

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS EXPRIMANT TROIS FORMES
DE RÉCEPTEURS TNFR BIOACTIFS CAPABLES D'INHIBER, IN VITRO, L'EFFET DE
LA CYTOKINE PRO-INFLAMMATOIRE TNF α

LAURENT BARTOLO

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

OCTOBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

CARACTÉRISATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS EXPRIMANT TROIS FORMES
DE RÉCEPTEURS TNFR BIOACTIFS CAPABLES D'INHIBER, IN VITRO, L'EFFET DE
LA CYTOKINE PRO-INFLAMMATOIRE TNF α

présenté par : BARTOLO Laurent

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M.JOLICOEUR Mario, Ph. D., président

M.MERZOUKI Abderrazak, Ph. D., membre et directeur de recherche

M.BUSCHMANN Michael D, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M.DUROCHER Yves, Ph. D., membre

DÉDICACE

À ma famille et à mon père décédé le 9 mai 2014

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Abderrazzak Merzouki et mon codirecteur Michael D. Buschmann de m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche et permis de mener à bien mon projet. Leur soutien, leur enseignement et leurs critiques constructives ont été un guide exceptionnel dans mon cheminement académique.

Je voudrais également remercier toute l'équipe du Dr. Buschmann pour leur support intellectuel et moral, particulièrement Chi-Yuan Chang, Julie Tremblay, Marc Lavertu, Charles-Hubert Lafantaisie et Nicolas Tran-Khanh. De plus, j'aimerais remercier mes amis et collègues Myriam Jean, Mohamad-Gabriel Alameh, Mohamed El-Ariss et Almas Siddiqui pour leur aide indispensable et leurs conseils judicieux d'ordre scientifique et personnel. Évidemment, je tiens à offrir mes remerciements sincères à tous les individus ayant contribué à ce projet de maîtrise et en particulier à mes stagiaires : Lamiaa Amzil, Xavier Beaulé et Eddie Armel Lucien A. Magnide.

Mon projet de maîtrise ès sciences appliquées a été rendu possible grâce au support financier des laboratoires du Dr. Merzouki et Dr. Buschmann et aux subventions octroyées aux Drs. Buschmann et Merzouki par les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC).

Je voudrais offrir toute ma gratitude à ma famille pour leur support inébranlable. Ils sont la raison pour laquelle j'ai réussi à mener mes études à terme et auront toujours leur part à mes accomplissements.

RÉSUMÉ

L'arthrose rhumatoïde est une maladie inflammatoire auto-immune. Elle provoque une inflammation chronique des articulations et des os qui conduisent à une destruction progressive de ces derniers. Cette maladie affecte 0.5 à 1 % de la population des pays industrialisés et impose des coûts importants au système de santé. La société canadienne de l'arthrose rapporte que 6 % des hospitalisations totales au Canada sont imputables à l'arthrite. La cytokine TNF α joue un rôle important dans le processus inflammatoire lié à l'arthrose de ce fait la neutralisation et/ou l'inhibition de la surexpression de cette cytokine est une cible prometteuse pour le traitement de l'arthrose rhumatoïde. Il existe plusieurs molécules biologiques bloquant la cytokine TNF α , utilisées avec grand succès pour le traitement de l'arthrose tel que l'anticorps monoclonal anti TNF α Infliximab et le récepteur soluble TNFRII Etanercept. Cependant la durée de vie de ses protéines en circulation est faible et peut nécessiter une augmentation des doses et des injections, avec le risque d'augmentation de la toxicité de ses protéines. Ces inconvénients associés à cette approche thérapeutique peuvent être contournés par une approche de thérapie génique qui permet une production stable de la protéine dans le temps et une expression localisée du transgène. Notre objectif est, en choisissant le rat comme modèle animal de l'arthrose rhumatoïde, de construire des plasmides recombinants contenant des transgènes codant pour des protéines recombinantes correspondantes au récepteur soluble du TNF α capables de bloquer le TNF α . Les plasmides recombinants sont livrés *in vitro* aux cellules à l'aide d'un système de livraison polymérique, le chitosane. Le chitosane s'est avéré le système de livraison idéal pour la protection de L'ADN plasmidique contre la dégradation par les nucléases et pour leur livraison au niveau du cytosol. Nous avons donc construit trois transgènes codant pour des protéines mimant le récepteur soluble du TNF α du rat. Le premier (TNFR) code pour la partie extracellulaire soluble du récepteur TNFRII. Le second (IgTNFR) code pour la partie extracellulaire soluble du récepteur TNFRII couplé à la séquence codante pour les régions CH2 et CH3 de la partie constante d'une immunoglobuline de type G1 (IgG1) du rat excluant la région charnière. Le troisième (IgTNFRd) composé de la partie extracellulaire soluble du récepteur TNFRII couplée à la séquence codante pour les régions CH2 et CH3 de la partie constante d'un IgG du rat incluant la région charnière. La région charnière permet la dimérisation via pont disulfure de l'anticorps et donc de la protéine recombinante IgTNFRd. Le vecteur d'expression eucaryotique pVax1 sécuritaire et approuvé par la FDA (food and drugs administration) a été utilisé pour l'expression de nos trois transgènes. Les

plasmides recombinants sont livrés *in vitro* aux cellules à l'aide d'un système de livraison polymérique, le chitosane. Le chitosane s'est avéré le système de livraison idéal pour la protection de L'ADN plasmidique contre la dégradation par les nucléases et pour leur livraison au niveau du cytosol. Le chitosane 92-10-5 (degré de désacétylation-masse moléculaire-ratio azote : phosphate) a été complexé à l'ADN recombinant pour générer des nanoparticules utilisées lors des expériences de transfection *in vitro* de la lignée cellulaire HEK293. Les résultats en microscopie électronique (ESEM) et en DLS (diffusion dynamique de la lumière) démontrent que les nanoparticules sont respectivement de forme majoritairement sphérique et cylindrique avec un diamètre de l'ordre de 95 nm et un potentiel ζ de l'ordre de 30 mV. La capacité des nanoparticules Chitosane/ADNp à résister à la digestion par les nucléases à des niveaux supraphysiologiques est testée. La taille la charge et la capacité des nanocomplexes de chitosane à protéger l'ADN de la digestion par les nucléases en fait un système de livraison génique adéquat théoriquement. La capacité de ce système à induire la prise en charge du transgène par les cellules transfectées est vérifiée *in vitro*. Les ARN messagers correspondant à la transcription des transgènes codant TNFR, IgTNFR et IgTNFRd sont retrouvés dans les cellules HEK 293 et CHO transfectées par nos nanocomplexes de chitosane. La traduction de ces ARNm est confirmée par un test ELISA non quantitatif permettant de détecter la présence des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd dans les surnageant des cellules HEK293 transfectées. La bioactivité de nos protéines recombinantes est ensuite testée à l'aide des cellules de la lignée WEHI-var-13. Les cellules de la lignée WEHI-var-13 sont sensibles à la présence du TNF α dans leur milieu de culture qui entraîne leur mort cellulaire. Les surnageants de cellules HEK293 transfectées par des nanocomplexes de chitosane transportant les transgènes codant TNFR, IgTNFR et IgTNFRd sont capables d'inhiber cette mort cellulaire induite par TNF α . Les protéines recombinantes produites par les cellules transfectées possèdent donc bien une activité inhibitrice du TNF α . Les nanocomplexes de chitosane transportant les transgènes codant TNFR, IgTNFR et IgTNFRd sont donc capables de transfecter des cellules *in vitro* et de conduire à l'expression des protéines recombinantes bioactives.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that affects joints and leads to gradual destruction of bones and articulations. RA affects 0.5 to 1 % of the population in industrial countries and imposes considerable cost on the healthcare system. According to The Arthritis Society 6 % of total hospitalization in Canada are due to arthritis. The tumor necrosis factor (TNF), a proinflammatory cytokine, plays a key role in the pathogenesis of RA and a lot of drugs targeting this molecule have emerged to treat RA. These molecules such as anti-TNF monoclonal antibody or soluble TNF receptor II, Etanercept, are currently in use to treat RA with success. However, this molecule have some limitation, their half-life is short in circulation requiring high doses and multiple injections which increases their risk to different infections. This limitation can be overcome by gene therapy based strategy. Gene therapy allows a stable and localized production of the therapeutic transgene. Our goal was to design and construct three recombinant plasmids encoding soluble TNF receptors capable of inhibiting TNF in solution. The first recombinant plasmid, TNFR encodes for the extracellular region of the rat TNF receptor II. The second recombinant plasmid, IgTNFR encodes for the extracellular region of the rat TNF receptor II merged to the CH2 and CH3 regions of the constant region of rat immunoglobulin G1 without the hinge region. The third recombinant plasmid, IgTNFRd encodes for the extracellular region of the rat TNF receptor II merged to the CH2 and CH3 regions of the constant region of rat immunoglobulin G1 including the hinge region. The hinge region is responsible for antibody dimerization by disulfure bond. The safe and FDA (food and drugs administration) approved eukaryote plasmid, pVax was selected as expressing vector of the three transgenes. The recombinant plasmids are complexed with the polymeric carrier chitosan to form chitosan-based nanoparticles that protect plasmid DNA against digestion by nucleases until their delivery to the cytosol. The formulation of chitosan 92-10-5 (degree of deacetylation- molecular weight- ratio nitrogen: phosphate) was used to complex recombinant pDNA to form nanoparticles. These nanoparticles were characterized using techniques of electron microscope (ESEM) and dynamic light scattering (DLS). These two techniques showed nanoparticles with spherical and cylindrical shapes with an average diameter of 95 nm and a zeta potential of 30 mV. During this research project, we have clearly demonstrated the capacity of chitosan to protect the plasmid DNA against nuclease digestion at supraphysiological concentrations with the detection of transgene-specific mRNA specific transgene in HEK293 and CHO transfected cell lines. The production

and secretion of TNFR, IgTNFR and IgTNFRd recombinant proteins by transfected HEK 293 cells was demonstrated by ELISA while the bioactivity of the recombinant proteins was tested using WEHI-var-13 cells. WEHI-var-13 cells are sensitive to TNF in their culture medium, which lead to the cells death. Supernatant from transfected HEK293 cells were able to inhibit the cells death induced by TNF on WEHI-var-13 cells. Chitosan noncomplex system with TNFR, IgTNFR and IgTNFRd transgenes were able to transfect cells and lead to bioactive recombinant proteins expression.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XVI
LISTE DES ANNEXES	XIX
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 L'Arthrose Rhumatoïde.....	3
1.1.1 Les aspects sociaux économiques	3
1.1.2 La pathologie.....	4
1.1.3 La destruction des os : le rôle de RANKL et de TNF α	4
1.1.4 Tumor Necrosis Factor α (TNF α)	5
1.1.5 Principaux traitements de l'arthrose rhumatoïde	9
1.1.6 Les agents biologiques bloqueurs de TNF α	11
1.2 Thérapie génique	13
1.2.1 Historique	13
1.2.2 État actuel de la thérapie génique.....	14
1.2.3 Principe de thérapie génique	16
1.3 Le chitosane.....	25

1.3.1	Origine et structure du chitosane.....	25
1.3.2	Chitosane comme vecteur de transfection génique	25
1.3.3	Influence des caractéristiques du chitosane	26
1.3.4	Utilisation du chitosane en thérapie génique.....	28
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE		31
2.1	Clonage.....	31
2.1.1	Clonage de la séquence codante la partie extracellulaire du récepteur TNFR II du rat (TNFR) et de la séquence codante pour la région constante de l'immunoglobuline (Ig) du rat.....	31
2.1.2	Formation des trois constructions plasmidiques pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd.....	34
2.2	Préparation des particules de chitosane/ADN plasmidique (ADNp)	35
2.2.1	Préparation des formulations de chitosane	35
2.2.2	Formation des nanoparticules chitosane/ADNp.....	35
2.3	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosan/ADNp	36
2.3.1	Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosan/ADNp	36
2.3.2	Analyse des nanoparticules chitosan/ADNp par microscopie électronique à balayage.....	36
2.3.3	Étude de la protection de l'ADNp complexé au chitosane (nanoparticules de chitosane/ADNp) contre la digestion par l'ADNase.....	37
2.3.4	Culture cellulaire	38
2.3.5	Transfection des cellules <i>in vitro</i> avec les nanoparticules chitosan/ADNp.	39
2.4	Expression de l'ARN messager (ARNm) correspondant au transgène.....	39
2.5	Comparaison de l'activité des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd contre TNF α : ELISA de compétition.....	41

CHAPITRE 3	RÉSULTATS	43
3.1	Clonage.....	43
3.1.1	Clonage de la construction correspondant à la partie extracellulaire du récepteur TNFR _{II} du rat (TNFR) vectorisée dans le plasmide pVax1 (pVax/TNFR).....	43
3.1.2	Clonage de la construction correspondant à la partie extracellulaire du récepteur TNFR _{II} du rat (TNFR) liée à la partie constante d'une immunoglobuline G (Ig) vectorisée dans le plasmide pVax1 (pVax/IgTNFR).....	45
3.1.3	Clonage de la construction correspondant à la partie extracellulaire du récepteur TNFR _{II} du rat (TNFR) liée à la partie constante d'une immunoglobuline G (Ig), incluant la région charnière lui permettant de se dimériser, vectorisée dans le plasmide pVax1(pVax/IgTNFRd)	48
3.2	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ADNp.....	50
3.2.1	Analyse par DLS	50
3.2.2	Analyse par microscopie électronique à Balayage.....	51
3.2.3	Protection de l'ADN plasmidique apportée par le chitosane contre la digestion par les nucléases	53
3.3	Expression des ARN messagers (ARNm).....	55
3.4	Bioactivité des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd	57
3.5	Capacité d'inhibition des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd contre TNF α : ELISA de compétition.....	61
CHAPITRE 4	DISCUSSION	65
4.1	Clonage.....	65
4.2	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules Chitosane/ADNp.....	68
4.3	Production de protéines recombinantes bioactives par les cellules transfectées.....	69
CONCLUSION	73

BIBLIOGRAPHIE 75

ANNEXES 87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 Expression cellulaire des ligands et des récepteurs de la superfamille TNF [32].....	6
Tableau 1-2: Agents biologiques approuvés pour le traitement de l'AR [5]	10
Tableau 2-1 Amorces pour clonage des gènes TNFR et Ig.....	32
Tableau 2-2 dilution de la solution de chitosane 92-10 à 5 mg/ml	37
Tableau 2-3 séquences des amorces utilisées pour détection des ARNm	40
Tableau 3-1 résultats de DLS	50

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: rôle de RANKL dans le cycle de reformation des os (modifié à partir de [23]).	5
Figure 1-2 interactions entre TNF et récepteurs [40]	8
Figure 1-3 Forme soluble et transmembranaire du TNF α et de ces récepteurs [41].	9
Figure 1-4 Structure des 5 principaux bloqueurs de TNF α (tiré de [40])	12
Figure 1-5 1.2.3 État actuel des études cliniques en thérapie génique [59]	15
Figure 1-6 Vecteurs dérivés de virus [67].	19
Figure 1-7 Exemples de lipoplexes couramment utilisés comme vecteurs [119]	23
Figure 1-8 exemples de polyplexes utilisés comme vecteurs [120].	24
Figure 1-9 structure chimique du chitosane [125]	25
Figure 1-10 formation des nanoparticules Chitosane/ADN (ou ARN) [125]	26
Figure 3-1 Schéma de la séquence de TNFR clonée	43
Figure 3-2. Photo du Gel d'agarose 0.8% montrant les produits de digestion du plasmide pCR2.1/TNFR par les enzymes HindIII et KpnI.	44
Figure 3-3 Schéma de la séquence du fragment Ig clonée	45
Figure 3-4 Digestion du plasmide pCR2.1 contenant le fragment Ig	46
Figure 3-5. Schéma du produit de liaison entre le fragment Ig et TNFR (IgTNFR)	47
Figure 3-12. Schéma de la séquence du fragment Ig+charnière clonée	48
Figure 3-17 Digestion des constructions pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd par les enzymes de restriction permettant d'extraire les fragments TNFR, IgTNFR et IgTNFRd	49
Figure 3-8 Observation en microscopie électronique à balayage des nanoparticules 92-10-5-pVax/TNFR au grossissement 80000 x	51
Figure 3-9 Observation en microscopie électronique à balayage des nanoparticules 92-10-5-pVax/IgTNFR au grossissement 80000 x	52

Figure 3-10 Observation en microscopie électronique à balayage des nanoparticules 92-10-5-pVax/IgTNFRd au grossissement 80000 x	52
Figure 3-11 Protection de l'ADN plasmidique contre la digestion par l'ADNase	55
Figure 3-12. Photo du Gel d'agarose montrant les produits RPC à partir des ADNc correspondant à l'ARN extrait des cellules transfectées par nos constructions.	56
Figure 3-13 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par le TNF.	58
Figure 3-14 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par TNF: protéines recombinantes et contrôles négatifs.....	59
Figure 3-15 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par TNF: protéines recombinantes diluées 1 :2 et contrôles négatifs	60
Figure 3-16 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par TNF: protéines recombinantes diluées 1:4 et contrôles négatifs	61
Figure 3-17. Résultats du test ELISA de compétition.....	63
Figure 3-18. Résultats du test ELISA de compétition entre IgTNFRd et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé.	64

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNp	ADN plasmidique
ADNc	AND complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF récepteur
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LT	lymphotoxine
sTNF	Soluble TNF
tmTNF	Transmembranaire TNF
TACE	TNF converting enzyme
AR	Arthrose rhumatoïde
DARM	Drogue anti-rhumatique modifiant la maladie
NF- κ B	Nucléar factor- κ B
RANKL	Receptor activator NF- κ B ligand
Fc	Fragment cristallisable

