluorescently labeled cells, we ran nontransfected cells as negative controls. The cellular uptake of the polyplexes was calculated as the percentage of 5'6FAM-DPP-IV_{ODN} labeled cells, and the relative amount of the internalized 5'6FAM-DPP-IV_{ODN} was estimated from the median fluorescence intensity of the 5'6FAM-positive population.

Confocal imaging

Polyplexes internalization was studied by confocal imaging. Chitosans were labeled with fluorescent rhodamine B isothiocyanate (RITC) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) and DPP-IV_{ODN} (21 nucleic acid) were labeled with 6-FAM on their 5'extremities (Integrated DNA Technologies, Inc). Cells were seeded 24 hours prior to transfection in 35 mm glass bottom culture dishes (MatTek, Ashland, MA) using 500 μ l of complete medium at 40,000 cells/dish. Chitosan/ODN polyplexes were incubated with cells at a concentration of 2.5 μ g ODN/wells in media containing 10% serum at pH 6.5 for 24 hours. Colocalisation was assessed qualitatively by the occurrence of yellow pixels resulting from the spatial overlap of red (Chitosan pseudocolor) and green pixels (ODN pseudocolor) from 2 separate channels. Prior to imaging, cell membranes were stained for 5 minutes at 37°C with 5 μ g/ml of Cell Mask™ Deep red (Invitrogen, Carlsbad, CA) in complete media followed by two washes with cold PBS solution and resuspension in complete media. Imaging of live cells was done using a Zeiss LSM 510 META confocal Axioplan 200 microscope (Carl Zeiss AG, Feldbach, Switzerland).

RNA extraction and assessment methods (yield, purity, and integrity)

RNA extraction was performed using the RNA XS® extraction kit from Macherey-Nagel (Biolynx, Montréal, QC) according to the manufacturer protocol. For comparison purposes, RNA was also extracted with RNAqueous® from Ambion (Applied Biosystems, Streetsville, ON) according

and RNA integrity measured using the Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Mississauga, ON) following the manufacturer's protocol. RNA integrity was evaluated by the ratio of 28S/18S ribosomal RNA (rRNA)²³ and the RNA integrity number (RIN). Agilent 2100 BioAnalyzer uses automated microfluidics, capillary electrophoresis, an

measure of RNA quality that is based on a larger portion of the electrophoretic trace. The BioAnalyzer 2100 automatically computes this parameter, and an ideal nondegraded RNA sample has a RIN of 10.

TaqMan® Gene Expression Assays: endogenous controls

Gene expression level for endogenous controls was determined using prevalidated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Streetsville, ON). PCR reactions for 384 well plate formats were performed using 2 μ L of cDNA samples (25–50 ng), 5 μ L of the Fast Universal qPCR MasterMix (Applied Biosystems, Streetsville, ON), 0.5 μ L of the TaqMan Gene Expression Assay (20X), and 2.5 μ L of water to create a total volume of 10 μ L. The following genes were used as endogenous control: TBP (TATA binding protein) and HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase).

Universal Probe Library (UPL) assays

Gene expression levels were determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche (<http://www.universalprobelibrary.com>). This technology utilizes short hydrolysis probes of 8 or 9 bases. The high melting temperature characteristic of longer probes is retained by using locked nucleic acid (LNA) nucleotide chemistry in these shorter probes. Since probes are only 8 or 9 bases long, each probe can hybridize to over 7,000 transcripts; thus, a set of only 100 probes can enable the quantification of virtually any transcript in a transcriptome. RNA samples were reverse transcribed into cDNA using the first strand cDNA transcriptor kit following the manufacturer protocol (Roche, Laval, QC). PCR reactions for 384 well plate formats were performed using 2 μ L of cDNA samples (25 ng), 5 μ L of the Fast Universal qPCR MasterMix (Applied Biosystems, Streetsville, ON), 2 μ M of each primer, and 1 μ M of a UPL probe # 71 (Roche, Laval, QC) to create a total volume of 10 μ L.

Detection and analysis

The ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect cDNA amplification level and was programmed with an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of: 5 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values of Ct (cycle threshold) were used for quantification. TBP and HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) were used as endogenous controls.

