

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
**INRS-Institut Armand- Frappier**

**EXPRESSION *IN VIVO* DES FACTEURS DE CROISSANCE FGF-2 ET PDGFBB EN  
UTILISANT LE CHITOSANE COMME SYSTEME DE LIVRAISON**

**Par  
Faïza Smaoui**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
en microbiologie appliquée

**Jury d'évaluation**

Président du Jury	: Dr Maximilien Arella
Examineur externe	: Pr Grégory De Crescenzo
Directeur de recherche	: Dr Abderrazzak Merzouki
Codirecteurs de recherche	: Dr Claude Guertin et Pr Michael D. Buschmann

Janvier 2009

© droits réservés de Faïza Smaoui, 2009

« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite. Un plein effort est une pleine victoire »

- Gandhi -

*Extrait des Lettres à l'Âshram*

À ma chère maman, merci de m'avoir toujours fait confiance. Chaque fois que j'ai fourni des efforts pour en arriver à ce résultat, je l'ai fait d'abord pour toi et je te promets d'en faire toujours.

À mon cher papa, le bien que tu m'as transmis, voilà ce que j'en ai fait ! Tu m'as donné le libre choix de venir étudier au Québec. Je te dirais MERCI toute ma vie.

À ma nièce Inès, mes sœurs, mon frère adorés  
et à mon petit trésor Waël.

## REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser ici tous mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Tout d'abord le Dr Abderrazzac Merzouki, mon superviseur et directeur de ce mémoire, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie aussi pour m'avoir transmis le flambeau d'un sujet si passionnant. Mes remerciements s'adressent également à mes codirecteurs le Pr. Michael Buschmann et le Dr Claude Guertin, pour leurs conseils si précieux. J'exprime ma gratitude à notre technicien M. Marc Henrichon qui a toujours accepté de répondre à mes questions avec gentillesse. Qu'il soit aussi remercié pour m'avoir fait profiter de son immense connaissance, et pour l'aide et le temps qu'il m'a consacré.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches, mes amis de France, d'ici et d'ailleurs. À Chahrazed pour tes conseils, pour toutes nos discussions à propos de la science et de nos projets d'avenir. À ma chère amie Latifa pour avoir su rester accessible et prête à partager son savoir. Ce sont des qualités qu'un étudiant apprécie particulièrement ; merci pour ton aide précieuse, et ton investissement au cours de ce travail. Je t'en suis sincèrement reconnaissante. À Claude et Francine pour m'avoir constamment soutenue et encouragée au cours de la rédaction de ce mémoire.

À mes sœurs Nawale, Chadia et Saliha, au mérite qu'elles ont eu à toujours s'intéresser à mes travaux. Merci à toi Chadia, qui a si souvent été un exemple pour moi dans les moments plus difficiles. À mon petit frère Amine. À mes très chers parents pour leur amour, leur confiance et pour le réconfort qu'ils m'ont toujours apporté.

Enfin, je remercie la Fondation Armand Frappier ainsi que les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) qui, par leur contribution financière, ont permis la réalisation de ce projet.

Rien n'aurait été aussi simple sans votre soutien !

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
RESUME.....	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS .....	5
INTRODUCTION.....	7
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
1. Les facteurs de croissances.....	10
1.1. Introduction .....	10
1.2. Le facteur de croissance basique des fibroblastes ou FGF-2 .....	11
1.3. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF.....	13
2. Les systèmes de livraison de gènes.....	20
2.1. Généralités .....	20
2.1.1. Vecteurs viraux.....	21
2.1.2. Vecteurs non-viraux.....	25
2.1.2.1. ADN nu.....	25
2.1.2.2. Liposomes.....	26
2.1.2.3. Le chitosane .....	30
2.1.2.3.1. Historique.....	30
2.1.2.3.2. Propriétés physico-chimiques .....	33
3. Immunisation.....	36
3.1. Immunisation classique et ses limites .....	36
3.2. Immunisation génétique .....	37
3.2.1. Historique.....	38
3.2.2. Principe .....	39
3.2.2.1. Méthodes et voies d'immunisation.....	39
3.2.2.2. Maturation et présentation de l'antigène.....	41
4. Perspectives.....	42
4.1. Rôles des facteurs de croissances dans la réparation tissulaire .....	42
4.2. Cas de la réparation des tissus articulaires.....	44
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	49
1. Clonage des gènes fgf-2 et pdgf-bb .....	49
1.1. Extraction des ARN .....	49
1.2. Réaction de transcription inverse (RT-PCR) .....	50
1.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	50
1.4. Amplification du gène codant pour la protéine recombinante 4sFGF-2.....	51
1.5. Amplification du gène codant pour la protéine recombinante PDGF-BB.....	54
1.6. Vecteur de clonage pCR <sup>®</sup> 2.1 : .....	54

1.7.	Transformation de bactéries compétentes INV $\alpha$ F' par choc thermique .....	58
1.8.	Criblage des bactéries transformées par les plasmides recombinants pCR2.1-4sfgf-2 et pCR2.1-pdgf-bb.....	58
2.	Construction des plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb	59
2.1.	Le vecteur d'expression eucaryote pVax-1 <sup>©</sup> : .....	59
2.2.	Digestion enzymatique .....	60
2.3.	Sous-clonage des gènes 4sfgf-2 et pdgf-bb dans le vecteur pVax-1 <sup>©</sup> :.....	60
3.	Production des vecteurs recombinants nécessaires à l'immunisation génétique.....	63
3.1.	Purification des plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb..	63
3.1.1.	Maxi-préparation des ADN plasmidiques pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb.....	64
3.1.2.	Caractérisation des plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb.....	65
3.1.2.1.	Digestion par les enzymes de restriction <i>HindIII</i> et <i>XhoI</i> .....	65
3.1.2.2.	Séquençage des vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb.....	66
4.	Formulations de chitosane utilisées comme système de livraison des vecteurs recombinants.....	67
4.1.	Caractéristiques du chitosane.....	67
4.2.	Capacité du chitosane à protéger l'ADN plasmidique contre les endonucléases .....	69
4.3.	Capacité du chitosane à livrer l'ADN dans les lignées cellulaires HEK293 et HeLa CCL-2.....	70
4.3.1.	Lignées cellulaires et conditions de culture.....	70
4.3.2.	Transfection <i>in vitro</i> de lignées cellulaires par le plasmide pVax1-LacZ complexé au chitosane ou à la lipofectamine.....	71
5.	Immunisation génétique de souris Balb/c.....	74
5.1.	Protocole des immunisations .....	74
5.1.1.	Groupes de souris et matériel d'immunisation .....	74
5.1.2.	Calendrier et voie d'immunisation : injections et prélèvements.....	75
5.2.	Évaluation de la réponse immunitaire.....	76
5.2.1.	Détermination quantitative des concentrations en protéines 4sFGF-2 et PDGF-BB.....	76
5.2.2.	Détermination des titres d'anticorps anti-4sFGF-2 et anti-PDGF-BB..	78
	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>80</b>
1.	Construction du vecteur d'expression recombinant pVax1-4sfgf-2 .....	80
1.1.	Amplification du gène fgf-2 et stabilisation dans le vecteur pCR@2.1 .....	80
1.2.	Sous-clonage du gène 4sfgf-2 dans le vecteur d'expression pVax-1 <sup>©</sup> .....	85
2.	Construction du vecteur d'expression pVax1-pdgf-bb .....	85
2.1.	Amplification du gène pdgf-bb et clonage dans le vecteur pCR@2.1 .....	85
2.2.	Sous-clonage du gène pdgf-bb dans le vecteur d'expression pVax-1 <sup>©</sup> .....	86
3.	Évaluation du potentiel et de l'efficacité du chitosane comme système de livraison de gènes .....	91

3.1.	Efficacité du chitosane dans la protection de l'ADN plasmidique contre les nucléases .....	91
3.2.	Transfection in vitro des lignées cellulaires HEK293 et HeLa CCL-2 avec les nanoparticules chitosane/ADN plasmidique .....	98
4.	Expression, in vivo, des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB, et induction de la réponse immunitaire suite à l'immunisation des souris par voie sous-cutanée.....	103
4.1.	Expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB in vivo.....	103
4.2.	Induction de la réponse humorale suite à l'immunisation de souris par voie sous-cutanée .....	104
5.	Expression, in vivo, des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB, et induction de la réponse immunitaire suite à l'immunisation des souris par voie intramusculaire .....	114
5.1.	Expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB in vivo.....	114
5.2.	Réponse humorale induite par l'injection intramusculaire des vecteurs recombinants pVax-1-4sfgf-2 et pVax-1-pdgf-bb .....	115
DISCUSSION.....		125
CONCLUSION .....		133
BIBLIOGRAPHIE .....		135

## RESUME

L'immunisation génétique utilisant l'ADN nu est une technique prometteuse dans la lutte contre des maladies infectieuses. Toutefois, cette méthode d'immunisation n'induit pas des niveaux d'expression suffisants pour produire un effet thérapeutique désiré dans les délais voulus. L'ADN nu, en plus d'avoir une demi-vie plasmatique très courte, subit une dégradation très rapide par les endonucléases sériques. Afin de pallier les limites que présente ce type d'immunisation, l'administration d'ADN nu se fait dans un contexte de système de livraison de gènes (liposomes, polymères).

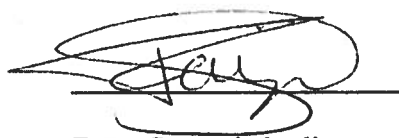
Le chitosane est un polymère cationique non-toxique et biocompatible utilisé comme système de livraison de l'ADN. Ce biopolymère permet d'envisager une nouvelle démarche thérapeutique prometteuse pour la réparation tissulaire notamment pour des lésions localisées du cartilage. En effet, des études ont démontré le rôle du chitosane dans la réparation du cartilage endommagé en agissant comme charpente tridimensionnelle *in situ*.

Basé sur ces informations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le chitosane combiné aux vecteurs d'expressions recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb codants pour « des facteurs de croissances thérapeutiques » favoriserait le processus de réparation des tissus. En effet, les facteurs de croissances issus des fibroblastes (FGF-2) et dérivés des plaquettes (PDGF-BB) ont largement été décrit pour leurs multiples rôles dans la vascularisation, le chimiotactisme et la régénération tissulaire. Dans notre laboratoire, un projet d'envergure a été entrepris afin de préparer des vecteurs d'expression des facteurs de croissance FGF-2 et PDGF-BB dont l'expression a été caractérisée. L'intégrité de ces protéines recombinantes a été vérifiée dans un modèle *in vitro* et *in vivo*. Nous avons utilisé le chitosane comme moyen de livraison des gènes fgf-2 et pdgf-bb grâce à ses propriétés efficaces et sécuritaires de livraison.

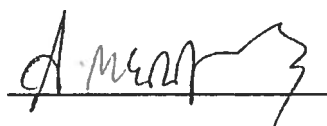
La greffe du peptide signal du facteur de croissance FGF-4 à la partie N terminale du facteur FGF-2 nous a permis d'obtenir un plasmide recombinant pVax1-4sfgf-2 plus performant avec un haut niveau d'expression de la protéine recombinante 4sFGF-2. Nos résultats de séquençage ont confirmé l'intégrité structurelle des vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb.

L'immunisation de souris BALB/C nous a permis de montrer l'expression *in vivo* des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB livrées dans un contexte de *gene delivery system*. Trois formulations différentes de chitosane, 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 [DDA-MW- N:P ratio], ont été utilisées pour former des complexes chitosane/ADN plasmidique avec chacun des deux plasmides recombinants, pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb. Les deux premières formulations, 92-10-5 et 80-10-10, se sont avérées plus efficaces dans la livraison des plasmides recombinants comparativement à la formulation 80-80-5. Un niveau d'expression efficace des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB a été démontré, soit des concentrations de 2500 pg/ml et de 7000 pg/ml après livraison par la formulation 92-10-5. L'évaluation qualitative des réponses humorales induites par les injections sous-cutanées, ont également montré que le chitosane 80-10-10 était responsable d'un taux élevé d'anticorps anti-4sFGF-2 (valeur de densité optique de 1.2).

L'ensemble de nos résultats est fondamental et indique que nous serons capables à long terme d'évaluer le potentiel des complexes chitosane-pVax1-4sfgf-2 et chitosane-pVax1-pdgf-bb à initier la vascularisation tissulaire et à régénérer les défauts articulaires de patients souffrant, entre autres, de pathologies articulaires.



Faïza Smaoui, étudiante



Abderrazzak Merzouki,  
directeur de recherche

---

Claude Guertin,  
co-directeur de recherche

---

Michael D. Buschmann  
co-directeur de recherche



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Figures :

<i>Figure 1</i> : Différentes isoformes FGF-2 résultant de la traduction d'ARN.....	14
<i>Figure 2</i> : Biosynthèse de la protéine dimérique PDGF-bb. ....	18
<i>Figure 3</i> : Livraison génétique par le chitosane. ....	31
<i>Figure 4</i> : Comparaison des structures de la chitine (a) et du chitosane (b) .....	34
<i>Figure 5</i> . Rôle des cytokines et des facteurs de croissance dans le processus de reconstruction tissulaire. ....	45
<i>Figure 6</i> : Représentation schématique des plasmides recombinants pCR2.1-4sfgf2 et pCR2.1-pdgf-bb à partir du vecteur de clonage pCR <sup>®</sup> 2.1 (Invitrogen).....	56
<i>Figure 7</i> : Représentation schématique des plasmides recombinants pVax1-4sfgf2 et pVax1-pdgf-bb à partir du plasmide pVax-1 <sup>®</sup> (Invitrogen) .....	61
<i>Figure 8</i> : Séquence nucléotidique du gène 4sFGF-2 et sa séquence déduite en acides aminés.....	81
<i>Figure 9</i> : Profil électrophorétique du gène 4sfgf-2 amplifié par PCR à partir d'ADNc .....	83
<i>Figure 10</i> : Profil électrophorétique du plasmide recombinant pVax-1 <sup>®</sup> /4sfgf-2 digéré par les endonucléases <i>HindIII</i> et <i>XhoI</i> .....	87
<i>Figure 11</i> : Séquence nucléotidique du gène pdgf-bb et sa séquence déduite en acides aminés.....	89
<i>Figure 12</i> : Profil électrophorétique de l'amplicon pdgf-bb amplifié par RT-PCR.....	92
<i>Figure 13</i> : Profil électrophorétique du plasmide recombinant pVax-1-pdgf-bb digéré par les endonucléases <i>HindIII</i> et <i>XhoI</i> .....	94
<i>Figure 14</i> : Mécanisme de préparation de nanoparticules Chitosane/ADN .....	96
<i>Figure 15</i> : Analyse électrophorétique des nanoparticules chitosane/ADN plasmidique suite à une digestion par la <i>DNaseI</i> . ....	99
<i>Figure 16</i> : Transfection, <i>in vitro</i> , des cellules HEK293 et HeLa CCL-2 avec le plasmide recombinant pVax1-LacZ seul ou complexé à la lipofectamine et au chitosane.....	101

<b>Figure 17: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante 4sFGF-2 suite à l'immunisation sous-cutanée avec le vecteurs recombinant pVax1-4sfgf2</b>	105
<b>Figure 18: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante PDGF-BB suite à l'immunisation sous-cutanée avec le vecteurs recombinant pVax1-pdgf-bb</b>	107
<b>Figure 19: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection sous-cutanée du vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2</b>	110
<b>Figure 20: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection sous-cutanée du vecteur recombinant pVax1-pdgf-bb</b>	112
<b>Figure 21: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante 4sFGF-2 suite à l'immunisation intramusculaire avec le vecteurs recombinant pVax1-4sfgf-2</b>	117
<b>Figure 22: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante PDGF-BB suite à l'immunisation intramusculaire avec le vecteurs recombinant pVax1-pdgf-bb</b>	119
<b>Figure 23: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection intramusculaire du vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2</b>	121
<b>Figure 24: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection intramusculaire du vecteur recombinant pVax1-pdgf-bb</b>	123
<b>Figure 25: Événements produits <i>in vivo</i> suite à l'immunisation des souris avec les complexes chitosane/ ADN recombinant</b>	131

**Tableaux :**

<b>Tableau 1 : Comparaison des principaux vecteurs de transfert de gènes</b>	22
<b>Tableau 2: amorces utilisées lors des expériences de transcription inverse</b>	53
<b>Tableau 3: caractéristiques physicochimiques des formulations de chitosane utilisées pour l'étude</b>	68
<b>Tableau 4: immunisation génétique des souris Balb/c</b>	77

## LISTE DES ABREVIATIONS

a.a : acide aminé  
AAV : adenovirus associated virus  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
BGH: bovine growth hormone  
BSA : albumine sérique bovine  
CHI: chitosan  
CISAU : comité institutionnel des soins aux animaux et de leur utilisation  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
COI : Cut Off Index  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CTL : cytotoxique T lymphocyte  
DDA : degré de déacétylation  
DEPC : diéthylpyrocarbonate  
DO : densité optique  
DOPE : dioléoylphosphatidyléthanolamine  
DOTMA : dioléoxyloxy-propyl-triméthylammonium  
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique  
EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid  
ELISA : « enzyme linked immunosorbent assay »  
FDA: Food and Drug Administration  
Ig : immunoglobuline  
IL-2 : interleukine-2  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
LB: Luria Bertani  
LTR sequence : long terminal repeat sequence  
mM : millimolaire  
MMP : matrix metalloproteinase

nm : nanomètre

ORF : cadre de lecture ouvert (*open reading frame*)

p/v : poids par volume

pb : paires de bases

Pb: paires de base

PBS : solution saline phoshatée

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PEG : polyéthylènglycol

PEI : polyéthylènimine

RT-PCR : reverse transcriptase PCR

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TAE : Tris acétate EDTA

TE : Tris-HCL EDTA

UV : ultraviolet

v/v : volume par volume

VIH : virus d'immunodéficiency humaine

µg : microgramme

µL : microlitre

## INTRODUCTION

Le chitosane est un polymère naturel biodégradable extrait de la carapace de crustacés et reconnu comme étant un bon agent de livraison de gènes non-toxique pour des tests de transfection *in vitro* (MacLaughlin, Mumper et al. 1998; Mao, Roy et al. 2001). Le rôle du chitosane dans l'attachement, la différenciation et la morphogénèse des cellules a clairement été décrit, ce qui a permis de proposer ce biomatériau comme agent potentiel pour la régénération et la réparation tissulaire (Denuziere, Ferrier et al. 1998). Le principe d'utilisation de ce polymère cationique pour la livraison d'ADN repose sur la forte interaction entre le polycation et l'ADN portant des charges opposées pour former des nanoparticules. Ainsi, l'ADN est encapsulé et protégé de l'activité des nucléases capables de le dégrader en quelques secondes (Dash, Read et al. 1999). Parmi les polymères qui ont été exploités pour la livraison de gènes, le chitosane semble être le matériau le plus efficace grâce à ses propriétés non toxiques et sécuritaires.

Notre projet consiste essentiellement en la préparation de vecteurs recombinants capables de mener à l'expression de deux facteurs de croissance : FGF-2 et PDGF-BB. Les facteurs de croissance jouent un rôle crucial dans la régénération tissulaire à différents stades de prolifération et de différenciation cellulaire (Meddahi, Bree et al. 2002) .

Le facteur de croissance dérivé des fibroblastes FGF-2 est un membre de la famille des FGF qui comprend 19 protéines mitogènes incluant deux prototypes, le facteur FGF acide (FGF-1) et le facteur FGF basique (FGF-2). Ces facteurs de croissance FGF ne contiennent pas de séquence signal N-terminale classique pour être sécrété à travers la voie conventionnelle du réticulum endoplasmique (RE)-appareil de golgi (Mignatti, Morimoto et al. 1992). Dans ce projet de maîtrise, nous nous sommes basés sur les travaux de Y.D Sohn et de ses collaborateurs démontrant que la séquence du peptide signal du facteur de croissance FGF-4 était responsable de l'augmentation de son niveau de sécrétion (Sohn, Lim et al. 2001). Une autre étude a montré que l'expression du facteur FGF-1 fusionné avec le peptide signal du facteur FGF-4 augmente l'efficacité de sécrétion dans des cellules NIH3T3 transfectées (Robinson, Overbeek et al. 1995). Ainsi, nous avons remplacé la

partie N terminale du facteur FGF-2 par la séquence du peptide signal du facteur de croissance FGF-4 grâce à la méthode de recombinaison des fragments de gène afin de permettre l'expression d'une protéine recombinante que nous avons appelé 4sFGF-2. Cette modification génétique devait permettre un meilleur niveau de sécrétion de la protéine recombinante 4sFGF-2.

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines ou PDGF peut être composé de deux types de polypeptides, A (16 kDa) et B (14 kDa), dont les séquences présentent 50% d'homologie. Ces polypeptides reliés par des ponts disulfures peuvent former trois molécules dimériques possibles, l'homodimère PDGF-AA, l'hétérodimère PDGF-AB et l'homodimère PDGF-BB. Le PDGF agit sur plusieurs types cellulaires, particulièrement sur les cellules mésenchymateuses, en tant que facteur mitogène et chimiotactique. Le facteur PDGF est présent à toutes les étapes de la cascade de réparation des blessures. Jusqu'à présent, le PDGF-BB, le plus puissant des trois isoformes, est le seul facteur de croissance efficace dans les processus de réparation de blessures chroniques chez l'Homme. Des études récentes ont suggéré que la synergie entre les facteurs PDGF-BB et FGF-2 conduisait à une meilleure vascularisation (Heldin and Westermark 1999; Bennett, Griffiths et al. 2003; Cao, Brakenhielm et al. 2003).

Les facteurs de croissance FGF et PDGF ont été décrit comme étant d'excellents candidats participant à l'accélération de la réparation des lésions cartilagineuses et à la reconstitution des défauts osseux lors d'études cliniques (Lukashev and Werb 1998; Nevins, Giannobile et al. 2005). Ainsi, une des approches possibles serait de livrer ces facteurs de croissances aux sites tissulaires endommagés. Des chercheurs japonais ont eu l'idée d'intégrer le plasma autologue riche en plaquettes à un hydrogel biodégradable semblable au chitosane que nous avons utilisé pour nos expériences. L'hydrogel ainsi imprégné est introduit dans la partie lésée du ménisque. Avec cet hydrogel qui ne se décompose que très lentement une fois en place, les plaquettes libèrent petit à petit, en deux semaines environ, les facteurs de croissance qu'elles contiennent. En ce qui concerne l'expérimentation chez l'animal, ces chercheurs ont utilisé des lapins chez qui avait été créée une lésion méniscale expérimentale. Ils ont introduit un endoscope dans l'articulation

du genou de l'animal et pu ainsi appliquer l'hydrogel imprégné de plasma riche en plaquettes sur la lésion méniscale expérimentale. Au bout d'un mois, les chercheurs ont constaté que le fibrocartilage s'était régénéré et la lésion méniscale était pratiquement guérie, confirmant l'efficacité de ce nouveau traitement des lésions méniscales (Tozum and Demiralp 2003; DeBerardino, Branstetter et al. 2007; Ishida, Kuroda et al. 2007). Ainsi, nous avons considéré que le chitosane serait le matériel biologique le plus adéquat pour la livraison des gènes 4sfgf-2 et pdgf-bb.

Lors de nos travaux, chacune des constructions plasmidiques, pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb, a été couplée à des formulations différentes de chitosane pour être utilisée dans les expériences d'immunisation de souris Balb/C par deux voies d'administration différentes: sous-cutanée (s.c.) et intramusculaire (i.m.). Nous avons démontré que la réponse immunitaire chez l'animal suite à l'injection des complexes ADN-chitosane était supérieure à celle induite par l'injection d'ADN nu, ce qui se traduit par des niveaux élevés d'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2, PDGF-BB et d'anticorps spécifiques en réponse aux injections de complexes ADN plasmidique-chitosane. Ces résultats, en plus de confirmer l'intégrité des protéines recombinantes, confirment le rôle efficace du chitosane dans la livraison des gènes.

Nos résultats constituent une approche thérapeutique prometteuse pour remédier aux pathologies articulaires. En effet, sur le plan pathologique, le cartilage est le siège de syndromes de type dégénératif pouvant conduire à un blocage des articulations. Ces pathologies dégénératives touchent une part importante de la population humaine puisqu'elles peuvent apparaître progressivement au cours du vieillissement, à la suite d'une sollicitation excessive ou après un traumatisme. Actuellement, il n'existe pas de médicaments ou de méthodes de réparation efficaces permettant la régénération d'un cartilage articulaire fonctionnel. Ainsi, la mise au point de nouvelles stratégies visant la restauration de tissus biologiquement et mécaniquement fonctionnels est nécessaire. Nos travaux démontrent que l'utilisation des facteurs de croissance FGF-2 et PDGF-BB associés au chitosane est une avenue prometteuse.

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Les facteurs de croissances

#### 1.1. Introduction

Les facteurs de croissance sont des protéines de faible poids moléculaire (6-30 kDa). Ces facteurs participent à différentes fonctions du vaste réseau de communication intercellulaire. En plus d'influencer la différenciation tissulaire, les facteurs de croissance régulent la croissance et les fonctions des cellules *via* des récepteurs cellulaires spécifiques. L'activation de la cellule se traduit par une activation de signaux transmembranaires, puis par une cascade de phénomènes cytoplasmiques et aboutit à la transcription des gènes spécifiques d'une ou de plusieurs protéines. À la différence des hormones sécrétées à distance du tissu effecteur (sécrétion endocrine), la plupart des facteurs de croissance agissent sur les cellules toutes voisines (sécrétion paracrine), et leur concentration plasmatique est très faible. Certaines cellules ont des récepteurs pour les facteurs de croissance qu'elles produisent (sécrétion autocrine). Récemment, grâce à la technologie des protéines recombinantes, il s'est développé un intérêt considérable dans l'utilisation des facteurs de croissance comme agents thérapeutiques pour le traitement de nombreuses pathologies. L'utilisation de nombreux facteurs de croissance comme agents thérapeutiques nécessite de comprendre leurs caractéristiques biologiques et leurs potentiels cliniques (Mohan and Baylink 1991).

Les facteurs de croissance agissent en se fixant sur les récepteurs membranaires spécifiques (récepteur tyrosine kinase ou sérine-thréonine kinase) des cellules cibles déclenchant, par l'intermédiaire d'une cascade de réactions, la stimulation de messagers intra-cellulaires qui migrent dans le noyau où ils activent par phosphorylation des facteurs transcriptionnels qui, à leur tour, engendrent des réponses différentes dans le noyau des différentes cellules cibles. Ces réponses dépendent de l'état de la cellule, de son environnement, des autres facteurs de croissance. Les facteurs de croissance agissent à des doses faibles et interviennent sur la prolifération cellulaire par l'augmentation ou la diminution de la production des récepteurs, le changement dans leur affinité pour leur récepteur ou même



l'internalisation par endocytose après leur liaison à un récepteur particulier. Ils agissent sur la prolifération cellulaire en tant que facteurs de compétence où ils déplacent le cycle cellulaire de sa phase de repos G0 vers la phase G1 de début de cycle. Les facteurs de croissance peuvent aussi agir en tant que facteurs de progression où ils déplacent les cellules de la phase G1 à la phase S de synthèse de l'ADN et contribuent à la stimulation de la différenciation et aux fonctions métaboliques de la cellule osseuse. Ces effets, combinés à ceux de la prolifération cellulaire, font des facteurs de croissance des agents essentiels dans le développement embryonnaire, la croissance et la différenciation des tissus, la cicatrisation des blessures et même les altérations pathologiques.

Il existe de nombreux facteurs de croissance polyvalents capables de stimuler la division cellulaire et ce dans différents types cellulaires, tandis que d'autres facteurs de croissance sont spécifiques à un type de cellules particulier. Parmi les facteurs de croissance, nous nous sommes intéressés à deux types lors de notre étude. Les principales familles sont la famille des FGF ou facteur de croissance dérivé des fibroblastes, et la famille des PDGF ou facteur de croissance dérivé des plaquettes. Ces derniers peuvent induire la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes et stimuler la maturation terminale en chondrocytes hypertrophiques (Stheneur, Dumontier et al. 2003). Ces facteurs ont des effets différents selon leur concentration, la présence ou non de cofacteur, le niveau de différenciation des chondrocytes, et le nombre de récepteurs présents à la surface des chondrocytes. Pour nos travaux, nous avons utilisé le facteur de croissance basique des fibroblastes (b-FGF ou FGF-2) et l'isoforme BB du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-BB).

## **1.2. Le facteur de croissance basique des fibroblastes ou FGF-2**

Le facteur FGF-2, aussi connu sous le nom de FGF basique ou HBGF-2 (heparin-binding growth factor 2), est un facteur mitotique qui a aussi été décrit sous le nom de facteur de croissance dérivé du cartilage (Cartilage Derived Growth Factor) (Suzuki 1999). Le facteur de croissance FGF-2 est une protéine ayant un poids moléculaire de 18 kDa. Cependant, il existe une variété d'isoforme du facteur FGF-2 de plus grand poids moléculaire allant de

22 à 34 kDa qui ont été identifiés (Touriol, Bornes et al. 2003) (*figure 1*). L'existence de ces isoformes est le résultat de l'extention amino-terminale de la protéine produite à l'issue d'une initiation de traduction au niveau de régions non-AUG (1 - 6) de l'ARNm (Touriol, Bornes et al. 2003). Le facteur FGF-2 peut être isolé de différentes sources telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales (Giri, Ropiquet et al. 1999). Il s'agit de la forme la plus abondante de la famille des FGF dans les tissus humains.

Le FGF-2 stimule la croissance cellulaire des chondrocytes adultes en culture et son action peut être augmentée par la présence d'insuline (Stheneur, Dumontier et al. 2003). La protéine FGF-2 stimule la prolifération des cellules issues du tissu mésodermale et neuroectodermale, notamment les fibroblastes, les cellules endothéliales, les astrocytes, les oligodendrocytes, les neuroblastes, les ostéoblastes (Hanahan and Weinberg 2000). Certaines études ont démontré le rôle chimiotactique et mitogène de FGF-2 vis-à-vis des cellules endothéliales *in vitro*, mais également son rôle dans la survie et la régénération des axones et des tissus périodontaux (Murakami, Takayama et al. 1999; Meijs, Timmers et al. 2004). Sur des cultures d'explants d'épithéliums olfactifs prélevés chez le rat et chez l'humain, l'addition de FGF2 induit la différenciation neuronale dans des cultures de tissus épithéliaux (MacDonald, Murrell et al. 1996). Le facteur FGF-2 stimule également la migration des cellules gliales (Pedersen, Ness et al. 1994). L'expression du facteur FGF est détectée dans une grande variété de tissus chez l'embryon de souris suggérant un rôle du FGF dans la régulation du développement et de la différenciation embryonnaire (Savage, Hart et al. 1993). Nakamura et al. ont évalué l'effet de la protéine recombinante humaine (rhFGF-2) sur la réparation des fractures de tibia chez un groupe de chiens comme modèle expérimental. Une ostéotomie transversale a été créée à la hauteur du tibia de chacun de ces animaux. Un groupe a été traité à l'aide de 200µg de rhFGF-2 injecté au niveau de la fracture. Les animaux ont été euthanasiés après 2, 4, 8, et 32 semaines suite à la fracture tibiale, et les sites de fracture ont été analysés du point de vue des caractéristiques morphologiques. Deux semaines suivant la fracture tibiale, le groupe traité par le rhFGF-2 possédait un nombre élevé de cellules différenciées en chondrocytes et d'ostéoblastes comparativement au groupe contrôle. De plus, ce même groupe traité par le rhFGF-2 avait une ossification intramembranaire plus prononcée que celle du groupe contrôle. Ces

résultats suggèrent clairement que le facteur rhFGF-2 accélère la réparation osseuse et favorise la restauration des propriétés biomécaniques de l'os (Nakamura, Hara et al. 1998).

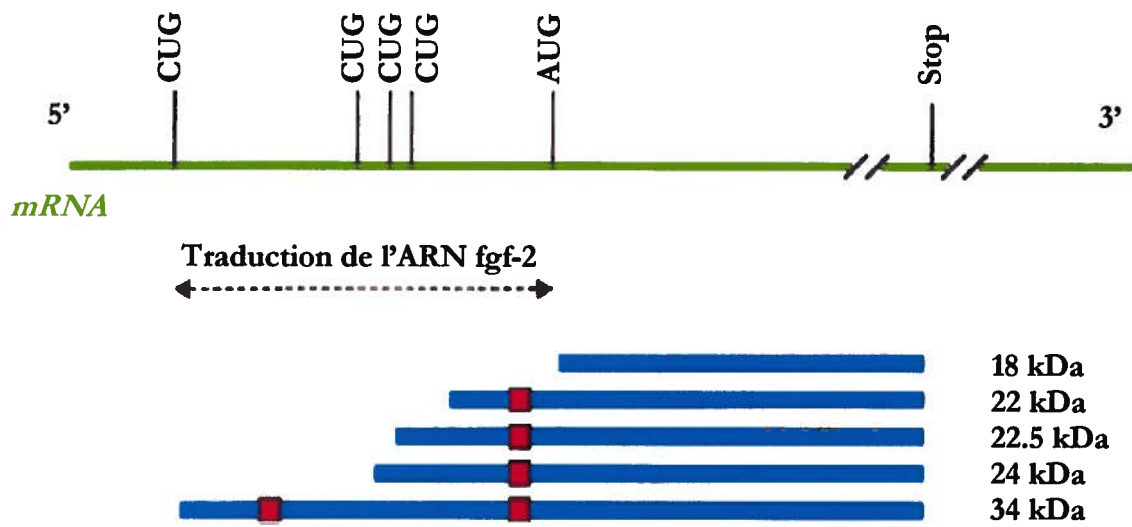
### **1.3. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF**

Le PDGF est une glycoprotéine de poids moléculaire de 30 kDa qui existe sous 3 isoformes donnant 2 homodimères (PDGF-aa et PDGF-bb) et un hétérodimère (PDGF-ab). Les ostéoblastes et les cellules d'ostéosarcomes expriment les gènes codant pour les chaînes PDGF A et B. L'homodimère PDGF-aa est sécrété par les cellules de la lignée ostéoblastique alors que les isoformes PDGF-bb et PDGF-ab sont libérés des granules  $\alpha$  après dégranulations des thrombocytes activés. Les isoformes du facteur PDGF ont différents rôles tels que la prolifération, la migration ou encore l'organogénèse (Hoch and Soriano 2003). Le PDGF fait partie de la famille des homodimères et hétérodimères de chaînes polypeptidiques A- et B reliées par des ponts disulfures. Les chaînes matures PDGF-A et B sont constituées d'une centaine d'acides aminés et présentent environ 50% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés (Pierce, Mustoe et al. 1991; Fredriksson, Li et al. 2004). Huit résidus cystéine sont parfaitement conservés entre ces deux chaînes polypeptidiques, dont deux, le deuxième et le quatrième, sont impliqués dans la liaison des deux sous-unités du dimère, tandis que les six autres résidus sont engagés dans les liaisons intrachânes par des ponts disulfures (Haniu, Rohde et al. 1993). La chaîne B du PDGF est issue d'un précurseur par clivages protéolytiques des régions N et C terminales (Ostman, Andersson et al. 1991) (*figure 2*). Le gène codant pour la chaîne B du PDGF est porté par le chromosome 22 (Dalla-Favera, Gallo et al. 1982). Ce gène est composé de sept exons, l'exon 1 codant la séquence signal, les exons 2 et 3 codant pour la séquence du précurseur sont éliminés lors du clivage endopeptidique, les exons 4 et 5 codent pour la majorité de la séquence de la protéine mature, enfin l'exon 7 est constitué d'une région majoritairement non-codante. L'exon 6 code pour la séquence C terminale qui est éliminée lors de la maturation de la chaîne B du facteur de croissance PDGF. Les plaquettes humaines et les lignées cellulaires en culture qui expriment naturellement les deux chaînes A et B contiennent les trois types d'isoformes du PDGF (PDGF-AA, PDGF-BB et PDGF-AB), ce qui suggère un processus d'assemblage aléatoire des dimères (Hart, Bailey et al. 1990).