Fv	Fragment variable
Cl	Light chain
CH	Constant Heavy chain
HEK293	Human embryonic kidney 293
CHO	Chinese hamster ovary
FDA	Food and drugs Administration
CCDA	Cytotoxicité dépendante de l'anticorps
VAA	Virus adéno-associés
rVAA	Recombinant VAA
RPE-65	Retinal pigment epithelium-specific 65kDa protein
kDa	Kilo Dalton
SCID-X1	Severe combined immunodeficiency X-linked
GFP	Green fluorescent protein
DDA	Degree de désacétylation
N:P	Ration base amine: base phosphate
MM	Masse moléculaire
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
PDGF-BB	Platelet derived growth factor-BB
GLP1	Glucagon like protein 1

pb

Pairs de bases

HindIII

Haemophilus influenza deoxyribonuclease III

KpnI

Klebsiella pneumonia I

XbaI

Xanthomonas Brandrii I

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 - Produit du Séquençage du fragment TNFR.....	76
Annexe 2 - Séquence nucléotidique codante pour le fragment TNFR cloné à l'intérieur de pVax1.	76
Annexe 3 - Séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique pVax/TNFR	76
Annexe 4 - Séquence nucléotidique du fragment Ig à l'intérieur du plasmide pCR2.1/Ig	76
Annexe 5 - Séquence nucléotidique du fragment d'ADN codant pour la protéine recombinante IgTNFR	76
Annexe 6 - Séquence en acides aminés déduite à partir de la séquence nucléotidique IgTNFR... ..	76
Annexe 7 - Séquence du fragment Ig contenant la région charnière.....	76
Annexe 8 - Séquence nucléotidique du fragment d'ADN codant pour la protéine recombinante IgTNFRd	76
Annexe 9 - Séquençage du fragment d'ADN codant pour la protéine recombinante IgTNFRd	76

INTRODUCTION

L'arthrose rhumatoïde (AR) est une maladie inflammatoire auto-immune touchant les cartilages et des os causant leur lente dégradation. Cette maladie très répandue touchant près de 1 % de la population des pays industrialisés [1], provoque un handicap de travail important et à un impact néfaste sur l'économie qui est par exemple estimé à 320 milliards de dollars aux États-Unis en 2003 [2]. L'AR se traduit plus spécifiquement par une inflammation non résolue du synovium de l'articulation enclenchée à la suite de la reconnaissance d'auto-antigènes. Il s'en suit une réaction auto-immunitaire provoquant le recrutement de cellules du système immunitaire activés et le largage de nombreuses cytokines inflammatoires dans le milieu. À la tête de ses cytokines pro-inflammatoires, nous avons le TNF α [3] qui joue également un rôle dans la destruction des os en troublant le cycle de résorption/reconstruction des os [4]. À la pointe des traitements existant pour le traitement de l'AR, se trouve des agents biologiques dirigés contre la cytokine TNF α , ceux-ci sont principalement composés d'anticorps monoclonaux humain ou chimérique humain murin ou encore des protéines recombinantes construites à partir du récepteur du TNF α [5]. Néanmoins l'utilisation de ces agents biologiques est associée à des risques d'infection sérieux et développement de la tuberculose [6-8] et peut conduire à l'apparition chez le patient d'anticorps dirigés contre l'agent biologique le rendant inefficace [9]. Ces risques sont dus au caractère immunosuppresseur local au niveau de l'injection. Ces protéines ont justement une demi-vie courte en circulation due à la présence de protéases et à une élimination rapide par le foie et les reins, nécessitant de répéter les injections. Une alternative à tous ces effets indésirables pourrait être la thérapie génique. En effet, elle consiste à introduire le matériel génique sous forme de transgène codant la protéine thérapeutique qui sera exprimée *in situ* par les cellules de l'hôte. Ce principe devrait permettre une production stable et localisée des transgènes et permettre ainsi d'éviter les effets néfastes de la présence systémique de la protéine [10]. Un des défis majeurs de la thérapie génique est de faire parvenir efficacement le transgène à la cellule, tissus ou organes à traiter. Pour ce faire, il s'avère nécessaire d'utiliser un système de livraison adéquat. Les vecteurs viraux ne conviennent pas à cause entre autres de leur préparation assez complexe, leur immunogénicité et le risque associé à leur utilisation pour développer d'autres maladies [11]. Il nous reste donc les vecteurs chimiques parmi lesquels se trouve le chitosane polymère biocompatible, biodégradable, peu toxique, peu immunogène et facile de production et de

manipulation. L'utilisation du chitosane comme système de livraison génique est la spécialité de notre groupe de recherche [12-14]. Le but de ce projet de recherche consiste à produire des plasmides d'expression recombinant contenant les transgènes codant pour des protéines recombinantes, TNFR, capables de bloquer le TNF α en surexpression *in vivo*. Ces plasmides recombinants sont ensuite complexés au chitosane pour générer des nanoparticules capables de transférer efficacement les cellules et de livrer leur cargo au niveau du cytosol pour l'expression de protéines recombinantes TNFR fonctionnelles. Les objectifs fixés pour la réalisation de notre but sont i) construction de différents plasmides recombinants avec différents transgènes TNFR; ii) générer des nanoparticules à base de chitosane, chitosane/pDNA suivi de leur caractérisation physico-chimique pour s'assurer de leur pouvoir à transférer les cellules *in vitro* et éventuellement *in vivo*; iii) confirmer, par biologie moléculaire et sérologie, du niveau d'expression des protéines recombinantes TNFR et de leur bioactivité. Ce mémoire présentera une revue de littérature abordant les thèmes de l'arthrose rhumatoïde et de son lien avec la cytokine TNF α , puis les thérapies géniques et enfin le véhicule de livraison génique polymérique le chitosane. La revue de littérature sera suivit des méthodes utilisées pour la réalisation des objectifs, des résultats de ces expériences, d'une discussion des résultats et enfin de conclusions globales.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 L'Arthrose Rhumatoïde

1.1.1 Les aspects sociaux économiques

L'arthrose rhumatoïde (AR) est la forme la plus courante d'arthrite. C'est une maladie auto-immune inflammatoire chronique des articulations de la main et du pied, menant à leur dégradation progressive. Une étude prospective menée sur des patients atteints d'AR [15] a estimé que le handicap apparaît chez 25 % des malades après 6,4 ans et chez 50 % après 20,9 ans, cela se traduit chez le malade par une baisse de revenus et une augmentation du risque de chômage et de dépression. L'AR est de plus très répandue puisqu'elle affecte 0,5-1 % de la population adulte des pays industrialisés [1]. En 1995 la proportion d'Américains atteints d'une des formes d'arthrose est estimée à 15 % (soit 40 millions de personnes) et est projetée à 18,2 % (59,4 millions de personnes) en 2020 [2]. Ces patients nécessitent souvent une prise en charge coûteuse pour les systèmes de santé. En France, en 2004 le coût direct annuel par patient était estimé entre 1812-11792 € et le coût indirect entre 1260-37994 € [16]. Aux États-Unis, en 2003, les dépenses dues à l'arthrose et autres rhumatismes sont estimées à 321,8 milliards de dollars [17]. Du côté du Canada, la société canadienne de l'arthrite [18] indique que le coût total de cette maladie est estimé à 33 milliards de dollars par année. Ce coût impressionnant pour la société s'explique de deux façons i) par les coûts d'hospitalisations (6% des hospitalisations totales au Canada sont imputables à l'arthrite) et ii) par une perte de productivité, puisque qu'un quart des personnes atteintes d'arthrite entre 25 et 44 ans sont inactifs à cause de cette maladie. L'AR est donc un enjeu majeur de recherche, le gouvernement du Canada a par exemple investi 77,7 millions de dollars en 2009-2010 dans la recherche contre les maladies musculo-squelettiques et l'arthrose [19].

1.1.2 La pathologie

L'articulation est composée de deux os, recouverts de cartilage, joints par une capsule contenant le liquide synovial composant le synovium. L'arthrose rhumatoïde se traduit par une inflammation de ce synovium. Cette inflammation se produit suite à la reconnaissance par le système immunitaire d'un auto-antigène dont la nature n'est toujours pas bien élucidée ce qui donne à cette pathologie son caractère auto-immun. Il semble, toutefois, que des protéines citrullinées capables d'induire la production d'anticorps soient des candidates possibles [20], puisqu'elles sont retrouvées chez un grand nombre de patients atteint par l'AR [21]. Toutefois, le rôle fonctionnel des protéines citrullinées sur des modèles murins expérimentaux d'arthrites mène à des résultats non probants [22]. La reconnaissance de cet auto-antigène mène à l'engagement du système immunitaire inné puis adaptatif et largage par celles-ci de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Il se produit ensuite une érosion locale des os à la périphérie de la zone enflammée. Il y a habituellement un équilibre parfait entre résorption des os effectuée par les cellules ostéoclastes et reformation effectuée par les cellules ostéoblastes permettant l'entretien de la matrice osseuse. Mais dans l'AR le synovium enflammé produit des cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-11 et TNF α capables d'induire le recrutement, la différenciation et l'activation des ostéoclastes tels [3], ce qui conduit à un déséquilibre du cycle de reformation des os en faveur de la résorption des os par les ostéoclastes. Le rôle de TNF α est particulièrement intéressant dans ce processus, puisqu'il perturbe un mécanisme de régulation du cycle de reformation des os, via l'activateur du récepteur du ligand NF- κ B(RANKL).

1.1.3 La destruction des os : le rôle de RANKL et de TNF α

Dans un processus normal (voir Figure 1-1-A), les ostéoblastes régulent la formation d'ostéoclastes d'une part, via la production de RANKL qui va interagir avec le récepteur du ligand NF- κ B (RANK) à la surface des cellules progénitrices d'ostéoclastes conduisant à leur différenciation en ostéoclastes matures, et d'autre part, via la production d'ostéoprotégerin (OPG) qui est un récepteur soluble pour RANKL qui va inhiber son action sur les progéniteurs d'ostéoclastes [4]. Les ostéoblastes sont donc capables d'augmenter, via RANKL, ou de diminuer, via OPG, la formation d'ostéoclastes matures. Dans un processus anormal ou

pathologique (voir Figure 1-1-B) la cytokine $TNF\alpha$ produit par les cellules du système immunitaire va avoir pour double effet de stimuler l'expression de RANKL et de supprimer l'expression de OPG par les ostéoblastes [4]. Ces deux événements conduisent tous deux à une surproduction d'ostéoclastes matures, déséquilibrant le cycle de reformation des os vers une destruction des os par les ostéoclastes.

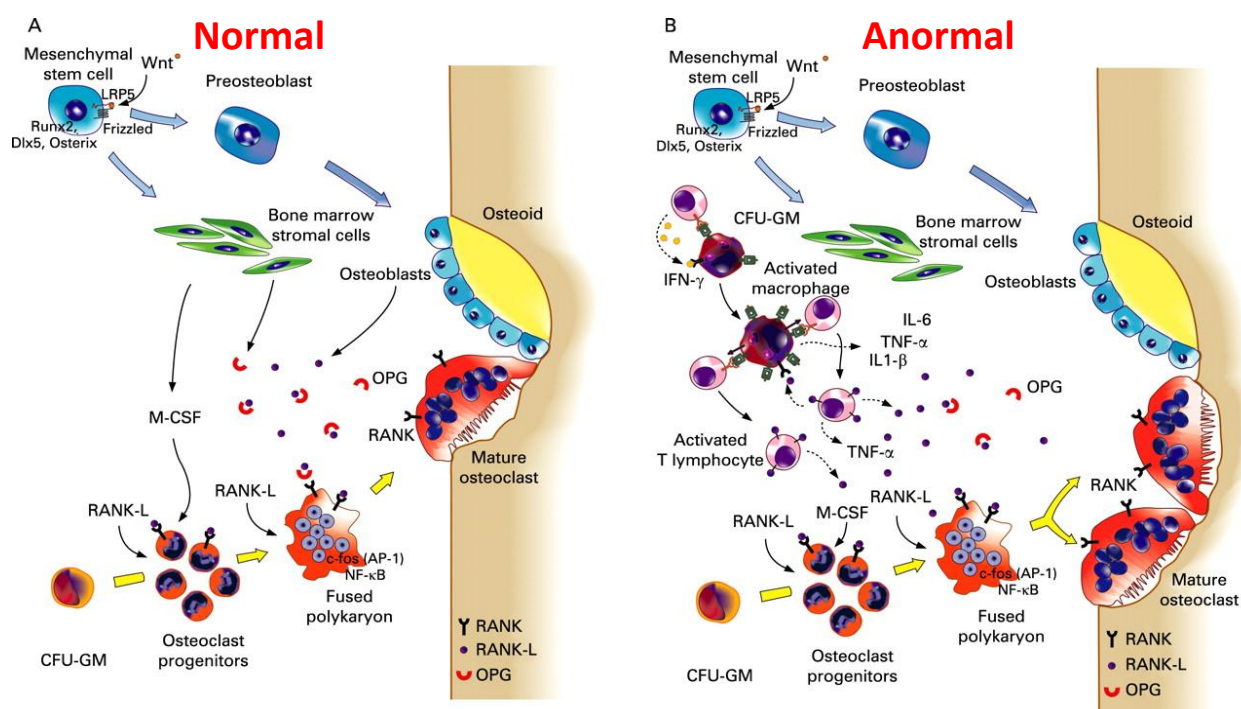


Figure 1-1: rôle de RANKL dans le cycle de reformation des os (modifié à partir de [23]).

1.1.4 Tumor Necrosis Factor α ($TNF\alpha$)

1.1.4.1 Historique

L'histoire du TNF commence en 1868, lorsqu'un physicien allemand remarque une régression des tumeurs humaines après infection de celle-ci par un pathogène [24]. Cette observation a amené 23 ans plus tard à l'utilisation par l'oncologue W. Coley d'extrait bactérien pour le traitement du sarcome un cancer des os [25]. En 1943, Shear et coll. isole les lipopolysaccharides (LPS) des extraits bactériens comme étant responsables de cette régression tumorale [26]. C'est finalement seulement en 1962 qu'O'Malley et coll. montrent que cette régression tumorale n'est

pas due directement aux LPS, mais par l'induction d'un facteur soluble que l'on nomme alors Tumor Necrotizing Factor [27], renommé ensuite Tumor Necrosis Factor (TNF) [28]. Parallèlement en 1968 la lymphotoxine (LT) est découverte. C'est une protéine produite par les lymphocytes pouvant tuer les cellules cancéreuses [29]. C'est ensuite en 1984 que l'on découvre par séquençage de l'ADN que LT et TNF sont deux protéines homologues, car possédant des séquences proches [30]. Une homologie fonctionnelle est ensuite découverte, les deux protéines peuvent se fixer aux mêmes récepteurs [31]. Le TNF sera ensuite distingué sous le nom TNF α et LT sous le nom TNF β , mais TNF α est souvent décrit dans la littérature sous le simple acronyme de TNF. La découverte de ces deux cytokines a porté les bases de l'identification d'une famille de cytokine : la superfamille TNF dont les récepteurs et les ligands sont décrits dans le tableau 1-1 [32].

Tableau 1-1 Expression cellulaire des ligands et des récepteurs de la superfamille TNF [32]

Cytokine	Cells	Receptor	Cells
LT α	NK, T and B cells	TNFR1 TNFR2	Most normal and transformed cells Endothelial cells and immune cells
TNF	Macrophages, NK, T and B cells	TNFR1, TNFR2	See above
LT β	DCs, macrophages, T, B and NK cells	LT β R	NK cells, CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells
CD95L	Activated splenocytes, thymocytes and non-lymphoid tissues, such as the eye and testis	CD95	Most normal and transformed cells
		DCR3	Lung and colon cells
TRAIL	NK cells, T cells and DCs	DR4, DR5 DCR1, DCR2, OPG	Most normal and transformed cells Most normal and transformed cells
TWEAK	Monocytes	FN14	Endothelial cells and fibroblasts
CD27L	NK, T and B cells	CD27	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells
CD30L	T cells and monocytes	CD30	Reed-Sternberg cells
CD40L	T and B cells	CD40	Reed-Sternberg cells
4-1BBL	B cells, DCs and macrophages	4-1BB	Activated T cells, monocytes and NK cells
OX40L	T and B cells	OX40	T cells
APRIL	Macrophages, lymphoid cells and tumour cells	BCMA TACI	B cells, PBLs, spleen, thymus, lymph nodes, liver and adrenals B cells, PBLs, activated T cells, spleen, thymus and small intestine
BAFF	T cells, DCs, monocytes and macrophages	TACI BCMA BAFFR	See above See above B cells, PBLs, resting T cells, spleen and lymph nodes
LIGHT*	T cells, granulocytes, monocytes and DCs	HVEM LT β R	T cells Non-lymphoid haematopoietic cells and stromal cells
VEG1*	Endothelial cells	DR3, DCR3	Activated T cells
GITRL	N. D.	GITR	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells
RANKL	Activated T cells and osteoblasts	RANK OPG	Osteoclasts, osteoblasts and activated T cells Osteoclast precursors, endothelial cells and others
EDA1	Skin	EDAR	Ectodermal derivative
EDA2	Skin	XEDAR	Ectodermal derivative
N. D.		DR6	Resting T cells
N. D.		RELT	Lymphoid tissues
N. D.		TROY	Embryo skin, epithelium, hair follicles and brain

1.1.4.2 TNF α et ses récepteurs

TNF α est une cytokine pro-inflammatoire pléiotropique qui joue un rôle important dans la régulation de la défense de l'hôte, de l'inflammation et de l'apoptose [32]. Elle est produite principalement par les cellules du système immunitaire tel que les macrophages, lymphocytes T et B, mais aussi par d'autres cellules somatiques comme les cellules endothéliales et les tissus neuronaux [33]. Elle existe à la fois sous la forme transmembranaire (tmTNF, un homotrimère constitué de monomères de 26-kDa) et sous forme soluble (sTNF homotrimère constitué de monomères de 17-kDa) une fois clivé par l'enzyme TACE (TNF α converting enzyme), leurs récepteurs sont TNFR1 et TNFR2. TNFR1 est exprimé par la quasi-totalité des cellules du corps et TNFR2 principalement par les cellules du système immunitaire et les cellules endothéliales [32]. TNF α active les deux récepteurs, bien que TNFR2 soit préférentiellement activé par TNF α sous sa forme membranaire [34]. En effet, sTNF se lie préférentiellement à TNFR1 (constante de dissociation $[k_d] \sim 20$ pM) plutôt qu'à TNFR2 ($[k_d] \sim 400$ pM), ce qui suggère que le sTNF se liant à TNFR2 va rapidement être relâché et transféré à TNFR1 [35]. Ces deux récepteurs à la fonctionnalité distincte peuvent également être clivés par protéolyse pour prendre une forme soluble capable de neutraliser l'action de TNF α (Figure 1-3). TNFR1 est présent sur la plupart des types cellulaires et active des voies cellulaires menant à la production de signaux pro-inflammatoires (production de cytokine inflammatoire), apoptotique (mène à l'apoptose de la cellule) et cytotoxique (production de protéines cytotoxiques). À l'inverse TNFR2 est surtout exprimé par les lymphocytes et conduit à une activation et prolifération lymphocytaire. La voie tmTNF-TNFR2 joue un rôle très important notamment dans l'expansion des lymphocytes T régulateurs [36]. C'est donc très important de maintenir cette voie puisque les lymphocytes T régulateur permettent de contrôler les lymphocytes T effecteurs auto-réactifs présents de façon normale chez tous les individus sains [37]. Il est intéressant de noter ici que l'inhibiteur de TNF α Etanercept possède un pouvoir d'inhibition relativement faible pour tmTNF [38], ce qui le rend potentiellement moins susceptible d'inhiber la voie tmTNF-TNFR2. La liaison des récepteurs TNFR ou des TNF α bloqueurs au tmTNF peuvent induire une signalisation inverse, conduisant à l'activation, la suppression de la production de cytokine ou à l'apoptose de la cellule porteuse de tmTNF [39]. L'activation inverse correspond à la transduction du signal vers le noyau non pas dû

à l'engagement du récepteur membranaire avec son ligand soluble, mais au contraire à l'engagement du ligand transmembranaire avec son récepteur ou inhibiteur soluble. Les interactions entre TNF α et ses récepteurs sont récapitulés dans la Figure 1-2.