The relative quantification of target genes was determined using the $\Delta\Delta$ CT method. Briefly, the Ct values of target genes were referenced to an endogenous control gene (Δ CT = Ct_{target} - Ct_{endoc}) and compared with a calibrator: $\Delta\Delta$ CT = Δ Ct_{Sample} - Δ Ct_{Calibrator}. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) using the formula $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Statistical analysis

The measurement data were collected and expressed as means values \pm standard deviation (SD) and were analyzed with Statistica 9.0 software (STATSOFT; Statistica, Tulsa, OK). The statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test. Differences were considered significant at $P < 0.05$ and highly significant at $P < 0.01$.

Results

Cellular uptake

Transfection efficiency of Chitosan 92–10–5/DPP-IV_{ODN}, Chitosan 92–10–10/DPP-IV_{ODN}, and Chitosan 92–10–20/DPP-IV_{ODN} complexes in HepG2 cells was evaluated using

plexes on the cell surface adds a bias to cytometry data when calculating the percentage of positive cells or determining fluorescence intensity levels to assess the amount of internalized oligonucleotides.

Our results show that almost 90% \pm 2 of HepG2 cells internalized the polyplexes and no significant difference between the three N/P ratios was observed (Figure 1a). Following chitosanase treatment, approximately a 10% reduction in the positive cell population was observed indicating that trypsinization and thorough washing alone did not fully dissociate surface bound polyplexes (Figure 1a). Furthermore, confocal imaging shows membrane associated polyplexes following thorough washing which supports our FACS data. Although the percentage of 6FAM- DPP-IV_{ODN} positive cells was similar for the three N/P ratios, the amount of the internalized DPP-IV_{ODN} as determined from the fluorescence intensity levels, varied (Figure 1b). Moreover, cells incubated with formulations that had higher N/P ratios showed lower amounts of internalized DNA. The excessive cellular uptake of polyplexes was further confirmed by confocal imaging, as shown in Figure 2. Large internalized assemblies of complexes were observed two hours post incubation and an optimal dissociation was observed 24 hours post transfection (Figure

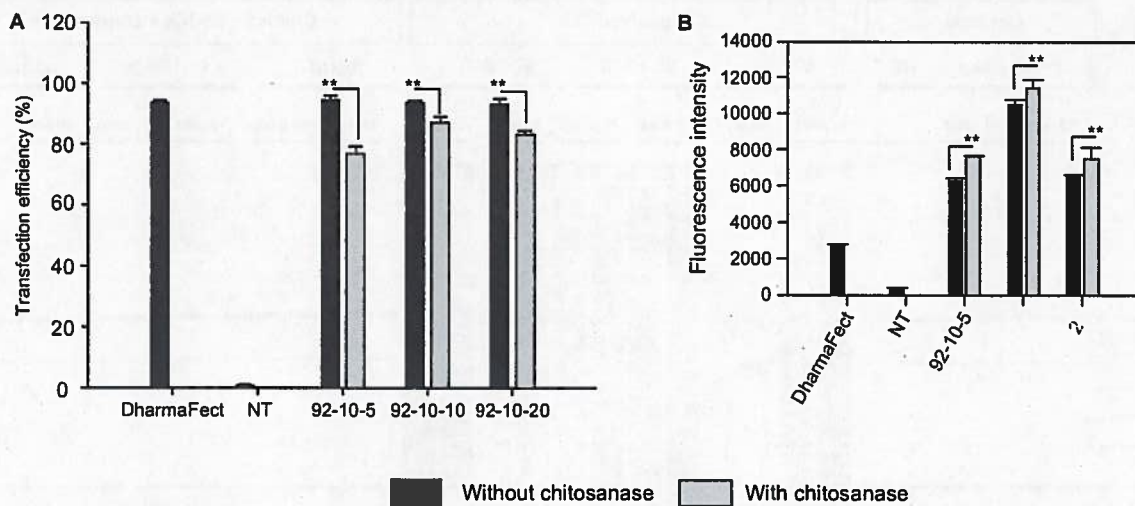


Figure 1 FACS analysis of chitosan/DPP-IV_{ODN} polyplexes uptake in HepG2 cell line. Uptake of 5'-6FAM labeled DPP-IV_{ODN} in chitosanase treated and untreated cells 24 hours post transfection. (A) Transfection efficiency was calculated as the percentage of 5'-6FAM-DPP-IV_{ODN} labelled cells. (B) The relative amount of internalized DPP-IV_{ODN} was determined using flow cytometry and is expressed as the median of fluorescence intensity (FI) of the 6FAM-DPP-IV_{ODN} positive cells. Data points represent the mean values \pm SD, n = 3. *P < 0.05; **P < 0.01.

evaluated in three independent experiments using flow cytometry.