**Figure 1 : Différentes isoformes FGF-2 résultant de la traduction d'ARN.**

Photographie tirée de Okada-Ban M et al. (2000).

L'ARN messager et les codons d'initiation correspondant à chacun des isoformes FGF-2 humain. Les poids moléculaires respectifs des différentes isoformes FGF-2 sont représentées. Les carrés rouges indiquent une séquence signal de localisation nucléaire (NLS ou nuclear localization signal) permettant une translocation des isoformes de haut poids moléculaire vers le noyau cellulaire (Touriol, Bornes et al. 2003).



Initialement, le PDGF était identifié comme un constituant du sang mais absent du sérum (Ross, Glomset et al. 1974). Par la suite, il a été purifié à partir de plaquettes humaines (Antoniades, Scher et al. 1979).

Le facteur PDGF joue un rôle important dans le développement des différents tissus et organes dans la croissance embryonnaire et intervient dans l'induction mésodermique et les interactions épithélio-mésenchymateuses durant l'organogénèse. Les récepteurs membranaires du facteur PDGF sont localisés dans les cellules souches mésenchymateuses de l'embryon alors que leurs ligands sont produits par les cellules épithéliales et endothéliales. Le facteur PDGF intervient aussi par voie autocrine. Ce facteur est un facteur de compétence puisqu'il stimule les cellules cibles en se fixant sur les récepteurs membranaires de type tyrosine-kinase, entraînant une cascade d'événements conduisant à une stimulation de la prolifération par accélération du cycle cellulaire et par induction des cellules au repos. Le PDGF possède un effet mitogène qui est neutralisé par TGF  $\alpha$ 1. Ce dernier intervient par inhibition de la phosphorylation des facteurs transrégulateurs en bloquant partiellement le récepteur. Le facteur PDGF possède un effet chimiotactique sur les cellules souches mésenchymateuses, mais aussi sur les ostéoblastes et sur les fibroblastes.

De nombreuses études *in vitro* ont démontré différents rôles joués par le facteur de croissance PDGF. Le facteur PDGF stimule essentiellement la prolifération et le recrutement de cellules osseuses *in vitro* (Canalis, McCarthy et al. 1989). L'isoforme PDGF-BB stimule la prolifération des chondrocytes, mais inhibe l'ossification endochondrale. Sur des ostéoblastes en culture, PDGF-AA et PDGF-BB induisent la production de PDGF -AA par voie autocrine. Le facteur PDGF accroît la production d'ostéopontine mais diminue la production d'ostéocalcine, des sialoprotéines dans les cellules osseuses et réduit l'activité de la phosphatase alcaline et la minéralisation. Le PDGF-BB stimule la résorption osseuse en augmentant le nombre d'ostéoclastes. Il induit également l'expression de la MMP par les ostéoblastes. Enfin, le facteur PDGF contribue au recrutement des cellules osseuses durant le remodelage et la réparation osseuse lorsqu'il est présent dans la matrice osseuse et qu'il est libéré pendant la dégradation de cette matrice (Zhang, Leeman et al. 1991).

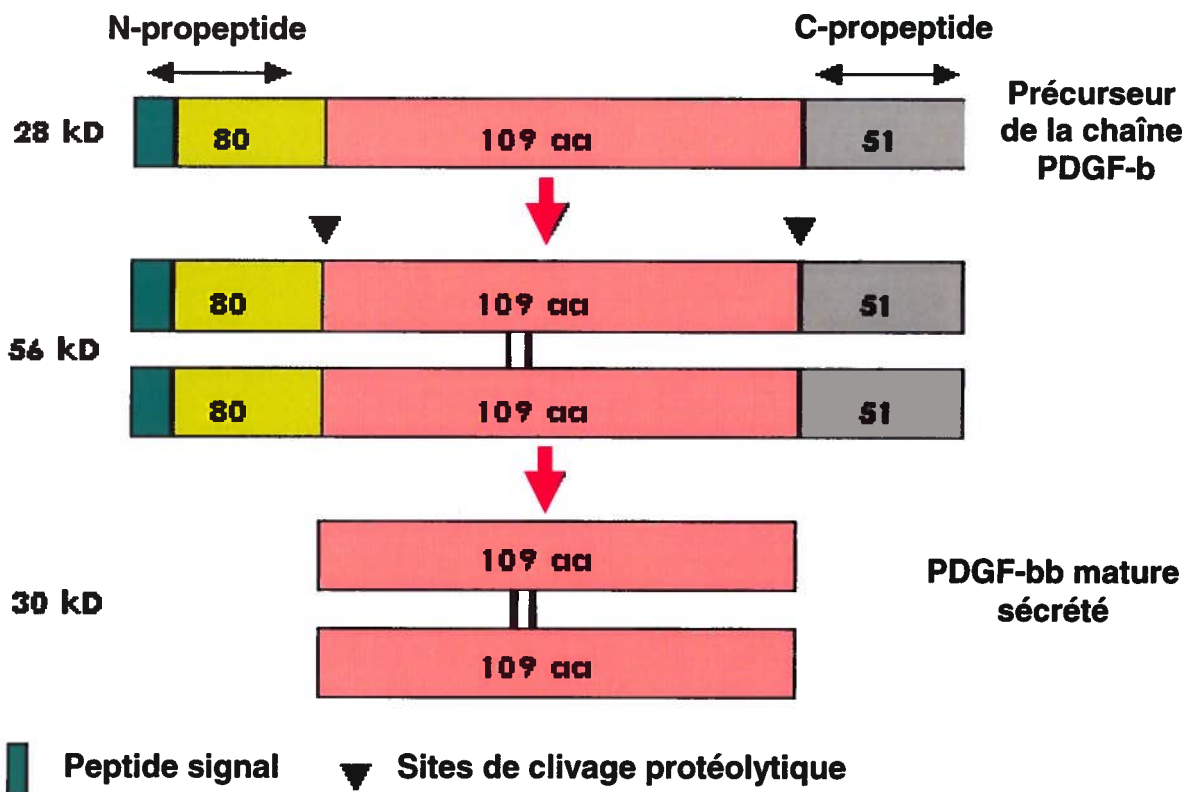
Des études *in vivo* ont permis de démontrer certaines caractéristiques propres au facteur PDGF. Chez le singe, une simple application de facteur PDGF au niveau des lésions parodontales augmente la hauteur d'os alvéolaire. Le facteur PDGF combiné au facteur de croissance IGF-I induit, à certaines doses, un accroissement osseux après un traitement parodontal et une augmentation de la formation d'os péri-implantaire au niveau crestal de manière significative. D'autres études réalisées sur le chien ont montré un gain d'os au niveau apical de l'implant. Les plaquettes, les macrophages, les cellules endothéliales et musculaires lisses issues d'une zone lésée sécrètent le PDGF contribuant ainsi à la réparation tissulaire en stimulant la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires. Ce phénomène induit une production plus intense de composés de la matrice extracellulaire par les fibroblastes et les macrophages présents au niveau du site de lésion de façon à reconstituer le tissu (Pierce, Mustoe et al. 1991). L'équipe de Nevins a démontré le rôle thérapeutique de l'homodimère PDGF-BB recombinant dans le traitement des défauts osseux périodontaux (Nevins, Giannobile et al. 2005). La protéine humaine recombinante PDGF-BB est approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) comme molécule thérapeutique utilisée pour traiter des ulcères (Robson, Mustoe et al. 1998). Les thérapies basées sur l'emploi du PDGF-BB ont cependant certaines limites. En effet, le PDGF-BB doit être administré fréquemment afin de maintenir une concentration thérapeutique suffisante du fait de son élimination rapide dans la circulation sanguine et de sa demi-vie *in vivo* qui est de moins de 2 min (Bowen-Pope, Malpass et al. 1984). L'utilisation d'un système capable de relarguer lentement ces facteurs clés, FGF-2 et PDGF-BB, de manière contrôlée au niveau de la zone endommagée représenterait un grand intérêt pour notre étude.

Le système de livraison de gènes utilisé dans nos expériences est un biomatériau issu de polysaccharides appelé chitosane. Les gènes utilisés lors de nos travaux sont issus de constructions de plasmides recombinants. La construction d'un plasmide recombinant consiste à insérer, dans un vecteur plasmidique, une séquence d'ADN en aval d'un promoteur. Ce dernier permet l'expression de l'ADN cloné dans un système cellulaire eucaryote. L'ADN et le plasmide sont préparés séparément puis sont ligués. Le plasmide recombinant résultant est amplifié par le système cellulaire de bactéries compétentes.

**Figure 2 : Biosynthèse de la protéine dimérique PDGF-bb.**

La chaîne du PDGF-BB est synthétisée à partir d'un précurseur de 240 acides aminés contenant des propeptides au niveau des régions N et C terminales. Les chaînes se dimérisent grâce à des ponts S-S dans le réticulum endoplasmique pour former des précurseurs inactifs. Les dimères sont clivés par des endopeptidases dans le réseau transgolgien lors de la maturation du PDGF-bb qui est biologiquement actif.





## 2. Les systèmes de livraison de gènes

### 2.1. Généralités

La thérapie génique requiert, pour son bon fonctionnement, l'utilisation de vecteurs capables d'acheminer les acides nucléiques vers leur cible. Cette étape de vectorisation est bien souvent une étape limitante de la thérapie génique. Pour pouvoir être utilisé en toute sérénité, un vecteur doit être efficace, de part sa capacité de transfection, la charge génique qu'il peut supporter et la spécificité dont il peut faire preuve. Mais un vecteur doit aussi pouvoir être utilisé en toute sécurité : il ne doit pas induire de réaction immunitaire ou déclencher une nouvelle pathologie.

Les vecteurs de la thérapie génique peuvent être classés en deux grandes catégories : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Très largement utilisés jusqu'à maintenant les vecteurs viraux présentent un grand nombre d'avantages. Les adénovirus présentent la plus grande capacité de transfert de gène puisque le titre viral de ces vecteurs peut atteindre  $10^{13}$  CFU/ml. De plus ils sont capables d'effectuer un transfert de gène dans des cellules quiescentes. Malheureusement, ils peuvent être immunogènes (Marshall 1999). Le système viral le plus utilisé est celui utilisant les rétrovirus. Ces derniers ont cependant une capacité de transfert plus faible ( $10^8$  CFU/ml). Ils ne sont capables de transférer l'ADN qu'à des cellules en division et l'insertion d'acide nucléique dans la cellule hôte se fait de manière aléatoire, pouvant soit activer un pro-oncogène soit inactiver un anti-oncogène (Robbins and Ghivizzani 1998). En effet, les résultats obtenus par Fischer et son équipe, démontre le danger de l'utilisation des rétrovirus en phase chez l'Homme. Il ne faut pourtant pas dénigrer les vecteurs viraux qui ont permis de grandes avancées en thérapie génique, mais leur utilisation systématique chez l'humain nécessite de nettes améliorations. La mise au point de techniques non virales a permis d'élargir le champ des recherches, et d'envisager des méthodes de transfert beaucoup plus sûres pour l'homme. Les systèmes non-viraux offrent de nombreux avantages en raison de leur utilisation facile, directe, sécuritaire et peu onéreuse (Jeschke, Barrow et al. 1999). Une comparaison des principaux vecteurs de transfert de gènes est présentée dans le *tableau 1*. Toutefois, l'efficacité de la plupart de ces techniques est encore très limitée. L'introduction d'ADN nu *in vivo* donne

très peu de résultats puisque dès son injection, l'ADN est dégradé par les nucléases endogènes. Les techniques d'électrotransfert qui montrent de bons résultats en culture cellulaire sont encore à l'état d'expérimentation en ce qui concerne les animaux. De plus cette technique ne garantit pas le ciblage d'un type cellulaire particulier. L'utilisation des liposomes comme vecteurs de la thérapie génique semble être une grande avancée dans l'administration d'acides nucléiques *in vivo* (Ogris and Wagner 2002).

### 2.1.1. Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont des particules virales véhiculant un génome artificiellement modifié en regard de celui de la souche virale dont le vecteur est dérivé. Le cycle viral naturel se divise en deux phases distinctes : infection et réplication. L'infection consiste en l'introduction du génome viral dans la cellule. L'expression des gènes viraux aboutit dans un second temps à la formation de nouvelles particules virales. Au cours de la production de virus recombinants, les particules virales encapsident un génome modifié contenant la cassette d'expression du gène d'intérêt thérapeutique à la place de tout ou partie du génome viral. La transduction se définit alors comme une infection abortive par ce virus recombinant défectif pour la réplication, qui introduit seulement une information génétique fonctionnelle dans la cellule cible. Ce type de vecteur a été longtemps utilisé à des fins thérapeutiques pour ses propriétés déjà décrites (Kamiya, Tsuchiya et al. 2001).

Parmi les virus les plus utilisés comme vecteurs, il existe les adénovirus, les rétrovirus, les virus associés aux adénovirus (AAV). Toutefois, la pathogénicité de nombreux virus parentaux utilisés, l'instabilité des génomes viraux et les possibilités de recombinaison avec d'autres virus ou avec des séquences d'origine cellulaire imposent la prise en compte d'un danger potentiel particulier lors de la production et de l'utilisation de virus génétiquement modifiés.

**Tableau 1 : Comparaison des principaux vecteurs de transfert de gènes.**

Vecteur	Avantages	Inconvénients
<b>Adénovirus</b>	Fort taux de transduction <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>  Transduction des cellules quiescentes et en division  Production aisée	Taille limite du transgène : 7.5 kb  Réadministration impossible  Durée d'expression courte
<b>Rétrovirus</b>	Taux de transduction élevé <i>ex vivo</i> Durée d'expression assez longue  Peu immunogène	Faible taux de transduction <i>in vivo</i>  Transduction des cellules en division uniquement  Risque de mutation insertionnelle  Taille limite du gène : 8 kb  Production difficile
<b>Lentivirus</b>	Transduction des cellules quiescentes et en division	Affilié aux virus immunodépresseurs  Taille limite du gène : 8 kb  Production difficile
<b>AAV</b>	Transduction des cellules quiescentes et en division  Durée d'expression longue <i>in vivo</i>  Peu immunogène	Réadministration impossible  Taille limite du gène : 4.5 kb  Production moyenne
<b>ADN nu</b>	Sécurité d'emploi  Très peu immunogène  Production simple	Transfection très peu efficace  Durée d'expression très courte  Ciblage de la transfection difficile
<b>Lipides cationiques et Particules d'ADN condensées</b>	Transfection efficace <i>in vivo</i> (complexes non ioniques)  Peu immunogène  Production assez simple	Transfection +/- efficace <i>in vivo</i> selon la nature du vecteur  Durée d'expression très courte

Parmi les dangers potentiels, sont considérés comme particulièrement sérieux :

- l'éventualité de la production accidentelle d'une souche recombinante hautement pathogène pour l'homme, les animaux ou les plantes;
- la propagation incontrôlable d'une souche virale artificielle, quelle que soit sa pathogénicité;
- l'utilisation médicale ou industrielle de préparations de vecteurs viraux contaminées par des espèces virales non identifiées et/ou non détectées.

Les adénovirus sont des virus à ADN bicaténaire à la fois très contagieux et très peu pathogènes pour l'homme. Le matériel génétique est contenu dans une structure protéique, la capside. La fixation de cette capside aux cellules cibles est rendue possible par la présence de longues fibres protéiques qui interagissent avec le récepteur membranaire de la cellule. L'ADN est libéré à proximité du noyau, lors de la destruction de l'endosome suite à la diminution du pH interne. L'ADN pénètre dans le nucléoplasme par les pores nucléaires (Bennett and Rainbow 1989). Les adénovirus utilisés en thérapie génique sont rendus déficients pour la réplication par délétion du gène E1 indispensable à celle-ci. Ainsi délévés, les virus ne peuvent se propager que dans des cellules exprimant le gène E1 comme notamment les cellules de la lignée 293. Une telle lignée permet la production de virus recombinants incapables de se propager en dehors des cibles qu'ils atteignent. Les adénovirus peuvent ainsi infecter un grand nombre de types cellulaires, qu'il s'agisse de cellules quiescentes ou mitotiques. L'ADN s'intègre très rarement dans le génome de la cellule hôte, ce qui limite les risques d'activation de proto-oncogène ou d'inactivation d'anti-oncogène. Cependant un inconvénient majeur subsiste : administrés *in vivo*, les adénovirus peuvent être immunogènes et provoquer ainsi une réponse immunitaire importante. Les adénovirus de seconde génération possèdent un pouvoir antigénique *in vivo* diminué, mais la durée d'expression du gène d'intérêt est également diminuée. Ceci est probablement dû à la perte d'une séquence nécessaire à la régulation du gène d'intérêt. L'efficacité du transfert peut aussi être augmentée en modifiant les fibres protéiques interagissant avec les récepteurs cellulaires afin que le virus puisse cibler d'autres composants de la membrane cellulaire (Wickham, Roelvink et al. 1996).

La plupart des vecteurs rétroviraux utilisés sont basés sur le virus de la leucémie murine de Moloney (« Moloney murine leukemia virus », MMLV), qui est le rétrovirus le plus étudié (Guild, Finer et al. 1988). Le gène du MMLV code pour trois polyprotéines, gag, pol et env, qui sont les facteurs trans nécessaires à la réplication virale. Les éléments cis nécessaires à la réplication et à l'encapsulation des particules virales se situent dans les régions 5' et 3' LTR : promoteur, séquence de polyadénylation, séquence d'encapsulation dite séquence de « packaging » ou séquence psi. Le cycle rétroviral débute par la fixation des particules virales sur des récepteurs présents à la surface des cellules cibles. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire, libérant dans le cytoplasme l'ARN et la transcriptase inverse nécessaire à la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire. Le brin d'ARN est alors détruit et le sond brin d'ADN synthétisé. A l'occasion de la division cellulaire et de la disparition de la membrane nucléaire, la séquence d'ADN virale est intégrée dans le génome de manière aléatoire (Zabransky, Hadravova et al. 2008).

Pour pouvoir être utilisés comme vecteurs de la thérapie génique, les rétrovirus sont délétés pour des gènes situés entre les séquences LTR : les gènes gag, pol et env, nécessaires à la réplication et sont remplacés par la séquence du gène d'intérêt. La séquence psi, nécessaire pour l'encapsidation des particules virales reste inchangée. Ainsi modifiés, les virus sont incapables de se répliquer, mais peuvent toujours produire des particules rétrovirales. On parle alors de rétrovirus défectifs pour la réplication, et les particules produites sont des particules rétrovirales défectives. Afin de pouvoir répliquer le gène d'intérêt, les virus nécessitent une lignée cellulaire particulière contenant les gènes gag, pol et env. On parle de cellules d'encapsidation (« packaging cell line »).

Les AAV sont des virus défectifs à ADN monocaténaire de la famille des parvovirus. Pour leur propagation, ils nécessitent la présence de virus helper tel qu'un adénovirus ou un virus herpes. Les plasmides codant pour l'AAV et pour l'adénovirus sont cotransfectés dans les cellules en culture. Le surnageant est ensuite recueilli. Il contient l'AAV qui est ensuite séparé de l'adénovirus par des moyens physiques (chauffage à 56°C et ultracentrifugation). Les AAV peuvent s'intégrer de manière stable et efficace dans le génome des cellules infectées. Ils ont la particularité de s'intégrer de manière spécifique dans le génome (région 19q13.3), ce qui diminue le risque d'activation de proto-oncogène. Cependant, la

préparation des AAV est lourde puisqu'elle nécessite la présence d'un adénovirus helper qu'il faut par la suite éliminer par différentes phases de purification. Enfin, une très grande quantité d'AAV est nécessaire pour la réalisation d'essais *in vivo* (Samulski 1993).

Bien que les systèmes viraux présentent un certain nombre d'avantages, ils ne sont pas à l'heure actuelle sans risque. Ces dernières années, de nombreuses techniques de transfert non virales de gènes ont été mises au point. Elles essayent de combiner les avantages de vecteurs viraux tout en palliant leurs défauts.

### **2.1.2. Vecteurs non-viraux**

Les vecteurs non-viraux sont caractérisés par une production aisée et économique, une absence de pathogénicité et d'immunogénicité qui laisse envisager des administrations répétées et une grande flexibilité quant à la taille de la molécule d'ADN à insérer. Le transfert de gènes par des vecteurs non-viraux est caractérisé par une expression transitoire des gènes et une faible efficacité de transfection. Une expression de courte durée peut être un effet désirable dans le cas d'essais cliniques portant sur la régénération tissulaire par exemple.

#### **2.1.2.1. ADN nu**

Dans ce système, l'ADN est injecté directement dans le tissu sous forme d'un plasmide bactérien. Ce dernier contient le transgène sous contrôle de différents éléments de régulation eucaryotes. Dans l'organisme, l'ADN nu est rapidement dégradé par les nucléases endogènes. Cependant une injection d'un grand volume peut être à l'origine d'une transfection efficace chez la souris. Aucune réaction immunitaire spécifique n'est engendrée contre l'ADN.

Des méthodes plus efficaces ont été mises au point pour réduire les volumes injectés en particulier en vue d'applications chez l'Homme. L'injection se fait à l'aide d'un fusil à

gènes, qui permet de bombarder l'épiderme de microparticules recouvertes d'ADN. L'ADN atteint le noyau, où il reste sous forme épisomale et permet ainsi une expression transitoire de la protéine d'intérêt (Davis, Demeneix et al. 1993). Cependant les cellules musculaires semblent être les seules à pouvoir être transfectées par cette technique et à pouvoir exprimer le gène transfecté (Wolff, Malone et al. 1990). Cette technique ne semble pas suffisante pour corriger les anomalies génétiques mais pourrait s'avérer efficace lors d'une procédure de immunisation, puisqu'un faible taux d'expression du transgène est suffisant pour déclencher une réponse immunitaire (Zhu, Liggitt et al. 1993).

L'application d'un champ électrique sur des cellules *in vitro* permet, par électroporation, l'entrée d'ADN dans le cytoplasme. Son utilisation en thérapie génique est encore marginale du fait que la plupart des cellules ne survivent pas au procédé. L'électroporation pourrait cependant être intéressante pour transfecter des cellules souches *ex vivo*.

Pour pouvoir être administré par d'autres voies locales ou par voies systémiques, et être applicable à un spectre plus large de tissus cible, l'ADN doit être protégé des dégradations enzymatiques. Les liposomes cationiques sont les systèmes de livraison de gènes les plus étudiés et entrent dans plusieurs essais précliniques et cliniques (Dass, Walker et al. 2002).

### **2.1.2.2.Liposomes**

Les liposomes possèdent un certain nombre de caractéristiques qui en font de bons candidats pour la vectorisation d'ADN. Les liposomes sont répartis en trois catégories : liposomes cationiques, liposomes anioniques et liposomes neutres. Les différences de charges sont dues aux différents lipides entrant dans la constitution des liposomes. Du fait de ces variations au niveau des charges, les liposomes ont des utilités différentes.

Ce type de transfert repose sur l'encapsulation de la molécule d'ADN à l'intérieur d'une vésicule constituée d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Cette vésicule lipidique, appelée liposome, renferme un compartiment aqueux. Les liposomes peuvent contenir dans ce dernier ou dans leurs membranes lipidiques différentes molécules telles



que des agents pharmacologiques (Mayer, Tai et al. 1989; Gabizon, Isacson et al. 1994; Lee and Low 1995), des protéines, des acides nucléiques. Contrairement aux vecteurs viraux, ce système permet le transfert d'ADN sans que ce dernier soit limité en taille. Cependant afin de favoriser l'internalisation dans la cellule cible, les liposomes sont utilisés en présence d'un agent fusiogène, le polyéthylène glycol. Le glycérol peut être aussi employé et a pour fonction d'augmenter, d'induire ou de favoriser l'endocytose des liposomes par la cellule hôte. Cependant, cette technique ne permet d'obtenir qu'une expression transitoire du transgène, l'ADN restant sous une forme épisomale dans la cellule hôte.

Dans les liposomes cationiques, l'ADN, chargé négativement, est encapsulé dans une capsule lipidique chargée positivement, ce qui le protège de la dégradation par les nucléases endogènes, et permet une expression du transgène plus durable. De plus, les lipides entrant dans la composition des liposomes sont très peu immunogéniques et n'induisent pas ou peu de toxicité *in vivo*. Enfin, les liposomes sont capables de transférer une grande quantité d'ADN.

Ces vecteurs s'inspirent fortement des systèmes viraux puisque le principe repose sur une condensation de l'ADN (chargé négativement par les groupements phosphates) avec une molécule chargée positivement pour former des particules sub-micrométriques. Ces vecteurs lipidiques sont constitués de trois domaines : une tête cationique permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes, un « espaceur » séparant ces deux éléments.

Le prototype du lipide cationique utilisé lors du transfert de gène est le bromure de dioléoxyloxy-propyl-triméthylammonium (DOTMA), un ammonium quaternaire amphiphile. La chaîne hydrophobe est en général constituée par un phospholipide neutre, la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE). La formation d'un complexe « ADN/DOTMA/DOPE » permet d'obtenir un lipoplexe capable de transfecter un grand nombre de cellules en culture. L'excès de charges électrostatiques réparties à la surface du lipide cationique lui permet de se fixer aux membranes des cellules par interaction ionique,

la cellule possédant une charge globale négative. Cependant, l'efficacité du transfert dépend de plusieurs paramètres dont le type de lipide utilisé, la présence d'éléments permettant la condensation de l'ADN, le rapport ADN/lipide, le type cellulaire. Un des arguments principaux en faveur du développement des lipoplexes comme vecteur de transfert en thérapie génique, par rapport aux vecteurs viraux, repose sur leur efficacité et leur sécurité d'utilisation. Cependant, les études récentes réalisées par Dow et *al.*, (1999) démontrent que l'injection par voie intraveineuse de lipoplexes induit des effets immunologiques. Il semblerait que cet effet soit concomitant à la présence d'ADN plasmidique dans le lipoplexe puisque aucune réponse immunologique n'est observée lors de l'utilisation d'un liposome « vide ».

Il existe une autre catégorie de liposomes : les liposomes polycationiques ou polyplexes. Le plus utilisé est le liposome polyéthylèneimine (PEI), qui est un polymère synthétique, permettant la transfection d'ADN *in vitro* et *in vivo* (Ogris and Wagner 2002). Les PEI sont souvent complexés à des polymères hydrophiles tel que le poly éthylène glycol (PEG), dans le but d'éliminer les interactions non spécifiques entre les PEI et les composants sanguins (Kursa, Walker et al. 2003). L'utilisation des PEI, permet d'augmenter l'efficacité de transfection à la fois *in vitro* et *in vivo* de 2 à 28 fois. De plus, l'administration conjointe de PEI et de lipoplexes permet une augmentation de l'efficacité de transfert et une diminution de l'effet toxique (Lee, Ni et al. 2003).

Ces composés sont formés de l'association, par des interactions électrostatiques, de l'ADN avec une molécule comme la polylysine, la protamine, ou le polyéthylèneimine (PEI). L'ADN ainsi compacté est protégé des nucléases endogènes, et sa fixation cellulaire est augmentée soit par endocytose soit par phagocytose (Ogris and Wagner 2002).

Les expérimentations réalisées sur des modèles animaux, aussi bien avec les liposomes cationiques qu'avec les polyplexes, montrent l'efficacité de transfert de ces vecteurs puisque l'injection des complexes dans la circulation sanguine se traduit par une localisation du transgène au niveau des cellules endothéliales, des leucocytes et macrophages intravasculaires. De nombreux complexes se retrouvent dans les cellules endothéliales des

capillaires pulmonaires et dans certains organes comme le foie, les reins et même les tumeurs (McLean, Fox et al. 1997).

D'autres études sont réalisées afin d'améliorer le ciblage de ces complexes : en effet différentes molécules peuvent être greffées sur les polymères cationiques (PEI ou polylysine), comme la transferrine ou des anticorps CD3, qui permettent un ciblage spécifique via des récepteurs cellulaires particuliers (Kircheis, Kichler et al. 1997). Une sélectivité cellulaire peut être obtenue en associant les liposomes à des anticorps monoclonaux ou à des protéines spécifiques telles que la transferrine (Ahmad, Longenecker et al. 1993; Kursal, Walker et al. 2003).

Malgré tous ces avantages, les liposomes cationiques ne sont pas sans effets négatifs. Bien qu'ils ne présentent en eux-mêmes aucun effet toxique, l'association liposomes/ADN (lipoplexes) induit une réaction inflammatoire avec la production de cytokines. Cette réaction inflammatoire est due à la présence de séquences CpG non méthylées sur les acides nucléiques plasmidiques. Elle n'est pas observée pour l'ADN nu car ce dernier est dégradé quasi immédiatement après son administration. L'effet antitumoral de cette production de cytokines est loin d'être négligeable, car elle a un grand intérêt dans la mise au point de protocoles d'immunothérapie (Krieg, Yi et al. 1999).

Des études récentes ont montré la grande efficacité d'un polymère biologique, le chitosane, en l'introduisant directement dans l'articulation de genoux de lapin pris comme modèle animal pour l'ostéoarthrose (Zhang, Yu et al. 2006). En effet, le chitosane est un des biomatériaux les plus utilisés en médecine comme implants et représente un support tridimensionnel efficace notamment pour la réparation du cartilage. Les biomatériaux d'origine biologique peuvent provenir de diverses sources : de l'implant biologique acellulaire au collagène (Mizuno, Fujisawa et al. 1996) en passant par la fibrine (Hendrickson 1993) et les polysaccharides tels que l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate ou le chitosane. Ils possèdent de nombreux sites d'attachement aux cellules et sont biologiquement actifs, ils sont donc impliqués dans le chimiotactisme (Postlethwaite, Seyer et al. 1978). Ce biomatériau sert de système de transport moléculaire ou cellulaire

directement au niveau des lésions notamment dans les défauts cartilagineux et permet de promouvoir la multiplication des chondrocytes ainsi que la synthèse d'une matrice de type cartilagineux. Il se produit une reconnaissance du matériel par les cellules qui adaptent leur métabolisme. Notre projet consiste entre autres à utiliser le chitosane comme système de livraison de gènes qui codent pour les facteurs de croissance FGF-2 et PDGF-BB. La *figure 3* illustre le processus de livraison de gène par le chitosane. Une fois dans la cellule, ces complexes sont séquestrés dans des vésicules endosomales pour être importés dans le noyau cellulaire. Les cellules en division étant plus facilement transfectées (Brunner, Sauer et al. 2000; Escriou, Carriere et al. 2001) que les cellules en quiescence (Ferkol, Kaetzel et al. 1993). C'est dans le noyau que l'ADN plasmidique peut alors se répliquer grâce à son origine de répllication virale (Cooper 1996).

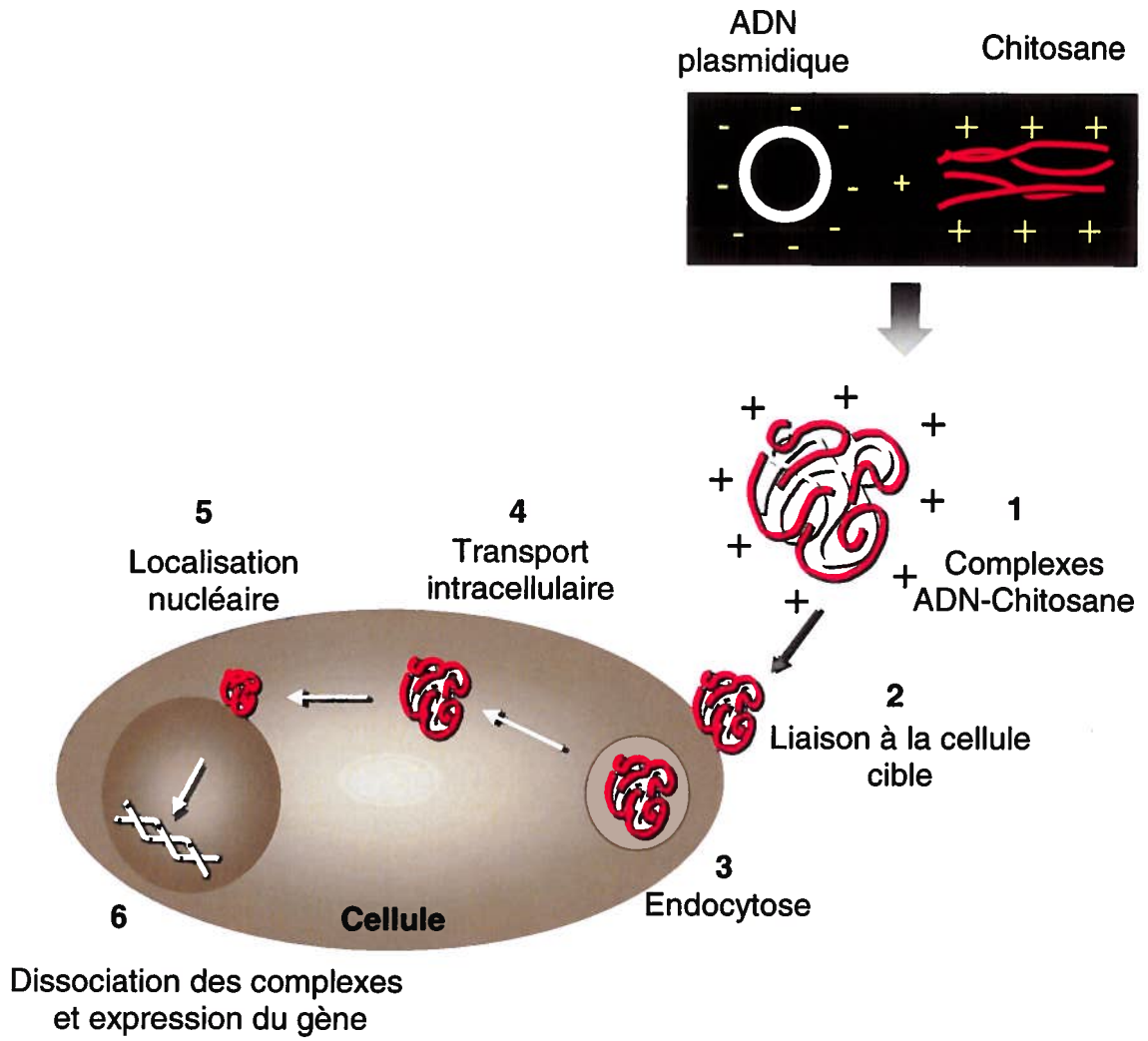
### **2.1.2.3. Le chitosane**

#### **2.1.2.3.1. Historique**

En 1811, le Pr. Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon. En 1823, la même substance a été isolée chez certains insectes (coléoptères) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie l'enveloppe). En 1859, le Pr. C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin résultant à un produit soluble appelé le chitosane en 1894 par Hoppe-Seyler.