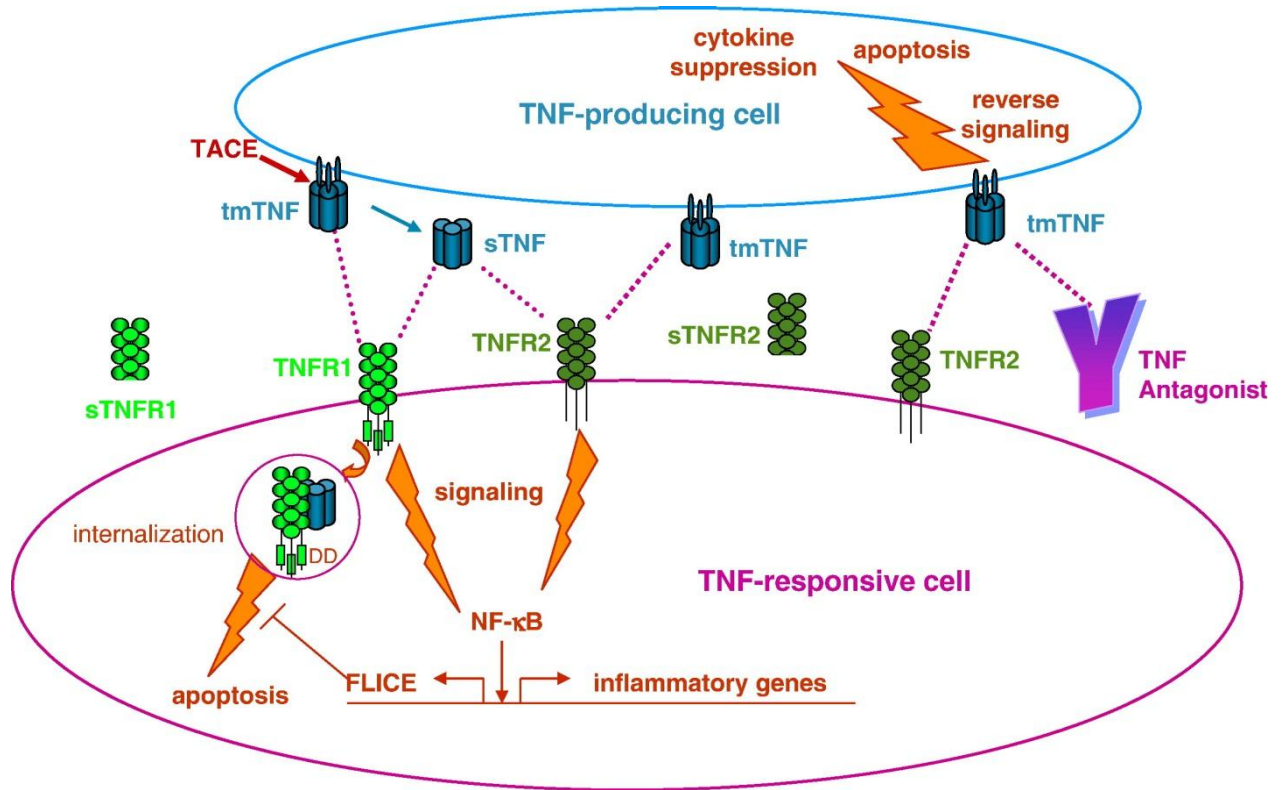


Figure 1-2 interactions entre TNF et récepteurs [40]

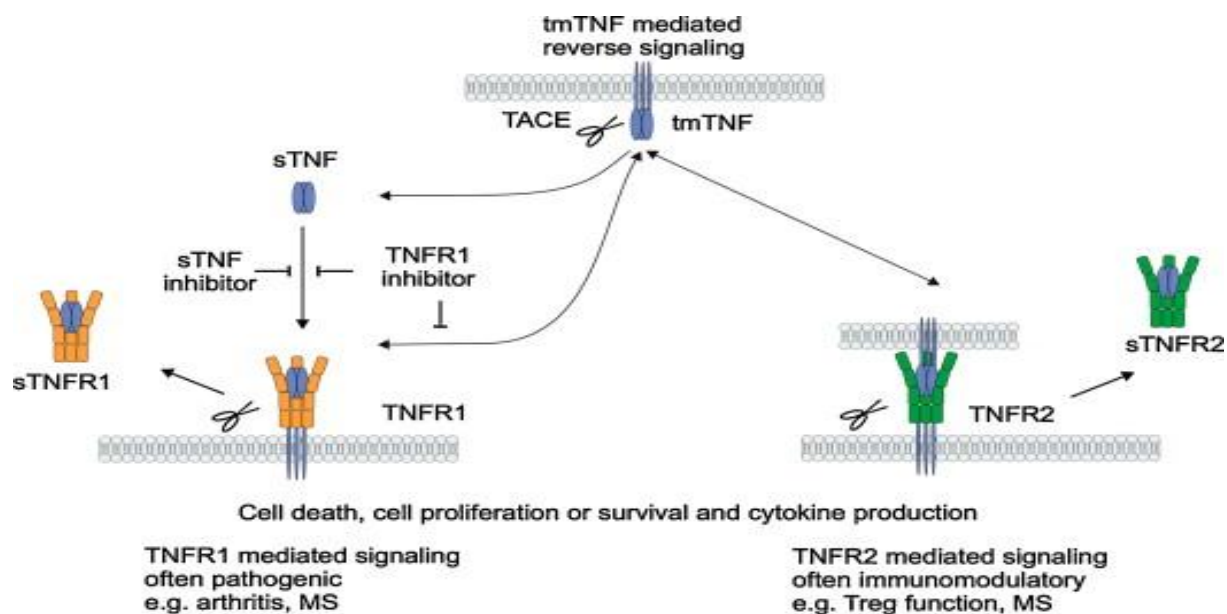


Figure 1-3 Forme soluble et transmembranaire du TNF α et de ces récepteurs [41].

1.1.5 Principaux traitements de l'arthrose rhumatoïde

Il existe principalement trois types de traitements l'arthrose, les agents chimiques qui traitent principalement les symptômes, les agents chimiques qui traitent les symptômes et qui sont capables de modifier la maladie et les agents biologiques capables de traiter les symptômes et d'améliorer la maladie [42].

Pour le traitement des symptômes, des analgésiques ou des anti-inflammatoires non-stéroïdaux sont utilisés. Ils réduisent la douleur et la raideur au niveau des articulations. Leur usage est remis en question à cause de leurs inefficacités à modifier la course de la maladie à long terme et leurs effets toxiques sur le système cardiaque et gastro-intestinal [43, 44].

Les drogues anti-rhumatiques modifiant la maladie (DARM) sont largement utilisées pour le traitement de l'arthrose, leurs utilisations sont recommandées le plus tôt possible après la confirmation du diagnostic [45]. Elles agissent sur la plupart des symptômes réduction de la douleur, des gonflements et améliore la mobilité de l'articulation ; ralentissent les dommages aux articulations et conduisent même à des rémissions [46, 47]. Methotrexate est le DARM le plus utilisé. Il existe également dans une liste non exhaustive : le Sulfasalazine, l'hydroxichloroquine et le Rituximab [48]. Les DARMs sont utilisés seul ou en combinaison les uns avec les autres,

elles peuvent être biologique ou synthétique et leur mode de fonctionnement est très varié [49]. Cependant certains patients n'acquièrent pas une réponse satisfaisante au traitement et nécessitent une thérapie additionnelle [50], notamment en combinaison avec des agents biologiques.

Les agents biologiques se sont développés à la suite de découvertes significatives dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation. Ceci a permis de développer des agents biologiques capables de cibler les médiateurs biologiques associés à l'arthrose et d'ouvrir la voie à de nouveaux traitements très efficaces [51]. La cible la plus courante de ces agents biologiques et la première à avoir été approuvée est la cytokine TNF α , mais des agents biologiques dirigés contre d'autres cibles commencent à émerger [5] (Tableau 1-2: Agents biologiques approuvés pour le traitement de l'AR [5]).

Tableau 1-2: Agents biologiques approuvés pour le traitement de l'AR [5]

Biological drugs approved for treating RA.

Biological DMARD	Target	Structure
Etanercept	TNF-a	Human TNF-a receptor p75Fc fusion protein
Infliximab	TNF-a	Chimeric human-murine anti-TNF-a monoclonal antibody
Adalimumab	TNF-a	Recombinant human anti-TNF-a monoclonal antibody
Certolizumab	TNF-a	Fab pegylated anti-TNF α
Golimumab	TNF-a	mAb anti-TNF α
Tocilizumab	IL-6	Humanised anti-IL-6R monoclonal antibody
Anakinra	IL-1	Recombinant human IL-1 receptor antagonist
Rituximab	B cell	Chimeric human-murine anti-CD20 monoclonal antibody
Abatacept	T cell co-stimulation	Human fusion protein (CTLA4-Ig)

1.1.6 Les agents biologiques bloqueurs de TNF α

Les 5 principaux agents biologiques dirigés contre TNF α utilisés dans le traitement de l'arthrose sont Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab et Golimumab leur structure précédemment décrite dans le Tableau 1-2 est schématisé sur la Figure 1-4. Excepté Etanercept ils sont composés d'anticorps monoclonaux dirigés contre TNF α . Les anticorps sont constitués d'une chaîne lourde (C_H : heavy chain) et d'une chaîne légère (C_L : light chain), possédant chacune un fragment constant aussi dit cristallisable (Fc) et un fragment variable (Fv). Infliximab, Adalimumab et Golimumab sont des anticorps monoclonaux entiers totalement humanisés de classe IgG1. Infliximab est un anticorps chimérique contenant des peptides du Fv d'un anticorps de souris anti-TNF α dans la région variable monté sur un anticorps monoclonal humain de classe IgG1 et Certolizumab est un Fv d'anticorps monoclonal humain de classe IgG1 dans lequel est inséré quelques régions dérivées d'un Fv d'anticorps monoclonal anti-TNF α de souris, le tout lié de façon covalente à du polyéthylène glycol. Etanercept quant à lui est une fusion entre la portion extracellulaire du récepteur TNFR2 fusionnée au Fc d'un anticorps de classe IgG1 humain. L'affinité des bloqueurs de TNF α pour sTNF a été déterminée par résonance du plasmon [52]: la constante de dissociation à l'équilibre d'etanercept, certolizumab, adalimumab, et infliximab sont respectivement 33.4, 89.3, 157.4, et 227.2 pmol/L, les valeurs les plus faibles indiquent la plus grande affinité. Etanercept et certolizumab ont donc une plus grande affinité qu'adalimumab et infliximab. Cependant sTNF peut rapidement se dissocier d'etanercept (90 % de dissociation après 3h), mais reste fixé à infliximab [53]. De plus, etanercept se lie uniquement à sTNF sous forme trimérique avec un ratio d'un dimère d'etanercept pour un trimère de sTNF alors que infliximab et adalimumab peuvent se lier à sTNF sous forme trimérique et monomérique. Pour l'affinité envers tmTNF en revanche etanercept se lie de façon moins forte qu'infliximab (1.15 nmol/L contre 0.45 nmol/L). Certolizumab, infliximab, et adalimumab ont un potentiel de neutralisation de la voie de signalisation de tmTNF deux fois plus grands qu'etanercept [52]. Etanercept, infliximab, et adalimumab peuvent induire une cytotoxicité dépendante de l'anticorps(CCDA) [54]. Ils sont tous très efficaces pour traiter l'AR mais aussi d'autre maladie inflammatoire comme le psoriasis.

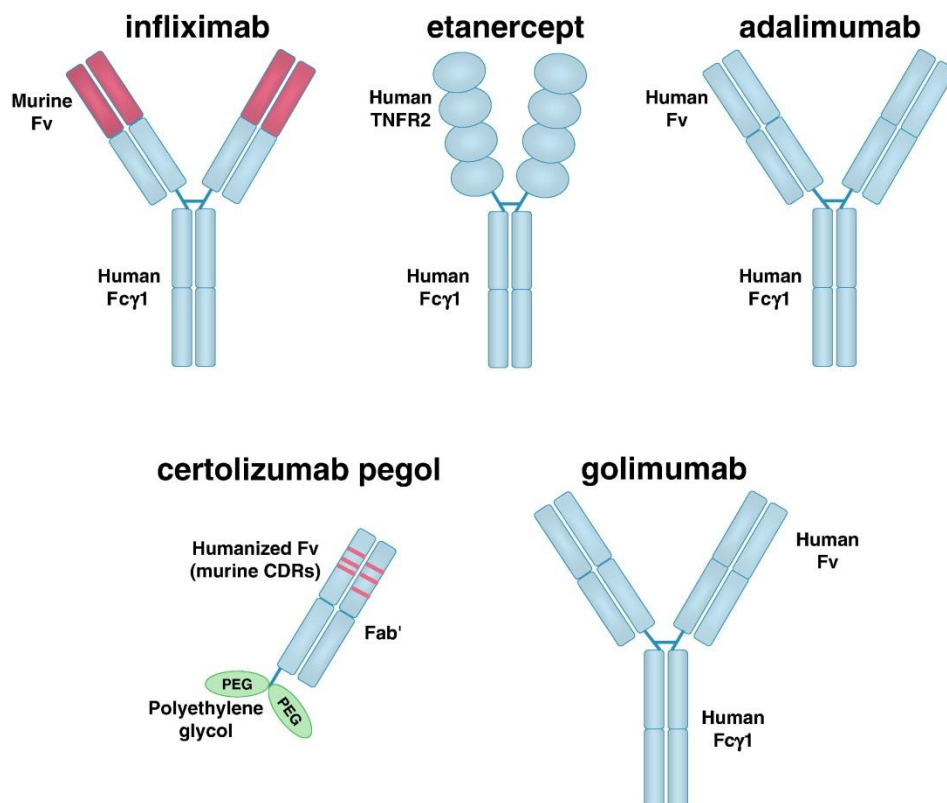


Figure 1-4 Structure des 5 principaux bloqueurs de TNF α (tiré de [40])

Cependant ces agents biologiques sont associés, d'après de nombreuses études et méta-analyse avec des risques d'infections sérieuses [6, 7] et de développement de la tuberculose [8] chez les patients traités nécessitant d'évaluer la balance bénéfice/risque d'un tel traitement. Ces risques sont dus au caractère localement immunosuppresseur de ces agents, causant notamment des risques d'infections au niveau de la zone d'injection. De plus ces traitements peuvent conduire à l'apparition chez le patient d'anticorps dirigés contre l'agent biologique le rendant inefficace [9]. Il existe également d'autres stratégies d'administration de ces agents biologiques tels que la thérapie génique. L'utilisation du gène codant pour la protéine se révèle plus adéquate que l'utilisation de la protéine, car la thérapie génique permet une production stable de la protéine dans la durée et une expression localisée du transgène qui permet d'éviter les effets néfastes de la présence systémique de la protéine [10].

1.2 Thérapie génique

La thérapie génique consiste à un transfert d'acide nucléique sous forme d'ADN ou d'ARN dans les cellules malades. Par cette approche il est possible de remplacer un allèle défectueux par un allèle fonctionnel dans le cas des maladies héréditaires ou bien surexprimé une protéine ayant un effet thérapeutique. Le choix des cellules cibles et du vecteur permettant de transporter le matériel génétique jusqu'à celles-ci sont les facteurs critiques qui déterminent l'efficacité de la livraison génique [55]. L'agence américaine Food and Drug Administration (FDA) définit quant à elle la thérapie génique comme des substances « qui produisent des effets par transcription et/ou traduction de matériel génétique transféré et/ou par intégration au génome de l'hôte et qui est administré sous forme d'acides nucléiques, virus ou microorganismes modifiés génétiquement. Ces substances peuvent être utilisées pour modifier des cellules *in vivo* ou transférées à des cellules *in vitro* avant d'injecter ces dernières à un receveur ». Deux types de thérapie génique se distinguent, la thérapie génique sur cellules germinales ou sur cellules somatiques, la différence est qu'avec les cellules somatiques la modification génétique n'est pas transmise à la génération suivante. Aujourd'hui seule la thérapie génique visant les cellules somatiques est autorisée chez l'humain.