Effect of low molecular weight chitosan on RNA recovery

The effect of low molecular weight chitosan (DDA 92, MW = 10 kDa) at different N/P ratios on RNA extraction was assessed using the Bioanalyzer 2100 system (Figure 3). These results show very poor recovery of total RNA from low number cells transfected with chitosan/siRNA polyplexes compared to both lipofectamine-treated and nontransfected cells (Figure 3). We found that the majority of the samples had a recovery level below the detection threshold (10 ng/ μ l, RNA Integrity Number (RIN) >7). Additionally, our results indicated that lower N/P ratios or lower amounts of added

polyplexes (corresponding to 50 pmol to 10 pmol siRNA per well) did not improve total RNA yield. The extraction

ated in three independent experiments with triplicates in each experiment.

Effect of lysis buffer on chitosanase activity

We assessed both the effect of guanidium thiocyanate, a chaotropic agent, contained in commercial RA1 lysis buffer, and high DDA (92% and 98% respectively) on *S.griseus* chitosanase activity. First, chitosan polyplexes were digested with *S.griseus* chitosanase and were compared to nondigested samples (Figure 4). Our results show that chitosan digestion was not affected at high DDA (98%). Moreover, DPP-IV_{ODN} liberated from chitosanase-treated polyplexes showed a quasi-total recovery indicating that smaller monomers did not bind nucleic acid. Second, chitosanase activity was assessed in lysis buffer. Our results show that *S.griseus* chitosanase activity is not altered or reduced in lysis buffer (Figure 5). These results suggest that the chitosanase digestion can be performed directly in the lysis buffer decreasing the processing time of the sample (Figure 5).

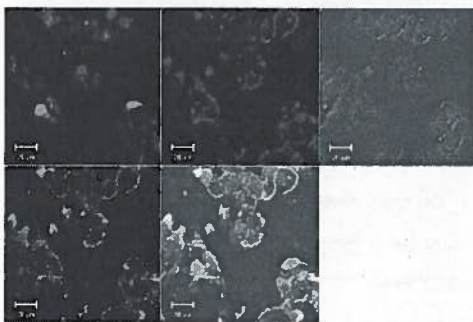


Figure 2 Confocal imaging of polyplexes uptake. Confocal microscopy images of HepG2 live cells 24 hours post transfection with chitosan/DPP-IV_{ODN} polyplexes (N/P = 5). Chitosan 92-10 (DDA, MW) was labeled with Rhodamine (red), the DPP-IV_{ODN} with 6FAM at the 5' extremity (green), and the cell membranes were stained prior to imaging with cell mask (blue). Membrane staining was performed to differentiate between internalized and membrane bound polyplexes.

Gene silencing

The ability of chitosan 92-10-5 formulation to deliver DPP-IV siRNA in three different cell lines was assessed using qPCR. Our results revealed an 80% and 78% silencing of the DPP-IV gene in HepG2 and Caco-2 cell lines respectively when compared to nontransfected cells. These results are