Le chitosane est obtenu par N-désacétylation partielle de la molécule de chitine. Leur structure chimique, représentée sur la *figure 4*, résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées en  $\beta,(1\rightarrow4)$ . Le chitosane possède trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupe amine et deux groupes hydroxyles en positions  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_6$  respectivement (*figure 4*).

**Figure 3 : Livraison génétique par le chitosane.**



La chitine et le chitosane se différencient par la proportion des unités acétylées présentes dans le copolymère, appelée aussi le degré de désacétylation (noté DDA). Le DDA représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques. Dans le cas du chitosane, le DDA est supérieur à 70% pour les produits commerciaux. Cette valeur détermine également la limite de solubilité de ce polymère dans les solutions acides diluées ( $2 < \text{pH} < 6$ ). Le DDA est un paramètre structural qui influence les propriétés physico-chimiques telles que la solubilité, la charge globale et la réactivité, les propriétés mécaniques comme l'élongation à la rupture, la résistance à la traction. Il influence également les propriétés biologiques comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'activité biostimulante et anticholestémiant (Chatelet, Damour et al. 2001).

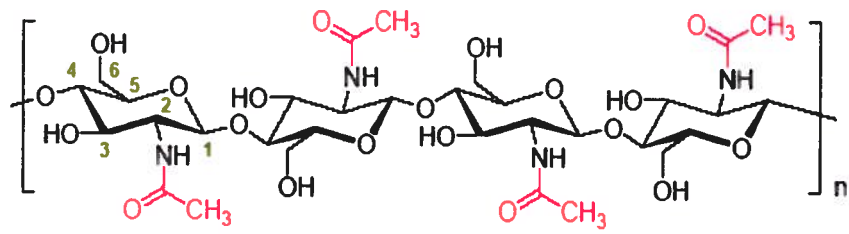
Le chitosane est un polysaccharide cationique qui présente des caractéristiques et des propriétés particulières. C'est un polymère biocompatible, biodégradable, non antigénique et non toxique. Le chitosane, enrobant une ou plusieurs molécules d'ADN formant ainsi un complexe, est utilisé comme système de livraison de gènes. Il a été démontré que le complexe chitosane-ADN peut faciliter le transport et l'expression d'un gène, porté par la molécule d'ADN, dans l'intestin grêle et le côlon chez le lapin (MacLaughlin, Mumper et al. 1998).

#### **2.1.2.3.2. Propriétés physico-chimiques**

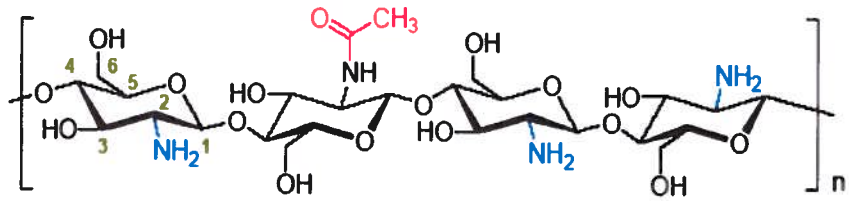
La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur DDA et par leur masse molaire. La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 800 000 à  $10^6 \text{ g.mol}^{-1}$  et elle est généralement fortement acétylée. Les chitosanes ont une masse molaire de l'ordre de 200 000  $\text{g.mol}^{-1}$  et un DDA allant de 2 à 25%. Pour le chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée. De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et modifie sa solubilité.

**Figure 4 : Comparaison des structures de la chitine (a) et du chitosane (b)**  
Photographie tirée de M.Rinaudo *et al.*, (2000).





(a)



(b)

En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Le chitosane est solubilisé et il devient cationique quand le pH du milieu dans lequel il est dissout est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3 (Hejazi and Amiji 2003). A un pH supérieur (>6,5), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et le polymère peut ainsi précipiter. La viscosité du chitosane en solution est influencée par différents facteurs, comme le DDA, la masse molaire, la concentration, la force ionique, le pH et la température.

Les propriétés particulières du chitosane sont liées essentiellement à la présence de la fonction amine portée par le carbone 2. Elles sont de deux types:

- à pH acide, où il est soluble, le chitosane porte de nombreuses charges positives. Il est donc un bon agent de floculation et un bon agent de coagulation. En effet, le chitosane peut interagir avec des molécules chargées négativement (par exemple acides gras, protéines et ADN) (Fang, Chan et al. 2001) et former ainsi des complexes polyanion-polycation.
- à pH plus élevé (> 6,5), le chitosane perd ses charges positives, le doublet électronique de l'azote est libre. Ces doublets libres et la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane lui permettent de se comporter comme un excellent complexant, en particulier des métaux lourds. Il est donc utilisé pour la purification des eaux, par exemple pour la récupération de métaux dans les effluents industriels.

### **3. Immunisation**

#### **3.1. Immunisation classique et ses limites**

Les vaccins classiques sont essentiellement constitués de micro-organismes vivants atténués, c'est à dire rendus non virulents, qui simulent une infection naturelle et

déclenchent différentes réponses immunitaires. L'atténuation du pouvoir pathogène est obtenue par passage du micro-organisme sur des cultures cellulaires successives ou par traitement chimique. Pour la plupart, ce sont des vaccins dirigés contre des virus car la mise au point de vaccins anti-bactériens atténués s'est révélée assez difficile.

Une autre méthode " classique " d'immunisation consiste à utiliser non plus des vaccins vivants atténués mais des vaccins à base de micro-organismes tués (inactivés) ou des vaccins constitués de certains composants purifiés de micro-organismes. Ces derniers tués doivent être capables eux aussi d'être reconnus par le système immunitaire de l'organisme vacciné. Plusieurs vaccins viraux de ce type sont actuellement commercialisés contre une multitude de virus: le virus de la grippe, le virus de l'hépatite A, le virus de l'encéphalite japonaise, le virus de la rage. La plupart des vaccins bactériens de première génération sont constitués de bactéries entières tuées : *Salmonella typhi* pour la typhoïde, le vibron cholérique pour le choléra, *Bordetella pertussis* pour la coqueluche. Les vaccins contre la diphtérie et le tétanos sont quant à eux fondés sur l'obtention, par Gaston Ramon, à l'Institut Pasteur (1923), de protéines sécrétées par les bactéries, purifiées et traitées chimiquement pour leur faire perdre leur toxicité : les anatoxines capables de stimuler le système immunitaire de l'organisme vacciné.

Les vaccins vivants atténués sont généralement considérés comme étant plus efficaces. Ils agissent à faible dose et n'exigent en principe pas de rappel, de sorte qu'ils sont souvent bon marché. Mais ils ont aussi leurs limites. Tout d'abord, il n'est pas toujours possible d'atténuer la virulence d'un micro-organisme tout en lui conservant des capacités immunogènes. De plus, il peut arriver qu'un microbe atténué redevienne pathogène. Face à cela, le vaccin inactivé a l'avantage d'être plus sûr, mais il nécessite souvent d'être inoculé à des doses plus élevées et avec des rappels pour induire une bonne immunité à long terme.

### **3.2. Immunisation génétique**

Le plus récent développement dans la vaccinologie est l'immunisation avec des polynucléotides (Babiuk, van Drunen Littel-van den et al. 1999). Cette technologie est communément appelée immunisation à ADN ou immunisation génétique. L'immunisation génétique est un procédé qui consiste à administrer *in vivo* des plasmides recombinants

contenant l'ADN codant pour un ou plusieurs antigènes, à un organisme pour induire une réponse immunitaire contre ce ou ces antigènes (Kucerova 1998).

### 3.2.1. Historique

La vaccination est un moyen efficace et bien rodé dans la lutte contre les maladies infectieuses. La vaccinologie a progressé de façon remarquable depuis les travaux de Louis Pasteur et Edward Jenner, sur les vaccins atténués et inactivés. Tout récemment, la technologie de l'ADN recombinant a permis de produire des vaccins basés sur les sous-unités des antigènes spécifiques. Les premières expériences décrivant le transfert d'ADN dans les cellules d'un animal vivant ont été rapportées par Stasmey en 1950, Parchkis en 1955, et Ito en 1958 (Koprowski and Weiner 1998). Ces expériences décrivaient la capacité de préparations de chromatine, préparations grossières d'ADN provenant dans ce cas-ci de cellules cancéreuses, d'induire la formation de tumeurs suite à une injection chez des rongeurs de laboratoire (Koprowski and Weiner 1998). Les progrès scientifiques ont permis de confirmer que l'injection d'ADN en absence de vecteur viral peut conduire à l'expression du gène inoculé chez l'hôte (Koprowski and Weiner 1998).

Des expériences additionnelles ont appliqué ces découvertes aux molécules d'ADN recombinant. En 1990, Wolff et *al.* ont été les premiers à introduire le concept de la vaccination à ADN. Ces auteurs ont démontré que l'injection de vecteurs plasmidiques, portant des gènes rapporteurs, dans le muscle de souris permet l'expression *in vivo* de protéines biologiquement actives (Wolff, Malone et al. 1990). Cette découverte a ainsi suggéré que le transfert de gènes *in vivo* peut s'effectuer sans l'utilisation de vecteurs viraux. Des études ont révélé que suivant l'injection, le vecteur plasmidique persiste et s'exprime pendant plusieurs mois dans les cellules musculaires du modèle animal. L'ADN plasmidique reste sous forme extrachromosomique ce qui l'empêche de se répliquer ou de s'intégrer au génome de l'animal vacciné (Wolff, Ludtke et al. 1992).

En 1992, Tang et *al.* ont démontré que la livraison *in vivo* du gène codant pour de l'hormone de croissance humaine (HGH) par un canon à gène (gene gun) suscitait une réponse immunitaire associée à la production d'anticorps anti-HGH chez la souris (Koprowski and Weiner 1998). Ces auteurs ont nommé cette procédure d'immunisation,

immunisation génétique, décrivant la capacité des gènes inoculés à être des immunogènes individuels (Koprowski and Weiner 1998). Dans la même période, il a été démontré que les vaccins à ADN pouvaient produire une réponse immunitaire contre le virus de l'influenza (Fynan, Robinson et al. 1993; Fynan, Webster et al. 1993; Ulmer, Donnelly et al. 1993), le virus HIV-1 (Wang, Ugen et al. 1993) et le virus de l'hépatite B (Davis, Pink et al. 1993; Davis, Michel et al. 1993).

Chez l'humain, plusieurs vaccins à ADN sont en cours d'expérimentation pour susciter une réponse prophylactique et/ou thérapeutique. Il s'agit notamment des vaccins dirigés contre le cancer, la malaria, le virus de l'hépatite B et le VIH (Gurunathan, Wu et al. 2000). Des essais cliniques en phase I ont débuté pour évaluer l'innocuité et l'immunogénicité des vecteurs à ADN exprimant les protéines ENV et REV du VIH de type I chez les sujets séropositifs et séronégatifs (MacGregor, Boyer et al. 1998; Boyer, Cohen et al. 2000; MacGregor, Boyer et al. 2000).

Depuis, l'immunisation génétique a été étudiée dans plusieurs modèles de maladies infectieuses en plus de ceux précédemment mentionnés, nous pouvons citer un vaccin contre l'herpès simplex de type 1 ou HSV-1 (Manickan, Rouse et al. 1995), HSV-2 (Bourne, Milligan et al. 1996), l'hépatite C (Geissler, Gesien et al. 1997) et plus récemment contre l'Ebola (Xu, Sanchez et al. 1998). L'immunisation génétique est également envisagée dans l'immunothérapie dirigée contre le cancer (Cohen, Boyer et al. 1998). Il a été démontré que l'injection d'ADN plasmidique codant pour les antigènes associés aux tumeurs provoquait une réponse immunitaire tumorale antigène-spécifique et pouvait ainsi protéger les souris contre une épreuve tumorale létale (Conry, LoBuglio et al. 1995; Wang, Chen et al. 1995).

### **3.2.2. Principe**

#### **3.2.2.1. Méthodes et voies d'immunisation**

La manière dont le vaccin ADN est administré influence le type de réponse immunitaire suscité. En effet, il semble que le site d'inoculation et la méthode par laquelle le plasmide

est administré peuvent affecter indépendamment l'immunité induite d'une manière qualitative et/ou quantitative (Cohen, Boyer et al. 1998).

Lors de l'immunisation génétique, l'ADN peut être administré par une injection à l'aide d'une aiguille (par voie intramusculaire ou intradermale) ou à l'aide de techniques biolistiques. Différents types de réponses immunitaires sont produits par ces dernières méthodes (Doria-Rose and Haigwood 2003). Dans la technique biolistique, l'ADN plasmidique est administré en utilisant un canon à gène (gene gun). Cet appareil permet de bombarder des cellules par des micro-particules enrobées d'ADN plasmidique pour y introduire des gènes étrangers ((Mor 1998; Peachman, Rao et al. 2003).

Plusieurs voies d'immunisation ont permis d'étudier la vaccination à ADN: incluant la voie intraveineuse (Fynan, Robinson et al. 1993), intramusculaire (Davis, Michel et al. 1994), intra nasale (Okada, Sasaki et al. 1997), intra épidermique (Fynan, Webster et al. 1993). La majorité des vaccins ADN étudiés jusqu'à maintenant utilisent soit le muscle ou la peau comme sites de vaccination (Cohen, Boyer et al. 1998). L'injection intramusculaire, au niveau des quadriceps antérieurs, est la méthode la plus couramment utilisée de par sa simplicité et son efficacité relative. Il a été démontré par différents groupes de chercheurs que l'administration d'agents toxiques causant la nécrose du tissu musculaire précédant l'injection de l'ADN pouvait augmenter l'expression génique (Cohen, Boyer et al. 1998). L'injection d'ADN par voie intramusculaire génère une réponse immunitaire majoritairement de type Th1 avec une augmentation du ratio IgG2a :IgG1, une production d'interféron- $\gamma$  et une faible production d'interleukine 4 (Xiang and Ertl 1995; Pertmer, Roberts et al. 1996; Feltquate, Heaney et al. 1997). En revanche, l'immunisation génétique utilisant le canon à gène suscite principalement une réponse des cellules Th2 (Doria-Rose and Haigwood 2003). Besarab *et al.* ont précisé les différents avantages de la voie sous-cutanée : efficacité supérieure à d'autres voies d'administration, maniabilité et très bonne tolérance (Besarab 2001; Bhattacharjee, Izadjoo et al. 2006). De nombreux auteurs, dont Kaufman et *al.*, (1998), ont montré que la voie sous-cutanée permet une économie de dose d'environ 30 % pour une efficacité similaire. De plus, la voie d'administration sous-cutanée est recommandée par les différentes sociétés savantes qui ont émis les guides de bonnes pratiques de prescriptions.

### **3.2.2.2. Maturation et présentation de l'antigène**

Les quantités d'antigènes produites *in vivo* par immunisation génétique sont faibles soit de l'ordre du nano et picogramme. Ces observations suggèrent que l'induction de la réponse immunitaire est reliée aux types et au mode d'action des cellules présentatrices d'antigène (CPA). L'antigène exprimé *in vivo* à partir de l'ADN plasmidique est traité puis présenté aux cellules du système immunitaire pour susciter une réponse. Cette maturation et présentation de l'antigène peut se faire par trois mécanismes : a) l'induction directe par les cellules somatiques (toutes les cellules n'exprimant pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II ou CMH type II); b) la transfection directe des CPA professionnelles telles que les cellules dendritiques, les macrophages; c) l'induction croisée au cours de laquelle l'ADN plasmidique peut transférer à la fois une cellule somatique et une CPA professionnelle et l'antigène sécrété est pris en charge par une autre CPA professionnelle qui le présente aux lymphocytes T ou LT (Gurunathan, Stobie et al. 2000).

Plusieurs études ont rapporté le potentiel des cellules somatiques, notamment des myocytes, à internaliser l'ADN plasmidique suite à une injection intramusculaire (Ulmer, Deck et al. 1996; Payette, Weeratna et al. 2001). Wolff et al, (1992) ont suggéré que l'ADN plasmidique entre dans les cellules musculaires *via* les tubules T et les cavéoles. Il a été démontré que l'ADN plasmidique injecté *in vivo* dans les muscles peut être exprimé et sécrété par les myocytes. Aussi, plusieurs études ont précisé que les cellules musculaires ont un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immunitaire suite à la vaccination à ADN (Whitton, Rodriguez et al. 1999; Henke 2002). Cependant, une question se pose quant à l'induction directe des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) par les myocytes exprimant l'antigène ou, indirecte par le transfert de l'antigène d'une cellule musculaire à une CPA professionnelle. Cette ambiguïté provient du fait que les myocytes n'expriment pas les molécules nécessaires à l'activation des cellules T naïves, telles que les molécules du CMH de type II et les molécules de costimulation (ex :CD80, CD86). De plus, seules les CPA professionnelles et non pas les myocytes sont capables de présenter l'antigène *via* le CMH de type I (Leitner, Ying et al. 2000). Torres et al. (1997) ont démontré que l'ablation du

muscle après 10 minutes suivant l'injection de l'ADN plasmidique n'affecte pas l'intensité et la longévité de la réponse immunitaire. Il a été ainsi suggéré que les cellules musculaires nécessitent la collaboration des CPA professionnelles pour l'induction de la réponse immunitaire. Les kératinocytes et les cellules de Langerhans constituent les principales cellules transfectées lors d'une injection cutanée avec l'ADN plasmidique (Raz, Carson et al. 1994). Il a été démontré que la transplantation de la peau préalablement vaccinée (jusqu'à 12h post-vaccination) permet de stimuler le système immunitaire chez l'animal receveur (Klinman, Conover et al. 1998). D'autres études ont suggéré que les kératinocytes transfèrent l'antigène aux CPA professionnelles suite à la mort cellulaire (Akbari, Panjwani et al. 1999). Ainsi, les cellules somatiques seraient des réservoirs de production d'antigène qui procèdent probablement par induction croisée pour la stimulation du système immunitaire.

L'immunisation génétique implique également la transfection directe des CPA de la moelle osseuse. Suite à la biosynthèse et la maturation, l'antigène est présenté *via* les molécules du CMH de classe I et II des CPA professionnelles qui activent les cellules T effectrices et mémoires. Il a été observé que les macrophages présentant l'antigène à leur surface migrent à partir du muscle injecté vers les ganglions lymphatiques (Chattergoon, Robinson et al. 1998). Les cellules dendritiques semblent particulièrement efficaces dans l'induction de la réponse immunitaire. Toutefois, des études ont démontré que seulement une faible proportion de cellules dendritiques (0.4%) peut être transfectée par l'ADN plasmidique (Casares, Inaba et al. 1997). Lors de l'induction croisée, les CPA professionnelles internalisent, par phagocytose ou endocytose, l'antigène présenté par d'autres cellules (cellules somatiques ou CPA professionnelles). Une fois l'antigène présenté, la réponse immunitaire est déclenchée (Gurunathan, Wu et al. 2000).

#### **4. Perspectives**

##### **4.1. Rôles des facteurs de croissances dans la réparation tissulaire**



Lors de la réparation tissulaire, plusieurs phénomènes étroitement dépendants les uns des autres interviennent. Si l'on considère l'exemple d'une blessure de la peau, la réparation de celle-ci implique les événements suivants :

- formation de nouveau tissu conjonctif, elle-même dépendante de la migration et de la prolifération des fibroblastes, puis de la synthèse de macromolécules matricielles, en particulier de collagènes ;
- formation d'un néo-épithélium, nécessitant la migration et la prolifération des kératinocytes ;
- revascularisation des tissus lésés, par l'intermédiaire de bourgeons vasculaires émanant des capillaires situés à proximité ;
- réinnervation du tissu cicatriciel, à partir des terminaisons nerveuses périphériques.

Les facteurs de croissance et les cytokines qui interviennent dans ces processus sont très nombreux (Ferrara, Houck et al. 1991; Bennett and Schultz 1993). Le(s) site(s) d'action privilégiée(s) des principaux d'entre eux sont résumés sur la *figure 5*. L'EGF, le PDGF et l'IGF1 sont les facteurs les plus importants pour stimuler la prolifération et/ou la migration des fibroblastes. L'IL1 paraît également capable d'exercer cet effet. Les différentes isoformes du TGF $\beta$ , mais aussi de l'IL4 et de l'IGF1, sont de puissants agents activateurs de la production de matrice extracellulaire par les cellules du tissu conjonctif. L'EGF, le KGF, le TGF $\alpha$  et, à un moindre degré, l'IGF1, sont capables de stimuler la migration et la prolifération des kératinocytes pour former un néo-épithélium.

Le processus de néo-angiogenèse est un facteur crucial pour la réparation tissulaire. Il n'y a pas de bonne réparation tissulaire sans vascularisation correcte. Ce processus nécessite une migration des cellules endothéliales à partir des capillaires se trouvant à proximité. Les bourgeons capillaires ainsi formés se creusent de nouveaux capillaires, donnant ainsi naissance aux néovaisseaux. Le VEGF, le FGF1 et le FGF2 sont les principaux facteurs impliqués dans la revascularisation des tissus lésés, mais le PDGF et l'IGF1 pourraient également être capables d'y contribuer.

Le problème de la restauration des fonctions nerveuses des tissus lésés a été beaucoup moins étudié que celui de la fermeture des plaies. Pour le moment, seul le FGF1 a été proposé comme l'un des facteurs susceptibles de stimuler ce processus. Il est probable, toutefois, que de nombreux autres facteurs de croissance ou de cytokines puissent également intervenir, en particulier le facteur de croissance du nerf, NGF.

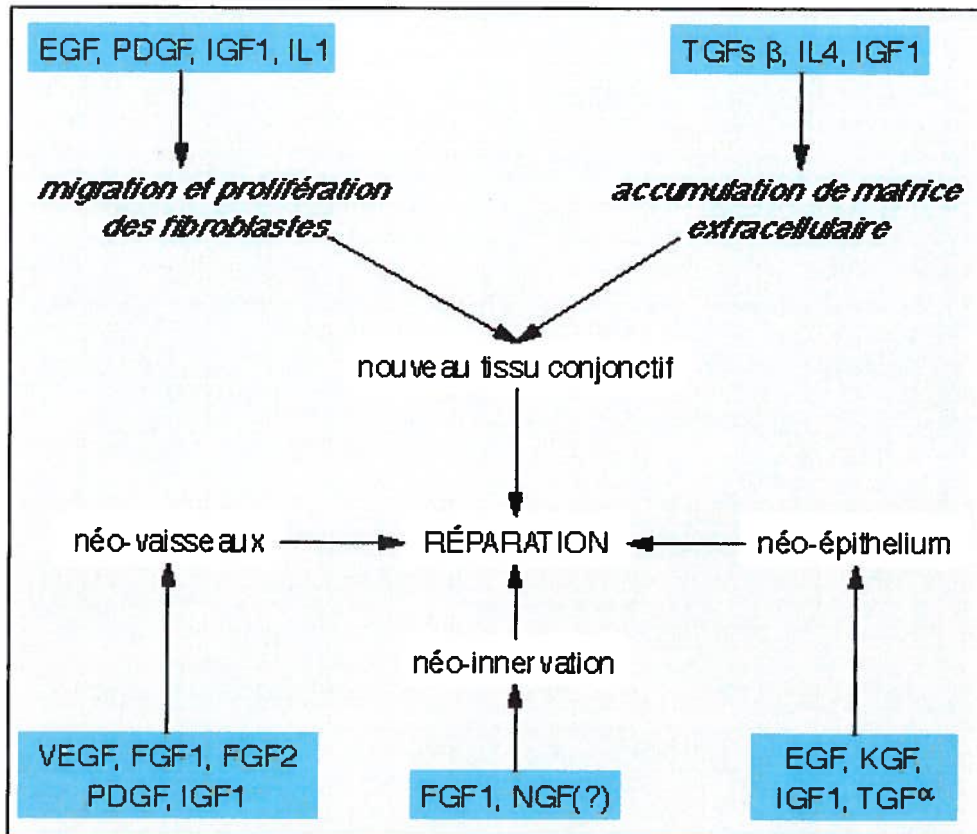
L'expression de ces différents facteurs de croissance et cytokines doit être parfaitement contrôlée dans le temps et dans l'espace ; par exemple, une expression trop importante du facteur de croissance tumoral TGF $\beta$ 1 pourrait être responsable de cicatrices hypertrophiques. Au contraire, le facteur de croissance tumoral TGF $\beta$ 3, qui diminue l'expression des deux autres isoformes, aurait un effet anticicatriciel, minimisant ainsi la cicatrice (Shah, Foreman et al. 1995).

#### **4.2. Cas de la réparation des tissus articulaires**

Les facteurs de croissance peuvent être injectés au niveau intra-articulaire. En effet, Otsuka et al. (1997) ont démontré que le facteur de croissance basique des fibroblastes (ou bFGF) stimule la formation de cartilage lors de la réparation d'un défaut cartilagineux chez le lapin. L'utilisation du facteur de croissance tumoral TGF- $\beta$ 1, pour la réparation, ne semble pas efficace. En effet, une seule injection provoque une stimulation de la synthèse de protéoglycanes alors que de multiples injections induisent une hyperplasie de la synovie et la formation d'ostéophytes ou proliférations de tissus osseux (van Beuningen, van der Kraan et al. 1994). Malgré certaines controverses relatives à l'utilisation de certains facteurs de croissance pour la réparation du cartilage défectueux dues vraisemblablement à des problèmes d'effets / doses, ces produits semblent très prometteurs. En effet, ils peuvent être véhiculés par un biomatériau qui aura alors deux rôles: **(1)** transférer, conserver les facteurs de croissance au niveau du cartilage endommagé et les protéger de la dégradation ; **(2)** servir de guide pour la régénération du cartilage.

**Figure 5. Rôle des cytokines et des facteurs de croissance dans le processus de reconstruction tissulaire.**

Photographie tirée de Borel JP, Maquart FX (1998).



Le manque d'efficacité des techniques de réparation tissulaire actuellement utilisées justifie les recherches portant sur la régénération du cartilage *in vivo*. C'est dans ce cadre que se situe notre projet de recherche qui consiste à étudier les effets d'un système de livraison de matériel biologique dans la réparation du cartilage défectueux. En effet le chitosane permettrait la livraison de vecteurs exprimant les facteurs de croissances FGF-2 et PDGF-bb responsables, en partie, de la différenciation et de la maturation des chondrocytes et ainsi de la néoformation d'un tissu cartilagineux.

## OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE

La présente étude s'insère dans un projet d'envergure qui, à long terme, devrait permettre de développer une thérapie "nouvelle génération" pour la réparation des cartilages défectueux. Notre projet consiste essentiellement à étudier l'expression des facteurs de croissance FGF-2 et PDGF-BB livrés *in vivo* par le chitosane. Les gènes codant pour chacun de ces deux facteurs de croissance ont été introduit dans le vecteur d'expression eucaryote pVax-1<sup>®</sup> (Invitrogen).

Différents objectifs sont visés par les travaux présentés dans ce mémoire :

- Le clonage des gènes codants pour les facteurs de croissance FGF-2 et PDGF-BB.
- La préparation et la caractérisation des vecteurs recombinants pVax-1/4sFGF-2 et pVax1/PDGF-bb.
- La préparation et la caractérisation des complexes [vecteurs recombinants-chitosane].
- L'immunisation génétique des souris par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire, et caractérisation de l'expression des protéines recombinantes *in vivo* par :
  - La détermination de la quantité de protéines recombinantes produite
  - L'évaluation de la réponse humorale

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### **1. Clonage des gènes fgf-2 et pdgf-bb**

Le clonage des gènes fgf-2 et pdgf-bb implique la réalisation de différentes étapes : l'extraction d'ARN total suivie d'une transcription inverse pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc est utilisée pour l'amplification par PCR des séquences de gènes fgf-2 et pdgf-bb. L'étape finale consiste à cloner les fragments d'ADN amplifiés dans le vecteur d'expression eucaryote pVax-1<sup>©</sup>.

#### **1.1. Extraction des ARN**

L'extraction des ARN se fait en utilisant du matériel certifié sans RNase. L'eau est préalablement traitée au diethyl pyrocarbonate (DEPC) afin d'inactiver l'action de ces enzymes. La manipulation des ARN se fait sur glace car les RNases sont très actives à température ambiante.

L'ADNc du gène fgf-2 a été synthétisé à partir des ARN totaux extraits d'un tissu de donneur sain. L'extraction des ARN totaux pour la synthèse d'ADNc du gène pdgf-bb a été réalisée à partir d'un échantillon de sang d'un donneur sain tel que décrit par Whitman et ses collaborateurs (Whitman, Berry et al. 1997).

La méthode d'extraction des ARN totaux a été réalisée telle que décrit par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987) en utilisant le TRIzol LS (GibcoBRL, Life Technologies). Brièvement, le tissu cellulaire et le coagulum issu de l'échantillon sanguin sont chacun lysés à l'aide de 100 µL de TRIzol dans un tube Eppendorf et écrasés à l'aide d'une tige de plastique traitée au DEPC avant de compléter le volume final à 1ml de TRIzol. Un volume de 200 µl de chloroforme est ajouté à chacun des tubes. Le tout est mélangé vigoureusement, incubé 2 minutes à température ambiante et centrifugé à 13 000 x g pendant 15 min à 4°C. La couche incolore supérieure est transférée dans un autre microtube, en prenant bien soin de ne pas prélever l'interface, ni la couche inférieure. L'ARN est précipité par l'ajout de 500 µL d'alcool isopropylique. Après 10 min

d'incubation à température ambiante, une centrifugation à 13000 x g pendant 10 min à 4°C permet de culotter l'ARN, qui est ensuite lavé avec 1ml d'éthanol 75% (v/v) et centrifugé à 7500 x g pendant 5min à 4°C. L'ARN est séché à l'air ambiant et resuspendu dans 50 µL d'eau DEPC. L'ARN est ensuite gardé à -70°C jusqu'à son utilisation. La qualité et la quantité de l'ARN extrait sont estimées par spectrophotométrie à 260 nm et à 280 nm. Un ratio 260 nm/280 nm supérieur à 1,5 indique que l'ARN extrait est pur. L'état de pureté des ARN est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose. La concentration d'ARN est déterminée par la formule suivante :  $DO_{260} \times \text{facteur de dilution} \times 50 \mu\text{g/mL}$ .

### **1.2. Réaction de transcription inverse (RT-PCR)**

L'ADNc a été synthétisé en utilisant le système ThermoScript RT-PCR (Invitrogen). Un microlitre d'une solution d'ARN total est incubé à 65°C pendant 5 minutes avec 0.8 µM d'amorce sens Fw4s.1 ou d'amorce antisens Rv18h spécifiques de la séquence du fragment 4sfgf-2 (*tableau 2*) en présence de 1.6 mM d'un mélange de dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) et de l'eau stérile traitée au DEPC pour compléter un volume final de 12 µL. Les mélanges réactionnels sont transférés sur glace. Ensuite un volume réactionnel de 4 µL d'une solution tampon 5x permettant la synthèse du brin d'ADN, 1 µL de 0,1M DTT et 1 unité de l'enzyme ARN polymérase ont été ajoutés. La réaction de transcription inverse dure 60 min à 50°C en présence de 7.5 unités de transcriptase inverse ThermoScript (Invitrogen). Enfin, une incubation de 5 min à 85°C avant d'ajouter 2 unités d'inhibiteur de l'ARN polymérase et une période d'incubation à 37°C pendant 20 min. On obtient ainsi un ADNc servant de matrice pour l'amplification par PCR.

### **1.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

L'amplification des séquences d'ADN par PCR a été effectuée en utilisant le système ThermoScript RT-PCR (Invitrogen). La réaction se fait à partir de 10 ng d'ADNc dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant du Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, un mélange de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) à une concentration de 1.6 mM, 200 nM de chacun des couples d'amorces Fw4s.2/Rv18h puis Fw4sFGF/Rv18h pour l'amplification du fragment d'ADN 4sfgf-2 ou FwPDGF/RvPDGF pour le fragment



d'ADN pdgf-bb, et 2.5 unités de l'enzyme ADN polymérase Taq (Invitrogen). Les amplifications PCR ont été réalisées en utilisant un thermocycleur programmable : GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) et comportent les étapes décrites dans le *tableau 2*. Les programmes ont été choisis selon la taille du gène à amplifier. La température d'hybridation  $T_m$  est déterminée en fonction des amorces choisies et elle varie de 52°C à 57°C. Les produits de l'amplification sont déposés sur gel d'agarose 0,8% afin de vérifier leur taille.