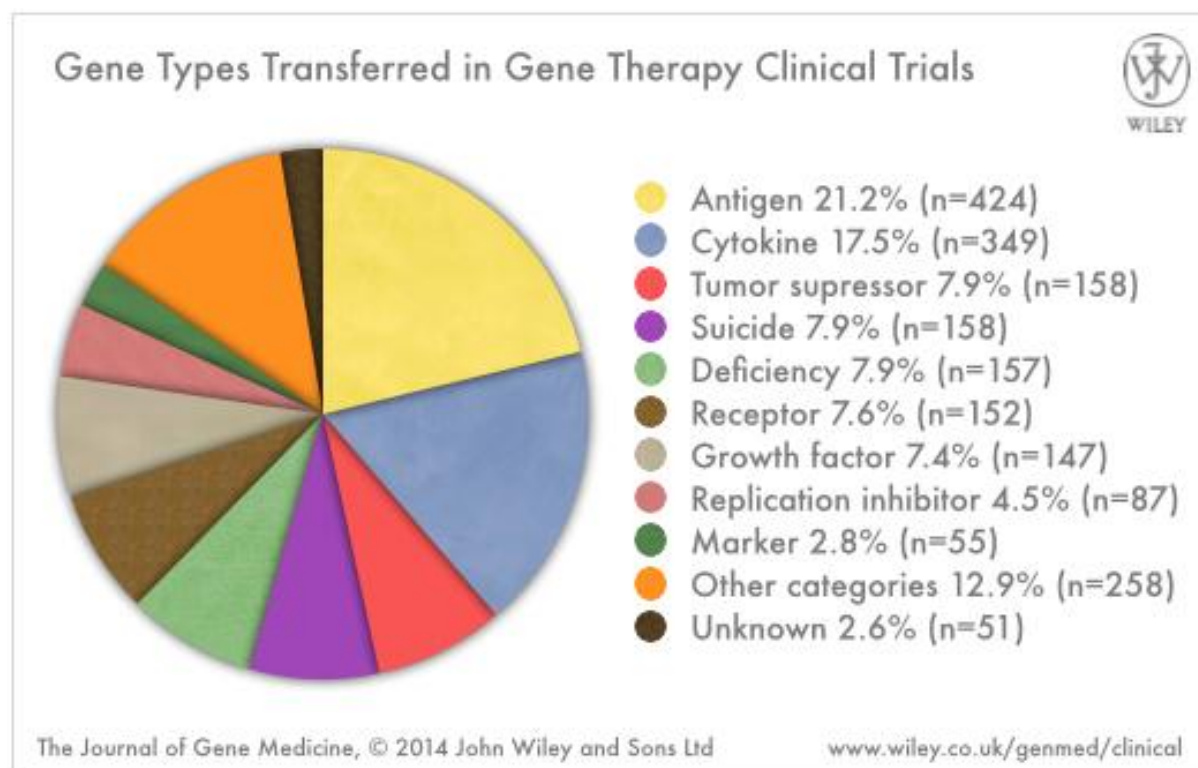
1.2.1 Historique

Le concept théorique de la thérapie génique a été évoqué dès les années 1960 par le prix Nobel Joshua Lederberg. Mais c'est seulement dans les années 1980 que la première étude clinique utilisant le transfert d'un gène a eu lieu [56]. L'équipe de Rosenberg s'est servi d'un vecteur rétroviral pour introduire dans des lymphocytes infiltrant les tumeurs prélevées sur les patients un gène marqueur de résistance à la néomycine. Ces lymphocytes sont ensuite réintroduits chez les patients et la production du marqueur par ces cellules va permettre de les suivre à long terme. Le séquençage du génome humain dans les années 1990 a permis d'identifier des gènes surexprimés dans certaines maladies et donc d'identifier de potentielles cibles de traitement, par ailleurs le développement des technologies permettant la manipulation de l'ADN a permis d'ouvrir la voie vers le développement de traitement basé sur la thérapie génique. Un des premiers succès dans ce

domaine s'est produit dans les années 2000, par une équipe française du professeur Alain Fisher [57], il s'agit de traiter une immunodéficience due à une mutation du gène codant pour le récepteur de cytokine γ en transférant aux cellules de la moelle osseuse une copie normale de ce gène, cette approche apporte un grand espoir à tous ceux qui ne peuvent recevoir de greffe de moelle faute de donneur compatible. A ce jour, c'est plus de 1800 études cliniques en thérapie génique qui ont été menées dans plus de 31 pays [58].

1.2.2 État actuel de la thérapie génique

Dans les études cliniques de thérapie génique qui sont actuellement en cours, les trois principaux types de gènes que l'on cherche à introduire sont des gènes codant pour des antigènes dans le cadre de vaccin ou de désensibilisation, des cytokines ou des molécules suppressives de tumeur. La principale application de ces thérapies géniques est de loin le traitement des cancers. Les principaux vecteurs utilisés pour cela sont des adénovirus et des rétrovirus.



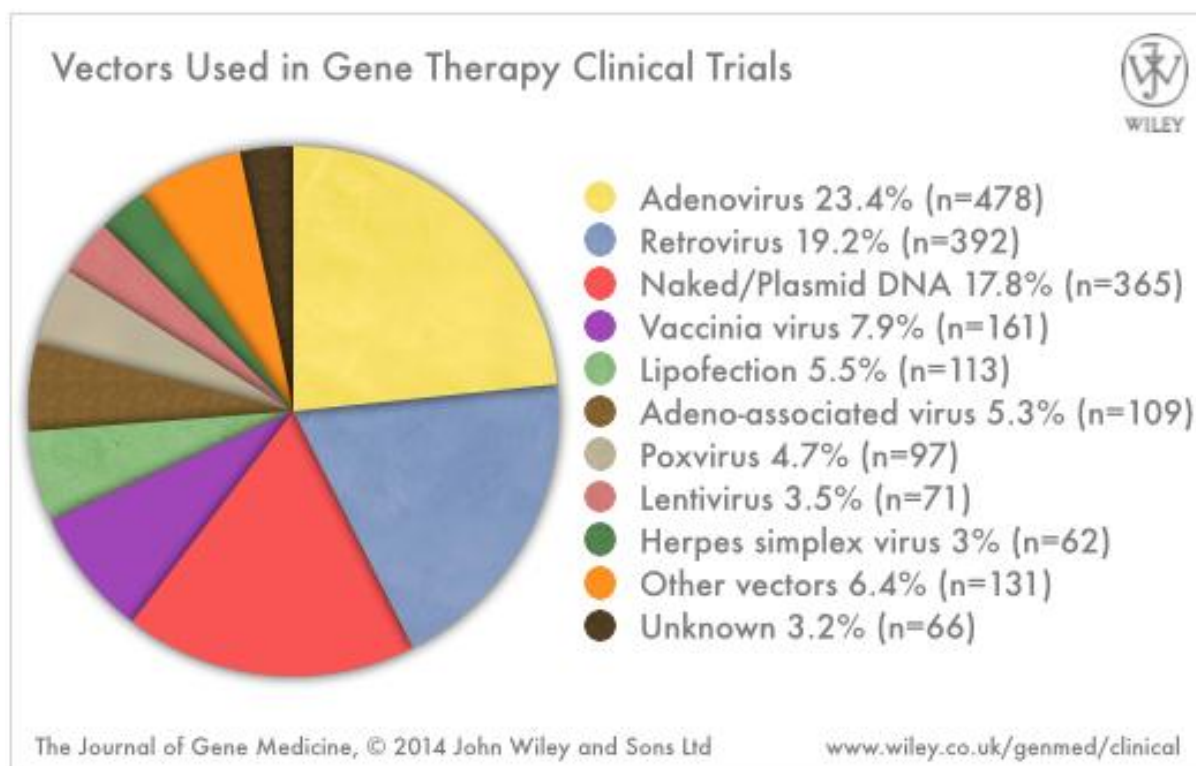
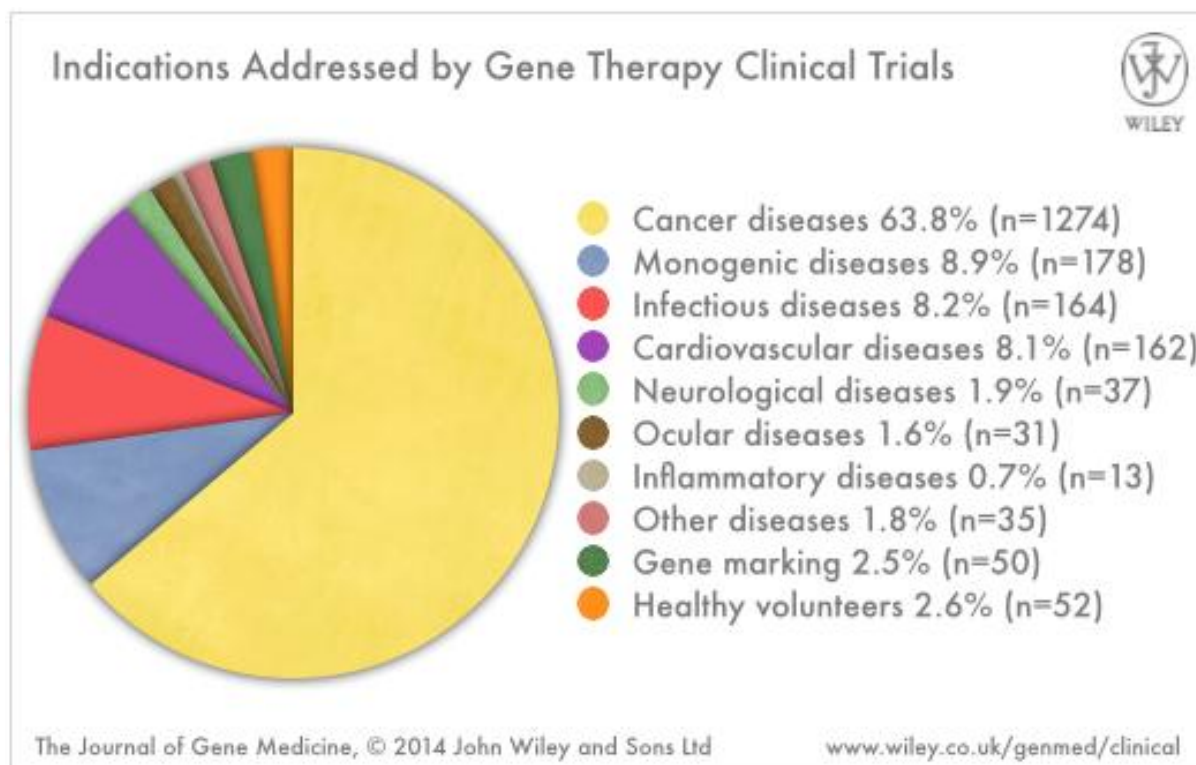


Figure 1-5 1.2.3 État actuel des études cliniques en thérapie génique [59]

1.2.3 Principe de thérapie génique

L'introduction du matériel génétique à la base de la thérapie génique se fait via un véhicule de livraison. Plusieurs types de matériels génétiques sont utilisés en thérapie génique : l'ADN double brin, l'ADN simple brin, l'ADN plasmidique [60], les oligonucléotides antisens, les ARN interférences et les micros ARN [61]. Ce transfert peut se faire *ex vivo*, le gène est alors transféré à la cellule cible dans le laboratoire puis la cellule est alors réinjectée au patient. Ce transfert peut se faire également *in vivo*, le gène est cette fois injecté directement au patient. Dans le cas d'un transfert de gène, la séquence du gène cible que l'on souhaite introduire est accompagnée de séquence d'ADN permettant de contrôler l'expression du gène par la cellule (séquence promotrice). Cette séquence forme la cassette d'expression. Cette cassette qui correspond le plus souvent à un plasmide (ADN circulaire double brin) va ensuite être insérée dans un véhicule de livraison. En effet, le transfert d'ADN nu dans le modèle animal c'est avéré peu efficace en raison de son élimination rapide [62]. L'ADN et l'ARN sont sensibles à la dégradation par les nucléases présentes dans le milieu biologique, de plus leur caractère hydrophile et sa charge négative [63] les empêchent de pénétrer naturellement la membrane cellulaire. Ce véhicule peut être de nature virale ou non virale et permet d'accroître l'efficacité et la spécificité du transfert génique et permet le passage de la membrane cellulaire et parfois de la membrane nucléaire. Le choix de la cassette génique et du véhicule de livraison est critique pour contrôler l'expression génique. La voie d'administration *ex vivo* ou *in vivo* est également un facteur important à prendre en compte.

L'approche *ex vivo* permet un ciblage très précis de la population de cellules et donc du tissu, puisque celle-ci est purifiée dans le laboratoire avant d'y transférer un gène ou de modifier ses gènes. Dans cette approche les cellules traitées doivent être capable de se répliquer une fois réinjectées, il est parfois préférable d'utiliser un système de livraison qui permet l'intégration du gène pour qu'il persiste au cours des divisions cellulaires. Les thérapies géniques *ex vivo* permettent par exemple de traiter des immunodéficiences héréditaires, comme la leucodystrophie [64], en utilisant un vecteur qui permet l'intégration durable du gène manquant dans le génome des cellules. Ou des maladies telles que l'hémophilie A par le transfert, à des fibroblastes autologues, du gène codant pour le facteur de coagulation VIII [65]. La thérapie génique *ex vivo*

est utilisée pour l'induction des cellules souches pluripotentes et dans l'ingénierie des tissus en introduisant des gènes pour moduler leur croissance et les protéger contre le rejet par l'hôte [66]. La thérapie *ex vivo* permet un choix plus large de véhicule de livraison, car le caractère immunogène et la toxicité moins importante à prendre en compte. Car le receveur ne sera au final au contact qu'avec des résidus du véhicule présents sur les cellules qui lui seront réinjectées.

Dans la stratégie *in vivo* de thérapie génique, le véhicule transportant est injecté directement au tissu cible ou dans le flux sanguin menant à ce tissu. Ce transfert peut se faire à l'aide de véhicule viral ou non viral. Cette stratégie évite le processus compliqué d'isolement, de culture et de manipulation *in vitro* des cellules du patient, mais comporte d'autres défis, dont le premier est le choix du véhicule de transport génique.

1.2.3.1 Véhicule génique à base viral

La plupart des essais cliniques de thérapie génique utilisent des virus modifiés comme véhicule génique [60]. En effet les virus possèdent des mécanismes très efficaces pour internaliser leur propre génome dans la cellule hôte. Un virus est une nanoparticule composée d'acide nucléique et de quelques protéines qui la protège de la dégradation extracellulaire et contrôle son internalisation dans la cellule cible. Les vecteurs viraux utilisés pour la thérapie génique sont constitués d'un virus auquel la plupart des gènes codant pour les protéines virales responsables de sa pathogénicité ont été enlevées de son génome. La séquence cis-actine requise pour la réplication du génome du virus est en revanche conservée. Les gènes codant pour les protéines de structure sont déplétés du génome afin que le vecteur ne puisse pas se répliquer. Dans un contexte de production du vecteur viral uniquement et non pour la thérapie génique elle-même les protéines de la structure du virus sont exprimées directement par la cellule productrice du véhicule viral (qui n'est pas la cellule à traiter). Ceci est fait soit par co-transfection à l'aide d'un plasmide codant les protéines de structure soit par ingénierie préalable du génome de la cellule productrice du véhicule viral pour lui faire exprimer les protéines de structure du virus [67]. Il existe 4 classes principales de virus utilisé comme véhicule pour la thérapie génique : les gammarétrovirus, les lentivirus, les adénovirus et les virus adéno-associés (Figure 1-6).

Les gammarétrovirus et les lentivirus sont des rétrovirus leur génome est sous forme d'ARN. Ils sont capables d'insérer le transgène dans les chromosomes de l'hôte permettant une expression permanente [68, 69]. Les gènes codant les protéines virales étant absents de son génome le rétrovirus est capable d'effectuer un unique cycle d'infection. La voie d'entrée du véhicule gammarétrovirus est dans le noyau de la cellule est passive elle ne peut se faire qu'au moment de la division cellulaire lorsque la membrane nucléaire se résorbe [70, 71]. Les véhicules géniques à base gammarétrovirus ne peuvent donc transfecter que les cellules qui se divisent. Au contraire la voie d'entrée dans le noyau pour les lentivirus est active. Les lentivirus forment un complexe de ré-intégration capable d'interagir avec les protéines au niveau des pores nucléaires [72]. Les véhicules à base lentivirus sont donc capables d'infecter les cellules qui ne se divisent pas.

Les adénovirus humains sont capables d'infecter un large panel de cellule puisque le récepteur coxsackie/adénovirus qui lui permet d'entrer dans la cellule est exprimé par la plupart des types cellulaires [73]. Ils exploitent la machinerie cellulaire pour l'amener à produire les protéines virales sans pénétrer le noyau [73]. Les véhicules géniques à base adénovirus n'intègrent donc pas le transgène dans le génome de l'hôte.

Les véhicules géniques basés sur les virus adeno-associés(VAA) sont capables de transfecter les cellules qui ne se divisent pas et sont relativement sûres par rapport aux autres véhicules viraux, car les VAA ne sont associés à aucune maladie connue [67]. Ils sont particulièrement intéressants dans le cas de l'arthrose puisque les VAA sont les plus efficaces pour délivrer un transgène dans le synovium [74]. D'ailleurs plusieurs, essais cliniques ont été réalisés dans le cadre d'une thérapie génique à base d'anti-TNF contre l'arthrose. Elle utilise un virus adéno-associé recombinant (VAAr) pour le transfert d'un transgène de fusion entre le gène codant la partie soluble du récepteur TNF et le fragment cristallisable d'une immunoglobuline (sTNFR:Fc) [75, 76]. L'avantage du VAAr pour le traitement de l'arthrose est sa capacité à transfecter les cellules qui ne se divisent pas et sa faible immunogénivcité [77]. Dans l'étude clinique rAAV-TNFR:FC un ADNc codant etanercept (TNFR:Fc) a été incorporé à un AAV pour former le vecteur rAAV-TNFR:Fc. L'efficacité de ce vecteur a été montrée sur une étude phase I [75], et une étude phase II sur 100 patients atteints d'AR [76]. Cette étude n'a cependant pas montré de réponse clinique statistiquement significative.