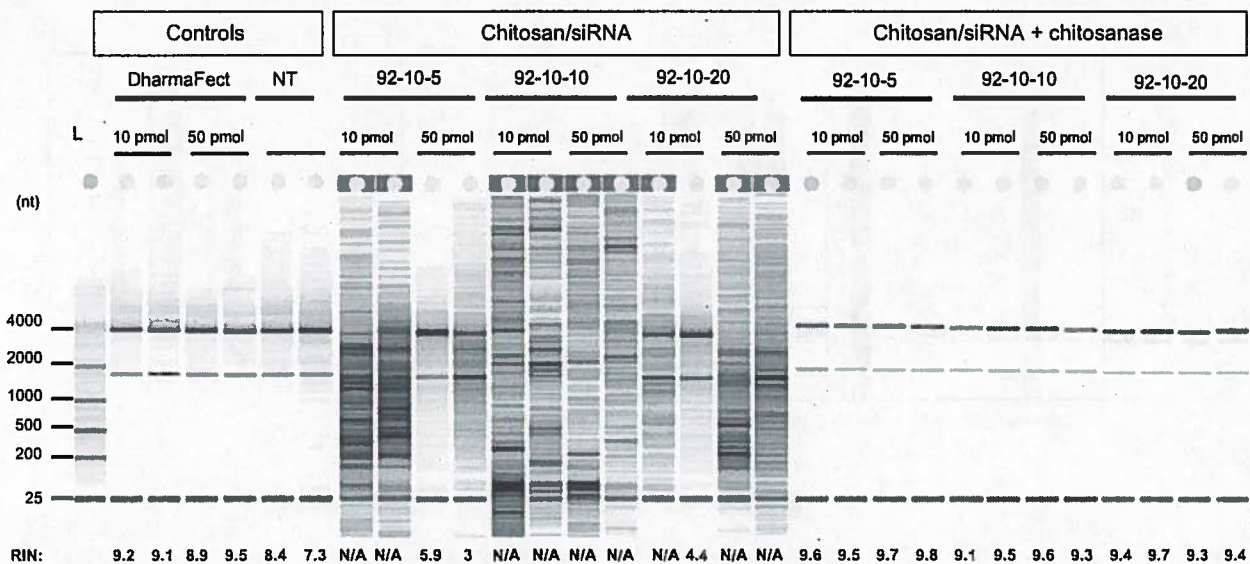


Figure 3 Effect of *Streptomyces griseus* chitosanase on yield and integrity of total RNA extraction. Total RNA extraction was performed on HepG2 cells transfected with 10 pmol and 50 pmol of nanoparticles siRNA/chitosan at three different N/P ratios indicated by the formulation code 92-10-5, 92-10-10, or 92-10-20 (DDA, MW, N/P). Chitosanase was resuspended in DMEM pH 6.5 and directly applied to cells at a final concentration of 6.12 mU/ μ g of chitosan. Total RNA was extracted from chitosan transfected cell treated with or without chitosanase. The different extractions were compared to control Dharmafect™ 1 transfected cells and nontransfected (NT) cells. (nt) nucleotide, L standard ladder, the green band is a lower marker, which allows sample alignment and permits comparison for RIN calculation. RIN = RNA integrity number, is an algorithm-based numbering system that calculates-RNA integrity with 10 being the most intact and 1 being fully degraded.

similar to the liposome-based positive control, Dharmafect 1™ (Table 1). Moreover, total RNA recovery from low cell number without chitosanase treatment was very low with RIN values below the set threshold accounting for the inability to assess gene inhibition using qPCR (Table 1). HT-29 cell

line was difficult to transfect using this specific chitosan/siRNA formulation due to the absence of cellular uptake as shown by our FACS and confocal microscopy results (data not shown). Although the HT-29 cell line was difficult to transfect, recovery of total RNA was poor, most probably due to extracellular excess of chitosan and to membrane bound polyplexes. Cellular viability in HepG2, Caco-2, and HT-29 cell lines was maintained after addition of the differ-

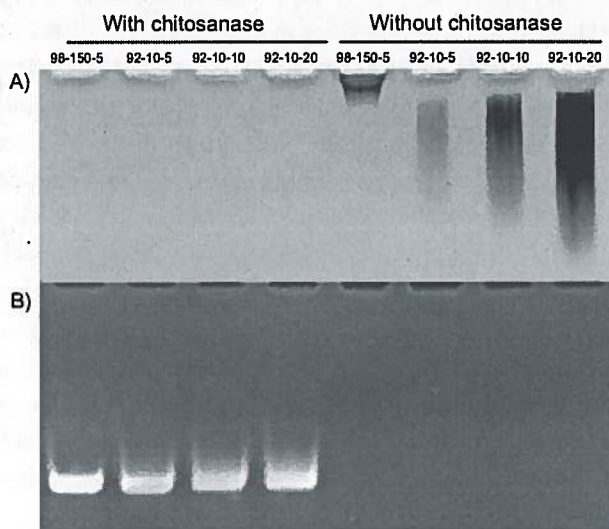


Figure 4 Polyacrylamide gel electrophoresis of chitosan/DPP-IV_{ODN} polyplexes bearing different DDAs and N/P ratios, treated with or without *Streptomyces griseus* chitosanase. a) chitosan migration. b) ODN migration. Lanes 1 to 4 correspond to chitosan/DPP-IV_{ODN} directly incubated with chitosanase for 60 minutes at 37 C. Chitosan digestion allows the ODN release. Lanes 5 to 8 correspond to chitosan/DPP-IV_{ODN} incubated at the similar conditions without chitosanase. Faster chitosan migration was observed when comparing lanes 5 and 6 due to different MW of these formulations. Increased band intensity (lanes 6–8) results from greater amounts of chitosan at higher N/P ratios.