#### **1.4. Amplification du gène codant pour la protéine recombinante 4sFGF-2**

L'ADNc fgf-2 issu de la réaction de transcription inverse décrite en 1.2, est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Afin d'amplifier le gène recombinant 4sfgf-2, des modifications de l'ADNc sont nécessaires. Trois réactions séparées d'amplification par PCR ont été réalisées à l'aide de trois paires d'amorces afin de modifier le gène fgf-2 en gène recombinant 4sfgf-2.

L'ADNc du gène fgf-2 est utilisé comme matrice pour la première réaction de PCR. Les deux premières amorces sens (Fw4s.1 et Fw4s.2) utilisées pour l'amplification PCR possèdent à leurs extrémités 5' une partie de la séquence signal codant pour la protéine FGF-4. La dernière paire d'amorces (sens Fw4sFGF et antisens Rv18h) utilisée pour la dernière amplification PCR possède 6 bases (AAGCTT et CTCGAG respectivement) indépendantes de la séquence du 4sfgf-2. Ces bases sont choisies en fonction de l'enzyme de restriction utilisée, *HindIII* et *XhoI* respectivement, pour linéariser le plasmide dans lequel sera cloné le gène amplifié.

Les réactions d'amplification se sont effectuées en présence d'amorces 0.2  $\mu$ M, de tampon de polymérisation (Tris HCl 50 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM), de dNTP 1.6 mM et de 2.5 unités de l'enzyme ADN polymérase Taq (Invitrogen) dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ L.

Ces trois réactions d'amplification sont représentées sur le schéma ci-dessous :

10 ng cDNA *fgf-2*



1<sup>ère</sup> amplification (35 cycles) :  
dénaturation 15 s à 94°C  
hybridation 25 s à 55°C  
élongation 25 s à 70°C

*Fw4s.1* → .....cccGCCTTG  
CGGAAC.....ATGTCTGCTAAGAG  
TACAGACGATTCTCGact.... ← *Rv18h*



2<sup>ème</sup> amplification (35 cycles) :  
dénaturation 15 s à 94°C  
hybridation 25 s à 55°C  
élongation 25 s à 70°C

*Fw4s.2* → .....tcgGGGCCCGGGAC  
CCCGGGCCCTG...ATGTCTGCTAAGAG  
TACAGACGATTCTCGact.... ← *Rv18h*



3<sup>ème</sup> amplification (35 cycles) :  
dénaturation 1 min 10 s à 94°C  
hybridation 2 min à 55°C  
élongation 2 min 30 s à 70°C

*Fw4s.FGF* → .....gaagctTACCATGTTCGGGGCCCGGGAC  
ATGGTACAGCCCCGGGCCCTG...ATGTCTGCTAAGAG  
TACAGACgat.... ← *Rv18h*

**Tableau 2: Amorces utilisées lors des expériences de transcription inverse**

Gène et Taille du produit PCR (pb)	Séquence de l'amorce	Dénaturation	Hybridation	Elongation
4sfgf-2 (465 pb)	<b>Fw4s.1</b> 5'- GGGACGGCCGCGCCC GCCTTGCCCGAGGATGGC GGC -3'	15 s à 94 °C pour 1 cycle	25 s à 55 °C pour 35 cycles	25 s à 70 °C pour 35 cycles
	<b>Fw4s.2</b> 5'- GTCGGGGCCCGGGAC GGCCGCGCCCGCCTTGCC CGA -3'	15 s à 94 °C pour 1 cycle	25 s à 55 °C pour 35 cycles	25 s à 70 °C pour 35 cycles
	<b>Rv18h</b> 5'-CTCGAGTCAGCTCTTA GCAGACAT-3'			
	<b>Fw4sFGF</b> 5'-AAGCTTACCATGTC GGGGCCCGGA-3'	1 min à 94 °C pour 1 cycle	2 min à 55 °C pour 35 cycles	2 min 30 s à 70 °C pour 35 cycles
pré-pdgf-bb	<b>FwprePDGF</b> 5'- AAGCTTACCATG AATCGCTGCTGGGCG -3'	94 °C for 15 s	57 °C for 20 s	70 °C for 30 s
	<b>RvprePDGF</b> 5'-CTCGAGCTAGGC TCCAAGGGTCTCCTT -3'			
pdgf-bb (327 pb)	<b>FwPDGF</b> 5'-AAGCTTACCATGAG CCTGGGTTCCCTGACC -3'	1 min 10 s à 94 °C pour 1 cycle	2 min à 52 °C pour 35 cycles	2 min 30 s à 70 °C pour 35 cycles
	<b>RvPDGF</b> 5'-CTCGAGGGTCACAG GCCGTGCAGCTGC -3'			

### **1.5. Amplification du gène codant pour la protéine recombinante PDGF-BB**

L'ADNc issue de la RT-PCR sur l'ARN total isolé d'un échantillon de sang d'un donneur sain a servi de matrice pour l'amplification par PCR du gène *pdgf-bb* codant pour le facteur de croissance PDGF-BB.

Le fragment d'ADN codant pour la protéine recombinante PDGF-BB a été généré à la suite de deux réactions indépendantes de PCR en utilisant deux paires d'amorces différentes. La première amplification implique la paire d'amorces FwprePDGF/RvprePDGF (*tableau 2*) permettant d'amplifier le gène codant pour le précurseur du PDGF. La réaction d'amplification s'est effectuée selon les paramètres expérimentaux suivants: dénaturation de l'ADN matrice pendant 15 s à 94°C, appariement des amorces FwprePDGF et RvprePDGF à l'ADN matrice dénaturé durant 20 s à 57°C, et extension par la Taq polymérase de ces amorces durant 30 s à 70°C. Ce cycle a été répété 35 fois. À partir de ce fragment PCR, on a réalisé une amplification par nested PCR ou amplification interne du gène codant pour la protéine PDGF-BB se trouvant à l'intérieur de la région codant pour le précurseur de ce facteur de croissance. Pour ce faire, une paire d'amorce FwPDGF/RvPDGF (*tableau 2*) a été utilisée lors de la réaction d'amplification selon les conditions suivantes: dénaturation de l'ADN matrice pendant 1 min 10 s à 94°C, appariement des amorces FwPDGF et RvPDGF à l'ADN matrice dénaturé durant 2 min à 52°C, et extension par la Taq polymérase de ces amorces durant 2 min 30 s à 70°C pour générer un fragment de 327 nucléotides codant pour la protéine PDGF-BB. Ce cycle a été répété 35 fois. Une fois cloné dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1, le gène *pdgf-bb* est sous cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pVax-1<sup>®</sup> (Invitrogen).

### **1.6. Vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1 :**

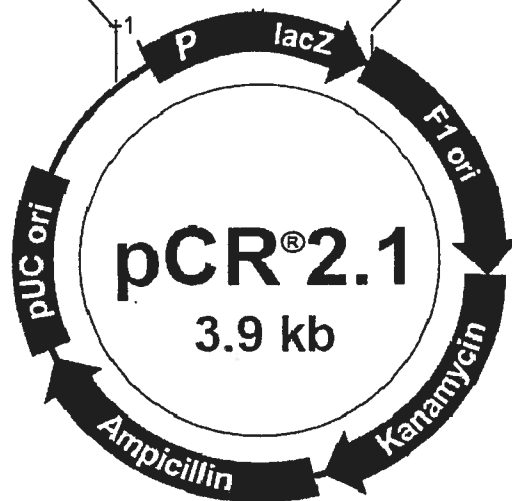
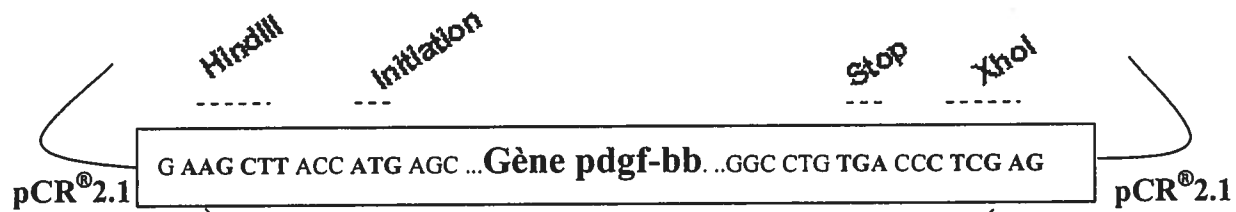
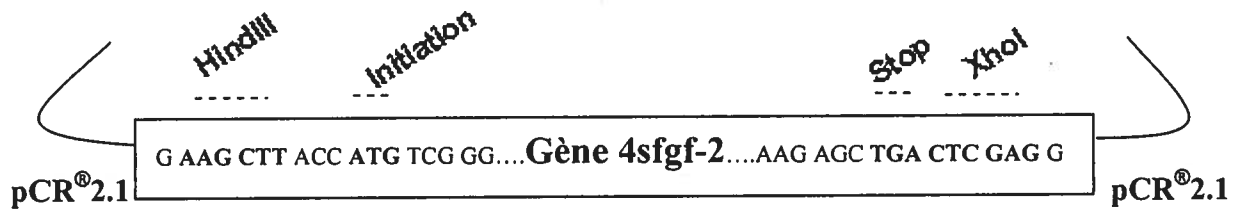
Les fragments amplifiés par PCR (*4sfgf-2* et *pdgf-bb*) ont été clonés dans le plasmide de clonage linéarisé pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen). Ce vecteur porte comme marqueurs de sélection, le gène de résistance à l'ampicilline et le gène de résistance à la kanamycine. De plus, le site de clonage se situe au niveau d'une portion du gène *LacZ* codant pour la partie N- terminale de la  $\beta$ -galactosidase d'*E.coli*, *LacZ*. Le peptide complémentaire codé par le gène *LacZ* est indispensable pour l'activité de l'enzyme dans la

bactérie hôte. En faisant croître les bactéries transformées par le vecteur pCR2.1 en présence d'un substrat artificiel (X-Gal, composé incolore) et d'ampicilline, on permet l'hydrolyse de ce substrat par l'enzyme fonctionnelle et la production de 5Br,4Cl-indol de couleur bleue (colonies bleues). Dans le cas de l'insertion d'un fragment dans le site de clonage du pCR2.1, l'expression du peptide complémentaire de la  $\beta$ -galactosidase par les bactéries transformées recombinantes est interrompue et ainsi les bactéries ne pourront plus digérer le X-Gal (colonies blanches). On peut ainsi sélectionner les colonies ayant intégré le vecteur recombinant sur un milieu contenant le substrat X-Gal et l'antibiotique.

Les fragments amplifiés 4sfgf-2 et pdgf-bb ont ainsi été clonés dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1. Les réactions de ligation ont été effectuées selon le protocole proposé par Invitrogen avec quelques modifications. Les rapports molaires insert : vecteur utilisés étaient de 3 :1 et la ligation dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 (*figure 6*) a été effectuée à l'aide de l'enzyme T4 ADN ligase catalysant la formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3' et l'extrémité 5' de deux nucléotides. Ainsi, la réaction a été réalisée à partir de 70 ng du produit PCR purifié et de 25 ng du plasmide pCR<sup>®</sup>2.1 dans un volume final de 10 $\mu$ L contenant du tampon de ligation (Tris-HCl 6 mM à pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 6mM, NaCl 5 mM, BSA 1 mg/mL,  $\beta$ -mercaptoéthanol 7 mM, ATP 0.1 mM, DTT 2 mM, spermidine 1 mM) et 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase (Invitrogen). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 16 heures dans un bain à 14°C. Les produits de ligation ont été utilisés pour transformer les bactéries compétentes *E.Coli* INV $\alpha$  F' tel que décrit dans la stion 1.7.

**Figure 6 : Représentation schématique des plasmides recombinants pCR2.1-4sfgf2 et pCR2.1-pdgf-bb à partir du vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen)**

Les fragments amplifiés 4sfgf-2 et pdgf-bb amplifiés par PCR, avec les sites de restrictions enzymatiques HindIII et XhoI à chacune de leurs extrémités, ont été clonés dans le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1 et l'intégrité des gènes a été vérifiée par séquençage.



Gène codant pour LacZ : 1-545 nt  
 Site de l'amorce universelle M13 Reverse : 205-221 nt  
 Promoteur T7 : 362-381 nt  
 Site de l'amorce universelle M13 Forward : 389-404 nt  
 Origine de répliation f1 : 546-983 nt  
 Gène de résistance à la kanamycine : 1317-2111nt  
 Gène de résistance à l'ampicilline : 2129-2989 nt  
 Origine de répliation pUC : 3134-3807 nt

### **1.7. Transformation de bactéries compétentes INV $\alpha$ F' par choc thermique**

Les plasmides recombinants pCR2.1-4sfgf-2 et pCR2.1-pdggf-bb ont été utilisés pour transformer les cellules compétentes *E.Coli* INV $\alpha$  F' (Invitrogen). Ainsi, 200 ng d'ADN plasmidique recombinant ont été ajoutés à 50 $\mu$ L de cellules compétentes *E.Coli* INV $\alpha$  F' en présence de 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercapto-éthanol 0,5 M. Les cellules sont gardées sur glace.

La transfection des plasmides dans les cellules compétentes est réalisée à l'aide d'un choc thermique. Tout d'abord, les tubes ont été incubés dans un bain de glace durant 30 minutes, les bactéries fragilisées sont placées à 42°C pendant 40 secondes pour permettre la pénétration des produits de ligation dans les bactéries. Les tubes sont ensuite transférés dans un bain de glace durant 2 minutes. Après l'ajout de 250  $\mu$ L de milieu nutritif SOC (2% p/p tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 20 mM de glucose pH7.0), les tubes ont été incubés à 37°C sous agitation constante (125 rpm) durant 1 heure pour favoriser la régénération des parois bactériennes. Des volumes de 50  $\mu$ L et 200  $\mu$ L des bactéries transformées ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant 20 mL de milieu nutritif Luria-Bertani agar ou LB agar (1.6% p/v de tryptone, 1% d'extrait de levure, 0.5% p/v de NaCl pH7.0, 1.5% agar), 50  $\mu$ g/mL de l'antibiotique kanamycine (Boehringer Mannheim, Allemagne) et 50mg/mL de substrat chromogène bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal, Diagnostic Chemicals Limited, USA). Les boîtes de Pétris ont été placées dans un incubateur à 37°C durant 18 heures avant le début de la sélection des colonies recombinantes.

### **1.8. Criblage des bactéries transformées par les plasmides recombinants pCR2.1-4sfgf-2 et pCR2.1-pdggf-bb**

La sélection des bactéries transformées se fait grâce à la kanamycine. Seules les bactéries résistantes, c'est-à-dire celles qui ont été transformées par le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 peuvent croître en présence de l'antibiotique. Une deuxième sélection concomitante permet de visualiser les colonies d'*E. coli* ayant été transformées par le vecteur recombinant pCR<sup>®</sup>2.1 (colonies bleues/blanches). En effet, le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 contient la séquence du gène de la  $\beta$ -galactosidase qui est exprimé suite à l'induction conférée par l'IPTG présent dans le milieu de culture. La  $\beta$ -galactosidase transforme son substrat (le X-gal, lui-aussi



contenu dans le milieu de culture) en colorant bleu. Or, le gène de la  $\beta$ -galactosidase contient le site de clonage qui permet l'insertion de séquences dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1. Sans insertion de séquence au niveau du site de clonage, le gène de la  $\beta$ -galactosidase n'est pas modifié et les bactéries transformées par le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 produisent la protéine  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle pouvant transformer son substrat X-gal en un composé bleu (colonies bleues). La présence de colonies blanches d'*E. coli* signifie que le substrat X-gal n'a pas été transformé, indiquant que la protéine  $\beta$ -galactosidase fonctionnelle n'est pas exprimée. Dans ce cas, le gène de la  $\beta$ -galactosidase a été modifié suite à l'insertion de l'ADN recombinant au niveau du site de clonage et les colonies de couleur blanche renferment des bactéries qui ont été transformées par le vecteur recombinant.

La sélection des bactéries transformées par les vecteurs pVax-1<sup>®</sup> incluant les gènes 4sfgf-2 ou pdgf-bb, a été faite selon leur capacité à résister à la kanamycine, et ce, grâce à la présence du gène de résistance à cet antibiotique dans le vecteur pVax-1<sup>®</sup>.

## **2. Construction des plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb**

L'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB dans un système eucaryote implique le clonage des ORFs codant pour chacune de ces protéines dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>®</sup> (Invitrogen). Ce dernier permet de diriger la production *in vivo* des protéines 4sFGF-2 et PDGF-BB suite à l'injection des vecteurs recombinants dans les cellules de souris Balb/c. L'utilisation d'un tel système offre l'avantage de produire une protéine fonctionnelle sous une conformation native.

### **2.1. Le vecteur d'expression eucaryote pVax-1<sup>®</sup> :**

Le vecteur d'expression pVax-1 (*figure 7*) d'une taille de 3.0 kb contient l'origine de répllication du vecteur pUC, le gène de résistance à la kanamycine pour permettre la sélection des bactéries transformées et un site de clonage multiple. La séquence promotrice du gène du cytomégalovirus humain (CMV) assure un haut niveau transcriptionnel de l'insert *in vivo* (Boshart, Weber et al. 1985). Ce vecteur possède également des signaux de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH) capables de stabiliser les ARNm transcrits en leur ajoutant un segment poly(A).

Le vecteur pVax-1 a été amplifié dans la souche bactérienne E.Coli INVα F' et purifié à l'aide du système PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep (Invitrogen) selon les suggestions du fabricant et tel que décrit dans la stion 3.1.1. L'ADN plasmidique a été quantifié par spectrophotométrie à 260 nm et à 280 nm.

## **2.2. Digestion enzymatique**

Le plasmide pVax-1 (25ng) utilisé pour le clonage des gènes 4sfgf-2 et pdgf-bb est linéarisé par les endonucléases HindIII et XhoI (5 unités de chaque enzymes). La réaction est réalisée à 37°C pendant 1 heure. Le produit de digestion est précipité par un mélange éthanol 100%/ acétate de sodium 3mM (2.5 vol /0.1 vol), puis lavé dans l'éthanol 70%. Le culot est séché et repris dans un petit volume d'eau distillée (20 µL). La linéarisation est vérifiée sur gel d'agarose 0.8%.

## **2.3. Sous-clonage des gènes 4sfgf-2 et pdgf-bb dans le vecteur pVax-1<sup>®</sup> :**

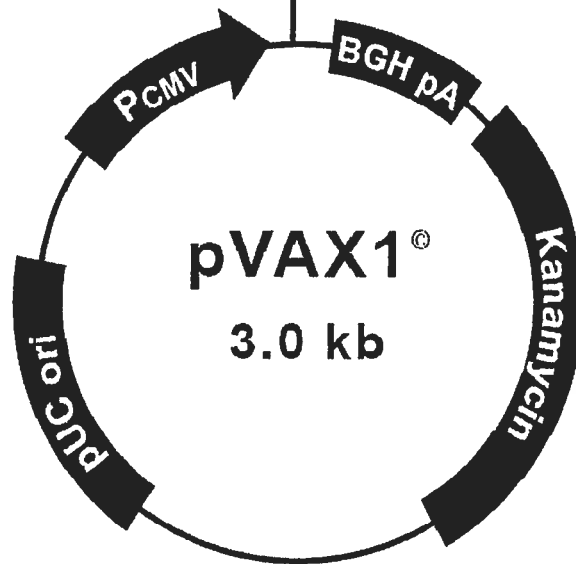
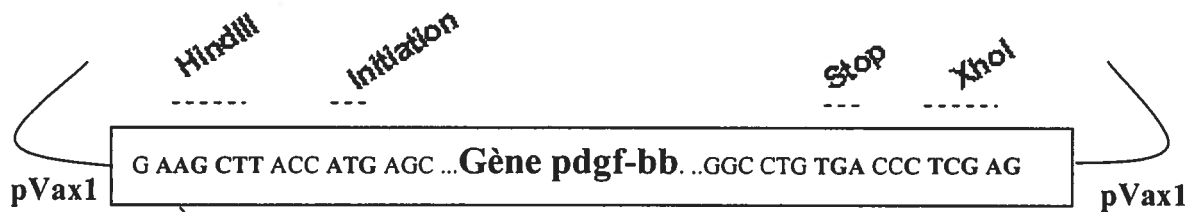
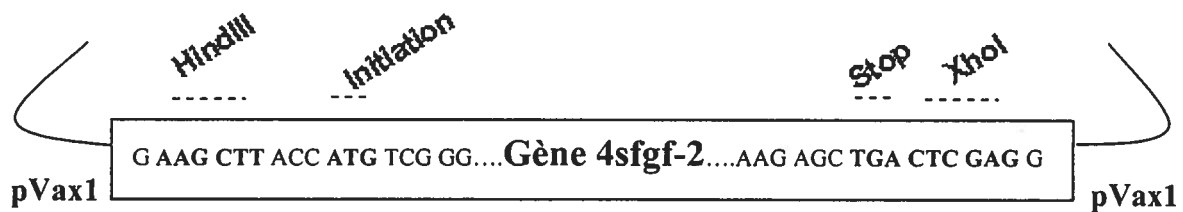
Les séquences de gènes 4sfgf-2 et pdgf-bb issus des réactions d'amplification décrites dans les stions 1.4 et 1.5, ont été clonés dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1, en utilisant le système de clonage « TA cloning<sup>®</sup> Kit » de Invitrogen permettant une insertion directe des fragments PCR dans le plasmide de clonage (*figure 6*). Ce système prend avantage de l'activité de l'ADN polymérase Taq à ajouter des simples déoxyadénosines (A) de part et d'autres des extrémités de toutes les amplicons doubles brins.

Ces A-dépassants sont utilisés pour insérer les amplicons dans le vecteur linéarisé et dont les extrémités T-dépassants sont utilisées comme site d'insertion.

Lors des expériences d'amplification par PCR des fragments de gènes 4sFGF-2 et pdgf-bb, les extrémités 5' et 3' de ces derniers ont été modifiés en leur introduisant les sites de restriction enzymatique *HindIII* et *XhoI* de part et d'autres de ces extrémités. Après avoir été stabilisés dans le vecteur de clonage pCR<sup>®</sup>2.1, ces gènes ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pVax-1<sup>®</sup> (Invitrogen).

**Figure 7 : Représentation schématique des plasmides recombinants pVax1-4sfgf2 et pVax1-pdgf-bb à partir du plasmide pVax-1<sup>®</sup> (Invitrogen)**

Les séquences de gènes 4sFGF-2 et pdgf-bb ont été sous clonées dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>®</sup>, au niveau des sites de restriction enzymatiques *HindIII* et *XhoI*, afin d'exprimer les protéines recombinantes respectives 4sFGF-2 et PDGF-BB dans un système eucaryote.



Promoteur CMV : 137-724 nt  
 Promoteur T7 : 664-683 nt  
 Site de clonage multiple : 696-811 nt  
 Site de l'amorce BGH reverse : 823-840 nt  
 Signal de polyadénylation du BGH : 829-1053 nt  
 Gène de résistance à la kanamycine : 1226-2020 nt  
 Origine de répliation pUC : 2320-2993 nt

Les séquences 4sFGF-2 et pdgf-bb clonées dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 ont été digérées à l'aide des enzymes de restriction *HindIII* et *XhoI*, tel que décrit dans la stion 3.1.2.1, puis ont été insérées de façon directionnelle dans le site de clonage multiple du vecteur pVax-1<sup>®</sup> (Invitrogen) linéarisé à l'aide des mêmes endonucléases (*figure 7*). La réaction de ligation a été réalisée à partir de 7 µg du produit PCR purifié et de 0.2 µg du plasmide pVax-1<sup>®</sup> dans un volume final de 10µL contenant du tampon de ligation (Tris-HCl 50 mM à pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1mM, 5% (w/v) de polyéthylène glycol-8000) et 4 unités de l'enzyme T4 ADN ligase (Invitrogen). Le mélange réactionnel a été incubé 16 heures dans un bain à 14°C pour faciliter la ligation. Les produits de ligation ont été utilisés pour transformer les bactéries compétentes INVα F'.

### **3. Production des vecteurs recombinants nécessaires à l'immunisation génétique**

#### **3.1. Purification des plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb**

L'amplification et la purification des plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb nécessitent une étape de vérification de l'intégrité de la construction plasmidique à l'aide d'une minipréparation. Cette dernière consiste à prélever et ensemercer les colonies bactériennes transformées par les plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb dans 5 mL de milieu LB supplémenté par 50 µg/mL de kanamycine. La croissance des bactéries est déclenchée à 37°C sous agitation. Ces conditions sont maintenues durant une nuit afin d'atteindre la phase exponentielle de croissance des bactéries. La suspension bactérienne est centrifugée à 10 000 g pendant 1 min, et le culot bactérien est utilisé pour la purification de l'ADN plasmidique suivant le protocole du kit « QIAprep Spin Miniprep » (Qiagen). Une digestion enzymatique du plasmide purifié, réalisé par les endonucléases *HindIII* et *XhoI* génère, si les ADNc 4sfgf-2 et pdgf-bb sont intégré correctement dans le plasmide pVax-1, deux fragments de 3.0 kb et 468 pb ou 3.0 kb et 327 pb respectivement. Les produits de digestion sont visualisés sur gel d'agarose 0.8%.

Pour les expériences *in vitro* et *in vivo*, l'extraction et la purification des vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb ont été réalisées en utilisant le système PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep (Invitrogen). La quantité d'ADN purifiée par cette

méthode est de l'ordre de 2,5 mg d'ADN par colonne à partir d'une culture bactérienne initiale de 1 L.

### **3.1.1. Maxi-préparation des ADN plasmidiques pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdggf-bb**

Pour la purification et la caractérisation des plasmides recombinants pCR2.1-4sfgf-2, pCR2.1-pdggf-bb, pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdggf-bb, le système PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep (Invitrogen) a été utilisé.

À partir de chaque culture de bactéries *E.Coli* INVα F' recombinantes, un volume de 1ml a été prélevé puisensemencé dans 500 mL de milieu liquide LB contenant 50µg/mL de kanamycine. Suite à une incubation de 16 heures à 37°C sous agitation, les cultures bactériennes ont été divisées en 2 fractions de 250 mL puis centrifugées à 4000 g durant 10 minutes à 4°C. Chaque culot bactérien a été resuspendu dans 10 mL de tampon de suspension (Tris-HCl 50mM pH8.0, EDTA 10 mM, RNase A 20 mg/mL). Les parois bactériennes ont été digérées suite à une incubation en présence de 10 mL de tampon de lyse (NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v)) pendant 5 minutes à la température ambiante. Les lysats bactériens ont été ensuite neutralisés par une incubation de 20 minutes sur glace avec 10 mL de tampon neutralisant (pH5.5) contenant 3.1 M d'acétate de potassium. Une centrifugation à 15 000 x g a été effectuée pendant 10 minutes à la température ambiante pour éliminer les débris cellulaires, l'ADN génomique, les protéines ainsi que le SDS. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique a été déposé sur une colonne de résine échangeuse d'anions (PureLink™ HiPure Maxi, (Invitrogen)) préalablement équilibrée avec une solution à pH neutre (acétate de sodium 0.1M, pH5.0 ; NaCl 0.6M, Triton® X-100 0.15% (v/v)). La colonne a ensuite été lavée une fois à l'aide de 60mL de tampon de lavage (acétate de sodium 0.1 M, pH5.0 ; NaCl 800 mM). L'élution de l'ADN plasmidique a été effectuée en appliquant sur la colonne un volume de 15ml de tampon d'élution (Tris-HCl 100 mM, pH8.5 ; NaCl 1.25 M). Suite à l'ajout d'un volume de 10.5 mL d'isopropanol, l'ADN plasmidique a été précipité par centrifugation à 15 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le précipité obtenu a été lavé avec 5 mL d'éthanol 70% puis centrifugé à 15 000 x g pendant 5 minutes à 4°C. Une fois le culot séché durant 10 minutes, l'ADN plasmidique a été resuspendu dans un volume de 500 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM,

pH8.0 ; EDTA 0.1 mM). La quantification et la pureté ont été déterminées par mesure de la densité optique à 260/280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

### **3.1.2. Caractérisation des plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb**

#### **3.1.2.1. Digestion par les enzymes de restriction *HindIII* et *XhoI***

La présence des gènes 4sfgf-2 et pdgf-bb dans les vecteurs recombinants purifiés a été confirmée suite à une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestion des vecteurs recombinants par les endonucléases de restriction *HindIII* et *XhoI* (Invitrogen). Brièvement, 0.4 µg d'ADN plasmidique purifié a été incubé en présence de 5 unités des enzymes de restriction *HindIII* et *XhoI* et du tampon de digestion *react*® 2 1X (Tris-HCl 50 mM pH8.0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 50 mM) (Invitrogen) dans un volume final de 10 µL, pendant 1 heure à 37°C.

Le fragment d'une taille de 465 pb correspondant au gène 4sfgf-2, et le fragment d'une taille de 327 pb correspondant au gène pdgf-bb ont été excisés du gel à l'aide d'un scalpel puis placés dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL préalablement pesés. La purification des produits de digestion a été réalisée à l'aide de la trousse Sephaglas BandPrep (Amersham Pharmacia). Le volume du fragment de gel d'agarose contenant l'ADN a été estimé à partir de son poids en grammes. Les mêmes volumes d'une solution d'iodure de sodium (NaI) ont été ajoutés aux microtubes contenant les échantillons de gel d'agarose-ADN. Les tubes ont ensuite été incubés pendant 5 à 10 minutes à 60°C, jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Un volume de 5 µL d'une suspension de billes Sephaglass BP (20% (p/v) Sephaglass BP resuspendues dans de l'eau distillée contenant 0.15% de Kathon® CG/ICP Biocide) a été ajouté à chacun des tubes qui ont été incubés 5 minutes à la température ambiante sous agitation de façon à favoriser le contact des billes de Sephaglas avec l'ADN. Les tubes ont été ensuite centrifugés à 13 000 x g durant 30 secondes et le surnageant a été décanté. Les culots contenant les billes de silice sur lesquelles l'ADN s'est fixé, ont été lavés 3 fois avec 80 µL de solution de lavage (Tris-HCl

20 mM, pH8.0, EDTA 1 mM, NaCl 0.1 mM et de l'éthanol 95%). Les culots contenant l'ADN-Sepaglas ont été séchés sous la hotte à flux laminaire durant 10 minutes.

Les fragments d'ADN correspondants aux séquences du 4sfgf-2 ou du pdgf-bb ont été élués en incubant les culots dans un volume de 20 µL d'eau distillée stérile dans chaque tube pendant 5 minutes à la température ambiante. Après une centrifugation à 13 000 x g durant 1 minute, les surnageants contenant l'ADN purifié ont été récupérés et transférés dans des tubes Eppendorf stériles. Les ADN ainsi purifiés ont été conservés à -20°C.

### **3.1.2.2. Séquençage des vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb**

Afin de vérifier l'intégrité des fragments d'ADN 4sfgf-2 et pdgf-bb insérés dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>©</sup>, chacun des deux brins d'ADN recombinants ont été séquençés en utilisant la technique de Sanger (Genome Québec Université de McGill) (Sanger, Nicklen et al. 1977). Cette technique utilise la réaction de polymérisation de l'ADN avec la sequenase, une polymérase T7, et des didésoxyribonucléotides (ddNTP). La polymérisation de l'ADN est initiée par une amorce complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par la polymérase. Les quatre désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration les quatre 2'-3'didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Ces didésoxynucléotides, une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, arrêtent l'élongation. Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les chromatogrammes générés par le séquenceur sont analysés avec le logiciel Chromas 1.34. Ce logiciel, dont la fonction d'analyse est l'interprétation des chromatogrammes d'électrophorèse, procède à un traitement mathématique des données d'intensité de fluorescence des fragments d'ADN qui passent devant le détecteur. Le résultat de ces traitements est l'attribution d'un nucléotide aux différents pics de fluorescence obtenus. Les séquences nucléotidiques obtenues à l'aide du programme BioEdit v.7.0.5 correspondent aux séquences des fragments d'ADN 4sfgf-2 et pdgf-bb. Ces dernières clonées dans le plasmide pVax, sont 100% homologues aux séquences des gènes fgf-2 et pdgf-bb disponibles dans la banque de données GenBank/EMBL. Les



bactéries contenant les vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb, caractérisés par séquençage, ont été conservées à – 80°C dans un volume de 1mL de milieu de culture LB en présence de kanamycine et de DMSO (7 % v/v).

#### **4. Formulations de chitosane utilisées comme système de livraison des vecteurs recombinants**

##### **4.1. Caractéristiques du chitosane**

Pour la réalisation de notre projet de recherche, trois formulations différentes de chitosane bien caractérisées par leur capacité à transfecter *in vitro* les lignées cellulaires HEK 293 (Lavertu, Methot et al. 2006), ont été utilisées. Ces formulations de chitosane ont un degré de déacétylation (DDA) variant de 80% à 92%, et sont classiquement décrites de la manière suivante : 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 où chaque nombre représente respectivement le degré de déacétylation, le poids moléculaire et le rapport N/P (l'azote étant apporté par le chitosane et le phosphate par l'ADN) tel que décrit dans le *tableau 3*, soit [DDA-MW- N:P ratio].

Le chitosane est un polymère soluble en milieu acide. En effet, une protonisation complète des groupements amine par une solution acide favorise la dissolution du chitosane (Cho, Jang et al. 2000). Ainsi, les trois formulations de chitosane ont tout d'abord été dissoutes dans de l'eau distillée stérile à une concentration de 5mg/mL. Afin de maintenir un rapport monomères de glucosamine : HCl de 1 :1, un volume  $V_{HCl}$  donné d'une solution acide (HCl à 1N) est ajouté où  $M_{monomère}$  est la masse molaire du chitosane, selon la formule suivante :

$$V_{HCl} (mL) = \frac{\left[ \frac{\text{Masse chitosane pesée (mg)}}{M_{monomère} (g/mol)} \times \frac{\text{DDA} (\%)}{100} \right] \times 1000}{\text{Concentration HCl (mol/L)}}$$

**Tableau 3: caractéristiques physicochimiques des formulations de chitosane utilisées pour l'étude**

<b># Chitosane</b>	<b>DDA (%)</b>	<b>M<sub>n</sub> (kDa)</b>	<b>N:P ratio(X:1)</b>
AM081	92	10	5
AM057	80	10	10
AM057-1	80	80	5

Les tubes contenant chacune des formulations de chitosane ont été incubés durant la nuit sous agitation afin d'assurer une dissolution complète du chitosane. Ces solutions peuvent être conservées un mois à la température ambiante après leur date de préparation.