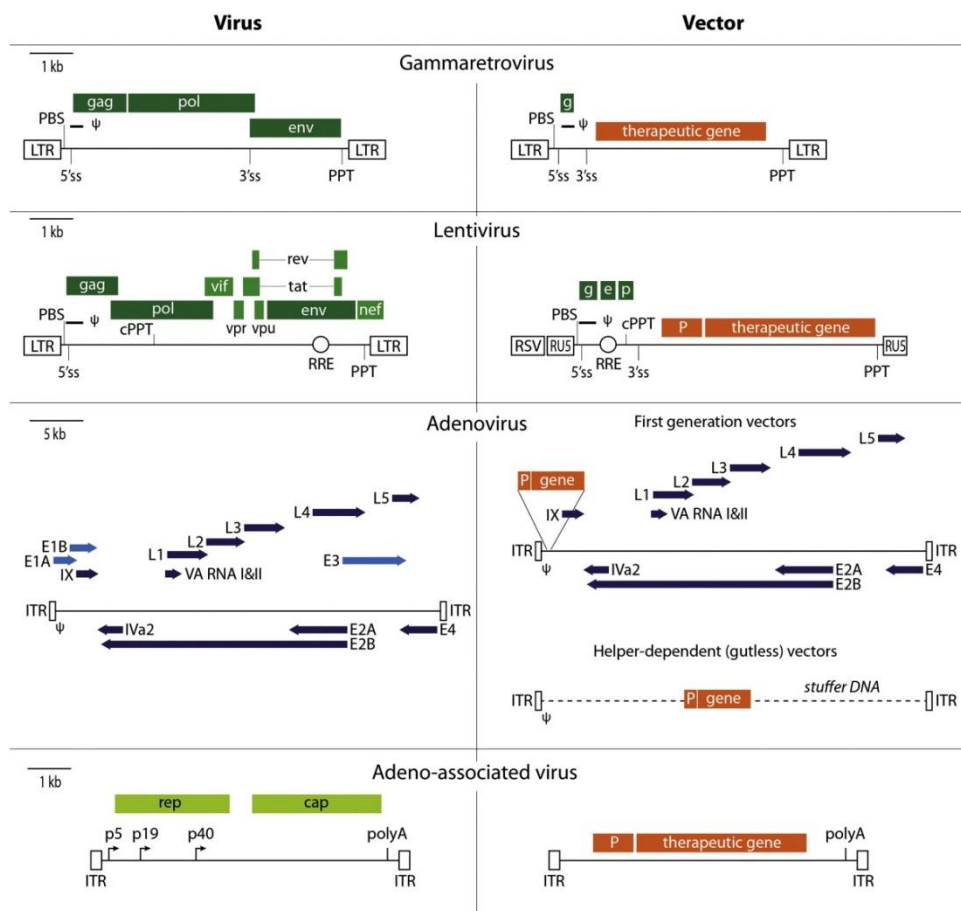


Figure 1-6 Vecteurs dérivés de virus [67].

Les véhicules viraux ont rencontré quelques succès récents notamment sur le traitement de l'immunodéficience due à la déficience en adénosine deaminase à l'aide d'un véhicule rétroviral transportant le gène codant l'adénosine deaminase [78] ou encore sur une forme congénitale de cécité (Amaurosis congénital de Leber) dû au défaut de la protéine oculaire RPE-65 traité par VAA transportant le transgène codant RPE-65 [79]. Malgré ces succès et les améliorations toujours plus nombreuses faites sur la sécurité de ses vecteurs, ils peinent encore à faire oublier les déboires qu'ils ont rencontrés dans les années 2000. La mort d'un patient lors d'une expérimentation pour traiter un déficit en ornithine-transcarbamylase (un enzyme du cycle de l'urée) utilisant les adénovirus en 1999, le développement d'une leucémie chez quatre enfants traités contre la SCID-X1 (immunodéficience héréditaire causée par l'absence d'une protéine dont le gène est présent sur le chromosome X qui prend part dans la formation de nombreux récepteurs à interleukine) avec des gammarétrovirus en 2002 à Paris [80, 81], suivit d'un enfant d'une cohorte différente traitée à Londres [82]. Ce développement de lymphome était dû à des mutations

insertionnelles du génome dues à l'insertion référentiel du transgène dans un région proto-oncogène LMO2 (LIM domain only 2) [83]. Dans ce contexte d'inquiétude au niveau de la sureté des véhicules viraux, les véhicules géniques non-viraux constituent une alternative de choix pour les thérapies géniques.

1.2.3.2 Véhicules géniques non viraux

1.2.3.2.1 Véhicules physiques

1.2.3.2.1.1 Electroporation

Le principe de l'électroporation est d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire par l'application d'une pulsation électrique intense, permet à l'ADN injectée de traverser la membrane cellulaire [84]. Cette technique a été utilisée avec succès sur de nombreux tissus comme la peau [85], les muscles [86] (transfert d'un plasmide codant IL-5 à des souris), le foie avec un [87] (transfert de la GFP (green fluorescent protein) au foie des rats) et des tumeurs (mélanomes murins) [88]. L'électroporation est utilisée en phase clinique pour la livraison de plasmide codant l'IL-12 pour le traitement des mélanomes [89]. Cette technique présente l'avantage de livrer l'ADN de façon efficace et reproductible [90], mais comporte des limites notamment *in vivo* puisqu'il faut placer l'électrode à 1cm du tissu visé ce qui peut nécessiter une chirurgie et le courant électrique peut causer des dommages aux tissus [91].

1.2.3.2.1.2 Transfert balistique d'ADN (gène gun)

Dans cette méthode des microbilles de métaux biocompatibles comme de l'or, du tungstène ou de l'argent sont recouverts de l'ADN à transférer et projetés à haute vitesse vers le tissu cible [92]. Cette technique est utilisée *in vivo* sur des animaux et permet d'atteindre de nombreux organes sans léser les tissus environnant comme le foie [93], le cœur [94], le cerveau [95] et les muscles [96] avec le transfert d'un plasmide codant la GFP pour suivre l'efficacité de transfection. Comme pour l'électroporation de la chirurgie peut être nécessaire pour atteindre les tissus profonds.

1.2.3.2.1.3 Les ultrasons

Cette technique est proche de l'électroporation à la différence que ce n'est plus une pulsation électrique, mais une onde acoustique qui crée des pores dans la membrane cellulaire par cavitation acoustique permettant à l'ADN de pénétrer. Cette technique est non invasive et permet d'atteindre les organes profonds sans chirurgie [97]. Elle est utilisée pour transférer de l'ADN dans les muscles (transfert d'un plasmide codant GFP dans les muscles de la souris) [98], les tumeurs solides (transfert d'un plasmide codant la β -galactosidase pour suivre la croissance de tumeurs rénales chez la souris) [99], le foie (livraison du gène codant le facteur IX dans le foie de souris) [100], les reins (transfert d'un plasmide codant GFP dans les reins de la souris) [101] et le cœur (transfert d'un plasmide codant la luciférase dans le cœur du rat) [102].

1.2.3.2.2 véhicules chimiques

Les véhicules chimiques consistent en la formation de nanocapsule ou nanoparticule qui ont pour but de masquer la charge négative de l'ADN/ARN de condenser les molécules d'ADN/ARN et de les protéger de la dégradation par les nucléases du milieu intracellulaire [103]. Les nanoparticules doivent entrer en interaction avec les phospholipides et les glycoprotéines de charge négative à la surface de la membrane cellulaire pour permettre aux nanoparticules d'entrer dans la cellule, une corrélation est même observée entre la quantité de charges positives qu'exhibe la nanoparticule et le taux de transfert du gène vers la cellule [104]. L'interaction entre la nanoparticule et l'ADN, qui se fait par liaison électrostatique ou chimique, permet à l'ADN d'être protégé de la digestion par les enzymes du milieu intracellulaire [105]. Les matériaux composants ses nanoparticules peuvent être divisées en deux catégories : les matériaux organiques et les matériaux inorganiques. Dans les matériaux organiques, il y a les lipoplexes (Figure 1-7) et les polyplexes (Figure 1-8). Les matériaux inorganiques utilisés pour nano-encapsuler l'ADN comportent principalement la silice, les oxydes de fer et les nanoparticules d'or, ils forment ensuite soit des composites avec des polymères cationiques où directement des propriétés d'absorption de l'ADN, les particules si elles sont magnétiques peuvent être adressées vers leur cible via l'application d'un champ magnétique [106].

Les lipoplexes sont composés de complexes entre des lipides cationiques et de l'ADN ou de l'ARN chargé négativement. Le lipide cationique qui sert de véhicule à l'ADN ou l'ARN est composé de trois parties. Ils possèdent une ancre hydrophobe composée de deux chaînes aliphatiques ou d'un dérivé du cholestérol, une tête hydrophile chargée positivement connectée à l'ancre par l'intermédiaire d'un « espaceur » [103]. Le premier lipoplexe qui a été utilisé pour le transport d'ADN par l'équipe de Felgner en 1987 était composé du lipide N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N,triméthylammonium chloride (DOTMA). Depuis de nombreux autres lipides sont utilisés pour former des lipoplexes pour le transfert génique (Figure 1-7). Les lipoplexes se sont montrés capables de condenser l'ADN et d'induire des niveaux de transfection élevé *in vitro* [107, 108] et *in vivo* [109]. L'internalisation du lipoplexe par la cellule se fait par deux mécanismes possibles. Le premier correspond à la fusion de la membrane plasmique promue par l'interaction entre le lipide cationique du lipoplexe et un lipide présent sur la membrane [110]. Le second mécanisme implique les voies de l'endocytose [107]. Le segment hydrophobique du lipide est un élément clef qui détermine la charge et la taille du lipoplexes. Il a été montré que la taille et la charge influencent l'internalisation du lipoplexe [111] et peuvent donc affecter l'efficacité de transfection du lipoplexe [112].

Le polyplexe est formé d'un polymère cationique qui condense des acides nucléiques anioniques via des interactions électrostatiques en un complexe de taille nanométrique. Les polyplexes compressent les molécules d'ADN pour former des particules de taille suffisamment faible pour faciliter l'internalisation dans la cellule et donc accroître l'efficacité de transfection [113]. En 1988 le premier polyplexe utilisé pour le transfert de gène *in vivo* est composé du polymère poly-L-lysine (PLL) [114]. Il a été suivi par d'autres (Figure 1-8), dont les plus utilisés comme véhicule génique *in vitro* et *in vivo* sont le poly ethylenimine (PEI) [115] et le chitosane [116]. Le chitosane a pour avantage d'être de synthèse simple, de coût réduit, de ne pas avoir de limite de taille pour l'ADN lors de la formation des polyplexes et d'avoir une structure et une chimie ajustable (Masse moléculaire MM et degré de désacétylation DDA) [117, 118]. Lavertu a montré au sein de notre laboratoire qu'un choix adéquat du DDA et de la masse moléculaire permet l'obtention *in vitro* de niveau de transfection similaire à un système phospholipidique commercial [118]. C'est pour ses qualités que le chitosane est choisi dans ce projet comme véhicule de livraison de nos transgènes.

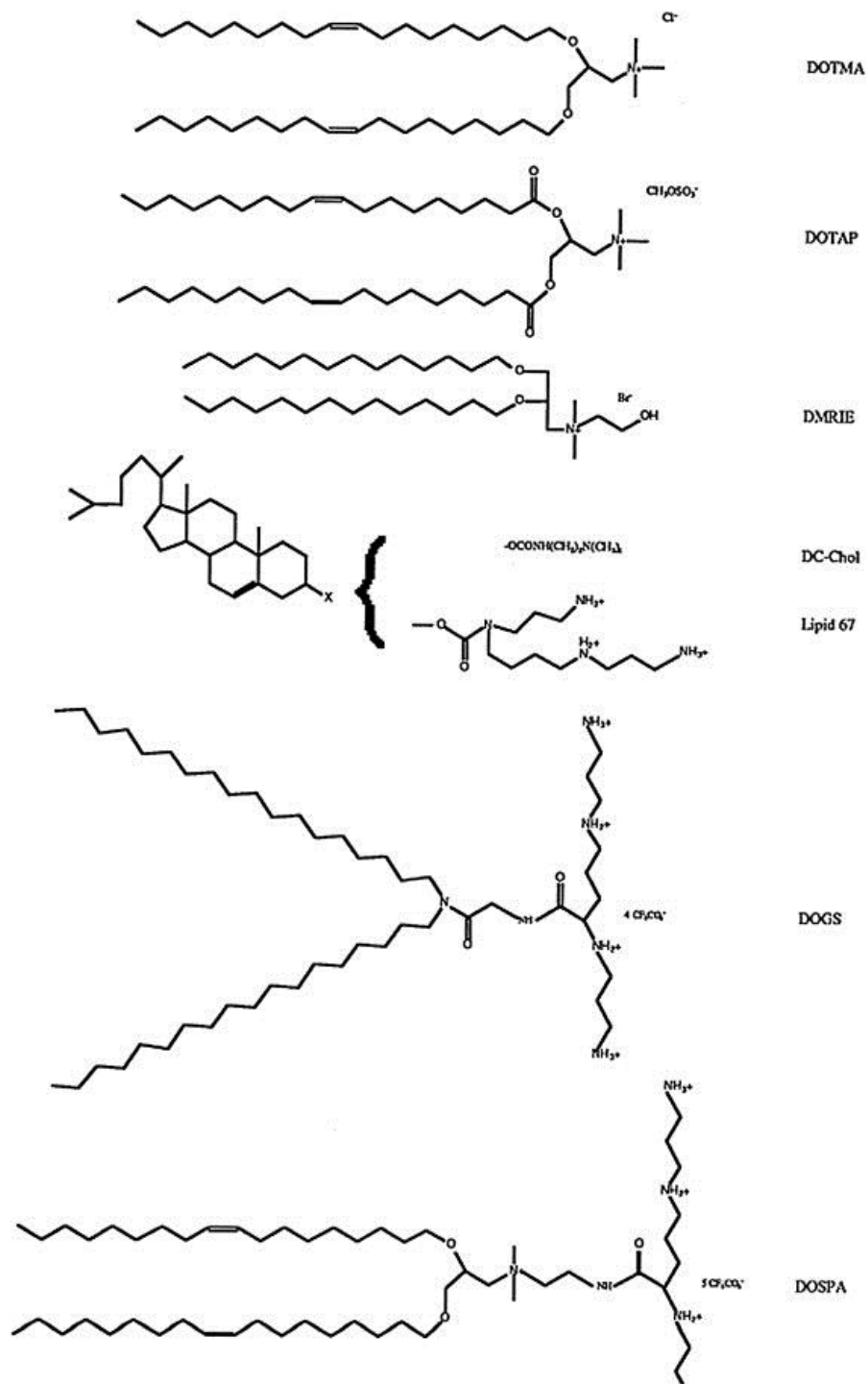


Figure 1-7 Exemples de lipoplexes couramment utilisés comme vecteurs [119]

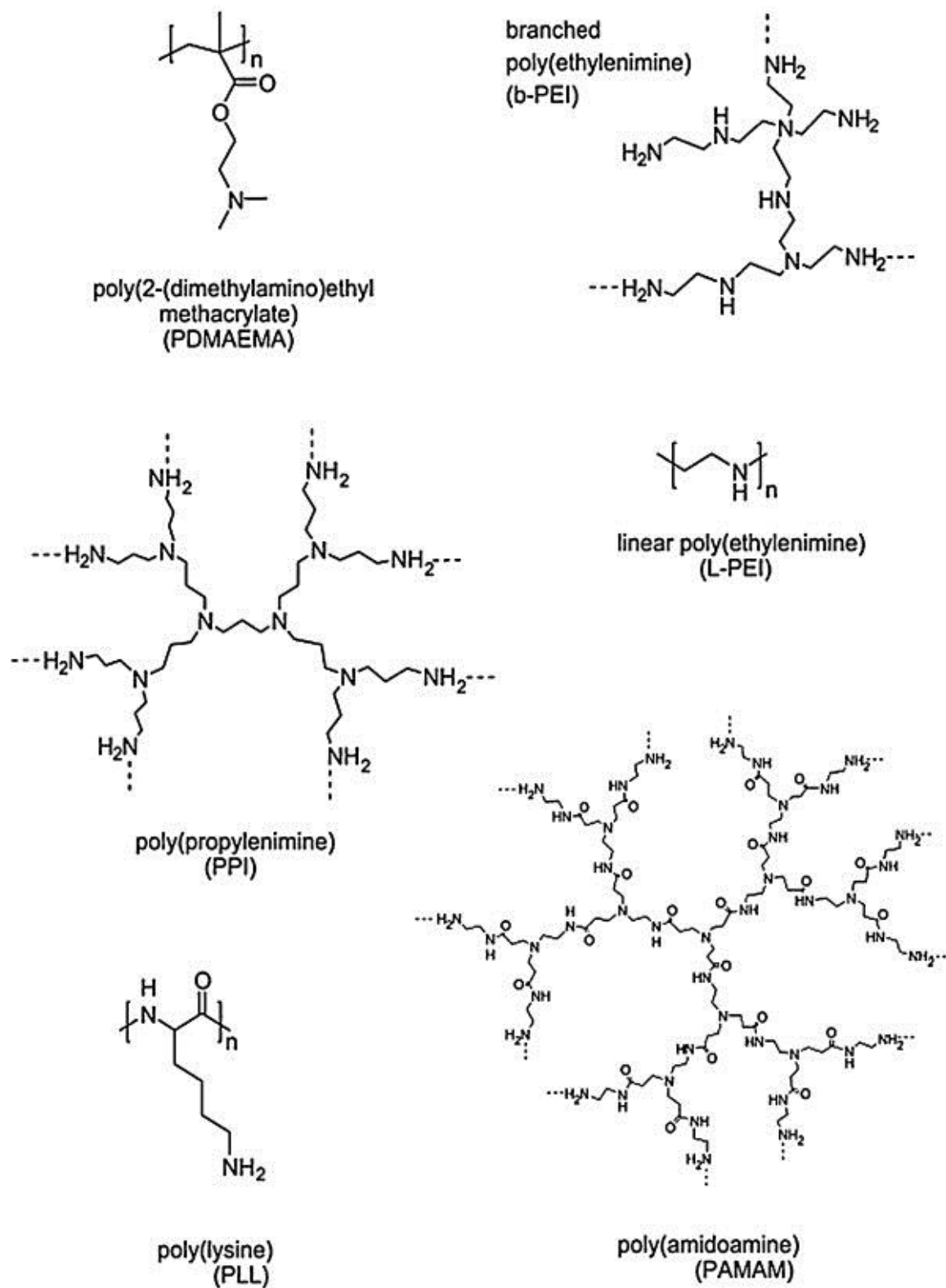


Figure 1-8 exemples de polyplexes utilisés comme vecteurs [120].