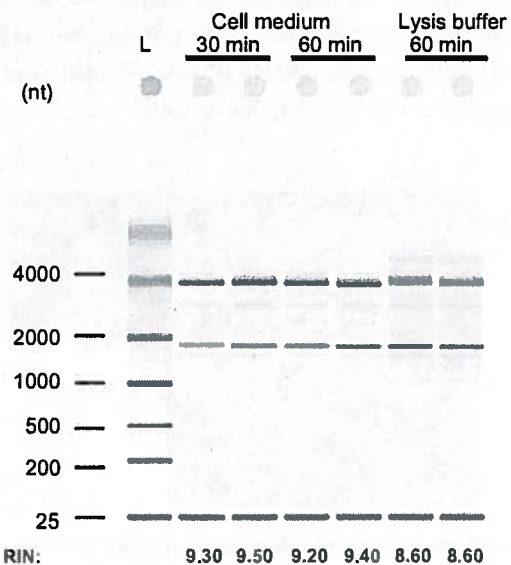


Figure 5 Total RNA extraction from HepG2 transfected cells with 10 pmol siRNA. Following transfection, cells were treated with chitosanase for: 30 min and 60 min in cell medium and for 60 min in lysis buffer.

Table 1 Effect of chitosanase treatment on RNA extraction, Relative Integrity Number (RIN), and real-time PCR (qPCR) analysis in three different DPP-IV expressing cell lines. Inhibition percentages of DPP-IV gene expression in siRNA/polyplexes transfected cells were determined in comparison with nontransfected cells

Cell line	Chitosan/siRNA			Chitosan/siRNA+ chitosanase		
	RNA extraction		qPCR	RNA extraction		qPCR
	RIN	[total RNA] ng/ l	Inhibition %	RIN	[total RNA] ng/μl	Inhibition %
HepG2	3.0	2.6	N/A	9.0	78	82
HT-29	2.3	1.7	N/A	9.3	83	20
Caco-2	4.7	3.9	N/A	8.7	76	78

N/A: not applicable, RIN below the set threshold required for qPCR.

ent chitosan formulations used for transfection, dismissing the likelihood of toxicity effects. Gene silencing was evaluated in two independent experiments in triplicates for each experiment.

Discussion

Current methods and commercial kits for RNA isolation are based on the use of acid guanidium thiocyanate buffers for cell lysis and protein denaturation. Depending on the methods used, either a phase separation followed by RNA precipitation is performed (TRIzol®) or silica-based matrices (RNeasy®; RNA XS®) are used to electrostatically bind and recover RNA through washing and elution steps. These methods present major drawbacks when large polysaccharide fragments are present after sample digestion. These polysaccharide fragments can entrap nucleic acids physically, thus reducing RNA after centrifugation.²⁴ Chitosan is a polymeric cation that has been shown to prevent the efficient purification of nucleic acids from cell entrapped matrices using available procedures and commercial kits.^{10,21} The low efficiency of purification is mainly due to the amine groups, which are protonated in acidic environments²⁵ such as the guanidinium thiocyanate buffer used in both Trizol®- and silica-based kits²⁶ hence promoting nucleic acid entrapment and/or binding. Another explanation for the poor recovery of total RNA when using silica-based column is that polysaccharide contaminants

of spin columns.²⁶ To resolve these issues associated with chitosan protonation, successful attempts have been made to adjust the pH of guanidinium thiocyanate extraction buffers.²⁷ However, the RNA purity ratio could not be measured adequately due to possible polysaccharide contamination. In our study, we showed that chitosan/siRNA transfection of low cell numbers resulted in a poor recovery of total RNA for subsequent transcriptomic analysis. The poor recovery might be due to the high binding affinity of chitosan to nucleic acids as recently quantified. Notably, the majority

of the chitosan in these preparations is soluble and not complexed to the polynucleotide according to our recent data using Asymmetric Field Flow Fractionation.²⁸ The main effect of chitosanase treatment may then be to eliminate the free fraction that could clearly bind to polyanionic mRNA and inhibit its extraction from chitosan-treated cells. This binding effect would be further accentuated in the cell lysis buffer containing guanidium thiocyanate which has an acidic pH of ~5 and increases ionization of chitosan therefore augments its binding affinity to polynucleotides.