Les complexes chitosane/ADN plasmidique ont été préparés en mélangeant les solutions de chitosane fraîchement préparées avec les vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2, pVax1-pdgf-bb, pVax1-lacZ et le vecteur d'expression pVax-1. Ainsi, les solutions d'ADN plasmidique sont diluées à la concentration finale de 0.33mg/mL dans une solution tampon stérile de Tris-EDTA (Invitrogen). Les formulations de chitosane nécessaires à la complexation de l'ADN sont diluées dans de l'eau stérile à la concentration appropriée selon le ratio N :P désiré ; les rapport de 5 :1 à 10 :1 ont été utilisés sachant qu'avec ces rapports nous observons une meilleure efficacité de transfection *in vitro* (Lavertu, Methot et al. 2006). Les solutions de chitosane ainsi préparées sont ajoutées dans chaque tubes contenant une suspension d'ADN plasmidique (pVax1-4sfgf-2, pVax1-pdgf-bb, pVax1-lacZ ou pVax-1) à volume égal soit 100µL de chaque solution, ceci afin de minimiser la formation de gradients de concentration. Après les avoir homogénéisées, les solutions ont été incubées pendant 30 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes entre le chitosane et l'ADN. Suite à cette période d'incubation, les complexes ont directement été utilisés soit pour des tests d'efficacité du chitosane dans la protection d'ADN contre les endonucléases, soit pour des tests de transfection cellulaire *in vitro* et *in vivo*.

#### **4.2. Capacité du chitosane à protéger l'ADN plasmidique contre les endonucléases**

La capacité du chitosane à protéger l'ADN contre les endonucléases a déjà été démontrée par plusieurs équipes de chercheurs. Dans un premier temps, nous avons testé la capacité du chitosane à protéger l'ADN plasmidique pVax1<sup>®</sup>LacZ contre la digestion par l'enzyme DNase I. Pour ce faire, 8 µg d'ADN nu pVax1<sup>®</sup>LacZ dilué dans 25 µl d'une solution stérile de Tris-EDTA (TE), ou 100 µL d'une suspension de complexes chitosane/ADN plasmidique ou nanoparticules, contenant 16 µg d'ADN plasmidique, ont été incubés durant 20 min à 37°C en présence de la *DNase I* (8 U par µg d'ADN). La réaction enzymatique a été arrêtée dans un bain-marie à 65°C en présence de 20 mM de EGTA, un

inhibiteur de DNase I (éthylène glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) pendant 10 minutes. Suite à la désactivation de la *DNase I*, l'intégrité du plasmide pVax1<sup>®</sup>lacZ d'environ 6050 pb a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%.

#### **4.3. Capacité du chitosane à livrer l'ADN dans les lignées cellulaires HEK293 et HeLa CCL-2**

Nous avons testé l'efficacité des formulations de chitosane 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 [DDA-MW- N:P ratio] à livrer l'ADN plasmidique pVax1-LacZ dans un modèle *in vitro* utilisant deux lignées cellulaires humaines HEK293 et HeLa CCL-2.

##### **4.3.1. Lignées cellulaires et conditions de culture**

Deux lignées cellulaires humaines ont été utilisées dans les expériences de transfection *in vitro*. La lignée HEK293 (ATCC #CRL 1573) est une lignée de cellules primaires de rein embryonnaire humain immortalisées par transformation avec un adénovirus de type 5. Cette lignée a été maintenue en culture, à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, dans le milieu Dulbecco's Minimum Essential Medium (Eagle, DMEM, Invitrogen) contenant 5% de sérum de veau foetal décomplémenté à 56°C pendant 10 min en présence de 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 2 mM de L-Glutamine.

La lignée HeLa CCL-2 (ATCC) est une lignée cellulaire adhérente issue d'un tissu épithélial du cerveau. Cette lignée a été maintenue en culture, à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, dans le milieu Dulbecco's Minimum Essential Medium (Eagle, DMEM, Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau foetal inactivé, 1.5 g/L de bicarbonate de sodium, 0.1 mM d'acides aminés non-essentiels, 1.0 mM de pyruvate de sodium et 2 mM de L-Glutamine.

Les passages cellulaires ont été effectués de façon à avoir une densité de 10<sup>6</sup> cellules/mL, ce qui représentait un passage par intervalle de 3 jours. Le nombre de cellules vivantes a été déterminé à l'aide d'un hématimètre, par exclusion du bleu de trypan 1% préparé dans du PBS.

#### **4.3.2. Transfection *in vitro* de lignées cellulaires par le plasmide pVax1-LacZ complexé au chitosane ou à la lipofectamine**

Les lignées cellulaires HEK293 et HeLa en phase logarithmique de croissance avec une viabilité d'environ 90% ont été utilisées dans ces expériences de transfection. Dans des plaques de culture 24 puits sont déposées environ  $0.2 \times 10^6$  cellules HEK293 et  $0.3 \times 10^6$  cellules HeLa par puits. Chacune des lignées est contenue dans 0.5mL de leur milieu de culture DMEM respectif tel que décrit précédemment. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 3 jours de façon à atteindre une population cellulaire confluente à 90%.

Pour la transfection à la lipofectamine, 2 µg d'ADN plasmidique pVax1-LacZ sont dilués dans 100 µL de milieu de culture sans sérum, Opti-MEM (Invitrogen) et mélangés délicatement. Des volumes différents de lipofectamine (2 µL, 4 µL et 6 µL) ont été dilués dans trois tubes stériles contenant du milieu Opti-MEM dans un volume final de 100 µL avant d'être incubés 25 min à la température ambiante. La lipofectamine a été ensuite ajoutée à l'ADN plasmidique pVax1-LacZ pour donner un volume final de 200 µL. Le tout a été mélangé délicatement à la pipette et incubé 20 min à la température ambiante. Suite à cette incubation, un complexe liposome/ADN plasmidique (lipoplexe) s'est formé et servira à la transfection des lignées cellulaires. 100 µL de ce mélange a été réparti dans un puits d'une plaque 24 puits contenant les cellules confluentes dans 0.5mL de milieu de culture DMEM et la plaque a été placée sur un agitateur pour favoriser la transfection cellulaire. Après 6 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>, le mélange de transfection est remplacé par 0.5 mL de milieu de culture frais et les plaques de cultures sont incubées pour une durée de 48 heures avant de procéder à une coloration X-Gal sur les cellules transfectées avec pVax1-LacZ afin d'évaluer le taux de transfection cellulaire (le choix de la technique d'évaluation est dictée par le gène rapporteur utilisé soit le gène LacZ).

Le protocole de transfection cellulaire à l'aide du chitosane a été réalisé en incubant les cellules confluentes avec chacun des trois complexes chitosane/ADN plasmidique 92-10/pVax1-LacZ, 80-10/pVax1-LacZ et 80-80/pVax1-LacZ. Brièvement, l'ADN

plasmidique pVax1-LacZ est dilué dans une solution stérile de Tris-EDTA à la concentration finale de 0.33 mg/mL. Les solutions mères de chitosane sont diluées dans un volume d'eau stérile selon le rapport N :P désiré comme décrit dans le *tableau 3*, puis stérilisées à l'aide d'un filtre de 0.22  $\mu$ m. Un volume de 60  $\mu$ L de chaque solution de chitosane fraîchement diluée ont été ajoutés à 60  $\mu$ L d'ADN pVax1-LacZ préparé à la concentration 0.33 mg/mL. Le chitosane et l'ADN plasmidique ont été mélangés délicatement à la pipette et incubés 30 min à la température ambiante pour permettre la formation de complexes chitosane/ADN plasmidique. Un volume de 18  $\mu$ L de ce mélange chitosane/ADN plasmidique, contenant 3  $\mu$ g d'ADN plasmidique pVax1-LacZ, est ajouté à 500 $\mu$ L d'un milieu de culture au pH ajusté pour favoriser la livraison d'ADN par le chitosane dans les lignées cellulaires. La totalité de ce mélange, soit 518  $\mu$ L, est déposé sur chacun des puits d'une plaque 24 puits dans laquelle se trouvent les cellules confluentes en présence de 0.5 mL de milieu de culture DMEM. La plaque de culture est ensuite placée sur un agitateur pour favoriser la transfection cellulaire. Après 24 heures d'incubation à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>, le mélange de transfection est remplacé par 1mL de milieu de culture frais en présence de sérum de veau fœtal. Les plaques de culture sont incubées durant 48 heures avant d'évaluer le taux de transfection cellulaire par une coloration X-Gal.

Dans les expériences de transfection, les contrôles étaient les suivants : un puits a été mis en présence de 3  $\mu$ g d'ADN plasmidique pVax1-LacZ seul contenant le gène de la  $\beta$ -galactosidase (Invitrogen), un puits a été mis en présence de chitosane seul et un dernier puits de cellules a servi de contrôle négatif ne contenant ni système de livraison d'ADN (lipofectamine, chitosane) ni ADN plasmidique pVax1-LacZ.

Les colorations X-Gal des lignées cellulaires HEK293 et HeLa ont été réalisées de manière à évaluer l'efficacité de transfection de ces différentes lignées par les formulations de chitosane 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5. Le gène "marqueur" LacZ est un gène bactérien qui code pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. Cette enzyme résiste à la dégradation par les protéases se trouvant dans les lysats cellulaires et son activité enzymatique est facilement mesurable. La  $\beta$ -galactosidase catalyse l'hydrolyse du substrat chromogène X-Gal, la réaction libérant un produit de couleur bleue. Les colorations X-Gal des différentes lignées

cellulaires ont été faites tel que décrit par Ausubel et collaborateurs (2000). Les surnageants des cultures cellulaires HEK293 et HeLa ont été éliminés puis les cellules ont été fixées avec 500 $\mu$ L d'une solution de 0,2% glutaraldéhyde-4% paraformaldéhyde-PBS pendant 10 minutes. Les cellules ont été ensuite lavées trois fois avec une solution de PBS 1X, puis ont été colorées avec la solution X-Gal (4 mM  $K_3Fe(CN)_6$ ; 4 mM  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ; 2 mM  $MgCl_2$ ; 50  $\mu$ L/mL X-Gal à 2% dans le PBS 1X). Après 18 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère à 5% de  $CO_2$ , les puits contenant les différentes lignées cellulaires, HEK293 et HeLa, ont été observés au microscope optique. Le nombre de cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase bleue est proportionnel au taux d'efficacité de transfection cellulaire que nous avons pu déterminer après observation des cultures cellulaires sous le microscope.

## 5. Immunsation génétique de souris Balb/c

### 5.1. Protocole des immunsations

#### 5.1.1. Groupes de souris et matériel d'immunsation

Toutes les expériences sur les souris ont été réalisées selon les recommandations du Comité institutionnel des soins aux animaux et de leur utilisation (CISAU). Les expériences d'immunsation ont été réalisées sur 18 groupes de 3 souris femelles Balb/c, âgées de 4 à 6 semaines et dont le poids variait entre 15 et 20g (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada). Les immunsations génétiques par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire ont été effectuées chacune sur neuf groupes de souris.

Le protocole d'immunsation des souris Balb/c est résumé dans le *tableau 4*. Les souris du groupe I et II, servant de contrôles négatifs tout au long des expériences d'immunsation, ont reçu respectivement des injections de solution saline PBS 1X (pH 7.4) par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire.

Les souris du troisième et quatrième groupe, servant de témoins négatifs pour les tests d'immunsation génétique par le plasmide recombinant pVax1-4sfgf-2, ont reçu des injections de vecteurs plasmidiques recombinants pVax1-4sfgf-2 par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement. Quant au cinquième et sixième groupe, les souris ont reçu des injections de vecteur plasmidique recombinant pVax1-pdgf-bb par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement.

Les groupes VII   XVIII ont reçu des injections d'ADN plasmidique, pVax1-4sfgf-2 ou pVax1-pdgf-bb, encapsulé par une des trois formulations de chitosane 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 formant ainsi des nanoparticules ou complexes Chitosan/ADN. Brièvement, les groupes VII et VIII ont reçu des injections de complexes 92.10/pVax1-4sfgf-2 par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement. Les groupes de souris IX et X ont reçu les complexes 92.10/pVax1-pdgf-bb par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement. Les groupes XI et XII ont reçu les complexes 80.10/pVax1-4sfgf-2 par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement. Les



groupes de souris XIII et XIV ont reçu les complexes 80.10/pVax1-pdgf-bb par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement. Enfin, les groupes XV et XVI ont reçu les complexes 80.80/pVax1-4sfgf-2 par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement ; tandis que les souris du dix-septième et dix-huitième groupe ont reçu les complexes 80.80/pVax1-pdgf-bb par voie sous-cutanée et par voie intramusculaire respectivement.

Excepté les groupes témoins I et II ayant reçu des injections de PBS, tous les groupes de souris ayant reçu des injections par voie sous-cutanée ont reçu 165 µg d'ADN plasmidique et les groupes de souris reçus des injections par voie intramusculaire ont reçu 50 µg d'ADN plasmidique.

Pour les expériences d'immunisation par voie sous-cutanée, les souris ont reçu un volume final de 1 mL par injection, alors que les souris immunisées par voie intramusculaires ont reçu un volume final de 100 µL par injection soit 50 µL par patte postérieure.

#### **5.1.2. Calendrier et voie d'immunisation : injections et prélèvements**

Lors des immunisations par voie sous-cutanée, les souris ont été injectées au niveau du cou, à l'aide d'une seringue hypodermique équipée d'une aiguille 25G. Ces injections ont été effectuées aux jours 0, 7, 14, 35, 49 et 63. Lors des immunisations par voie intramusculaire, les souris ont été injectées au niveau du quadriceps caudal des pattes postérieures à l'aide d'une aiguille 26G aux jours 0, 7, 14, 35, 49 et 63. Un prélèvement sanguin a été effectué sur les souris avant chaque injection. Un volume de sang variant de 50 à 100 µL a été prélevé à partir de la veine faciale de chaque souris à l'aide d'une aiguille 21G avant chaque injection. Les souris ont été pesées à chaque intervention. Au jour 77 post-injection, les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO<sub>2</sub> avant de subir un prélèvement sanguin final intracardiaque. Les sérums ont été récupérés des échantillons sanguins, après une centrifugation à 3 000 x g pendant 15 minutes, puis conservés à - 70°C jusqu'à analyse ultérieure.

## 5.2. Évaluation de la réponse immunitaire

### 5.2.1. Détermination quantitative des concentrations en protéines 4sFGF-2 et PDGF-BB

Des tests ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ont été effectués pour doser les protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB présentes dans les sérums murins. Pour le dosage des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB nous avons utilisé le test ELISA (*human FGF basic, Quantikine*) et le test ELISA (*human PDGF-BB, Quantikine*) de R&D Systems. Les puits de chacun des plateaux à fond plats tapissés avec des anticorps primaires spécifiques, anti-FGF-2 ou anti-PDGF-BB, sont lavées 2 fois avec une solution de lavage. Des volumes de 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de protéine standard FGF-2 à 320  $\text{pg/mL}$  ou de protéine standard PDGF-BB à 2000  $\text{pg/mL}$ , ont été ajoutés au premier puits contenant préalablement 100  $\mu\text{L}$  de diluant. À partir de ces premiers puits, une série de dilution a été effectuée dans les autres puits contenant également 100  $\mu\text{L}$  de diluant soit les dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 pour chacune des deux protéines standards FGF-2 et PDGF-BB.

Cette série de dilutions a permis d'établir deux courbes standards, l'une pour la protéine humaine FGF-2 et l'autre pour la protéine standard PDGF-BB. Des volumes de 100  $\mu\text{L}$  de sérums de souris Balb/c dilués (1/200) ont été transférés dans chaque puits contenant 100  $\mu\text{L}$  de diluant avant une incubation de 2 heures sur une plaque agitatrice. Tous les sérums ont été testés en duplicata. Chaque puits a ensuite été lavé 4 fois avec 400  $\mu\text{L}$  d'une solution de lavage, puis incubé pendant 2 heures sur une plaque agitatrice en présence de 200  $\mu\text{L}$  d'anticorps secondaire monoclonaux anti-FGF-2 produits chez la souris ou d'anticorps secondaire polyclonal anti-PDGF-BB couplés tous les deux à la peroxidase « *Horseradish peroxidase- HRP* » (R&D Systems, Minneapolis, MN). Suite à 4 lavages consécutifs, le développement est réalisé durant 30 minutes à l'abri de la lumière en présence du substrat 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) à raison de 200  $\mu\text{L}$ /puits. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50  $\mu\text{L}$ /puits d'une solution d'acide sulfurique 2N dès l'apparition de la couleur bleue dans les puits. La coloration passe du bleu au jaune et la densité optique est lue à 450 nm sur un lecteur de plaque « Digiscan microplate ».

**Tableau 4: immunisation génétique des souris Balb/c**

Groupes d'animaux S.C*	I.M#	Nombre par groupe	Traitement s.c et i.m	fréquence	ADN par souris S.C	ADN par souris I.M
I	II	3	PBS	6	-	-
III	IV	3	pVax-1/4sfgf-2	6	165µg	16.5 µg
V	VI	3	pVax-1/pdGF-bb	6	165 µg	16.5 µg
VII	VIII	3	92.10.5 – pVax-1/4sfgf -2	6	165 µg	16.5 µg
IX	X	3	92.10.5 – pVax-1/pdGF-bb	6	165 µg	16.5 µg
XI	XII	3	80.10.10 – pVax-1/4sfgf-2	6	165 µg	16.5 µg
XIII	XIV	3	80.10.10 – pVax-1/pdGF-bb	6	165 µg	16.5 µg
XV	XVI	3	80.80.5 – pVax-1/4sfgf -2	6	165 µg	16.5 µg
XVII	XVIII	3	80.80.5 – pVax-1/pdGF-bb	6	165µg	16.5 µg

\* Injection sous-cutanées

# Injection intramusculaire

Les courbes standards ont permis de déterminer les quantités (en pg) de protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB présentes dans les sérums prélevés en utilisant le logiciel Digiwin Software 3.1 (ASYS Hitech GmbH, Phoenix Biotech Corp., Canada). La limite de détection de la protéine recombinante FGF-2 par ce test ELISA est de 3 pg/ml alors que celle de la protéine recombinante PDGF-bb est de 15 pg/ml.

### **5.2.2. Détermination des titres d'anticorps anti-4sFGF-2 et anti-PDGF-BB**

Afin de déterminer le titre des anticorps spécifiques des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-bb dans les sérums prélevés, un test ELISA indirect a été mis au point.

Dans des plateaux 96 puits (NuncImmuno™, Nalge Nunc International, Rochester, NY), une quantité de 100 pg de protéine recombinante humaine FGF-2 (rhFGF basic, R&D Systems, Minneapolis, MN) ou 2 000 pg de protéine recombinante humaine PDGF-BB (Biosource International) ont été transférées dans chaque puits et incubées durant 12 heures à 4°C. Les plateaux ont été ensuite lavés à l'aide de 300 µL/puits d'une solution de lavage (PBS 10 mM, 0.05% Tween 20, pH7.2) afin d'éliminer les protéines non adsorbées au fond des puits. Les sites libres présents ont été saturés en présence de 300 µL d'une solution de blocage (PBS 10 mM, BSA 2% (p/v), 0.1% Tween 20, pH7.2) durant une incubation de 90 minutes. Les plateaux ont été lavés à l'aide de la solution de lavage et 100 µL de sérums de souris Balb/c dilués (1 :200) dans une solution de dilution (PBS 10 mM, BSA 1%) ont été transférés dans chaque puits avant une incubation d'une heure. Chaque puits a été ensuite lavé 5 fois avec 300 µL de tampon de lavage, puis les plateaux ont été incubés durant une heure en présence de 100 µL d'anticorps anti-IgG de souris produits chez la chèvre et couplés à la biotin (Sigma), dilués 1 :1500 dans la solution de dilution. Suite à 5 lavages consécutifs, les plateaux ont été incubés durant 30 minutes en présence de 100 µL/puits d'une solution de streptavidin/peroxydase (Calbiochem®, USA) diluée 1 :500. Le développement est réalisé durant 30 minutes à l'abri de la lumière en présence du substrat 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma, Oakville, Canada) à raison de 100µL/puits. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 µL/puits d'une solution d'acide chlorhydrique 2N (HCl 2N, Sigma, Oakville, Canada). Tous les sérums ont été

testés en duplicata. La densité optique de chacun des puits est lue à 450 nm sur un lecteur de plaque « Digiscan microplate » avec un filtre de référence à 570 nm.

En utilisant le logiciel Digiwin Software 3.1 (ASYS Hitech GmbH, Phoenix Biotech Corp., Canada), le titre des anticorps spécifiques des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-bb a pu être déterminé.

## RÉSULTATS

### 1. Construction du vecteur d'expression recombinant pVax1-4sfgf-2

#### 1.1. Amplification du gène fgf-2 et stabilisation dans le vecteur pCR®2.1

Le gène fgf-2 de 465 pb codant pour la protéine humaine FGF-2 a été amplifié à partir d'ARN extrait de cellules tumorales. Dans un premier temps, le gène fgf-2 a été amplifié par RT-PCR et ensuite cloné dans le vecteur pCR2.1. Afin d'augmenter le niveau d'expression du facteur de croissance FGF-2 et de permettre sa sécrétion *via* le système réticulum endoplasmique/appareil de Golgi, la partie 5' du gène fgf-2 a été remplacée par la région codant pour le peptide signal du facteur FGF-4. Cette modification a permis de générer un gène recombinant 4sfgf-2. Une étape d'amplification par PCR du gène fgf-2 a été réalisée en utilisant le couple d'amorces sens Fw4s.1 et anti-sens Rv18h (*tableau 2*), l'amorce sens contenant une partie de la région codant pour le peptide signal du facteur FGF-4. Une seconde amplification à l'aide des amorces sens Fw4s.2 et anti-sens Rv18h (*tableau 2*) a été réalisée pour amplifier la protéine recombinante 4sFGF-2. Enfin, l'ADN amplifié a servi de matrice pour une dernière amplification utilisant les amorces sens Fw4sFGF et anti-sens Rv18h (*tableau 2*) portant respectivement les sites de restrictions des endonucléases *HindIII* et *XhoI* pour introduire ces sites de restrictions aux extrémités 5' et 3' du gène 4sfgf-2 (*figure 8*). L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose du produit final amplifié par PCR a montré un fragment d'ADN d'une taille de 468 pb correspondant au fragment d'ADN codant pour la protéine recombinante 4sFGF-2 (*figure 9*, puits 3).

L'amplicon contenant le gène 4sfgf-2 a été par la suite purifié puis cloné dans le vecteur pCR®2.1 pour être utilisé dans les réactions de séquençage et de sous-clonage dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>©</sup>. Le séquençage du vecteur recombinant pCR2.1/4sfgf-2 a confirmé une homologie parfaite du fragment fgf-2 avec la séquence du gène humain fgf-2 disponible dans la banque de gènes « GenBank ».

**Figure 8 : Séquence nucléotidique du gène 4sFGF-2 et sa séquence déduite en acides aminés.**

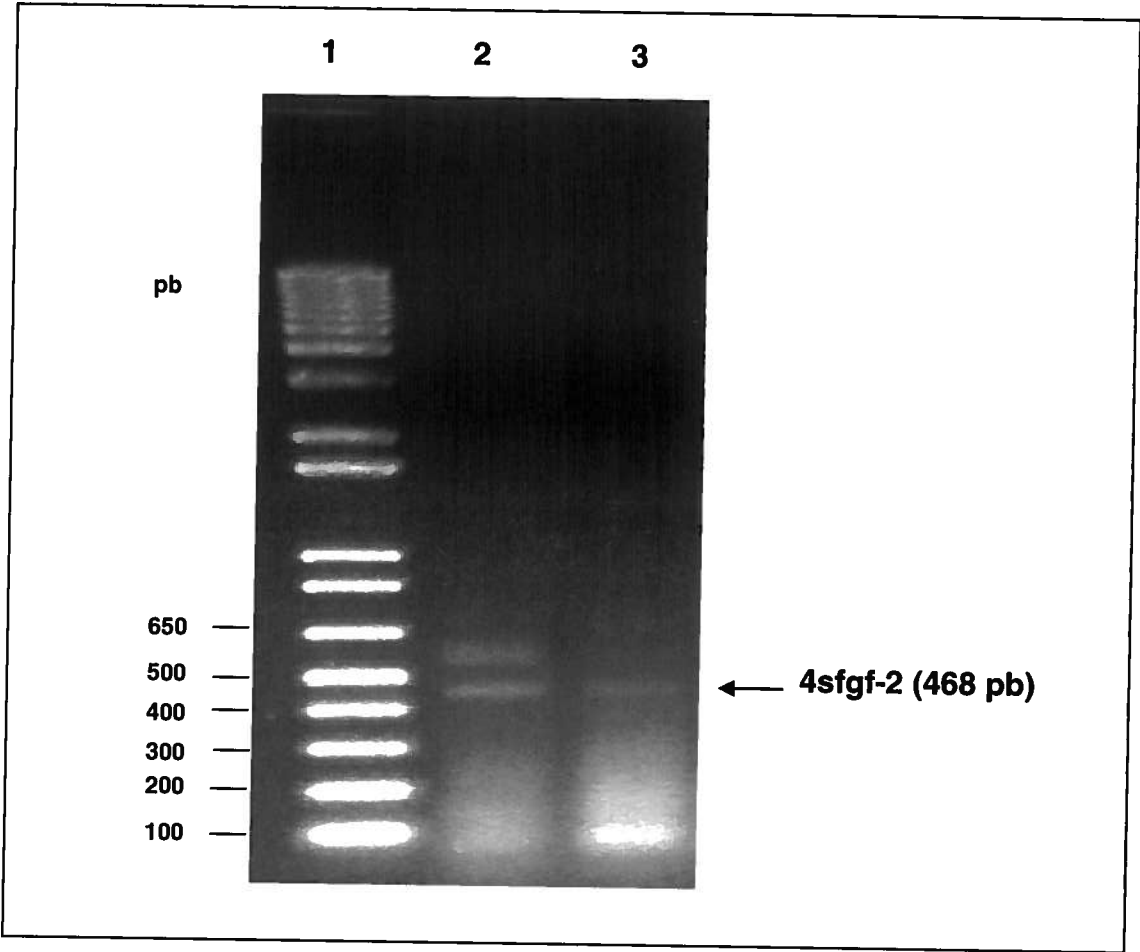
Les codons d'initiations (ATG) et de terminaison (TGA) sont indiqués en caractère gras rouge.

**1** ATG GCA GCC GGG AGC ATC ACC ACG CTG CCC GCC TTG CCC GAG  
M A A G S I T T L P A L P E  
**44** GAT GGC GGC AGC GGC GCC TTC CCG CCC GGC CAC TTC AAG GAC  
D G G S G A F P P G H F K D  
**86** CCC AAG CGG CTG TAC TGC AAA AAC GGG GGC TTC TTC CTG CGC  
P K R L Y C K N G G F F L R  
**128** ATC CAC CCC GAC GGC CGA GTT GAC GGG GTC CGG GAG AAG AGC  
I H P D G R V D G V R E K S  
**170** GAC CCT CAC ATC AAG CTA CAA CTT CAA GCA GAA GAG AGA GGA  
D P H I K L Q L Q A E E R G  
**212** GTT GTG TCT ATC AAA GGA GTG TGT GCT AAC CGT TAC CTG GCT  
V V S Y K G V C A N R Y L N  
**254** ATG AAG GAA GAT GGA AGA TTA CTG GCT TCT AAA TGT GTT ACG  
L K E D G R L L A S K C V T  
**296** GAT GAG TGT TTC TTT TTT GAA CGA TTG GAA TCT AAT AAC TAC  
D E C F F F E R L G S N N Y  
**338** AAT ACT TAC CGG TCA AGG AAA TAC ACC AGT TGG TAT GTG GCA  
N T Y R S R K Y T S W Y V A  
**380** CTG AAA CGA ACT GGG CAG TAT AAA CTT GGA TCC AAA ACA GGA  
L K R T G Q Y K L G S K T G  
**422** CCT GGG CAG AAA GCT ATA CTT TTT CTT CCA ATG TCT GCT AAG  
P G Q K A I L F L P M S A K  
**464** AGC TGA  
S



**Figure 9 : Profil électrophorétique du gène 4sfgf-2 amplifié par PCR à partir d'ADNc**

L'électrophorèse a été effectuée sur gel d'agarose 2% et les bandes d'ADN ont été visualisées sous UV suite à une coloration au bromure d'éthidium. Le produit d'amplification issu de la 3<sup>ème</sup> réaction de PCR impliquant la paire d'amorces Fw4sFGF et Rv18h est déposé dans le puits 2. La séquence du gène codant pour la protéine recombinante 4sFGF-2 correspond à un fragment de 468pb (puits 2). Le produit PCR purifié est déposé dans le puits 3 où la séquence du gène purifié 4sfgf-2 est située à la hauteur de 468 pb (puits 3). Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans le puits 1.



## **1.2. Sous-clonage du gène 4sfgf-2 dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>©</sup>**

Le plasmide recombinant pCR2.1/4sfgf-2 a été digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *XhoI*. L'insert 4sfgf-2 obtenu a été purifié à partir du gel d'agarose puis cloné dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>©</sup> préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide recombinant pVax1-4sfgf-2 ainsi généré a été analysé après digestion par les endonucléases de restrictions *HindIII* et *XhoI* (**figure 10, puits 2**). Cette analyse a montré que le vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2 purifié renferme un fragment d'ADN de 468 pb correspondant à la taille du gène codant pour la protéine 4sFGF-2 (**figure 10, puits 2**).

Le séquençage du plasmide recombinant pVax-1-4sfgf-2 a permis de confirmer l'intégrité de la séquence du gène 4sfgf-2. En effet, l'analyse de la séquence en acides nucléiques du gène 4sfgf-2 a montré 100% d'homologie avec la séquence du gène fgf-2 avec une extrémité 5' correspondant à la séquence du peptide signal du gène fgf-4. Le gène recombinant 4sfgf-2 a été introduit en aval du promoteur CMV afin de permettre son expression dans les systèmes d'expression eucaryotes.

Le plasmide recombinant pVax-1-4sfgf-2 a été produit dans les cellules bactériennes *E.coli* INVa. Les rapports de densité optique à 260nm et 280nm des préparations d'ADN ainsi produites étaient supérieures à 1.8 confirmant ainsi leur haut degré de pureté à des concentrations variant de 2.0 à 2.5 mg/L de culture bactérienne.

## **2. Construction du vecteur d'expression pVax1-pdgf-bb**

### **2.1. Amplification du gène pdgf-bb et clonage dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1**

De la même manière que pour le gène 4sfgf-2, le gène codant pour la protéine humaine PDGF-BB a été amplifié à partir d'ARN total extrait des plaquettes d'un échantillon de sang humain. À partir d'ARN total purifié, une paire d'amorces spécifiques, sens FwpréPDGF et anti-sens RvpréPDGF, a été utilisée afin de générer par transcription inverse des produits d'ADNc correspondant au gène humain pdgf-bb ; soit des fragments

de 327 pb. L'ensemble des fragments d'ADNc codant pour la protéine humaine PDGF-BB obtenus a été utilisé comme seconde d'hybridation à une seconde paire d'amorces, sens FwPDGF et anti-sens RvPDGF, afin d'isoler les clones pdgf-bb de la banque d'ADNc humain. Ces clones isolés ont été stabilisés dans le vecteur pCR@2.1 puis séquencés afin de nous assurer de l'intégrité du gène codant pour la protéine humaine PDGF-bb (*figure 11*). Nos résultats montrent que la séquence extraite des clones positifs était identique à la séquence théorique du gène humain pdgf-bb, ce qui nous a permis de confirmer l'intégrité structurelle du fragment de gène amplifié. Par ailleurs, l'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, après coloration au bromure d'éthidium, du produit final amplifié par PCR a montré un fragment d'ADN à la hauteur d'une taille de 327pb correspondant à la taille du fragment de gène codant pour la protéine humaine recombinante PDGF-bb (*figure 12*, puits 2 et 3). Les vecteurs recombinants pCR2.1-pdgf-bb extraits des clones positifs ont été digérés par les endonucléases de restriction *HindIII* et *XhoI* puis analysés sur gel d'agarose. L'insert correspondant au gène pdgf-bb a été purifié suite à son extraction à partir du gel d'agarose pour être ensuite cloné dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>®</sup>.

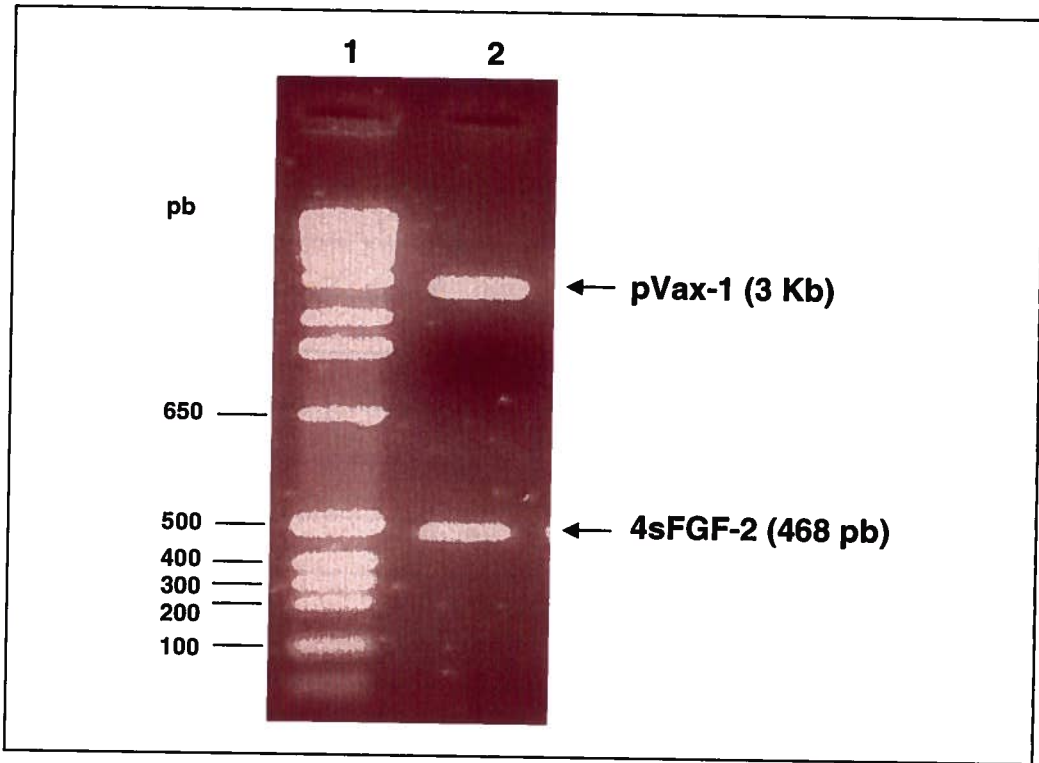
## **2.2. Sous-clonage du gène pdgf-bb dans le vecteur d'expression pVax-1<sup>®</sup>**

Le vecteur recombinant pVax-1-pdgf-bb extrait d'un clone positif 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 13*, puits 2). Cette analyse a confirmé la présence d'un fragment de 327 pb correspondant au gène pdgf-bb. (*figure 13*). Le séquençage de l'amplicon pdgf-bb a confirmé l'intégrité et l'homologie parfaite avec le gène pdgf-bb humain.