1.3 Le chitosane

1.3.1 Origine et structure du chitosane

Le chitosane est un polymère obtenu par désacétylation alcaline de la chitine qui est le second polysaccharide le plus abondant sur Terre après la cellulose, son unité monomérique est le N-acétyl- β -D-glucosamine relié par une liaison glycosidique (1 \rightarrow 4) (Figure 1-9). La chitine est principalement extraite des organismes marins issus des déchets de pêche [121]. Pour la désacétylation alcaline, la chitine est resuspendue dans une solution alcaline à haute température, le contrôle de la température et du temps de réaction permettent d'obtenir différents degrés de désacétylation (DDA). Il est possible de contrôler le DDA par complète désacétylation de la chitine puis réacétylation dans un mélange 80 % eau-méthanol (v/v) en présence d'une quantité stœchiométrique d'acide acétique pour le DDA désiré [122]. Le contrôle de la masse moléculaire du chitosane se fait par clivage des liaisons glycosidiques par l'utilisation d'acide nitrique concentré [123]. La caractérisation du chitosane produit peut se faire par spectroscopie infrarouge ou par résonance magnétique du proton et du carbone [124]. La caractérisation du chitosane est importante, car ses propriétés telles que son DDA et sa masse moléculaire sont des paramètres déterminants pour son efficacité en tant que vecteur de transfection, nous allons développer plus en détail cette influence dans la suite de la revue de littérature.

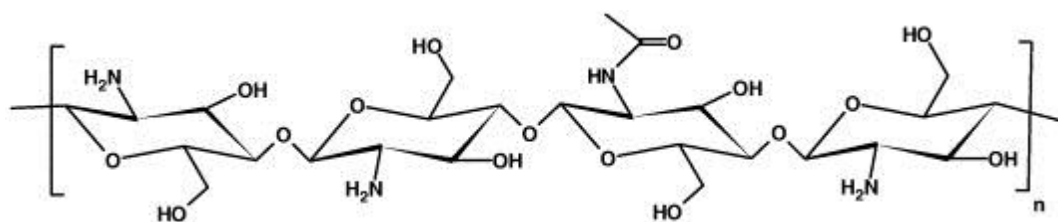


Figure 1-9 structure chimique du chitosane [125]

1.3.2 Chitosane comme vecteur de transfection génique

Le chitosane fait partie des vecteurs non viraux organiques, c'est un polymère cationique à pH acide. Les groupements amines du chitosane lui permettent de lier l'ADN (ou l'ARN) chargé

négativement via des interactions électrostatiques et de l'encapsuler. La condensation de l'ADN dans la nanoparticule est évaluée via le rapport du nombre de molécule d'azote (des groupements amines du chitosane chargés positivement) sur le nombre de molécules de phosphate (chargés négativement présents sur les bases d'ADN) : N/P.

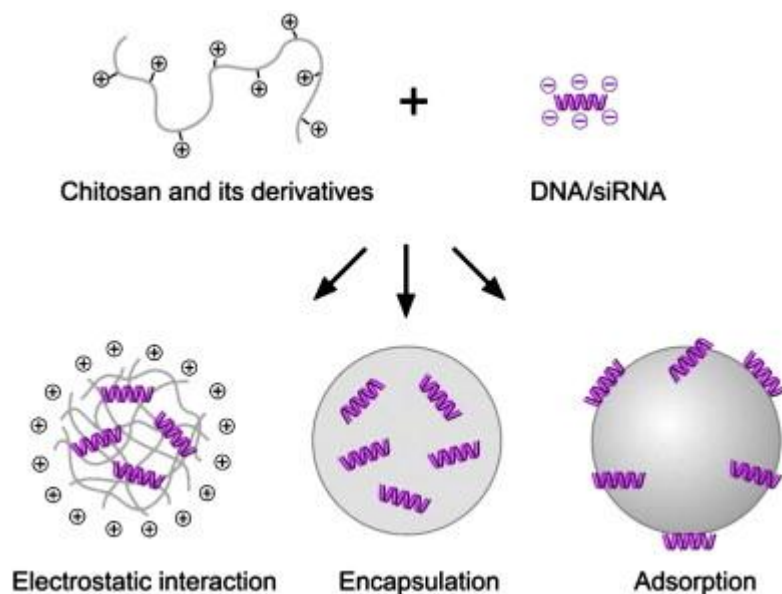


Figure 1-10 formation des nanoparticules Chitosane/ADN (ou ARN) [125]

1.3.3 Influence des caractéristiques du chitosane

Le DDA la masse moléculaire et le ratio N/P sont des paramètres qui influencent grandement l'efficacité de livraison du chitosane, mais aussi d'autres propriétés comme la toxicité, le caractère immunogène et la stabilité des nanoparticules [118, 126].

1.3.3.1 L'influence de la masse moléculaire et du DDA

Le DDA de chitosane correspond au nombre de groupements amines désacétylés, ce qui modifie la charge et donc le potentiel électrostatique [127]. Le pKa du chitosane est de 6.5, il possède donc une charge positive à pH acide (< 6.5) et perd cette charge [125] et sa solubilité [128] à pH neutre et basique. La charge de la nanoparticule de chitosane est donc dépendante du pH et du DDA. Cela est confirmé par plusieurs études qui rapportent une augmentation du potentiel zêta

avec l'augmentation du DDA [129, 130]. Une charge de surface positive est favorable à l'interaction avec la membrane cellulaire chargée négativement et favorise la transfection [131]. De plus un DDA trop faible (et donc une charge de surface faible) n'est pas favorable à la formation de nanoparticule stable avec les acides nucléiques [132]. Toutefois une densité de charge trop élevée peut induire de la cytotoxicité [133] c'est pourquoi il est important de sélectionner un DDA conduisant à un compromis entre efficacité de transfection et toxicité. De nombreuses études montrent que des nanoparticules de chitosane avec des masses moléculaires faibles (<150kDa) ont une efficacité de transfection plus élevée comparée aux chitosanes de masse moléculaire plus élevées [134-136]. Pour le DDA c'est sont les plus élevés (>80 %) qui ont la plus grande efficacité de transfection [137, 138], à l'exception du cas où l'on utilise des chitosanes avec une MM très élevée (390 kDa). Ce couplage qu'il semble exister entre MM et DDA a été étudié par Lavertu au sein de notre laboratoire [139], il ressort de cette étude que la balance entre MM et DDA du chitosane gouverne sont affinité de liaison à l'ADN et influence ça capacité à transférer de façon efficace. L'efficacité de transfection est la plus élevée pour des chitosanes avec une affinité intermédiaire pour l'ADN afin de permettre le relargage de celui-ci [140]. Les chitosans avec la meilleure efficacité de transfection sont donc ceux possédant un DDA relativement élevé (>90 %) associé avec une masse moléculaire relativement faible (<20 kDa) et les chitosanes possédant un DDA relativement faible (<90 %) associé à une masse moléculaire relativement élevée (>20 kDa). Par exemple les chitosanes 92-10 et 80-40 présentent une efficacité de transfection similaire [139]. Il est important de maîtriser avec précision les caractéristiques du chitosane pour l'utiliser en tant que véhicule de transfection génique.

L'influence du ratio N/P

Le ratio N : P (N pour le groupement amine du chitosane et P pour la base phosphate de l'ADN) traduit la quantité d'ADN que l'on a mis en présence du chitosane au moment la formation des nanoparticules. Il influence l'habilité de la nanoparticule à interagir avec l'ADN (plus il y a de chitosanes par rapport à l'ADN et plus l'interaction sera forte) et avec la membrane chargée négativement et donc l'efficacité de transfection [126]. Un excès de chitosanes par rapport à l'ADN (ratio N:P plus grand) provoque la formation d'un polyplexe légèrement plus grand [136, 141]. Or une nanoparticule de plus petite taille est plus efficace pour transférer les cellules [142]

Les ratios N/P les plus efficaces sont d'au moins 3-5, c'est-à-dire dans des situations où l'on a un excès de polycation qui reste libre [143, 144]. Les travaux de Jean au sein du laboratoire suggèrent que l'excès de polycation améliore le relargage du complexe chitosane/ADN du lysosome dans lequel il se trouve une fois qu'il a pénétré le cytoplasme. L'excès de chitosane libre de charges positives provoque une augmentation de la pression osmotique à l'intérieur de la vésicule endo-lysosomal qui permet la rupture de la vésicule et la libération de la nanoparticule [145]. Cependant le ratio N/P optimal dépend des autres propriétés du chitosan. Un chitosane de haute masse moléculaire présente une efficacité de transfection plus élevée à faible ratio N/P et inversement [138]. Pour une même masse moléculaire, les chitosans avec les plus bas DDA (donc le moins de charges positives) vont nécessiter un ratio N:P plus grand pour complètement condenser l'ADN [118].

1.3.4 Utilisation du chitosane en thérapie génique

Comme nous l'avons déjà vu le chitosane a la faculté d'empaquer l'ADN et l'ARN par interactions électrostatiques formant des nanoparticules. Cet empagement améliore l'internalisation de l'ADN, car en tant que biomatériaux adhésifs le chitosane prolonge le contact entre le nanocomplexe transportant le transgène et la cellule cible [146]. De plus il augmente la perméabilité de la membrane cellulaire en perturbant les jonctions serrées entre les cellules via altération l'actine cellulaire, ce qui améliore l'internalisation de de l'ADN [147]. Le chitosane permet également à l'ADN internalisé d'échapper des endolysosomes par augmentation de la pression osmotique [145]. Ces propriétés permettent l'utilisation pour plusieurs applications.

1.3.4.1 Application aux vaccins

Dans ce contexte le nanocomplexe de chitosane doit non seulement transporter l'ADN codant pour l'antigène contre lequel est développé l'immunité, mais aussi promouvoir l'activation du système immunitaire. Pour cela l'antigène codé par l'ADN doit être présenté à la surface de cellule appropriée afin d'être présenté aux lymphocytes B et T. Cela se fait par la transfection des cellules somatiques qui va conduire à l'activation des lymphocytes T cytotoxique via la voie de

présentation croisée ou par la transfection directe des cellules présentatrices d'antigènes [148, 149]. La voie orale et intranasale sont des voies de choix pour la vaccination, puisque ce sont les voies communes par lesquelles entrent les pathogènes et sont donc capables de générer une réponse immune locale et systémique. Le vecteur chitosane/ADN plasmidique a été utilisé avec succès sur ses voies d'administration chez la souris pour immuniser contre un allergène d'arachide [150] ou contre le virus de l'hépatite B [151]. D'autres voies d'administration peuvent être considérées, Jean et coll. montrent que l'injection sous-cutanée de chitosane/ADN plasmidique codant pour les protéines FGF-2 et PDGF-BB conduit chez la souris à la production d'anticorps spécifiques. Par ailleurs cette réponse immunitaire spécifique dépend de la formulation du chitosane utilisé : le chitosane avec le plus petit DDA (80%) et la plus haute masse moléculaire (80 kDa) est celui qui induit le plus d'anticorps spécifiques de l'antigène et l'infiltration de cellules inflammatoires. L'autre formulation au contraire, haut DDA (92 %) faible masse moléculaire (10 kDa) conduisant à une production faible d'anticorps spécifique de l'antigène.

1.3.4.2 Application à l'expression de protéine thérapeutique

Cette fois la réponse immunitaire n'est plus souhaitée et l'expression du transgène doit être soutenue. La structure chimique du chitosane, sa taille et sa charge sont des facteurs qui influent sur l'efficacité de transfection du transgène et un large nombre d'études montrent une expression soutenue du transgène dans les études animales utilisant des chitosanes de propriété très variée (dont la revue est faite dans [14]). L'équipe de Bowman est notamment parvenue à traiter de façon efficace l'hémophilie sur un modèle murin d'hémophilie A (Facteur VIII KO) en utilisant des chitosanes de formulation 84-390 et 70-390 (DDA-MM) par voie orale [152]. Ces chitosanes ont été utilisés comme véhicule d'un plasmide codant le facteur VIII (ou facteur anti-hémophilique A, cofacteur de coagulation) et permis l'induction de la synthèse du facteur VIII. La présence du facteur VIII est détectable dans le plasma sanguin un mois après administration orale. Le chitosane a également rencontré un succès par administration par voie intramusculaire et sous-cutanée. Jean a utilisé des chitosanes de formulation 92-10 et 80-10 (DDA-MM) pour la livraison d'un plasmide codant la protéine GLP1 (glucagon like peptide 1) [13]. GLP1 est une hormone intestinale qui augmente la production de glucose dépendante de l'insuline utilisée pour le traitement du diabète de type 2 [153]. Le chitosane livrant le plasmide est injecté par voie sous-

cutanée et intramusculaire chez des rats « Zucker Diabetic fatty » utilisés comme modèle animal pour le traitement du diabète de type 2. Les rats traités montrent une concentration accrue de GLP1 et d'insuline dans le plasma associé à un retour à la normale de leur niveau de glucose sanguin. Cet effet persiste jusqu'à 24h après la 5^{ème} et dernière injection. L'accroissement du niveau de GLP1 est sanguin et plus rapide chez les rats traités en sous cutané et les niveaux de GLP1 atteints sont plus importants avec le chitosane de formulation 92-10. Dans le cadre de notre projet, nous utilisons le chitosane 92-10 qui semble être le plus prometteur pour l'expression thérapeutique de nos protéines recombinantes bloqueuses de TNF.

CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE

2.1 Clonage

Des réactions de polymérisation en chaîne (RPC) sont effectuées à partir d'un échantillon d'ADN complémentaire (ADNc) issu de la rétro-transcription des ARN messagers (ARNm) provenant de cellules de la rate du rat. Pour isoler la séquence des gènes d'intérêts, nous avons utilisé des amorces nucléotidiques qui ont été choisies pour permettre l'amplification spécifique, par RPC, des gènes correspondant à la partie extracellulaire du récepteur du TNF α de type II (TNFR) et à la partie constante d'une immunoglobuline de type G (IgG). Un cycle de RPC comporte 3 étapes : une étape de dénaturation à 94 °C de l'ADN matrice, une étape d'hybridation (annealing) à la température de fusion, T_M moins 5 °C) et une étape d'élongation (polymérisation) à 68 °C.

2.1.1 Clonage de la séquence codante la partie extracellulaire du récepteur TNFRII du rat (TNFR) et de la séquence codante pour la région constante de l'immunoglobuline (Ig) du rat.

Des amorces nucléotidiques ont été dessinées de façon à permettre l'amplification spécifique du gène correspondant à la partie extracellulaire du récepteur du TNF α de type II (TNFR) (GenBank: NM_130426.4) et des régions CH2, CH3 avec ou sans région charnière de la partie constante d'une Ig de type G1 du rat (GenBank ACCESSION BC088240), mais aussi la mutation de ses séquences afin d'ajouter des sites pour enzymes de restrictions. Les sites correspondant aux endonucléases HindIII (15207-038, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), KpnI (15232-010, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), XbaI (15226-012, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vont permettre le clonage directionnel dans le vecteur d'expression pVax1. Les fragments d'ADN ainsi amplifiés ont été insérés dans un plasmide de clonage bactérien pCR2.1. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 2-1.

Tableau 2-1 Amorces pour clonage des gènes TNFR et Ig

Gène	Amorce sens	Site de restriction ajouté	Amorce anti-sens	Site de restriction ajouté
TNFR	5'- TAAGCTTAGAGCGGG AGCTACC-3'	HindIII	5'- TCGTTGGACTGACAGGT ACCA-3'	KpnI
CH2-CH3	5'- GGGTACCAGAGTATC ATCTGTCTT-3'	Enzyme KpnI	5'- AGTCTCTAAACTCTCCTC TAGAC-3'	Enzyme XbaI et <u>codon-stop</u>
CH2-CH3 + charnière	5'- GGTACCAAAATTGTG CCAAG-3'	Enzyme KpnI	5'- AGTCTCTAAACTCTCCTC TAGAC-3'	Enzyme XbaI et <u>codon-stop</u>

La réaction RPC est effectuée dans un thermocycleur programmable Rotor-Gene6000 (Corbett Life Science, NSW, Australie) en utilisant la crimson Taq (Crimson Taq DNA Polymerase, NEB, M0324S, New England, US) à partir de l'ADN complémentaire issu des ARNm des cellules de la rate du rat (CDNA-rat normal tissu : spleen, C1434246, BioChain, Newark, CA, USA). Pour cela 0.5µg d'ADNc 0.2µM des amorces, 200µM de nucléotide 1.25 unité de polymérase est utilisé pour un volume total de 50µL avec le programme suivant : dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 minutes; 35 cycles de dénaturations (94°C, 1minutes), hybridation (49 °C, 30 secondes) et élongation (68 °C 50 secondes); élongation finale à 68 °C pendant 2 minutes.

Le produit RPC a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 % pendant 45 minutes à 100 V. Le gel a été coloré au bromure d'éthidium (Ethidium bromide solution, E1510, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) à 0.5 µg/mL qui permet la visualisation des bandes d'ADN sous lumière UV à l'aide de l'appareil Biovision (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France). La bande correspondant au fragment d'ADN amplifié ont été extraites du gel en utilisant le kit

d'extraction de Quiagen (QUIAquick gel extraction Kit,28704, QUIAGEN, hilden, Germany). La réaction de ligation et de transformation a été effectuée à l'aide du kit TOPO cloning en suivant le protocole suivant (TOPO TA cloning kit, Invitrogen,45-0641, Carlsbad, CA). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur pétire de milieu LB à l'aide de l'antibiotique ampicillin (Ampicillin sodium salt, A0166, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dont le gène de résistance est présent dans pCR2.1 et par sélection blanc/bleu à l'aide du système LacZ/X-gal.

Les bactéries transformées sont repiquées dans 3 mL de milieu LB liquide avec ampicilline (100µg/µL) et incubées toute la nuit à 37 °C avec agitation horizontale à 200 rpm.