According to the hydrolysis specificity of the β-glycosidic linkages in partially N-acetylated chitosan molecules, chitosanase can be classified into three classes. *Streptomyces griseus* chitosanase is a type III enzyme that catalyzes both the endohydrolysis of β-(1-4)-linkage between N-acetylglucosamine and D-glucosamine (GlcNAc-GlcN) and between D-glucosamine (GlcN-GlcN) residues in chitosane.²⁹ Sato et al found that the relative activity of the enzyme was 80% when degrading chitosan with 90% DDA compared to a 100% activity in the presence of chitosan with 70% DDA.^{29,30} However, despite a lower activity when degrading high DDAs chitosan (>90%), *Streptomyces griseus* chitosanase is a powerful tool for nucleic acid recovery from chitosan nanoparticles bearing different DDAs, as shown in this study. Our results show a dramatic enhancement in RNA yield and integrity when treating cells with *S. griseus* chitosanase for 60 minutes prior to extraction. In addition, RNA yields from transfected cells are similar to those of nontransfected cells, suggesting a total recovery of RNA from chitosan transfected cells. Furthermore, our results show that a 30 minute treatment can be sufficient to improve total RNA yield, thus reducing sample processing time.

Although guanidium thiocyanate is a potent chaotropic agent that alters dimensional structures of proteins including endonucleases,³¹ its concentration in RAI lysis buffer does not seem to alter the function of this specific chitosanase. This

observation is supported by the fact that some chitosanases are resistant to the high concentration of denaturants such as urea or guanidium thiocyanate.³²⁻³⁴ The chitosanase treatment of DPP-IV_{ODN}/chitosan polyplexes permitted the recovery of ~90% of the complexes ODN showing that the digestion of the low MW chitosan (92–10–5) into smaller monomers did not interact with ODN release nor with silica-based matrices for RNA purification.

This new method has permitted us to obtain enough RNA with high integrity numbers to perform subsequent real-time RT-PCR and analysis. Our results revealed an 80% silencing of the DPP-IV gene with chitosan/siRNA when compared to nontransfected cells. Furthermore, silencing using this

the positive control DharmafectTM1 liposome, suggesting the potential use of these chitosan formulations to deliver siRNA both *in vitro* and *in vivo*. The HT-29 cell line was found to be more difficult to transfect with the specific chitosan/siRNA formulation, in particular at the cell uptake level as determined by FACS and confocal microscopy (data not shown). This observation is supported by the fact that chitosan has shown cell type dependency when transfecting DNA plasmid.³⁵

The silencing effect was also observed at the protein level where we observed a decrease in DPP-IV levels of approximately 55%, 48 hours post transfection (data not shown) demonstrating the ability of the specific chitosan formulation to efficiently deliver siRNA against DPP-IV mRNA. The FACS analysis of DPP-IV_{ODN} positive cells showed approximately 80% transfection efficiency following chitosanase treatment. The latter permitted a reduction of ~10% in transfection efficiency when compared to the chitosanase untreated cells. The 10% signal bias is possibly due to the membrane-bound chitosan as supported by confocal imaging. Therefore, this reduction may account for biased data, hence increasing accuracy of transfection efficiency quantification.

Conclusion

In this study, we have demonstrated the following: i) mRNA is difficult to extract from chitosan/siRNA-transfected cells for subsequent quantification of gene expression; ii) a relatively simple and inexpensive technique based on enzymatic digestion of chitosan permits the extraction and recovery of total RNA for subsequent quantification of messenger levels by qPCR; and iii) the method described is suitable for the removal of membrane bound chitosan for FACS analysis of transfection efficiency when using labeled siRNA or ODNs,

as a result reducing false positive data. Thus, this new method permits the quantification of gene silencing in chitosan delivery systems and eliminates any bias associated with chitosan binding to polynucleotides.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the National Science and Engineering Research Council (NSERC). The authors thank the members of Professor Buschmann Research Group for their assistance.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this research.