Le plasmide recombinant pVax-1-pdgf-bb a été produit dans les cellules bactériennes *E.coli* INV $\alpha$  avec des concentrations variant de 2.0 à 2.5 mg/L de culture bactérienne. Le rapport des densités optiques à 260 nm et à 280nm des préparations d'ADN ainsi purifiées était supérieur à 1.8 démontrant ainsi leur haut niveau de pureté.

**Figure 10: Profil électrophorétique du plasmide recombinant pVax-1<sup>®</sup>/4sfgf-2 digéré par les endonucléases *HindIII* et *XhoI***

L'électrophorèse a été effectuée sur gel d'agarose 0.8% et les bandes d'ADN ont été visualisées sous UV suite à une coloration au bromure d'éthidium. La digestion par les endonucléases de restriction permet la libération d'un fragment de 468pb correspondant à la séquence du gène 4sfgf-2, ainsi qu'un fragment de 3.0kb correspondant au plasmide pVax-1 linéarisé (puits 2). Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans le puits 1.



**Figure 11: Séquence nucléotidique du gène pdgf-bb et sa séquence déduite en acides aminés.**

Le codon d'initiation (ATG) est indiqué en caractère gras rouge. Le motif conservé de huit résidus cystéine appartenant à chacun des isoformes du PDGF est représenté en lettres soulignées bleues.

**1**     **ATG** AGC CTG GGT TCC CTG ACC ATT GCT GAG CCG GCC ATG ATC  
           M   S   L   G   S   L   T   I   A   E   P   A   M   I  
**43**    GCC GAG **TGC** AAG ACG CGC ACC GAG GTG TTC GAG ATC TCC CGG  
           A   E   C   K   T   R   T   E   V   F   E   I   S   R  
**85**    CGC CTC ATA GAC CGC ACC AAC GCC AAC TTC CTG GTG TGG CCG  
           R   L   I   D   R   T   N   A   N   F   L   V   W   P  
**127**   CCC **TGT** GTG GAG GTG CAG CGC **TGC** TCC GGC **TGC TGC** AAC AAC  
           C   V   E   V   Q   R   C   S   G   C   C   N   N   R  
**169**   CGC AAC GTG CAG **TGC** CGC CCC ACC CAG GTG CAG CTG CGA CCT  
           N   V   Q   C   R   P   T   Q   V   Q   L   R   P   V  
**211**   GTC CAG GTG AGA AAG ATC GAG ATT GTG CGG AAG AAG CCA ATC  
           Q   V   R   K   I   E   I   V   R   K   K   P   I   F  
**253**   TTT AAG AAG GCC ACG GTG ACG CTG GAA GAC CAC CTG GCA **TGC**  
           K   K   A   T   V   T   L   E   D   H   L   A   C   K  
**295**   AAG **TGT** GAG ACA GTG GCA GCT GCA CGG CCT GTG ACC CTC GAG  
           C   E   T   V   A   A   A   R   P   V   T   R   S   P



### 3. Évaluation du potentiel et de l'efficacité du chitosane comme système de livraison de gènes

Afin d'évaluer le potentiel et l'efficacité du chitosane comme système de livraison de gènes, nous avons procédé à la préparation de nanoparticules chitosane-ADN plasmidique recombinant. La technique de préparation de nanoparticules a consisté à ajouter la solution de chitosane diluée sur la solution d'ADN plasmidique tel que décrit dans la stion du *matériel et méthodes*. Le chitosane, un polymère cationique, s'associe à l'ADN par interaction électrostatique ce qui induit une réorganisation du biopolymère au sein du complexe chitosane-ADN plasmidique. Les nanoparticules chitosane-ADN plasmidique stables pénètrent ensuite dans la cellule généralement par un processus d'endocytose (*figure 14*).

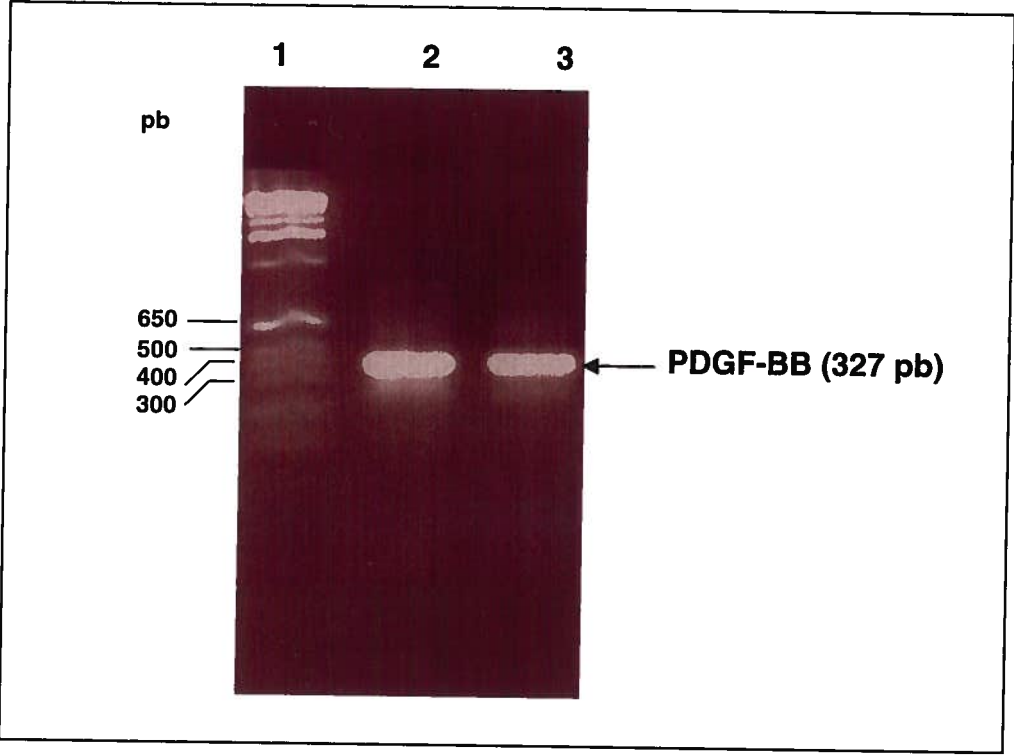
Dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet protecteur du chitosane vis-à-vis de l'ADN plasmidique contre la dégradation par les nucléases. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'efficacité du chitosane à transfecter *in vitro* deux lignées cellulaires adhérentes, soient la lignée HEK293 et la lignée HeLa CCL-2.

#### 3.1. Efficacité du chitosane dans la protection de l'ADN plasmidique contre les nucléases

L'effet protecteur des molécules d'ADN par le chitosane a été évalué à l'aide de tests de dégradation enzymatique. La sensibilité de l'ADN nu vis-à-vis des nucléases est une des causes majeure d'une faible efficacité de transfection. La condensation de l'ADN par des polymères cationiques favorise la résistance de la molécule d'ADN à la digestion enzymatique en empêchant les enzymes d'accéder à l'ADN (De Smedt, Demeester et al. 2000). Nous avons testé l'effet de protection de l'ADN plasmidique contre la dégradation par les nucléases en utilisant la *DNaseI* comme modèle enzymatique. Nos résultats ont montré que l'ADN plasmidique nu, incubé en présence de *DNaseI* à 37°C, se dégrade dans les 20 min qui suivent la réaction. La figure 15 présente les résultats de protection de l'ADN contre les nucléases en utilisant le plasmide pVax1-LacZ (*figure 15*).

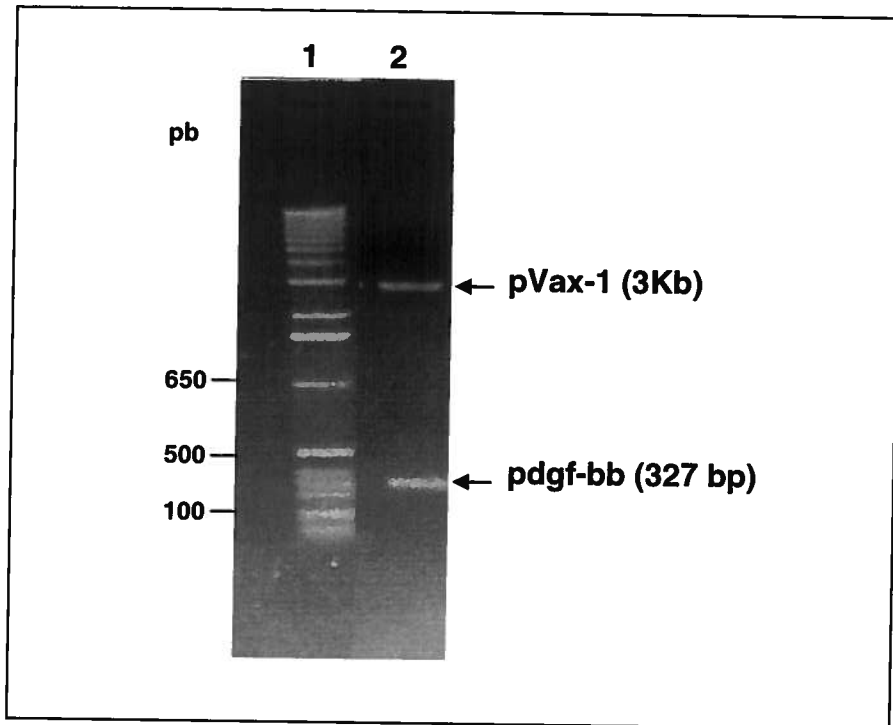
**Figure 12: Profil électrophorétique de l'amplicon pdgf-bb amplifié par RT-PCR**

L'électrophorèse a été effectuée sur gel d'agarose 2% et les bandes d'ADN ont été visualisées sous UV suite à une coloration au bromure d'éthidium. L'ADNc issu de la réaction de RT-PCR à partir d'ARN total a été déposé dans le puits 2. L'amplicon pdgf-bb est de 327 pb (puits 2). Le produit d'amplification du gène pdgf-bb de 327pb purifié par séphaglass a été déposé dans le puits 3. Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans le puits 1.

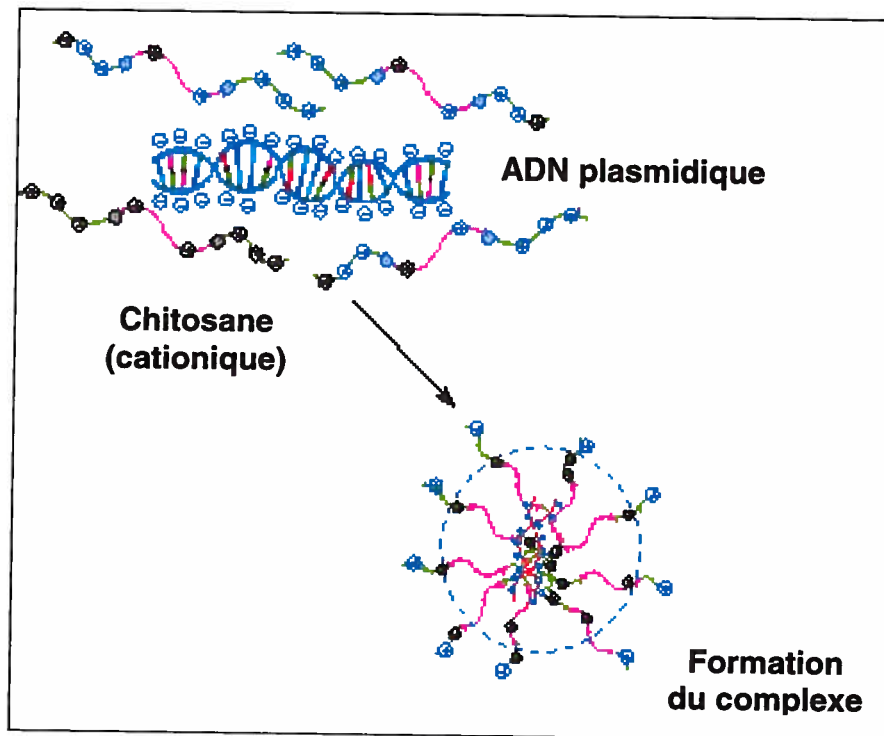
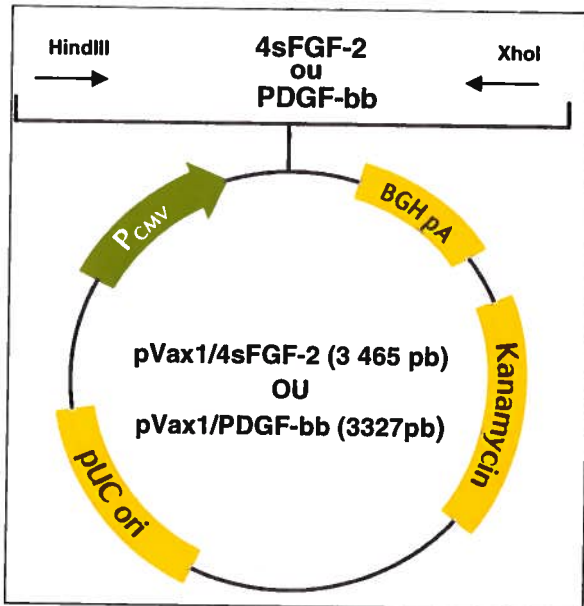


**Figure 13: Profil électrophorétique du plasmide recombinant pVax-1-pdgf-bb digéré par les endonucléases *HindIII* et *XhoI***

L'électrophorèse a été effectuée sur gel d'agarose 2% et les bandes d'ADN ont été visualisées sous UV suite à une coloration au bromure d'éthidium. La digestion par les endonucléases *HindIII* et *XhoI* permet la libération d'un fragment de 327 pb correspondant au gène pdgf-bb et un fragment de 3.0kb associé au plasmide pVax-1 linéarisé (puits 2). Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans le puits 1.



**Figure 14: Mécanisme de préparation de nanoparticules Chitosane/ADN**



Cependant, l'ADN condensé par chacune des différentes formulations de chitosane, 92-10-5, 80-10-10 ou 80-80-5, et traité de la même manière avec la *DNaseI*, n'est dégradé que partiellement par les nucléases (*figure 15*, puits 5,6 et 7). Ces résultats suggèrent qu'en condition physiologique où la concentration des nucléases est naturellement inférieure à celle testée, les formulations de chitosane, 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 sont capables de protéger efficacement l'ADN plasmidique contre la dégradation enzymatique.

### **3.2. Transfection in vitro des lignées cellulaires HEK293 et HeLa CCL-2 avec les nanoparticules chitosane/ADN plasmidique**

Les lignées cellulaires HEK293 et HeLa CCL-2 ont été transfectées par l'ADN plasmidique pVax1-LacZ. Le niveau de transfection et d'expression, *in vitro*, des vecteurs recombinants complexés au chitosane (soit chacune des trois formulations 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5) a été évalué en utilisant le plasmide pVax1-LacZ contenant le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase (*figure 16*).

La lipofectamine est une molécule lipidique polycationique qui induit une bonne efficacité de transfection dans de nombreux types cellulaires. Ainsi, la lipofectamine a été utilisée comme agent de transfection contrôle. Les trois formulations de chitosane ont été utilisées lors des transfections *in vitro* pour fin de comparaison, entre autre, avec les résultats de transfection et d'expression *in vivo*.

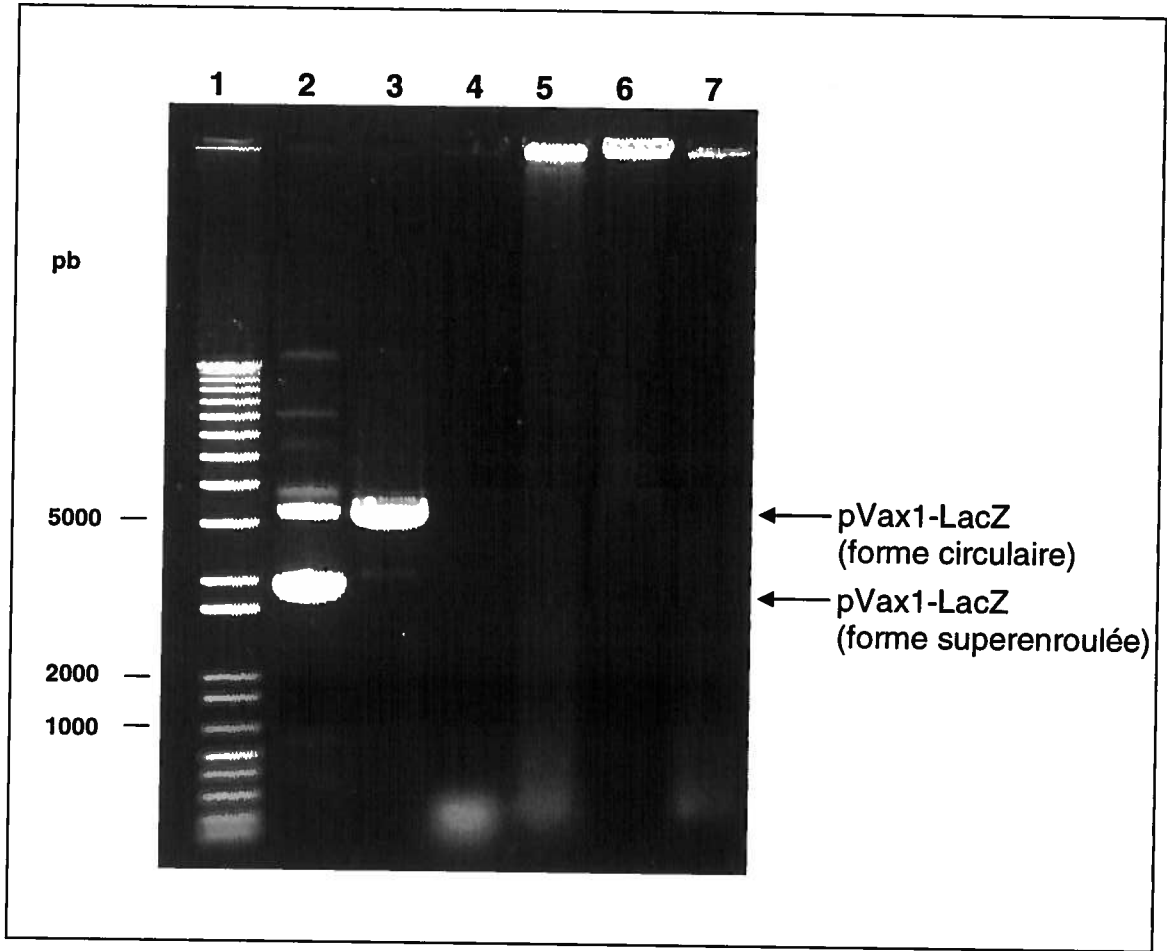
La formulation de chitosane 80-10-10 permet une transfection plus efficace des deux lignées cellulaires par l'ADN plasmidique pVax1-LacZ avec un taux de transfection de l'ordre de 80%. De plus, la transfection cellulaire est d'autant plus efficace lorsque l'ADN plasmidique pVax1-LacZ est complexé à chacune des trois formulations de chitosane que lorsqu'il est seul ou en présence de lipofectamine (*figure 16*).

La lipofectamine présente un faible taux de transfection des deux lignées cellulaires HEK293 et HeLa soit un taux de transfection de l'ordre de 45% et de 35% respectivement (*figure 16*).



**Figure 15: Analyse électrophorétique des nanoparticules chitosane/ADN plasmidique suite à une digestion par la *DNaseI*.**

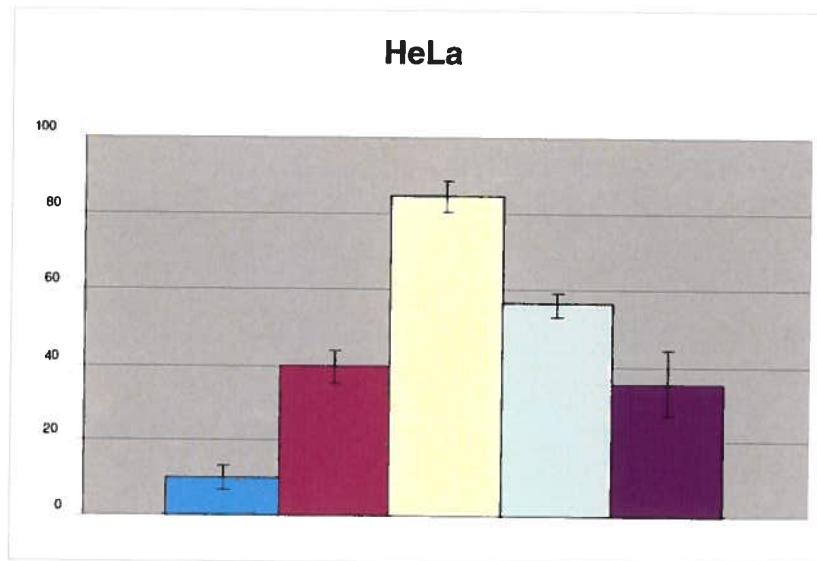
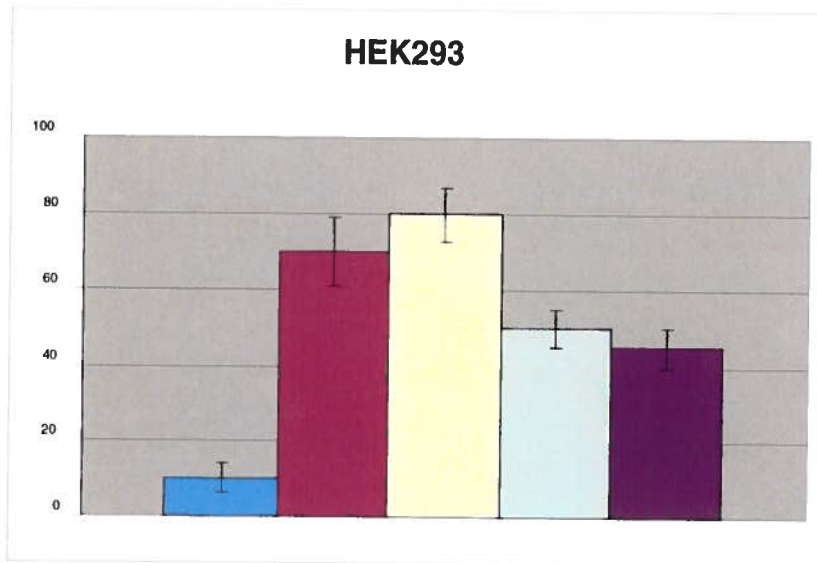
L'ADN nu (8 µg) et les nanoparticules chitosane/ADN plasmidique, contenant 16 µg d'ADN plasmidique, ont été incubés 20 min en présence de l'enzyme *DNaseI* à 37°C. La réaction de digestion a été arrêtée par addition d'éthylène glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) à une concentration finale de 20mM. Tous les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 0.8% et les bandes d'ADN ont été visualisées sous UV suite à une coloration au bromure d'éthidium. Le marqueur de masse moléculaire est représenté en pb dans le puits 1. Le plasmide recombinant non digéré est représentée dans le puits 2 où les formes relâchées, linéaires et super-enroulées sont représentées par la présence de plusieurs bandes. Le même plasmide a été digéré par l'enzyme *XhoI* ou par l'enzyme *DNaseI* (8 U/ µg d'ADN) et les produits de digestion ont été déposés dans les puits 3 et 4 respectivement. Les nanoparticules de chitosane/ADN plasmidique ont été soumis à la digestion enzymatique par la *DNaseI* (8 U/ µg d'ADN) soit les complexes chitosane 92-10-10/ ADN plasmidique, chitosane 80-10-5/ ADN plasmidique et chitosane 80-80-10/ADN plasmidique dans les puits 5,6 et 7 respectivement.



**Figure 16 : Transfection, *in vitro*, des cellules HEK293 et HeLa CCL-2 avec le plasmide recombinant pVax1-LacZ seul ou complexé à la lipofectamine et au chitosane**

Les lignées cellulaires HEK293 et HeLa CCL-2 ont été transfectées avec 3 µg d'ADN pVax1-LacZ seul ou complexé à la lipofectamine (lipoplexes) et au chitosane (nanoparticules). Les cellules mises en culture seules et les cellules cultivées en présence de chitosane seulement, ont servi de contrôles négatifs afin d'éliminer les bruits de fond. L'efficacité de transfection est mesurée à l'aide d'un test  $\beta$ -galactosidase.

Transfection %  
(cellules bleues/ nombre total de cellules)\*10



- pVax1/LacZ seul
- 92-10+pVax1/LacZ
- 80-10+pVax1/LacZ
- 80-80+pVax1/LacZ
- Lipofectamine+pVax/LacZ

#### **4. Expression, in vivo, des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB, et induction de la réponse immunitaire suite à l'immunisation des souris par voie sous-cutanée**

Nous avons caractérisé le niveau d'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB dans les sérums des souris Balb/c immunisées par voie sous-cutanée. Les expériences d'immunisation ont été réalisées tel que décrit sur le *tableau 4*, en présence ou absence d'une des trois formulations de chitosane (*tableau 4*). Les résultats de ces expériences *in vivo* sont représentés sur les figures *17* et *18* où les valeurs de concentration de protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB correspondent aux valeurs moyennes de trois souris par groupe.

##### **4.1. Expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB in vivo**

Le niveau d'expression de la protéine recombinante 4sFGF-2 suite à l'immunisation avec le vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2 par voie sous-cutanée a été évalué par ELISA sur des sérums de souris (*tableau 4*). Les souris injectées avec la solution saline (PBS) ont été utilisées comme contrôle négatif pour l'ensemble des expériences d'immunisation. Afin de s'assurer de l'exactitude et de la reproductibilité des résultats, l'indice de sensibilité, COI (Cut Off Index), a été estimé pour chaque type d'immunisation (sous-cutanée et intramusculaire) en testant par ELISA les derniers prélèvements de sérums des groupes de souris contrôles négatifs. Ainsi l'indice COI (0.136) a été calculé en additionnant la valeur de la densité optique moyenne mesurée (0.116) des sérums de souris injectées avec du PBS à deux fois la valeur de l'écart-type (0.010). Seules les densités optiques excédant la valeur du COI sont considérées significatives.

Suite à l'immunisation sous-cutanée des souris avec les nanoparticules 92.10/pVax1-4sfgf-2, une augmentation significative de la concentration en protéine recombinante 4s-FGF-2 a été observée dans le sérum pour atteindre 2500 pg/ml (*figure 17*). La concentration de protéine recombinante 4sFGF-2 observée pour ce groupe de souris est environ 1.6 fois

supérieure à celle obtenue pour les souris immunisées avec le plasmide recombinant pVax1-4sfgf-2 seul au 63<sup>ème</sup> jour post-immunisation (1500 pg/ml).

Le complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2 a permis un taux de transfection cellulaire plus élevé que le taux de transfection cellulaire observé pour les groupes de souris immunisées avec les complexes 80.10/pVax1-4sfgf-2 ou 80.80/pVax1-4sfgf-2 qui n'ont été capables de produire qu'une faible quantité de protéines recombinante 4sFGF-2 soit de l'ordre de 10 pg/ml et de 200 pg/ml respectivement (*figure 17*).

L'expression *in vivo* de la protéine recombinante PDGF-bb et l'induction de la réponse immunitaire ont été analysées par des tests ELISA à partir de sérums prélevés de cinq groupes de souris différents. Le groupe de souris injectées avec la solution saline (PBS) a été utilisé comme contrôle négatif, alors que le groupe de souris injectées avec le plasmide recombinant pVax-1-pdGF-bb seul a servi de contrôle positif. Les trois autres groupes de souris ont été injectés soit par les complexes 92.10/pVax-1-pdGF-bb, 80.10/pVax-1-pdGF-bb ou 80.80/pVax-1-pdGF-bb.

La figure 18 indique que l'immunisation des souris avec le complexe 92.10/pVax-1-pdGF-bb induit une production élevée de la protéine recombinante PDGF-BB soit une concentration de 7000 pg/ml dès le 63<sup>ème</sup> jour post-immunisation. Quant aux groupes de souris immunisées avec le complexe 80.80/pVax-1<sup>©</sup>/pdGF-bb ou le complexe 80.10/pVax-1<sup>©</sup>/pdGF-bb, ils sont capables de produire la protéine recombinante PDGF-BB à une concentration de l'ordre de 2000 pg/ml et 5700 pg/ml respectivement. Par ailleurs, la valeur de la concentration de la protéine recombinante PDGF-BB produite chez le groupe contrôle positif est relativement élevée puisqu'elle est de l'ordre de 3000 pg/ml (*figure 18*).

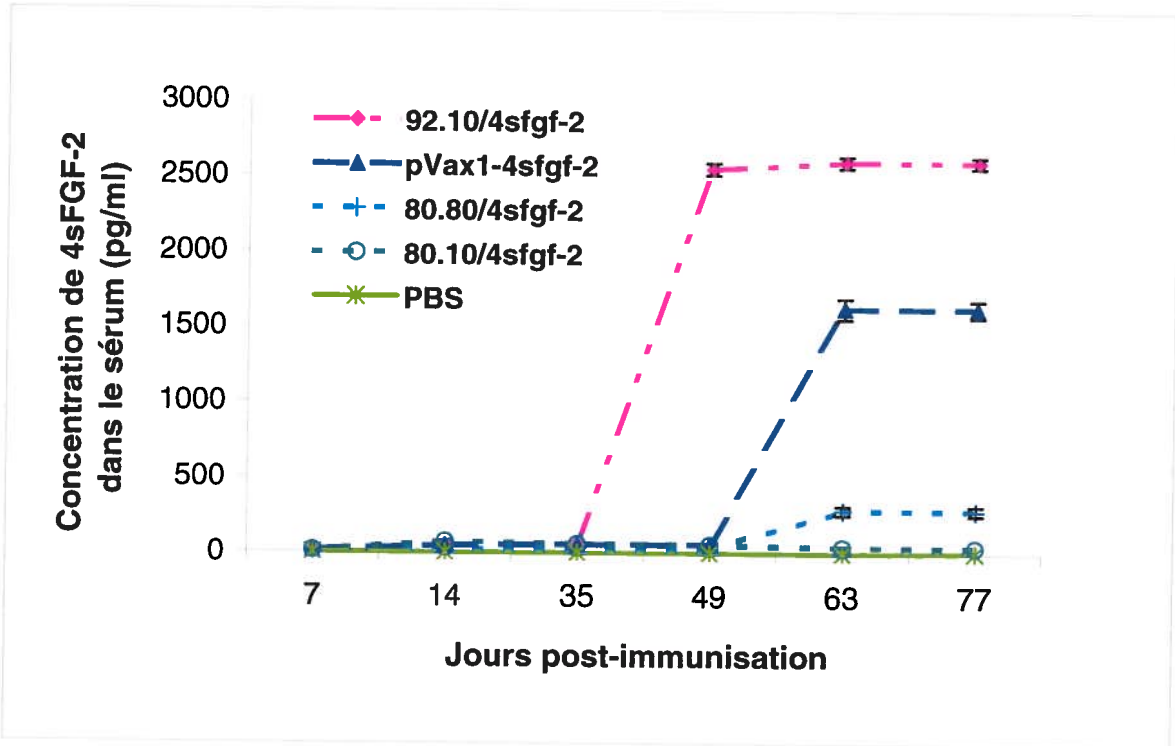
#### **4.2. Induction de la réponse humorale suite à l'immunisation de souris par voie sous-cutanée**

Le niveau de production des anticorps anti-4sFGF-2 et anti-PDGF-BB a été analysé afin d'évaluer qualitativement l'immunogénicité des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB exprimées *in vivo* (*figures 19 et 20*).

**Figure 17: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante 4sFGF-2 suite à l'immunisation sous-cutanée avec le vecteurs recombinant pVax1-4sfgf2**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- PBS : témoin négatif
- pVax1-4sfgf2 : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5



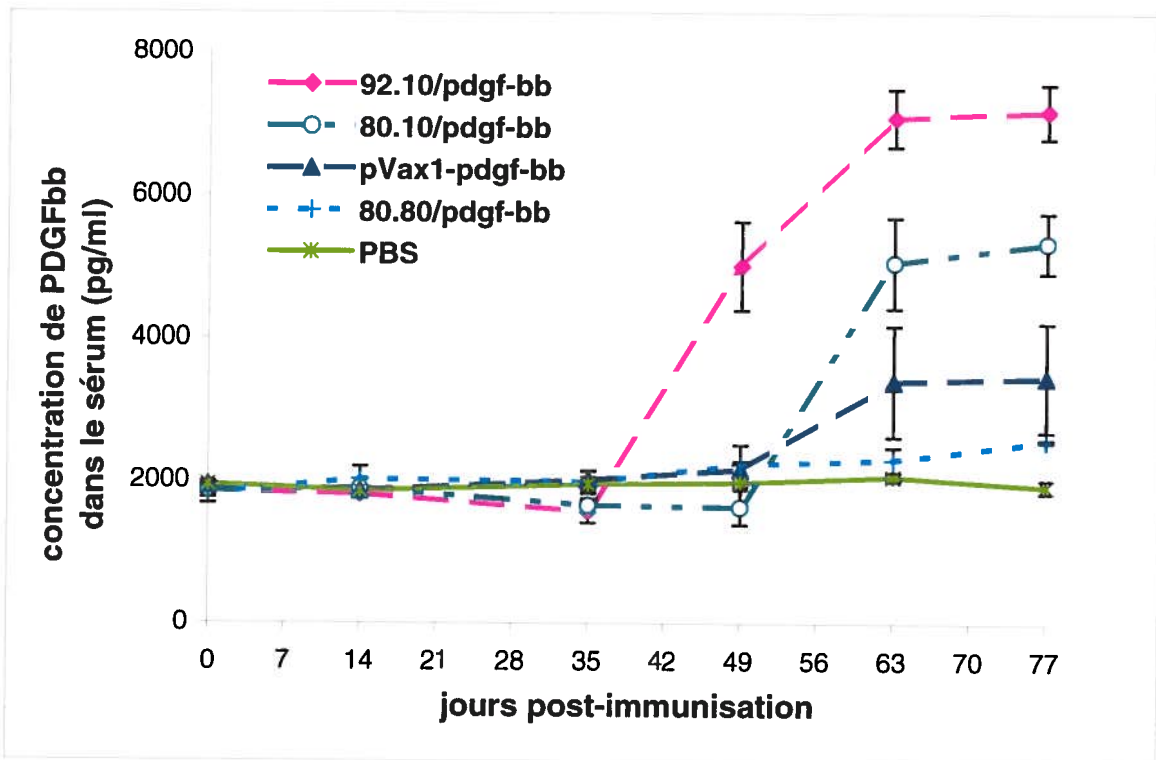


**Figure 18: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante PDGF-BB suite à l'immunisation sous-cutanée avec le vecteurs recombinant pVax1-pdgf-bb**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- PBS : témoin négatif
- pVax1-pdgf-bb : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1--pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-BB injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1--pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-BB injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1--pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-BB injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5

La valeur reportée sur le graphique correspond à la moyenne des concentrations de protéines recombinantes PDGF-BB présentes dans les sérums de trois animaux par groupe testé.