Après 14 à 16 h d'incubation 1.5 mL des cultures liquides de bactéries ont été centrifugées dans des tubes eppendorf à 800 rpm pendant 3 minutes. Le plasmide a ensuite été extrait du culot obtenu en utilisant le kit mini prep de Quiagen (QUIAprep Spin miniprep Kit,27106, QUIAGEN, hilden, Germany) comme décrit dans le manuel. Rapidement les culots sont dissouts avec 250 µL de solution P1, 250 µL de solution P2 est ajoutée (P2 est une solution basique qui permet la lyse des bactéries provoque la libération leur contenu en solution), les tubes sont ensuite agités par inversion puis incubés 5min à température pièce. 350 µL de solution N3 est ajoutée et les tubes sont agités jusqu'à observation d'un précipité blanc (N3 réduit le pH causant la précipitation des protéines et de l'ADN génomique et laissant le plasmide en solution). Pour éliminer ce précipité blanc qui correspond aux débris cellulaires et l'ADN génomique, les tubes sont centrifugés 10 min à 13000 rpm avant de récupérer le surnageant qui contient le plasmide. Les surnageants sont ensuite transférés sur les colonnes puis centrifugés 1 min à 13000 rpm, les colonnes sont ensuite lavées pour purifier l'ADN plasmique avec 500µL de solution PB puis 750 µL de solution PE (qui contient de l'éthanol afin d'éliminer l'excès de sel). Enfin le plasmide purifié est récupéré de la colonne à l'aide de 50µL d'eau. Les plasmides sont ensuite migrés sur un gel d'agarose 0.8 %. La longueur de la chaine d'ADN des plasmides purifiés est vérifiée. Les plasmides issus des colonies blanches (plasmide qui contient le fragment cloné) ont une chaine d'ADN plus longue que les plasmides issus des colonies bleues (plasmide qui ne contient pas le fragment cloné) L'absorbance à 260 nm et à 280 nm des échantillons est ensuite mesurée avec le spectrophotomètre (JENWAY 6405 UV/VIS, JENWAY, Burlington, NJ, USA).

La mesure à 260 nm correspond à la longueur d'onde d'absorption de l'ADN et la mesure à 280 nm à la longueur d'onde d'absorption des protéines. L'absorbance à 260 nm fournit la concentration de l'ADN dans l'échantillon (1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN doubles brins). Le ratio A_{260}/A_{280} permet lui, d'évaluer la proportion de contaminants protéiques dans l'échantillon (plus le ratio est élevé plus l'échantillon d'ADN est pur. Les échantillons avec un ratio $A_{260}/A_{280} < 1.8$ sont rejetées. Les échantillons restants sont envoyés pour séquençage à l'IRIC. Les séquences obtenues sont comparées à la séquence d'origine disponible sur Gene Bank,

2.1.2 Formation des trois constructions plasmidiques pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd

Le fragment TNFR comportant les sites pour KpnI et XbaI est prêt à être inséré dans le plasmide pVax. Le plasmide pCR2.1/TNFR et le plasmide pVax1 (pVax1, V260-20, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) sont digérés par les enzymes Hind III et XbaI (digestion avec une unité d'enzyme par µg de plasmide pendant 1 h à 37 °C) afin de générer des bouts cohésifs.

Les bouts cohésifs ainsi générées sont assemblés en utilisant la ligase ADN T4 (T4 DNA ligase, M0202S, NEB, New England, US) en utilisant la procédure suivante : l'équivalent de 100fmol de pVax sont mélangés à 600fmol de l'insert TNFR et 4µL du tampon de la ligase dans un volume total de 20 µL, le tout est incubé 16 h à 14 °C dans le bain réfrigéré (HAAKE G) permettant l'obtention du plasmide pVax/TNFR.

Les bactéries transformées sont cultivées sur des pétris formés d'agar, de milieu LB en présence kanamycine (Kanamycin sulfate, from Streptomyces Kanamyceticus, K1377, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) à la concentration 50 µg/ml durant une nuit à 37 °C. L'antibiotique utilisé est la kanamycine et non l'ampicilline contrairement à précédemment, car le gène de résistance à l'antibiotique (ou le gène de sélection) présent sur pVax est un gène de résistance à la kanamycine. Les bactériées sont repiquées, cultivées et les plasmides sont purifié comme décrit à la section 2.1.1.

Les plasmides pCR2.1/CH2-CH3 et pCR2.1/CH2-CH3+charnière sont digérées par les enzymes HindIII et KpnI. Les fragments sont ensuite liées aux fragments TNFR au niveau de leur extrémité cohésive générée par l'endonucléase KpnI en utilisant de 600 fmol de l'insert TNFR et

600 fmol de l'insert CH2-CH3 ou CH2-CH3+charnière à l'aide de la T4 ligase comme décrit au paragraphe précédents. Les fusions IgTNFR (fusion entre TNFR et les région CH2-CH3 de l'Ig) et IgTNFRd (fusion entre TNFR et les régions CH2-CH3+charnière de l'Ig) sont ainsi générés, elles sont ensuite insérées via les sites HindIII et KpnI dans le plasmides pVax tel que décrit au premier paragraphe de se chapitres

Des bactéries E.Coli (DH5 α -T1) chimiquement compétentes sont transformées avec les plasmides pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd : 2 μ L de produit de ligation sont ajoutés à un vial de bactérie E.Coli (DH5 α -T1) et incubés sur glace pendant 5 minutes. Les bactéries subissent ensuite un choc en plongeant le vial pendant 30 secondes dans un bain à 42 °C avant de le remettre sur glace ceci permet de déstabiliser la membrane plasmique pour permettre l'entrée du plasmide. Pour régénérer les bactéries, 250 μ L de milieu nutritif SOC sont ajoutés avant d'incuber le vial à 37 °C, avec rotation horizontale à 200 rpm.

2.2 Préparation des particules de chitosane/ADN plasmidique (ADNp)

2.2.1 Préparation des formulations de chitosane

Le chitosane (Laboratoire BCL, polytechnique Montréal, Montréal, Canada) 92-10 (degré de désacétylation-masse moléculaire) a été dissout pendant une nuit à température pièce avec une solution d'acide chlorhydrique en quantité stœchiométrique par rapport au groupement amide, afin d'obtenir une solution liquide de chitosane à 5 mg/mL. Les solutions ont ensuite été filtrées à 0.2 μ m sous une hôte biologique. Une solution de chitosane diluée est formée de façon à ce que une fois mélangé en proportion 1:1 avec de l'ADN plasmidique à la concentration 0.1 μ g/ μ L elle donne des nanoparticules de chitosane avec un ratio défini. Par exemple, pour obtenir 1mL de solution de travail nécessaire pour former des nanoparticules 92-10-5 il faut diluée 58 μ L de la solution de chitosane dilué 92-10 à 5mg/mL dans un volume total de 1 mL d'eau pure.

2.2.2 Formation des nanoparticules chitosane/ADNp

Le volume désiré d'ADNp à la concentration 0.1 μ g/ μ L est ajouté à un tube eppendorf, le même volume de solution de travail est ajouté et immédiatement mélangé par pipetage (environ 20 fois) et incubée une trentaine de minutes pour permettre la formation des nanocomplexes.

2.3 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosan/ADNp

2.3.1 Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosan/ADNp

La taille hydrodynamique, c'est-à-dire la taille de la particule et de la couche d'eau qu'il absorbe et le potentiel ζ des nanoparticules ont été déterminées avec l'appareil Zetasizer Nano ZS (DLS, Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, Worcesterchire, UK). La mesure de la taille hydrodynamique repose sur le principe de la diffusion dynamique de la lumière issue d'un laser lorsqu'il rencontre les particules en solution qui sont soumises à un mouvement brownien. La mesure de l'intensité de diffusion de la lumière du laser qui rencontre la particule permet d'évaluer son mouvement brownien qui dépend de la taille hydrodynamique de la nanoparticule. Par ce biais la taille hydrodynamique de la particule est calculable.

Le potentiel ζ est une mesure de la charge de surface de la nanoparticule. Sa mesure a été faite dans le même instrument que pour la taille hydrodynamique. Cette fois c'est le principe physique de la vélocimétrie à rayon laser à effet Doppler qui donne accès au potentiel ζ .

Les nanoparticules formées comme indiqué dans le chapitre 2.2.2 sont diluées 10 fois dans une solution de NaCl à 10 mM. Un volume de 500 μ L de cette solution a ensuite été placé dans une cuvette transparente (759075D, plastibrand, Brand, Wertheim, Allemagne) pour mesurer la diffusion de la lumière sous un angle de 173 ° à température pièce afin de déterminer la taille hydrodynamique de la nanoparticule. La solution est ensuite à nouveau diluée par deux dans une solution de NaCl à 10mM (dilution par 20 par rapport à la solution initiale) et introduit dans une cuvette destinée à la mesure du potentiel ζ (cellule capillaire jetable, DTS1061, Malvern Instruments, Worcesterchire, UK).

2.3.2 Analyse des nanoparticules chitosan/ADNp par microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage permet de visualiser la forme des nanoparticules chitosan/ADNp. Les nanoparticules préparées de la façon décrite au chapitre 2.2 ont été vaporisées sur un support de silicium et recouvertes d'une mince couche d'or. La taille des

particules d'or a été ajustée entre 1 à 2 nm de façon à éviter l'interaction avec les nanoparticules par l'instrument Agar Manuel Sputter Coater (Marivac Inc., Lakefield, QC, Canada). Le support a ensuite été placé dans la chambre du microscope électronique à balayage réglé en mode vide élevé (ESEM, Quanta 200 FEG, FEI Compagny Hillsboro, OR, USA). Des images ont été prises au grossissement 80000 X et 160000 X pour déterminer l'homogénéité des formes des nanoparticules au sein de la population observée et déterminé une taille à faire corrélée avec les résultats de diffusion dynamique de la lumière.

2.3.3 Étude de la protection de l'ADNp complexé au chitosane (nanoparticules de chitosane/ADNp) contre la digestion par l'ADNase.

Pour convenir comme système de livraison *in vitro* et *in vivo* en particulier, le chitosane doit protéger l'ADN qu'il véhicule contre la dégradation par les nucléases du milieu physiologique, afin de permettre à l'ADN de rejoindre sa cible. Les dilutions suivantes de la solution de chitosane 92-10 à 5 mg/mL (préparées comme indiqué dans la section 2.2) sont effectuées comme indiqué dans le Tableau 2-2 .

Tableau 2-2 dilution de la solution de chitosane 92-10 à 5 mg/ml

Formulation de chitosane cible	92-10-0.5	92-10-2	92-10-5	92-10-10	92-10-20
Volume total	1000 µL	500 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Volume de la solution de chitosane 92-10 à 5mg/ml(µL)	5µL	11µL	5µL	11µL	22µL
Volume d'eau (µL)	995µL	489µL	95µL	89µL	78µL

Ces dilutions sont utilisées pour former des nanocomplexes avec l'ADN plasmidique (en utilisant la procédure décrite à la section 2.2.2) de formulation 92-10-0.5, 92-10-2, 92-10-5, 92-10-10, 92-10-20. 20 µL de ces nanocomplexes et un contrôle ne contenant que l'ADNp ont été incubés en présence de quantités croissantes de ADNase de type I (DNase 1 amplification

grade, Sigma Aldrich, Product N° AMPD1-1KT) : 0, 1, 2 et 4 Unités dans un volume total de 30 μ L du tampon de l'ADNase, pendant 30 minutes à 37 °C. Puis la réaction de digestion a été arrêtée par l'ajout de 2 μ L d'EDTA à 50 mM (l'EDTA inhibe la DNase par chélation des ions Ca^{2+} nécessaire à l'activité de l'enzyme). Ces mêmes échantillons ont été ensuite digérés par 80 mU de chitosanase (Chitosanase from Streptomyces, Sigma Aldrich, Product N° C-9830-10UN) pendant 1h30 à 37 °C afin de libérer l'ADNp des nanoparticules. La réaction de digestion est finalement arrêtée par incubation 15 minutes à -20 °C. Les échantillons migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose 0.8 %. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium (Ethidium bromide solution, E1510, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) à 0.5 μ g/mL qui permet la visualisation des bandes d'ADN sous lumière UV à l'aide de l'appareil Biovision (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France) Culture des lignées cellulaires et transfection

2.3.4 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires suivantes ont été utilisées pour les expériences *in vitro* : HEK293, CHO et WEHI-13-Var (ATCC, Manassas, VA, USA). Les lignées cellulaires HEK293 et CHO ont été utilisées pour les transfections et la lignée WEHI13-Var a été utilisée pour l'expérience de biofonctionnalité. Les HEK293 ont été cultivées dans du milieu DMEM (DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium) à glucose élevé (12100-046, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplémenté de 1.85 g/L de NaHCO_3 (S-5761, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) et de 10 % (volume/volume) de FBS (FBS : fœtal bovine serum, 26140079, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les CHO ont été cultivées dans du milieu MEMalpha (Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium, 11900073, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Supplémenté de 6 % de FBS dialysé (Dialyzed Fetal Bovine Serum, 26400036, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et de L-glutamine à 4mM (L-Glutamine, 25030-081, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les WEHI-13-Var ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 (RPMI 1640, 30-2001, ATCC, Manassas, VA, USA) supplémenté de 10 % (volume/volume) de FBS (FBS : fœtal bovine serum, 26140079, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les cellules sont toutes maintenues à 37 °C en atmosphère contrôlée à 5 % de CO_2 .

2.3.5 Transfection des cellules *in vitro* avec les nanoparticules chitosan/ADNp.

Les transfections ont été effectuées avec des nanoparticules à base de chitosane (92-10-5)/ADNp préparées de la façon décrite au chapitre 2.2. Les cellules HEK293 ou CHO ont étéensemencées dans une plaque 24 puits la veille de la transfection de façon à atteindre les 50% de confluence le jour de transfection. Le jour de transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu de transfection en présence de 10 % de FBS et fraîchement ajusté au pH 6.5 et des nanoparticules de chitosan/ADNp de façon à avoir 1 µg d'ADN par puits. Le milieu de transfection est composé du milieu DMEM (DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium) à glucose élevé (12100-046, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplémenté de 0.839 g/L de NaHCO₃ (S-5761, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) et de 0.977 de MES (MES hydrate, M2933, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), ajusté au pH 6.5. Au bout de 24 h, le milieu de transfection a été remplacé par le milieu de culture normal. Les surnageants et/ou les culots ont été collectés au bout d'une autre 24h d'incubation dans leur milieu de culture.

2.4 Expression de l'ARN messager (ARNm) correspondant au transgène.

Les cellules HEK293 et CHO ont été transfectées par des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ADNp, avec les trois ADNp correspondants à pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd. Des cellules restent non transfectées comme contrôle. Les culots de cellules sont récupérés après 48 h de transfection dans des eppendorf de 1.5 ml. L'ARN total a ensuite été extrait en utilisant le kit d'extraction RNA XS (MCN74090250, Macherey-Nagel, Biolynx, Brockville, ON, Canada) : les culots sont lysés à l'aide de 100 µL de solution RA1 qui inhibe également les ARNases et 2 µL de solution TCEP qui réduit les ponts disulfure et favorise la liaison de l'ARN à la silice, 5 µL de solution « carrier » ARN est ensuite ajoutée pour faciliter la précipitation des ARN. Le produit de lyse est ensuite filtré à l'aide d'une membrane par centrifugation 30 seconde à 11000 g. 100 µL d'éthanol 70 % est ajouté pour ajuster les conditions de liaison de l'ARN à la silice. Le mélange est ajouté à la mini colonne de silice et centrifugé 30 seconde à 11000 g (l'ARN est maintenant lié à la colonne de silice). 100 µL de tampon de dessalage est ajouté à la colonne qui est centrifugée 30 secondes à 11000 g. L'ADN contaminant notre membrane de silice est digéré en utilisant 25 µL de mixture de DNase incubé 15 minute à température pièce. La membrane est

ensuite lavée par l'utilisation successive de 200 μL des tampons RA2 et RA3. Enfin l'ARN purifié est élué de la colonne à l'aide de 10 μL d'eau sans ARNase. Une fois récolté l'ARN total a été rétrotranscrit en ADN complémentaire en utilisant le kit Quantitect reverse transcription kit (205311, QIAGEN, Hilden, Germany) selon les instructions du fabricant. Rapidement, l'ADN génomique contaminant restant est éliminé de notre échantillon d'ARN purifié par incubation 2min à 42°C avec le tampon « gDNA wipeout ». Le mélange réactionnel pour la rétrotranscription est ensuite effectué en mélangeant : 1 μL de reverse transcriptase, 4 μL du tampon de la reverse transcriptase, 1 μL des amorces de la reversetranscriptase et 14 μL de notre ARN purifié. Le mélange est successivement incubé 15 minutes à 42 °C puis 3 minutes à 95 °C pour inactiver la reverse transcriptase. Une RPC est ensuite effectuée avec des amorces permettant d'amplifier nos trois une séquence spécifique de nos transgènes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd (Tableau 2-3). Pour cela 20 μL du produit de retrotranscription avec 0.2 μM des amorces, 200 μM de nucléotides et 1.25 unité de polymérase sont utilisés pour un volume total de 50 μL avec le programme suivant : dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 minutes; 50 cycles de dénaturation (94 °C, 15 secondes), hybridation (58 °C-0.5 °C pendant les 10 premiers cycles, 30 secondes) et élongation (68 °C, 30 secondes); élongation finale à 68 °C pendant 5 minutes.