References

1. Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*. 1998;15:1326–1331.
2. Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res*. 2004;21:344–353.
3. Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*. 2001;22:1653–1658.
4. Prego C, Torres D, Alonso MJ. Chitosan nanocapsules as carriers for oral peptide delivery: effect of chitosan molecular weight and type of salt on the in vitro behaviour and in vivo effectiveness. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6:2921–2928.
5. Prego C, Fabre M, Torres D, Alonso MJ. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharm Res*. 2006;23:549–556.
6. Prego C, Torres D, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quinoa E, Alonso MJ. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery. Effect of chitosan pegylation degree. *J Control Release*. 2006;111:299–308.
7. Jean M, Smaoui F, Lavertu M, et al. Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Ther*. 2009;16:1097–1110.
8. Centelles MN, Isasi JR, Qian C, Campanero MA, Irache JM. Influence of the chitosan nature on the transfection efficacy of DNA-loaded nanoparticles after hydrodynamic administration in mice. *J Microencapsul*. Feb 15 2010; [Epub ahead of print].
9. Zheng F, Shi XW, Yang GF, et al. Chitosan nanoparticle as gene therapy vector via gastrointestinal mucosa administration: results of an in vitro and in vivo study. *Life Sci*. 2007;80:388–396.
10. Zheng Y, Yang W, Wang C, et al. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;67:621–631.
11. Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N, Buschmann MD. High efficiency of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*. 2006;27:4815–4824.
12. Howard KA, Rahbek UL, Liu X, et al. RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther*. 2006;14:476–484.
13. Futami K, Kumagai E, Makino H, et al. Anticancer activity of RecQL1 helicase siRNA in mouse xenograft models. *Cancer Sci*. 2008;99:1227–1236.

14. Gao S, Dagnaes-Hansen F, Nielsen EJ, et al. The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol Ther.* 2009;17:1225–1233.
15. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29:23–39.
16. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002;30:503–512.
17. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 2006;28:1601–1613.
18. qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006;27:126–139.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
20. Arocho A, Chen B, Ladanyi M, Pan Q. Validation of the 2- $\Delta\Delta C_t$ calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol.* 2006;15: 56–61.
21. Tchemtchoua VT, Atanasova G, Aqil A, et al. Development of a procedure to simultaneously isolate RNA, DNA, and proteins for [corrected] characterizing cells invading or cultured on chitosan scaffolds. *Anal Biochem.* 2009;393:145–147.
22. Gambino G, Perrone I, Gribaudo I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal.* 2008;19:520–525.
23. Skrypina NA, Timofeeva AV, Khaspekov GL, Savochkina LP, Beabekashvili R. Total RNA suitable for molecular biology analysis. *J Biotechnol.* 2003;105:1–9.
24. MacRae E. Extraction of plant RNA. *Methods Mol Biol.* 2007;353: 15–24.
25. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. *J Control Release.* 2006;114:1–14.
26. Qiagen, ed. *RNeasy mini handbook.* 4th ed; 2004.
27. Hoemann CD, Sun J, Chrzanowski V, Buschmann MD. A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. *Anal Biochem.* 2002;300:1–10.
28. Ma PL, Lavertu M, Winnik FM, Buschmann MD. New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry. *Biomacromolecules.* 2009;10:1490–1499.
29. Tanabe T, Morinaga K, Fukamizo T, Mitsutomi M. Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67:354–364.
30. Jung HS, Son JW, Ji HS, Kim K. Effective Production of Chitinase and Chitosanase by *Streptomyces griseus* HUT 6037 Using Colloidal Chitin and Various Degrees of Deacetylation of Chitosan. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 1999;4:26–31.
31. Mason PE, Neilson GW, Dempsey CE, Barnes AC, Cruickshank JM. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: implications for protein stability in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:4557–4561.
32. Cockle SA, Epan RM, Moscarello MA. Resistance of lipophilin, a hydrophobic myelin protein, to denaturation by urea and guanidinium salts. *J Biol Chem.* 1978;253:8019–8026.
33. Ekowati C, Hariyadi P, Witarto AB, Hwang JK, Suhartono MT. Biochemical characteristics of chitosanase from the Indonesian *Bacillus licheniformis* MB-2. *Mol Biotechnol.* 2006;33:93–102.
34. Yoon HG, Kim HY, Lim YH, et al. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:3727–3734.
35. Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection. *J Control Release.* 2001;70:399–421.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Jean M, Smaoui F, Lavertu M, Méthot S, Bouhdoud L, Buschmann MD, Merzouki A. Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Therapy* (2009) 16, 1097–1110
doi:10.1038/gt.2009.60