Les anticorps anti-4sFGF-2 produits en réponse à l'immunisation des souris balb/c à l'aide du vecteur pVax1-4sfgf-2 par voie sous-cutanée ont été déterminé par ELISA (*figure 19*). Afin d'atténuer le signal provenant des interactions non spécifiques, les densités optiques relatives aux sérums préimmuns (prélèvement au jour 0) ont été préalablement soustraites des valeurs obtenues pour tous les sérums immuns des derniers prélèvements.

Les résultats indiquent que les valeurs des densités optiques des sérums de souris contrôles, injectées avec le PBS, sont inférieures à l'indice COI. Cette analyse démontre bien l'absence de production d'anticorps anti-4sFGF-2 par les groupes de souris contrôles négatifs.

Dans la *figure 19*, sont représentés les résultats des tests ELISA effectués sur les sérums de souris immunisées par voie sous-cutanée avec le vecteur pVax1-4sfgf-2. Les résultats indiquent une forte production d'anticorps anti-4sFGF-2 par le groupe de souris vaccinées à l'aide des complexes 80.10/pVax1-4sfgf-2 soit une production six fois plus importante que celle obtenue pour les quatre autres groupes de souris. En revanche, un faible niveau de production d'anticorps anti-4sFGF-2 est observé pour le groupe de souris injectées avec des complexes 92.10/pVax1-4sfgf-2 soit un niveau de production d'anticorps proche du niveau de détection basal d'anticorps observé pour le groupe de souris contrôles négatifs injectées au PBS.

L'immunisation de souris avec les nanoparticules 80-80/pVax1-pdgf-bb a suscité un niveau de production d'anticorps anti-PDGF-BB plus élevé que l'ensemble des autres groupes de souris immunisées mais reste toutefois relativement faible avec une valeur de D.O atteignant 0.2. Le niveau de production d'anticorps anti-PDGF-BB est relativement similaire pour tous les groupes de souris immunisées et très proche du niveau de production d'anticorps basale correspondant au groupe contrôle négatif injecté avec du PBS (*figure 20*).

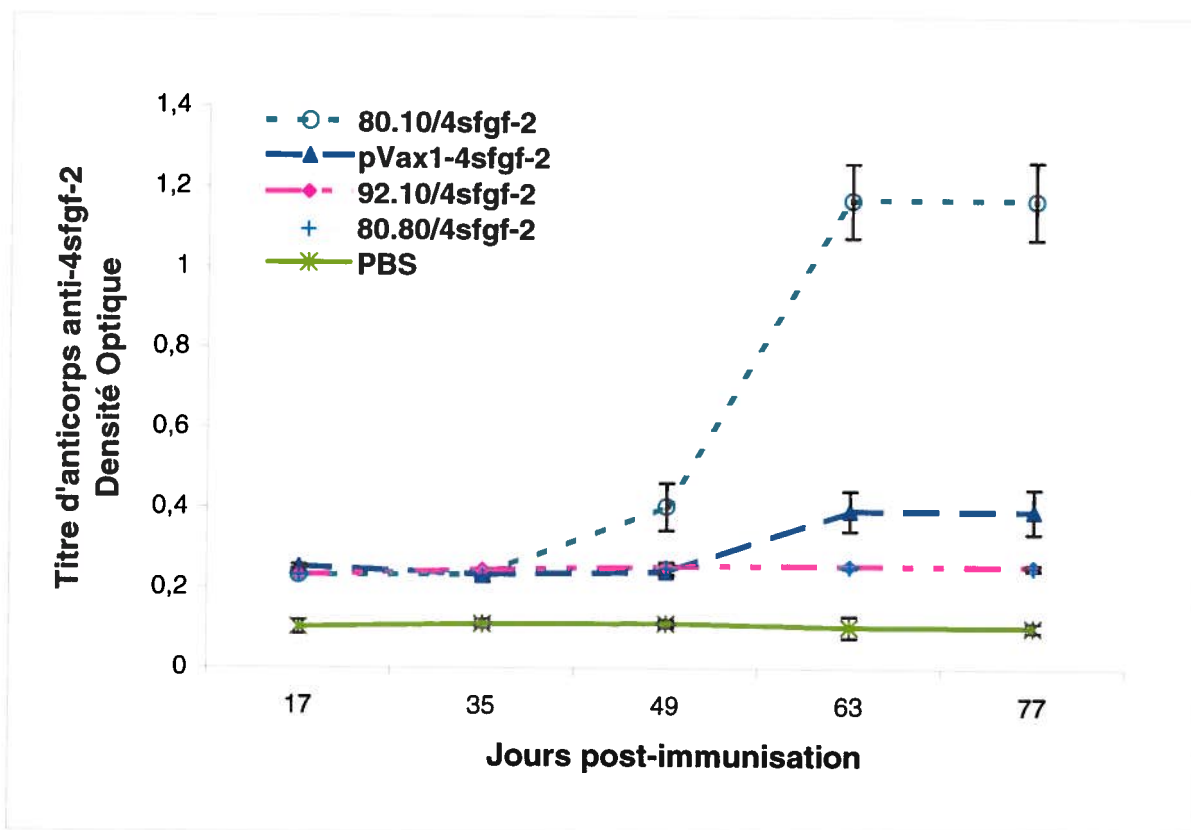
Tel que présenté dans les *figures 19* et *20*, les sérums provenant des groupes de souris contrôles négatifs présentent des titres d'anticorps anti-4sFGF-2 et anti-PDGF-BB négligeables, prouvant ainsi l'absence d'anticorps spécifiques à chacune des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB.

**Figure 19: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection sous-cutanée du vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- PBS : témoin négatif
- pVax1-4sfgf-2 : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2: vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1- 4sfgf-2: vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1- 4sfgf-2: vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5

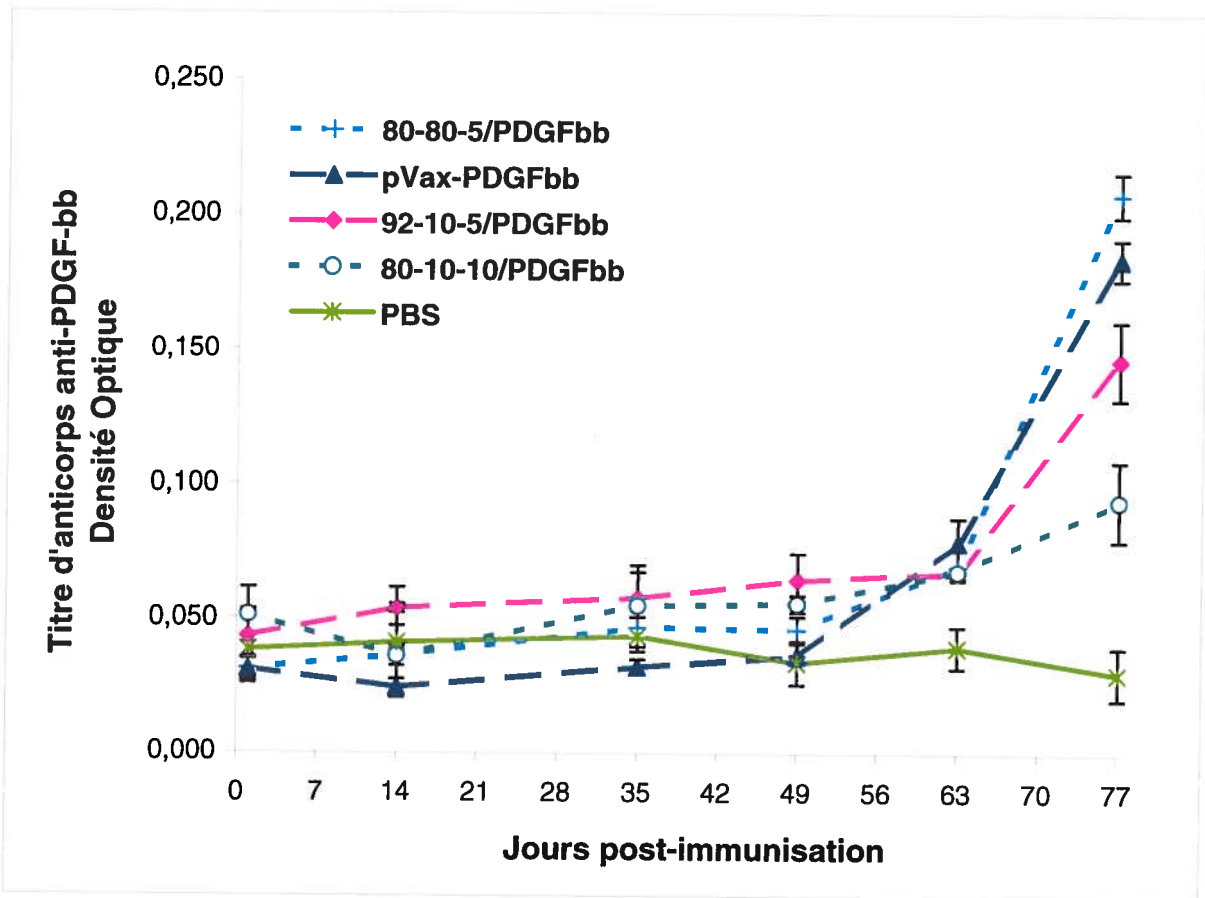
La valeur reportée sur le graphique est la moyenne des densités optiques mesurées pour les sérums des individus de chaque groupe.



**Figure 20: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection sous-cutanée du vecteur recombinant pVax1-pdgf-bb**

- PBS : témoin négatif
- pVax1-pdgf-bb : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1-pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-bb injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1-pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-bb injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1-pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-bb injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5

La valeur reportée sur le graphique est la moyenne des densités optiques mesurées pour les sérums des individus de chaque groupe.



## **5. Expression *in vivo* des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB, et induction de la réponse immunitaire suite à l'immunisation des souris par voie intramusculaire**

L'immunisation intramusculaire a fait l'objet d'une caractérisation du niveau d'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB dans les sérums des souris immunisées par les vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb, avec ou sans formulation de chitosane.

### **5.1. Expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB *in vivo***

Dans un premier temps, l'analyse du niveau de production de la protéine recombinante 4sFGF-2 en réponse à l'immunisation intramusculaire des souris balb/c avec le vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2 a été étudiée par un test ELISA sur des sérums de différents groupes de souris (*tableau 4*). Suite à l'injection intramusculaire du complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2, une forte concentration de protéine recombinante 4s-FGF2 a été observée dans le sérum atteignant 1200 pg/mL à 77 jours post-immunisation. Cette dernière valeur est 1.5 fois plus importante que celle de la concentration de la protéine recombinante 4sFGF-2 obtenue pour le groupe de souris immunisées avec le vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2 seul soit une valeur de l'ordre de 800 pg/mL (*figure 21*).

Comme nous l'avons observé pour l'immunisation par voie sous-cutanée à l'aide du vecteur pVax1-4sfgf-2 (*figure 17*), le niveau de production le plus élevé de protéine recombinante 4sFGF-2 détecté est celui du groupe de souris ayant reçu par voie intramusculaire le complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2.

Dans un second temps, le niveau de production de la protéine recombinante PDGF-BB en réponse à l'immunisation des souris balb/c par voie intramusculaire a été analysé à l'aide d'un test ELISA sur des sérums de différents groupes de souris comme décrit dans le *tableau 4*.

Comme nous l'avons observé précédemment pour les souris immunisées à l'aide du plasmide recombinant pVax1-4sfgf-2, le groupe de souris immunisées par voie sous-



cutanée capable d'exprimer la plus haute concentration de protéines recombinante PDGF-BB est le groupe de souris immunisées avec le complexe 92.10/pVax1-pdgf-bb avec un niveau d'expression de PDGF-BB recombinant atteignant 2800 pg/ml observé à 77 jours post-immunisation (*figure 22*).

Par ailleurs, l'immunisation du groupe de souris contrôles positifs avec le vecteur recombinant pVax1-pdgf-bb seul a suscité un niveau d'expression de la protéine recombinante PDGF-BB non négligeable soit une concentration d'une valeur d'environ 2200 pg/mL détectable à 77 jours post-immunisation (*figure 22*).

Une analyse comparative des résultats obtenus indique toutefois que l'immunisation par voie sous-cutanée a suscité des niveaux d'expression de protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB plus importants par rapport à l'immunisation par voie intramusculaire. En effet, les plus fortes quantités d'ADN injectées par voie sous-cutanée (165 µg) par rapport aux quantités d'ADN injectées par voie intramusculaire (16,5 µg) pourraient justifier ce type de résultats observés (*figures 17, 18, 21 et 22*).

## **5.2. Réponse humorale induite par l'injection intramusculaire des vecteurs recombinants pVax-1-4sfgf-2 et pVax-1-pdgf-bb**

Afin de suivre et de comparer le niveau ainsi que l'évolution du taux de production des anticorps anti-4sFGF-2 et anti-PDGF-BB suite aux immunisations intramusculaires, d'autres analyses par ELISA ont été effectuées. Tel que présenté sur les *figures 23 et 24*, les sérums provenant des groupes de souris contrôles négatifs présentent des réponses en anticorps nuls, prouvant ainsi l'absence d'anticorps spécifiques aux protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB.

Les résultats observés suite à l'immunisation par le vecteur pVax1-4sfgf-2 indiquent un niveau de production d'anticorps anti-4sFGF-2 relativement similaire et faible pour tous les groupes de souris immunisées voire proche du niveau de production d'anticorps basale correspondant au groupe contrôle négatif injecté avec du PBS seulement (*figure 23*).

Ainsi, l'immunisation par voie intramusculaire avec le vecteur pVax1-4sfgf-2, complexé ou non avec l'une des trois formulations de chitosane, n'influence pas le niveau des réponses en anticorps anti-4sFGF-2 induites.

La variation des taux de production des anticorps anti-PDGF-BB suite à l'immunisation intramusculaire avec le vecteur recombinant pVax1-pdgf-bb complexé ou non avec l'une des trois formulations de chitosane est analysée sur la *figure 24*. Le profil du niveau de production d'anticorps anti-PDGF-BB suite aux injections intramusculaires de nanoparticules chez les souris Balb/c est relativement similaire au profil obtenu dans le cas du niveau de production d'anti-4sFGF-2 chez les souris injectées par voie intramusculaire avec les nanoparticules chitosane/pVax1-4sfgf-2 (*figures 23 et 24*).

De manière générale, nos résultats ont montré que les tests ELISA effectués sur les sérums issus de l'immunisation sous-cutanée indiquaient des niveaux élevés d'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB. Ces derniers, atteignant 2500pg/mL et 7000pg/mL respectivement, ont été obtenus suite à l'immunisation avec les complexes 92.10/pVax1-4sfgf-2 et 92.10/pVax1-pdgf-bb respectivement.

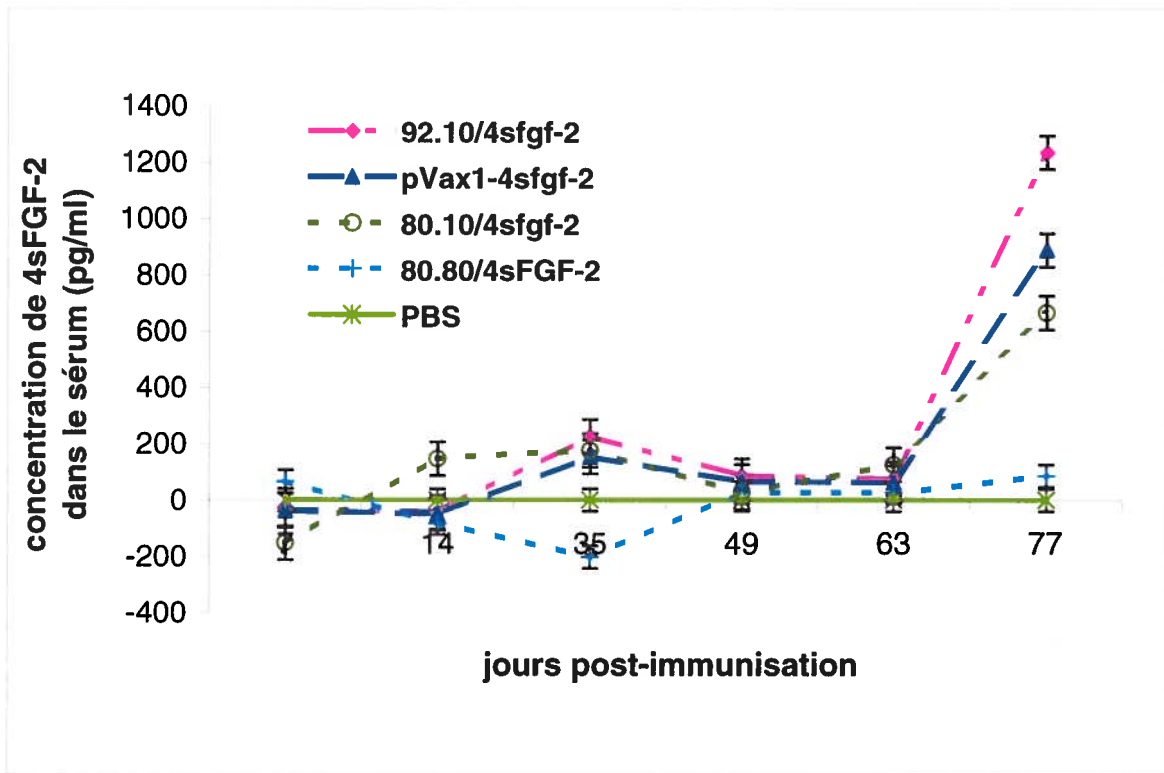
Par ailleurs, le taux de production d'anticorps spécifiques à la protéine recombinante 4sFGF-2 détecté dans le cas de l'immunisation sous-cutanée avec le complexe 80.10/4sfgf-2 s'est avéré être le plus fort parmi tous les autres groupes immunisés soit une valeur de D.O atteignant 1.2 (*figure 19*). Dans le cas de l'immunisation sous-cutanée et intramusculaire des souris avec les nanoparticules chitosane/pVax1-pdgf-bb, le niveau de production d'anticorps anti-PDGF-BB produit est relativement faible avec des valeurs maximales de D.O de l'ordre de 0.2 et 0.3 respectivement (*figures 20 et 24*).

**Figure 21: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante 4sFGF-2 suite à l'immunisation intramusculaire avec le vecteurs recombinant pVax1-4sfgf-2**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- PBS : témoin négatif
- pVax1-4sfgf2 : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5

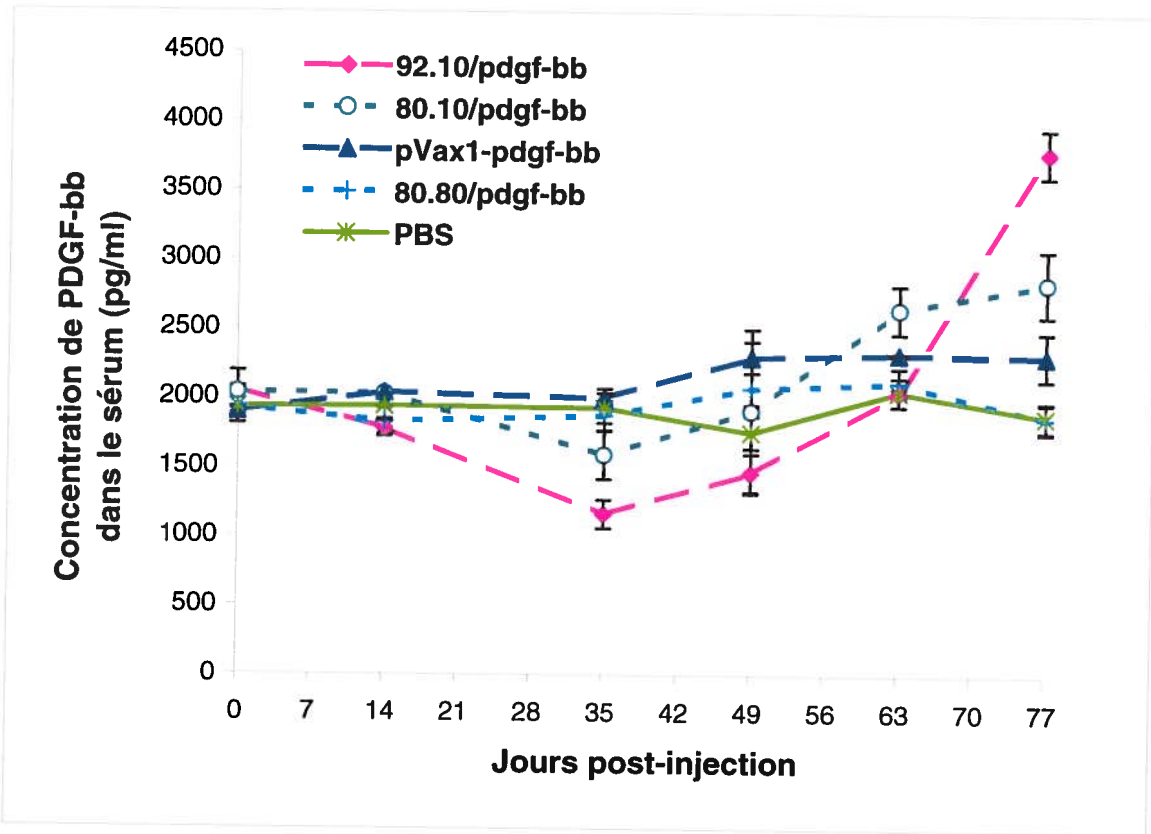
La valeur reportée sur le graphique correspond à la moyenne des concentrations de protéines recombinantes 4sFGF-2 dans les sérums d'individus de chaque groupe testé.



**Figure 22: Analyse par ELISA de l'expression de la protéine recombinante PDGF-BB suite à l'immunisation intramusculaire avec le vecteurs recombinant pVax1-pdgf-bb**

- PBS : témoin négatif
- pVax1-pdgf-bb : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1-pdgf-bb: vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-BB injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1-pdgf-bb: vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-BB injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1-pdgf-bb: vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-BB injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5

La valeur reportée sur le graphique correspond à la moyenne des concentrations de protéines recombinantes PDGF-BB dans les sérums d'individus de chaque groupe testé.

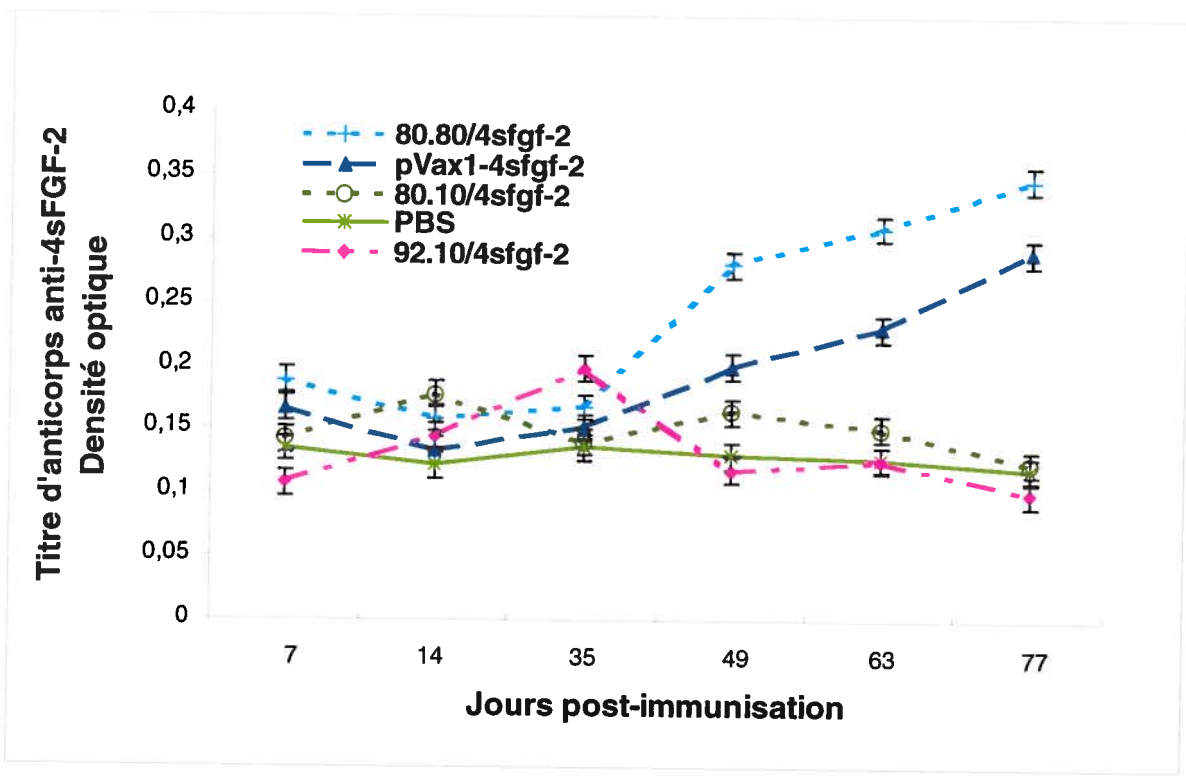


**Figure 23: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection intramusculaire du vecteur recombinant pVax1-4sfgf-2**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- PBS : témoin négatif
- pVax1-4sfgf-2 : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1-4sfgf-2 : vecteur recombinant exprimant la protéine 4sFGF-2 injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5

La valeur reportée sur le graphique est la moyenne des densités optiques des sérums d'individus de chaque groupe testé.



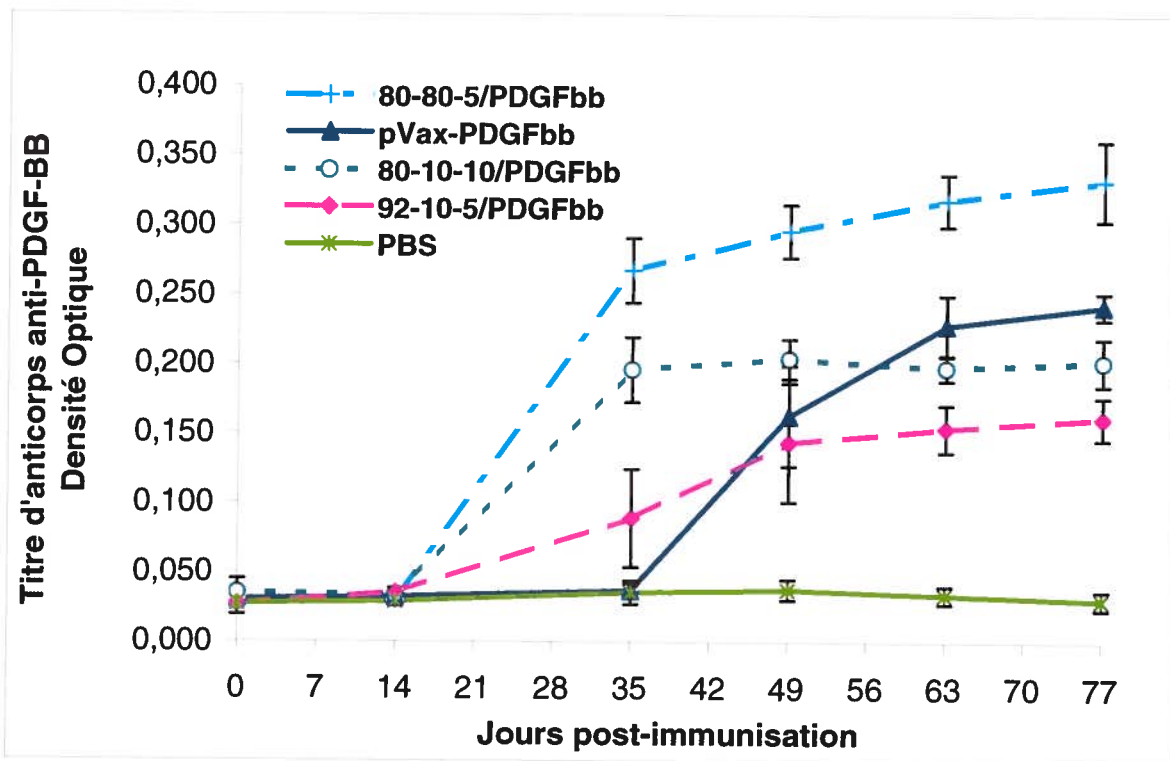


**Figure 24: Analyse par ELISA de la réponse humorale induite par injection intramusculaire du vecteur recombinant pVax1-pdgf-bb**

Les tests ELISA ont été effectués sur les sérums de souris Balb/c des groupes immunisés avec :

- PBS : témoin négatif
- pVax1-pdgf-bb : témoin positif
- complexe 92.10/pVax1-pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-bb injecté en association avec la formulation de chitosane 92.10.5
- complexe 80.10/pVax1- pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-bb injecté en association avec la formulation de chitosane 80.10.10
- complexe 80.80/pVax1- pdgf-bb : vecteur recombinant exprimant la protéine PDGF-bb injecté en association avec la formulation de chitosane 80.80.5

La valeur reportée sur le graphique est la moyenne des densités optiques des sérums d'individus de chaque groupe testé.



## DISCUSSION

Le premier volet de ce projet consistait à produire du matériel biologique (ADN du fgf-2 et du pdgf-bb) pour l'immunisation génétique de souris Balb/c grâce au clonage moléculaire. Afin de construire les plasmides recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb, nous avons amplifié le cadre de lecture ouvert de ces facteurs de croissance et nous les avons ensuite séquencés afin d'en vérifier l'intégrité. Les résultats de séquençage ont révélé une homologie de 100% pour le pdgf-bb et de plus de 99% pour le 4sfgf-2 avec la séquence des gènes humains respectifs pdgf-bb et fgf-2 confirmant ainsi l'intégrité structurelle de ces vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb. Seule l'extrémité 5' du gène 4sfgf-2 est substituée par la séquence du peptide signal du gène fgf-4 pour favoriser une meilleure expression du gène. Nos résultats ont démontré que cette substitution n'affectait pas l'expression de la protéine recombinante 4sFGF-2.

Comme rapporté dans plusieurs études *in vitro* (Mao, Roy et al. 2001; van der Lubben, Verhoef et al. 2001; van der Lubben, van Opdorpe et al. 2002), le chitosane peut avoir contribué à une meilleure efficacité de transfection en facilitant l'introduction de l'ADN dans les cellules hôtes. Nous avons décrit dans ce travail une méthode de transfection médiée par deux types de polymères : la lipofectamine et le chitosane. Ce type de transfection permet en principe d'augmenter l'efficacité de transfection en plaçant l'ADN sous forme de complexes directement dans le microenvironnement cellulaire. Une telle stratégie a été développée sur des surfaces de polystyrène utilisées pour la culture cellulaire (Segura and Shea 2002) et sur des membranes de PLGA avec différents types de complexes (PLL/ADN, PEI/ADN, CHI/ADN) (Shea, Smiley et al. 1999).

Nos résultats ont montré d'une part que l'efficacité de transfection cellulaire *in vitro*, lors de l'utilisation des formulations de chitosane, est très élevée comparativement à la transfection cellulaire avec le plasmide pVax/LacZ seul soit un taux de transfection variant de 50% à 70% dans le cas d'une transfection cellulaire par les complexes chitosane/ADN plasmidique au lieu de 10% d'efficacité de transfection cellulaire par l'ADN plasmidique seulement. D'autre part, l'efficacité relative à l'utilisation de la lipofectamine comme agent de transfection, en terme de pourcentage de cellules transfectées, après un temps de contact

d'environ 18 heures, est faible comparativement à l'efficacité de transfection par le chitosane permettant un taux de transfection cellulaire variant de 30% à 60% de plus que celui obtenu avec l'emploi de la lipofectamine. Ces résultats témoignent de l'efficacité du chitosane dans la transfection cellulaire.

Par ailleurs, l'effet protecteur des particules de chitosane sur l'ADN a été évalué par des tests de digestion par la *DNase I*. Cette dernière a été identifiée comme étant l'enzyme capable de dégrader les acides nucléiques potentiellement présents dans le sérum (Barry, Pinto-Gonzalez et al. 1999).

Nos résultats montrent que l'ADN plasmidique condensé par chacune des trois formulations de chitosane n'est pas dégradé par la *DNase I*, ce qui suggère que le chitosane joue un rôle protecteur des acides nucléiques contre une éventuelle digestion enzymatique dans les conditions physiologiques. En revanche, l'ADN nu est dégradé suite au traitement à la *DNase I* ce qui se traduit par la présence de plusieurs bandes sur le gel d'électrophorèse correspondant à plusieurs fragments d'ADN de tailles différentes générés suite à la digestion par l'enzyme de restriction *DNase I* (*figure 15*). Ces derniers résultats associés à ceux obtenus lors des tests de transfection *in vitro* suggèrent que l'intégrité fonctionnelle de l'ADN plasmidique pVax1<sup>®</sup>lacZ est maintenue dans les "microsphères" de chitosane puisque le gène LacZ a pu être exprimé par les cellules transfectées. Il a été décrit que l'efficacité de transfection médiée par des polycations est supérieure à une approche de transfection liposomale grâce à leur faible pouvoir cytotoxique (Cooper 1996). Nos expériences nous amènent à conclure que le chitosane 80-10-10 semble être l'agent de transfection le plus efficace pour livrer l'ADN plasmidique pVax1<sup>®</sup>lacZ dans un système *in vitro*. Mais il faut encore tenter d'expliquer les différences d'efficacité observées. Il faut aussi en déterminer la cytotoxicité afin de choisir, parmi les 3 vecteurs candidats, l'agent de transfection le plus approprié pour des tests *in vivo*.

Nos travaux d'immunisation de souris BALB/C nous ont permis de vérifier, dans un modèle *in vivo*, l'intégrité des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB livrées dans un contexte de *gene delivery system*. Nous avons co-injecté les vecteurs recombinants avec le chitosane, servant de moyen de livraison génétique, afin d'améliorer l'expression des

protéines recombinantes. En effet, nous avons utilisé le chitosane pour former des systèmes particuliers (nanoparticules et microparticules). Ces systèmes encapsulent l'ADN chargé négativement *via* des interactions électrostatiques entre les groupes phosphates de l'acide nucléique et les groupes amines du chitosane. Ce genre de système permet, entre autre, de protéger ces molécules de la dégradation et d'améliorer leur libération et leur absorption sous forme active. Ces aspects sont développés pour l'administration de peptides ou de protéines à visée immunologique ou thérapeutique (Calvo, Remunan-Lopez et al. 1997; Fernandez-Urrusuno, Calvo et al. 1999) et pour l'administration d'acides nucléiques (Roy, Cox et al. 1999). Ces systèmes permettent aussi la libération contrôlée et prolongée des substances enrobées de chitosane suite à une dégradation des particules de chitosane par les enzymes bactériennes (Lorenzo-Lamosa, Remunan-Lopez et al. 1998).

Un des objectifs de ce projet de recherche a consisté en la caractérisation de l'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB *in vivo* associée à l'immunisation, sous-cutanée et intramusculaire, de souris à l'aide des vecteurs recombinants pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb. Les deux techniques d'immunisation ont effectivement permis l'induction d'une réponse humorale spécifique dirigée contre chacune de ces protéines recombinantes. Le but de ces expériences d'immunisation consiste, entre autres, à évaluer laquelle des deux voies d'administration favoriserait une meilleure livraison du gène et ainsi un niveau d'expression optimale de la protéine recombinante produite. Nos résultats ont montré que le niveau de production des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB ainsi que le taux de production d'anticorps spécifiques à celles-ci sont précoces et plus élevées dans le cas d'une immunisation par voie sous-cutanée comparativement aux réponses générées suite à une immunisation intramusculaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que les quantités d'ADN injectées par voie sous-cutanée sont 10 fois plus importantes que la quantité d'ADN injectée par voie intramusculaire soit 165 µg et 16.5 µg respectivement (**Tableau 4**). La production élevée des protéines recombinantes induit leur reconnaissance par les cellules présentatrices d'antigènes lesquelles vont ensuite donner l'ordre aux cellules du système immunitaire de proliférer et de se différencier suite à des interactions cellulaires. Le système immunitaire ainsi activé permet la production d'anticorps spécifiques par les plasmocytes (**figure 25**).

L'injection à des souris Balb/c d'une suspension d'ADN purifié pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb couplée au chitosane nous a permis de comparer la réponse immunitaire induite. Les mêmes formulations de chitosane, 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 [DDA-MW-N:P ratio], utilisées pour les tests *in vitro*, ont servi à la formation de complexes chitosane/ADN plasmidique avec chacun des deux plasmides recombinants, pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb. Les deux premières formulations, 92-10-5 et 80-10-10, se sont avérées plus efficaces dans la livraison des plasmides recombinants comparativement à la formulation 80-80-5 lors de nos tests *in vivo*. Un niveau d'expression relativement efficace des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB a été démontré, soit des concentrations de 2500 pg/ml et de 7000 pg/ml respectivement suite à la livraison génétique par la formulation 92-10-5, ce qui confirme l'efficacité de transfection cellulaire élevée et de livraison des vecteurs pVax1-4sfgf-2 et pVax1-pdgf-bb par cette formulation de chitosane. De plus, la formulation 80-10-10 a permis la production d'un niveau d'expression de la protéine recombinante PDGF-BB relativement élevé à partir de 63 jours post-injection sous-cutanée soit une concentration de protéine recombinante PDGF-BB de l'ordre de 5000 pg/ml (*figure 18*). Ces résultats corroborent les travaux de Lavertu et son équipe (2006) démontrant que plusieurs formulations de chitosane induisent un niveau efficace d'expression du transgène dont deux formulations, 92-10-5 et 80-10-10 qui correspondent aux meilleurs contrôles positifs de leurs expériences *in vitro* (Lavertu, Methot et al. 2006).

Par ailleurs, nous avons observé que le niveau d'expression de protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB après immunisation sous-cutanée et intramusculaire avec les complexes chitosane/ADN est supérieur au niveau d'expression de ces mêmes protéines recombinantes généré après immunisation avec l'ADN seul. Ces résultats montrent que le chitosane est un puissant stimulateur d'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB dans le modèle de souris immunisées aussi bien par voie sous cutanée que par voie intramusculaire. Nous présumons que le chitosane, en plus de servir de véhicule pour la livraison des gènes 4sfgf-2 et pdgf-bb dans les noyaux cellulaires, a agit comme stimulateur de l'expression des protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB contribuant ainsi à l'augmentation de leur niveau d'expression. La figure 25

permet de comprendre les événements produits lors des expériences d'immunisation des souris avec les complexes chitosane/ADN.

En plus d'une quantité importante de protéine recombinante 4s-FGF2 produite pour le groupe de souris injectées par voie sous-cutanée avec le complexe 92.10/pVax1-4sfgf-2 soit une concentration atteignant 2500 pg/ml, nous avons observé un niveau de production d'anticorps 2 fois supérieure à celui obtenu pour le groupe de souris immunisé avec le plasmide recombinant pVax1-4sfgf-2 seul. De même avec le groupe de souris Balb/c pour lequel l'immunisation par voie sous-cutanée à l'aide des complexes 80.10/pVax1-4sfgf-2 a suscité une production d'anticorps anti-4sFGF-2 plus élevée que celle du groupe de souris immunisées à l'aide du vecteur recombinant pVax1-4sFGF-2 seul. Ces réponses humorales élevées démontrent clairement le rôle du chitosane comme activateur de la réponse immunitaire. Ces résultats sont appuyés par des études effectuées par d'autres chercheurs, qui en administrant du sel de chitosane, tel que le glutamate de chitosane associé aux antigènes par voie intranasale chez la souris, ont observé une réponse en anticorps IgG et IgA sérique et locale beaucoup plus élevée que celle induite sans les chitosanes (Bacon, Makin et al. 2000).

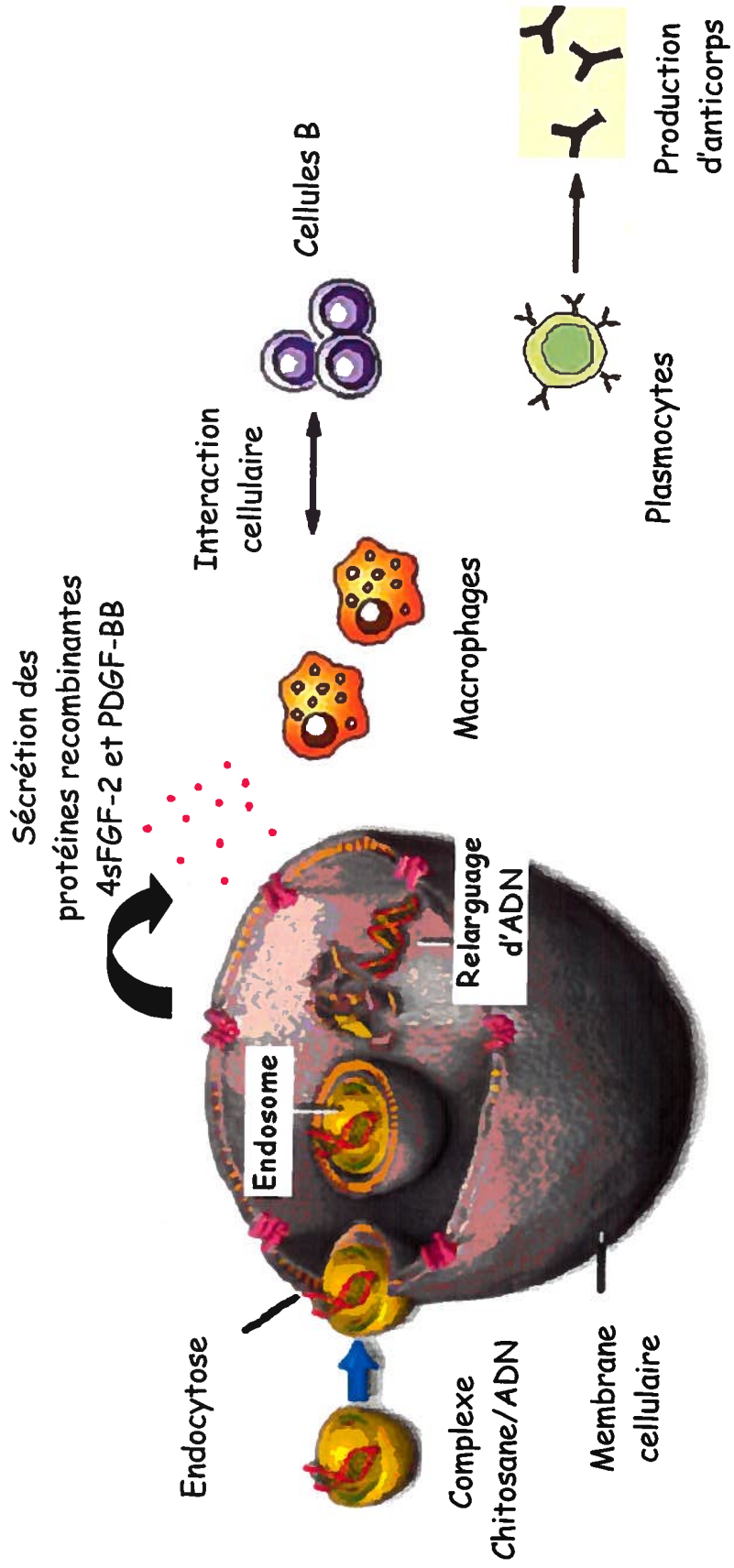
Les résultats des expériences d'immunisations montrent que le niveau de production des anticorps spécifiques est faible. Plusieurs explications possibles nous permettent de comprendre ce phénomène. D'une part la réponse humorale observée pour chaque groupe de souris immunisées est déjà maximale et d'autre part il est possible qu'en présence d'un fort niveau d'anticorps de haute affinité pour l'antigène on ne puisse détecter l'apparition d'autres nombreux anticorps de faible affinité (Kim, Werblin et al. 1974). La technique ELISA que nous avons employé pour détecter les anticorps spécifiques aux protéines recombinantes 4sFGF-2 et PDGF-BB n'était pas conçue pour détecter les anticorps de faible affinité, ce qui ne nous permet pas de conclure sur leur présence ou absence dans le sérum des souris immunisées.

Les mécanismes expliquant l'efficacité des immunisations avec le chitosane ne sont pas clairement élucidés. Néanmoins, plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de ce type d'immunisation tels que la nature des gènes, la capacité de la protéine à être présentée

au système immunitaire de façon appropriée (Chow, Huang et al. 1997), ou encore la quantité d'ADN injecté, le site d'injection, le protocole d'immunisation et le modèle animal étudié (Cohen, Boyer et al. 1998).



**Figure 25: Événements produits *in vivo* suite à l'immunisation des souris avec les complexes chitosane/ ADN recombinant**



## CONCLUSION

Dans un premier temps, les vecteurs recombinants capables d'exprimer les protéines 4sFGF-2 et PDGF-BB ont été construits avec succès en utilisant le vecteur d'expression eucaryote pVax1 aboutissant aux vecteurs recombinants pVax1-4sFGF-2 et pVax1-PDGF-BB. La production et l'accumulation d'une molécule thérapeutique versus l'induction de réactions immunitaires protectrices suite à la livraison d'ADN dépendent entre autres de la voie d'administration des molécules recombinantes. En effet, il a été démontré que la réponse immunitaire de type Th1 et celle de type Th2 était dépendante de la voie d'administration, de la dose et de la méthode d'injection (Chow, Chiang et al. 1998).

Cette étude reflète les effets sur le niveau d'expression de protéines recombinantes et le type de réaction immunitaire observés suite à deux voies d'administration différentes, intramusculaire (IM) et sous-cutanée (SC). Nos injections IM ont suscité une réponse humorale plus forte que les injections SC tel qu'en témoignent nos résultats avec des titres d'anticorps élevés et précoces dans le cas des injections IM par rapport aux injections SC. En accord avec ces observations, l'administration par voie SC a été associée à une production accrue et une accumulation de protéines recombinantes par rapport à la voie d'administration IM. Ces deux voies d'administration induisent une réponse de type Th2, mais elles agissent de manière différente quant à l'augmentation des anticorps spécifiques (Schirmbeck and Reimann 2001; Bramwell, Eyles et al. 2002; Bos, Kanellos et al. 2004).

Nous avons montré que la livraison d'ADN par voie IM et SC favorise la présence à long terme des vecteurs d'expressions chitosane/ADN et permet l'expression prolongée du transgène avec une production spécifique d'anticorps et de protéines recombinantes du jour 14 au jour 63 après injection.

Nous avons constaté que les formulations de chitosane 92-10-5 et 80-10-10 (ratio MW-DDA-N:P) favorisent la transfection *in vivo* avec des niveaux de protéines recombinantes en circulation plus élevés que celles engendrés par la formulation 80-80-5, ce qui est en accord avec nos précédents résultats *in vitro*. L'ensemble de nos observations concernant l'augmentation du niveau d'expression des protéines suite à une administration SC en

comparaison à la voie IM nous permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle les formulations de chitosane 92-10-5 et 80-10-10 constitueraient d'excellents vecteurs non-viraux pour des applications en thérapie génique en utilisant les plasmides pVax1-4sFGF-2 et pVax1-PDGF-BB administrés par voie SC. Dans le cas où les vaccins à ADN sont utilisés pour une meilleure production d'anticorps, la formulation de chitosane 80-80-5 semble particulièrement efficace pour générer un niveau de production d'anticorps plusieurs fois plus élevé que dans le cas d'une administration de plasmide recombinant seul.

Enfin, il faut noter que les molécules thérapeutiques administrées par voie sous-cutanée et intramusculaire dans notre étude peuvent aussi être administrées par voie intra-veineuse et/ou par voie orale et permettre ainsi le développement de nouvelles thérapies aussi bien dans le domaine de la médecine régénératrice que dans le traitement des maladies métaboliques et infectieuses.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Ahmad, I., M. Longenecker, et al. (1993). "Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice." Cancer Res **53**(7): 1484-8.
- Akbari, O., N. Panjwani, et al. (1999). "DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity." J Exp Med **189**(1): 169-78.
- Antoniades, H. N., C. D. Scher, et al. (1979). "Purification of human platelet-derived growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1809-13.
- Babiuk, L. A., H. van Drunen Littel-van den, et al. (1999). "Immunization of animals: from DNA to the dinner plate." Vet Immunol Immunopathol **72**(1-2): 189-202.
- Bacon, A., J. Makin, et al. (2000). "Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens." Infect Immun **68**(10): 5764-70.
- Barry, M. E., D. Pinto-Gonzalez, et al. (1999). "Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection." Hum Gene Ther **10**(15): 2461-80.
- Bennett, C. B. and A. J. Rainbow (1989). "DNA damage and biological expression of adenovirus: a comparison of liquid versus frozen conditions of exposure to gamma rays." Radiat Res **120**(1): 102-12.
- Bennett, N. T. and G. S. Schultz (1993). "Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing." Am J Surg **166**(1): 74-81.
- Bennett, S. P., G. D. Griffiths, et al. (2003). "Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers." Br J Surg **90**(2): 133-46.
- Besarab, A. (2001). "Darbepoetin Alfa: A Viewpoint by Anatole Besarab." Drugs **61**(14): 2105-2106.
- Bhattacharjee, A. K., M. J. Izadjoo, et al. (2006). "Comparison of protective efficacy of subcutaneous versus intranasal immunization of mice with a Brucella melitensis lipopolysaccharide subunit vaccine." Infect Immun **74**(10): 5820-5.
- Bos, G. W., T. Kanellos, et al. (2004). "Cationic polymers that enhance the performance of HbsAg DNA in vivo." Vaccine **23**(4): 460-9.
- Boshart, M., F. Weber, et al. (1985). "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus." Cell **41**(2): 521-30.
- Bourne, N., G. N. Milligan, et al. (1996). "DNA immunization confers protective immunity on mice challenged intravaginally with herpes simplex virus type 2." Vaccine **14**(13): 1230-4.
- Bowen-Pope, D. F., T. W. Malpass, et al. (1984). "Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance." Blood **64**(2): 458-69.
- Boyer, J. D., A. D. Cohen, et al. (2000). "Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines." J Infect Dis **181**(2): 476-83.
- Bramwell, V. W., J. E. Eyles, et al. (2002). "Liposome/DNA complexes coated with biodegradable PLA improve immune responses to plasmid encoding hepatitis B surface antigen." Immunology **106**(3): 412-8.
- Brunner, S., T. Sauer, et al. (2000). "Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus." Gene Ther **7**(5): 401-7.

- Calvo, P., C. Remunan-Lopez, et al. (1997). "Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines." Pharm Res **14**(10): 1431-6.
- Canalis, E., T. L. McCarthy, et al. (1989). "Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro." J Cell Physiol **140**(3): 530-7.
- Cao, R., E. Brakenhielm, et al. (2003). "Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2." Nat Med **9**(5): 604-13.
- Casares, S., K. Inaba, et al. (1997). "Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope." J Exp Med **186**(9): 1481-6.
- Chatelet, C., O. Damour, et al. (2001). "Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films." Biomaterials **22**(3): 261-8.
- Chattergoon, M. A., T. M. Robinson, et al. (1998). "Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells." J Immunol **160**(12): 5707-18.
- Cho, Y. W., J. Jang, et al. (2000). "Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins." Biomacromolecules **1**(4): 609-14.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Chow, Y. H., B. L. Chiang, et al. (1998). "Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes." J Immunol **160**(3): 1320-9.
- Chow, Y. H., W. L. Huang, et al. (1997). "Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2." J Virol **71**(1): 169-78.
- Cohen, A. D., J. D. Boyer, et al. (1998). "Modulating the immune response to genetic immunization." Faseb J **12**(15): 1611-26.
- Conry, R. M., A. F. LoBuglio, et al. (1995). "A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine has in vivo antitumor activity." Gene Ther **2**(1): 59-65.
- Cooper, M. J. (1996). "Noninfectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy." Semin Oncol **23**(1): 172-87.
- Dalla-Favera, R., R. C. Gallo, et al. (1982). "Chromosomal localization of the human homolog (c-sis) of the simian sarcoma virus onc gene." Science **218**(4573): 686-8.
- Dash, P. R., M. L. Read, et al. (1999). "Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery." Gene Ther **6**(4): 643-50.
- Dass, C. R., T. L. Walker, et al. (2002). "Liposomes containing cationic dimethyl dioctadecyl ammonium bromide: formulation, quality control, and lipofection efficiency." Drug Deliv **9**(1): 11-8.
- Davis, A. R., J. M. Pink, et al. (1993). "Isolated antibody to hepatitis B core antigen in blood donors and immune response to hepatitis B vaccination." Aust N Z J Med **23**(2): 215.

- Davis, H. L., B. A. Demeneix, et al. (1993). "Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle." Hum Gene Ther 4(6): 733-40.
- Davis, H. L., M. L. Michel, et al. (1994). "Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen." Vaccine 12(16): 1503-9.
- Davis, H. L., M. L. Michel, et al. (1993). "DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody." Hum Mol Genet 2(11): 1847-51.
- De Smedt, S. C., J. Demeester, et al. (2000). "Cationic polymer based gene delivery systems." Pharm Res 17(2): 113-26.
- DeBerardino, T. M., J. G. Branstetter, et al. (2007). "Arthroscopic treatment of unresolved Osgood-Schlatter lesions." Arthroscopy 23(10): 1127 e1-3.
- Denuziere, A., D. Ferrier, et al. (1998). "Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties." Biomaterials 19(14): 1275-85.
- Doria-Rose, N. A. and N. L. Haigwood (2003). "DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens." Methods 31(3): 207-16.
- Escriou, V., M. Carriere, et al. (2001). "Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer." J Gene Med 3(2): 179-87.
- Fang, N., V. Chan, et al. (2001). "Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH." Biomacromolecules 2(4): 1161-8.
- Feltquate, D. M., S. Heaney, et al. (1997). "Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization." J Immunol 158(5): 2278-84.
- Ferkol, T., C. S. Kaetzel, et al. (1993). "Gene transfer into respiratory epithelial cells by targeting the polymeric immunoglobulin receptor." J Clin Invest 92(5): 2394-400.
- Fernandez-Urrusuno, R., P. Calvo, et al. (1999). "Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles." Pharm Res 16(10): 1576-81.
- Ferrara, N., K. A. Houck, et al. (1991). "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides." J Cell Biochem 47(3): 211-8.
- Fredriksson, L., H. Li, et al. (2004). "The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms." Cytokine Growth Factor Rev 15(4): 197-204.
- Fynan, E. F., H. L. Robinson, et al. (1993). "Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine." DNA Cell Biol 12(9): 785-9.
- Fynan, E. F., R. G. Webster, et al. (1993). "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations." Proc Natl Acad Sci U S A 90(24): 11478-82.
- Gabizon, A., R. Isacson, et al. (1994). "Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin." Acta Oncol 33(7): 779-86.
- Geissler, M., A. Gesien, et al. (1997). "Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids." J Immunol 158(3): 1231-7.
- Giri, D., F. Ropiquet, et al. (1999). "Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer." Clin Cancer Res 5(5): 1063-71.

- Guild, B. C., M. H. Finer, et al. (1988). "Development of retrovirus vectors useful for expressing genes in cultured murine embryonal cells and hematopoietic cells in vivo." J Virol **62**(10): 3795-801.
- Gurunathan, S., L. Stobie, et al. (2000). "Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells." J Immunol **165**(2): 915-24.
- Gurunathan, S., C. Y. Wu, et al. (2000). "DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity." Curr Opin Immunol **12**(4): 442-7.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Haniu, M., M. F. Rohde, et al. (1993). "Disulfide bonds in recombinant human platelet-derived growth factor BB dimer: characterization of intermolecular and intramolecular disulfide linkages." Biochemistry **32**(9): 2431-7.
- Hart, C. E., M. Bailey, et al. (1990). "Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets." Biochemistry **29**(1): 166-72.
- Hejazi, R. and M. Amiji (2003). "Chitosan-based gastrointestinal delivery systems." J Control Release **89**(2): 151-65.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev **79**(4): 1283-316.
- Hendrickson, M. L. (1993). "How to access an implanted port." Nursing **23**(1): 50-3.
- Henke, A. (2002). "DNA immunization--a new chance in vaccine research?" Med Microbiol Immunol **191**(3-4): 187-90.
- Hoch, R. V. and P. Soriano (2003). "Roles of PDGF in animal development." Development **130**(20): 4769-84.
- Ishida, K., R. Kuroda, et al. (2007). "The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel." Tissue Eng **13**(5): 1103-12.
- Jeschke, M. G., R. E. Barrow, et al. (1999). "IGF-I gene transfer in thermally injured rats." Gene Ther **6**(6): 1015-20.
- Kamiya, H., H. Tsuchiya, et al. (2001). "Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors." Adv Drug Deliv Rev **52**(3): 153-64.
- Kim, Y. K., T. P. Werblin, et al. (1974). "Distribution of antibody-binding affinity. 3. Detection of low affinity antibody in the presence of high affinity antibody." J Immunol **112**(6): 2002-12.
- Kircheis, R., A. Kichler, et al. (1997). "Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery." Gene Ther **4**(5): 409-18.
- Klinman, D. M., J. Conover, et al. (1998). "Immunogenicity and efficacy of a DNA vaccine in aged mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **53**(4): B281-6.
- Koprowski, H. and D. B. Weiner (1998). "DNA vaccination/genetic vaccination." Curr Top Microbiol Immunol **226**: V-XIII.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1999). "Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA." Pharmacol Ther **84**(2): 113-20.
- Kucerova, L. (1998). "DNA/genetic vaccination (minireview)." Viral Immunol **11**(2): 55-63.



- Kursa, M., G. F. Walker, et al. (2003). "Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer." Bioconjug Chem **14**(1): 222-31.
- Lavertu, M., S. Methot, et al. (2006). "High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation." Biomaterials **27**(27): 4815-24.
- Lee, C. H., Y. H. Ni, et al. (2003). "Synergistic effect of polyethylenimine and cationic liposomes in nucleic acid delivery to human cancer cells." Biochim Biophys Acta **1611**(1-2): 55-62.
- Lee, R. J. and P. S. Low (1995). "Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro." Biochim Biophys Acta **1233**(2): 134-44.
- Leitner, W. W., H. Ying, et al. (2000). "Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors." Cancer Res **60**(1): 51-5.
- Lorenzo-Lamosa, M. L., C. Remunan-Lopez, et al. (1998). "Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery." J Control Release **52**(1-2): 109-18.
- Lukashev, M. E. and Z. Werb (1998). "ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." Trends Cell Biol **8**(11): 437-41.
- MacDonald, K. P., W. G. Murrell, et al. (1996). "FGF2 promotes neuronal differentiation in explant cultures of adult and embryonic mouse olfactory epithelium." J Neurosci Res **44**(1): 27-39.
- MacGregor, R. R., J. D. Boyer, et al. (2000). "Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data." J Infect Dis **181**(1): 406.
- MacGregor, R. R., J. D. Boyer, et al. (1998). "First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response." J Infect Dis **178**(1): 92-100.
- MacLaughlin, F. C., R. J. Mumper, et al. (1998). "Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery." J Control Release **56**(1-3): 259-72.
- Manickan, E., R. J. Rouse, et al. (1995). "Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes." J Immunol **155**(1): 259-65.
- Mao, H. Q., K. Roy, et al. (2001). "Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency." J Control Release **70**(3): 399-421.
- Marshall, E. (1999). "Gene therapy death prompts review of adenovirus vector." Science **286**(5448): 2244-5.
- Mayer, L. D., L. C. Tai, et al. (1989). "Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice." Cancer Res **49**(21): 5922-30.
- McLean, J. W., E. A. Fox, et al. (1997). "Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): H387-404.
- Meddahi, A., F. Bree, et al. (2002). "Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration." J Biomed Mater Res **62**(4): 525-31.

- Meijs, M. F., L. Timmers, et al. (2004). "Basic fibroblast growth factor promotes neuronal survival but not behavioral recovery in the transected and Schwann cell implanted rat thoracic spinal cord." J Neurotrauma **21**(10): 1415-30.
- Mignatti, P., T. Morimoto, et al. (1992). "Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex." J Cell Physiol **151**(1): 81-93.
- Mizuno, M., R. Fujisawa, et al. (1996). "Bone chondroadherin promotes attachment of osteoblastic cells to solid-state substrates and shows affinity to collagen." Calcif Tissue Int **59**(3): 163-7.
- Mohan, S. and D. J. Baylink (1991). "Bone growth factors." Clin Orthop Relat Res(263): 30-48.
- Mor, G. (1998). "Plasmid DNA: a new era in vaccinology." Biochem Pharmacol **55**(8): 1151-3.
- Murakami, S., S. Takayama, et al. (1999). "Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor." J Periodontal Res **34**(7): 425-30.
- Nakamura, T., Y. Hara, et al. (1998). "Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture." J Bone Miner Res **13**(6): 942-9.
- Nevins, M., W. V. Giannobile, et al. (2005). "Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial." J Periodontol **76**(12): 2205-15.
- Ogris, M. and E. Wagner (2002). "Targeting tumors with non-viral gene delivery systems." Drug Discov Today **7**(8): 479-85.
- Ogris, M. and E. Wagner (2002). "Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes." Somat Cell Mol Genet **27**(1-6): 85-95.
- Okada, E., S. Sasaki, et al. (1997). "Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens." J Immunol **159**(7): 3638-47.
- Ostman, A., M. Andersson, et al. (1991). "Identification of three amino acids in the platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain that are important for binding to the PDGF beta-receptor." J Biol Chem **266**(16): 10073-7.
- Payette, P. J., R. D. Weeratna, et al. (2001). "Immune-mediated destruction of transfected myocytes following DNA vaccination occurs via multiple mechanisms." Gene Ther **8**(18): 1395-400.
- Peachman, K. K., M. Rao, et al. (2003). "Immunization with DNA through the skin." Methods **31**(3): 232-42.
- Pedersen, P. H., G. O. Ness, et al. (1994). "Heterogeneous response to the growth factors [EGF, PDGF (bb), TGF-alpha, bFGF, IL-2] on glioma spheroid growth, migration and invasion." Int J Cancer **56**(2): 255-61.
- Pertmer, T. M., T. R. Roberts, et al. (1996). "Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery." J Virol **70**(9): 6119-25.
- Pierce, G. F., T. A. Mustoe, et al. (1991). "Role of platelet-derived growth factor in wound healing." J Cell Biochem **45**(4): 319-26.

- Postlethwaite, A. E., J. M. Seyer, et al. (1978). "Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(2): 871-5.
- Raz, E., D. A. Carson, et al. (1994). "Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9519-23.
- Robbins, P. D. and S. C. Ghivizzani (1998). "Viral vectors for gene therapy." Pharmacol Ther **80**(1): 35-47.
- Robinson, M. L., P. A. Overbeek, et al. (1995). "Extracellular FGF-1 acts as a lens differentiation factor in transgenic mice." Development **121**(2): 505-14.
- Robson, M. C., T. A. Mustoe, et al. (1998). "The future of recombinant growth factors in wound healing." Am J Surg **176**(2A Suppl): 80S-82S.
- Ross, R., J. Glomset, et al. (1974). "A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1207-10.
- Roy, A., R. A. Cox, et al. (1999). "Protein synthesis in the plastid of *Plasmodium falciparum*." Protist **150**(2): 183-8.
- Samulski, R. J. (1993). "Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus." Curr Opin Genet Dev **3**(1): 74-80.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Savage, M. P., C. E. Hart, et al. (1993). "Distribution of FGF-2 suggests it has a role in chick limb bud growth." Dev Dyn **198**(3): 159-70.
- Schirmbeck, R. and J. Reimann (2001). "Modulation of gene-gun-mediated Th2 immunity to hepatitis B surface antigen by bacterial CpG motifs or IL-12." Intervirology **44**(2-3): 115-23.
- Segura, T. and L. D. Shea (2002). "Surface-tethered DNA complexes for enhanced gene delivery." Bioconjug Chem **13**(3): 621-9.
- Shah, M., D. M. Foreman, et al. (1995). "Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring." J Cell Sci **108** ( Pt 3): 985-1002.
- Shea, L. D., E. Smiley, et al. (1999). "DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering." Nat Biotechnol **17**(6): 551-4.
- Sohn, Y. D., H. J. Lim, et al. (2001). "A novel recombinant basic fibroblast growth factor and its secretion." Biochem Biophys Res Commun **284**(4): 931-6.
- Stheneur, C., M. F. Dumontier, et al. (2003). "Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes." Biochem J **369**(Pt 1): 63-70.
- Suzuki, F. (1999). "Cartilage-derived growth factor and antitumor factor: past, present, and future studies." Biochem Biophys Res Commun **259**(1): 1-7.
- Touriol, C., S. Bornes, et al. (2003). "Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons." Biol Cell **95**(3-4): 169-78.
- Tozum, T. F. and B. Demiralp (2003). "Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry." J Can Dent Assoc **69**(10): 664.

- Ulmer, J. B., R. R. Deck, et al. (1996). "Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells." Immunology **89**(1): 59-67.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." Science **259**(5102): 1745-9.
- van Beuningen, H. M., P. M. van der Kraan, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint." Lab Invest **71**(2): 279-90.
- van der Lubben, I. M., F. A. van Opdorp, et al. (2002). "Transport of chitosan microparticles for mucosal vaccine delivery in a human intestinal M-cell model." J Drug Target **10**(6): 449-56.
- van der Lubben, I. M., J. C. Verhoef, et al. (2001). "Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches." Biomaterials **22**(7): 687-94.
- Wang, B., K. E. Ugen, et al. (1993). "Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4156-60.
- Wang, M., P. W. Chen, et al. (1995). "Anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes elicited with recombinant and synthetic forms of a model tumor-associated antigen." J Immunother Emphasis Tumor Immunol **18**(3): 139-46.
- Whitman, D. H., R. L. Berry, et al. (1997). "Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery." J Oral Maxillofac Surg **55**(11): 1294-9.
- Whitton, J. L., F. Rodriguez, et al. (1999). "DNA immunization: mechanistic studies." Vaccine **17**(13-14): 1612-9.
- Wickham, T. J., P. W. Roelvink, et al. (1996). "Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types." Nat Biotechnol **14**(11): 1570-3.
- Wolff, J. A., J. J. Ludtke, et al. (1992). "Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle." Hum Mol Genet **1**(6): 363-9.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.
- Xiang, Z. and H. C. Ertl (1995). "Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines." Immunity **2**(2): 129-35.
- Xu, L., A. Sanchez, et al. (1998). "Immunization for Ebola virus infection." Nat Med **4**(1): 37-42.
- Zabransky, A., R. Hadravova, et al. (2008). "Premature processing of mouse mammary tumor virus Gag polyprotein impairs intracellular capsid assembly." Virology.
- Zhang, L., E. Leeman, et al. (1991). "Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor." Am J Physiol **261**(2 Pt 1): C348-54.
- Zhang, X., C. Yu, et al. (2006). "Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints in vitro and in vivo." Biochem Biophys Res Commun **341**(1): 202-8.
- Zhu, N., D. Liggitt, et al. (1993). "Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice." Science **261**(5118): 209-11.