Tableau 2-3 séquences des amorces utilisées pour détection des ARNm

amorces pour détecter	Foward primer	Reverse primer
TNFR	5'- GACACCACATCATCCACAGA-3'	5'-GAGCTCGGATCCACTAGTCC-3'
IgTNFR	5'- GACACCACATCATCCACAGA-3'	5'- AGGTACACGTGTGTTGTGGTA-3'
IgTNFRd	5'- GACACCACATCATCCACAGA-3'	5'- AGGTACACGTGTGTTGTGGTA-3'

Les échantillons de RPC sont ensuite migrés sur gel d'agarose 0.8 %. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium (Ethidium bromide solution, E1510, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) à 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ qui permet la visualisation des bandes d'ADN sous lumière UV à l'aide de l'appareil Biovision (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France) et le gel est coloré au bromure d'éthidium pour faire apparaître les bandes d'ADN

Bioactivité des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd. Les cellules HEK293 ont été transfectées par des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ADNp, avec les trois ADNp

correspondant à pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd. Afin d'être utilisé comme contrôle des cellules sont transfectées avec un chitosane (92-10-5)/ADNp codant pour la protéine GFP (pEGFP_{luc}, 6169-1, Clontech, Mountain View, CA, USA), avec du chitosane seul et le plasmide GFP seul et d'autres sont laissées non transfectées. Le jour précédent la collecte des surnageants de transfection, des plaques 96 puits ont étéensemencées avec 15000 cellule/puits de WEHI-13-Var afin d'atteindre 50 % de confluence le lendemain. Les puits d'autres plaques 96 puits ont été remplis avec 50 ng d'actinomycin D (Sigma aldrich, Product N°A1410, St Louis, MO, USA) et différentes quantités de TNF α (R &D system, Product N°510-RT-050, Minneapolis, MN, USA): 300, 250, 200, 180, 150, 100, 75, 50, 25 et 0 pg en triplicata pour chaque échantillon et chaque contrôle. Les puits ont ensuite été complétés par 100 μ L des surnageants de transfection et les contrôles ont incubé 3 h à 37 °C, 5 % CO₂. A cette étape un contrôle est ajouté : une partie du surnageant des cellules non transfectées est mis en présence de 10 ng/ μ L d'anticorps anti-TNF α (R &D system, Product N°BAF-510, Minneapolis, MN, USA). Le milieu de culture des plaques contenant les WEHI-13-Var a été finalement remplacé par le milieu précédent contenant le TNF α et les surnageants, puis les cellules ont été incubées toute la nuit à 37 °C, 5 % CO₂.

Le lendemain un test MTT est effectué en utilisant le kit MTT cell proliferation assay (ATCC, Product N°30-1010K) : 10 μ L de réactif MTT ont été ajouté aux puits de la plaque contenant les cellules, les plaques ont été incubé à 37 °C, 5 % CO₂ jusqu'à apparition d'un précipité violet (2 à 4 h), 100 μ L de détergent a été ajouté avant d'incubé les plaques à température pièce à l'abri de la lumière pendant toute la nuit.

Le lendemain les plaques sont lues à l'aide du Microplate reader Tecan Infinite M200 (Teacan, Männedorf, Switzerland) à 570 nm.

2.5 Comparaison de l'activité des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd contre TNF α : ELISA de compétition.

Les cellules HEK293 ont été transfectées par des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ADNp, avec les trois ADNp correspondants à pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFR. Comme contrôle les cellules ont également été transfecté avec un chitosane (92-10-5)/ADNp codant pour la protéine GFP (pEGFP_{luc}, 6169-1, Clontech, Mountain View, CA, USA), avec du chitosane seul

et le plasmide GFP seul et des cellules non transfectées. Le jour précédent la collecte des surnageants de transfection, différentes quantités de TNF α de rat (R &D system, Product N°510-RT-050, Minneapolis, MN, USA) ont été fixées sur une plaque 96 puits pour ELISA à l'aide d'un tampon carbonate/bicarbonate au pH 9.5. Les quantités de TNF α ont été fixées à 800, 600, 400, 300, 200, 100, 50 et 0 pg. Le lendemain les surnageants sont collectés et les puits de la plaque d'ELISA sont bloqués 1 h avec 250 μ L de tampon carbonate/bicarbonate, 5 % de BSA (Sigma, A3294, St Louis, MO, USA), puis lavés avec 100 μ L de PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, D5652-10X1L, St Louis, MO, USA). Un volume de 100 μ L des surnageants a ensuite été ajouté et incubé à 4 °C toute la nuit. Le lendemain les plaques ont été à nouveau lavées au PBS et un volume de 100 μ L contenant 10 ng d'anticorps anti-TNF α (R &D system, Product N°BAF-510, Minneapolis, MN, USA) dilué dans du PBS, 2% BSA a été ajouté à chaque puits. La plaque a ensuite été incubée toute la nuit à 4°C. Le lendemain la plaque a été lavée avec 100 μ L de PBS et 100 μ L de Streptavidin-HRP (R &D system, DY998, Minneapolis, MN, USA) dilué 1/200 dans une solution de PBS, BSA 1 % a été ajouté au puits et le tout a été incubé à température ambiante 1h. La plaque a ensuite été lavée cinq fois au PBS et 100 μ L du substrat de la streptavidin (Substrate reagent pack, R&D systems, Product N°Dy999, Minneapolis, MN, USA) a été ajouté au puits. La plaque a été incubée à température ambiante et la réaction de coloration stoppée avec 50 μ L d'acide sulfurique. La plaque a ensuite été lue à l'aide du Microplate reader Tecan Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland) à 450 nm.

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

3.1 Clonage

3.1.1 Clonage de la construction correspondant à la partie extracellulaire du récepteur TNFRII du rat (TNFR) vectorisée dans le plasmide pVax1 (pVax/TNFR)

3.1.1.1 Clonage du fragment TNFR dans le plasmide pCR2.1

L'ADN amplifié par RPC est d'abord cloné dans le plasmide pCR2.1, en se basant sur le principe des nucléotides T et A dépassants dans les amplicons de RPC (TOPO TA cloning kit (45-0641, Invitrogen, Carlsbad, CA). Le fragment cloné contient deux séquences nucléotidiques de deux sites de restrictions lui permettant d'être clivé par les enzymes HindIII à son extrémité 5' et par KpnI à son extrémité 3', voir Figure 3-1.

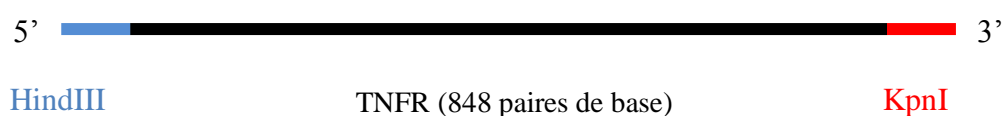


Figure 3-1 Schéma de la séquence de TNFR clonée

En bleu à l'extrémité 5' le site de restriction pour l'enzyme HindIII, en rouge à l'extrémité 3' le site de restriction pour l'enzyme KpnI.

La présence de la séquence TNFR dans le plasmide pCR2.1 est vérifiée par digestion avec les enzymes HindIII et KpnI afin d'extraire le fragment TNFR suivit d'une électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3-2. Photo du Gel d'agarose 0.8% montrant les produits de digestion du plasmide

pCR2.1/TNFR par les enzymes HindIII et KpnI. Figure 3-2). Une bande d'environ 4000 paires de bases (pb) et une bande d'environ 850 pb sont observées et qui correspondent respectivement au plasmide pCR2.1 linéarisé et au fragment TNFR dont la longueur est de 848 pb.

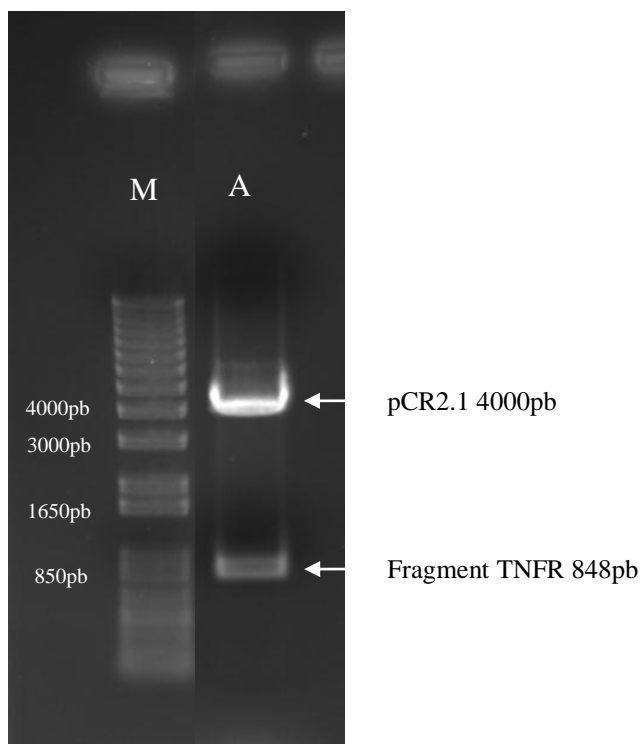


Figure 3-2. Photo du Gel d'agarose 0.8% montrant les produits de digestion du plasmide pCR2.1/TNFR par les enzymes HindIII et KpnI.

La ligne M correspond au marqueur 1Kb+ et la ligne A au produit de digestion du plasmide pCR2.1 par les enzymes HindIII et KpnI

L'identité de la séquence clonée a été vérifiée par séquençage (annexe 1), la séquence obtenue est 100% homologue à la séquence du gène TNFR (GenBank : NM_130426.4).

3.1.1.2 Transfert dans le plasmide d'expression pVax1

Le fragment TNFR a ensuite été extrait du plasmide pCR2.1 et a été transféré dans le vecteur d'expression eucaryotique pVax1. La réussite du transfert a été vérifiée par double digestion du plasmide avec les enzymes HindIII et KpnI, suivit d'une migration sur gel d'agarose (Figure 3-7) et du séquençage du fragment TNFR (la séquence obtenue est 100 % identique à celle présentée dans l'annexe 2). Une bande à 3000 paires de bases (pb) et à 850 pb sont observées qui correspondent respectivement au plasmide pVax1 linéarisé et au fragment TNFR.

Pour cette construction on n'introduit pas de codon de terminaison directement dans la séquence du fragment TNFR. Le codon de terminaison se trouve dans la séquence de pVax1. La séquence nucléotidique du fragment TNFR, du codon d'initiation au codon de terminaison, est donnée à l'annexe 2 et la séquence en acides aminés déduite est représentée dans l'annexe 3. La masse moléculaire prédite pour cette protéine est de l'ordre de 34,45 kDa.

3.1.2 Clonage de la construction correspondant à la partie extracellulaire du récepteur TNFR_{II} du rat (TNFR) liée à la partie constante d'une immunoglobuline G (Ig) vectorisée dans le plasmide pVax1 (pVax/IgTNFR)

3.1.2.1 Clonage du fragment Ig dans le plasmide pCR2.1

L'ADN du fragment Ig est amplifié par RPC puis inséré dans le plasmide pCR2.1. Le fragment cloné contient les séquences de deux sites de restriction lui permettant d'être clivé par les enzymes KpnI à son extrémité 5' et par l'enzyme XbaI à son extrémité 3' (Figure 3-3).

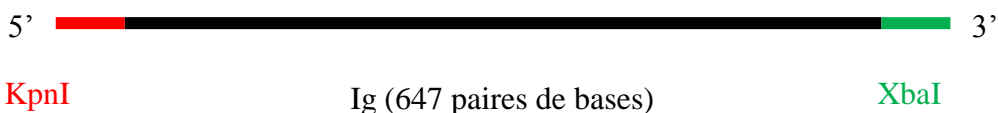


Figure 3-3 Schéma de la séquence du fragment Ig clonée

En rouge à l'extrémité 5' le site de restriction pour l'enzyme KpnI, en vert à l'extrémité 3' le site de restriction pour l'enzyme XbaI

La présence de la séquence correspondant au fragment Ig dans le plasmide pCR2.1 a été confirmée par double digestion enzymatique. Le plasmide pCR2.1/Ig est digéré par les enzymes KpnI et XbaI afin d'extraire le fragment Ig. Le produit de digestion est ensuite migré par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 3-4). Une bande à 4000 paires de bases (pb) et une bande à 650 pb sont observées, elles correspondent respectivement au plasmide pCR2.1 linéarisé et au fragment Ig de 647 pb de taille.

L'identité de la séquence a été confirmée par séquençage (Annexe 4), la séquence obtenue est 100% homologue à la séquence du gène Ig (GenBank ACCESSION BC088240).

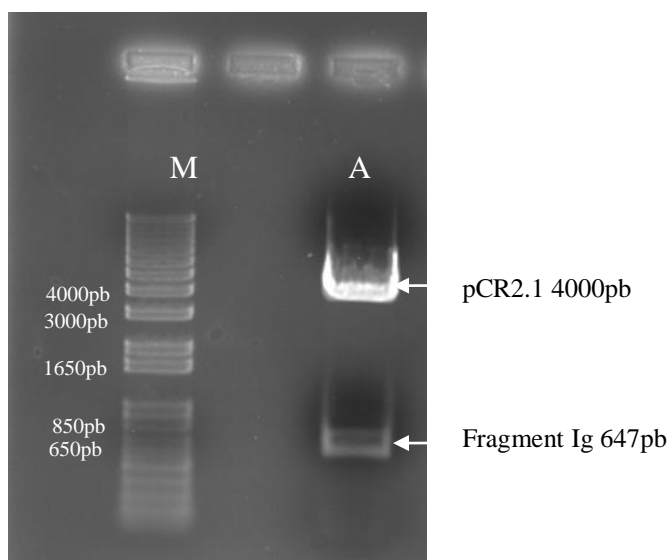


Figure 3-4 Digestion du plasmide pCR2.1 contenant le fragment Ig

La ligne M correspond au marqueur 1 Kb+ et la ligne A au produit de digestion du plasmide pCR2.1/Ig par les enzymes XbaI et KpnI

3.1.2.2 Fusion des fragments Ig et TNFR précédemment clonés

Les fragments Ig et TNFR sont extraits de leur plasmide respectif après digestion par les enzymes XbaI et KpnI pour le fragment Ig et HindIII et KpnI pour le fragment TNFR. Ces fragments sont ensuite liés ensemble en présence de la T4 DNA ligase au niveau des bouts cohésifs générés par KpnI. Le produit ainsi obtenu (Figure 3-5) a été cloné dans le plasmide pCR2.1.

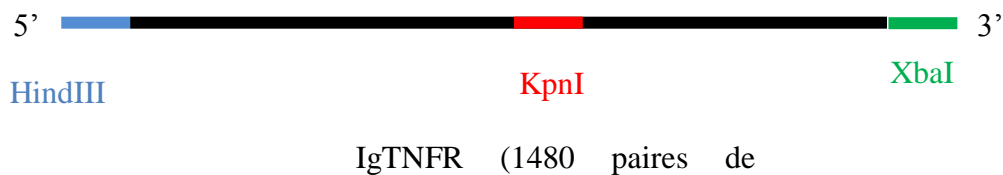


Figure 3-5. Schéma du produit de liaison entre le fragment Ig et TNFR (IgTNFR).

En bleu à l'extrémité 5' le site de restriction pour l'enzyme HindIII, en vert à l'extrémité 3' le site de restriction pour l'enzyme XbaI, en rouge au centre le site KpnI permettant la liaison des deux fragments

3.1.2.3 Transfert dans le plasmide d'expression pVax1

Le fragment IgTNFR a été d'abord cloné dans le plasmide pCR2.1 pour générer le plasmide recombinant pCR2.1/IgTNFR. Le fragment IgTNFR est ensuite extrait via digestion du plasmide pCR2.1/IgTNFR par les enzymes XbaI et HindIII, puis cloné dans le plasmide pVax1, pour former le plasmide pVax/IgTNFR. Ce plasmide peut être utilisé pour la transfection de cellule de mammifère. Le plasmide pVax/IgTNFR est ensuite digérée par les enzymes XbaI et HindIII puis migré sur gel d'agarose afin de vérifier la présence du fragment IgTNFR (voir Figure 3-7), un séquençage est également effectué pour vérifier la séquence du fragment (Annexe 5). La séquence obtenue de 1480 pb correspond parfaitement à la séquence clonée. Une bande à 3000 paires de bases (pb) et à 1480 pb sont observées qui correspondent respectivement au plasmide pVax1 linéarisé et au fragment IgTNFR dont la taille est de 1480 pb. La séquence en acides aminés déduite est donnée à l'annexe 6. La masse moléculaire prévue pour cette protéine est de 52.10 kDa.

3.1.3 Clonage de la construction correspondant à la partie extracellulaire du récepteur TNFR II du rat (TNFR) liée à la partie constante d'une immunoglobuline G (Ig), incluant la région charnière lui permettant de se dimériser, vectorisée dans le plasmide pVax1 (pVax/IgTNFRd)

Pour créer cette nouvelle construction il est nécessaire de générer un nouveau fragment Ig contenant la région charnière (Ig+charnière). Le fragment cloné contient deux séquences de restriction lui permettant d'être clivé par l'enzyme KpnI à son extrémité 5' et par l'enzyme XbaI à son extrémité 3' (Figure 3-6). La séquence de ce nouveau fragment de 685 paires de bases est donnée à l'annexe 7. Ce fragment a été amplifié par RPC et cloné dans un premier temps dans le plasmide pCR2.1. Ce fragment est lié à l'aide d'une ligase au fragment TNFR via le site KpnI puis cloné dans le plasmide pVax1 via les sites HindIII et XbaI pour générer le plasmide pVax/IgTNFRd. La présence du fragment IgTNFRd a été vérifiée par digestion à l'aide des enzymes HindIII et XbaI et par migration sur gel d'agarose 0.8 % (Figure 3-7) puis par séquençage (annexe 8). Une bande à 3000 paires de bases (pb) et à 1525 pb sont observées qui correspondent respectivement au plasmide pVax1 linéarisé et au fragment IgTNFRd de 1525 pb de taille. Le séquençage donne également une séquence de 1525pb correspondant parfaitement à la séquence du fragment cloné et disponible sur GenBank (séquence du gène Ig : ACCESSION BC088240, séquence du gène TNFR : NM_130426.4). La séquence déduite en acides aminés est donnée à l'annexe 9 et correspond à une protéine de 53.64 kDa.

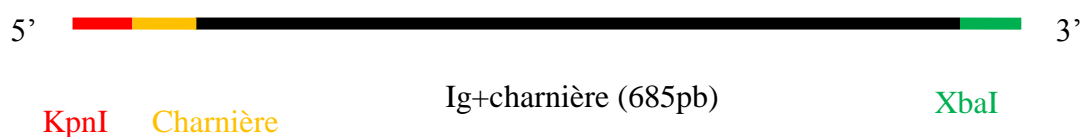


Figure 3-6. Schéma de la séquence du fragment Ig+charnière clonée

En rouge à l'extrémité 5' le site de restriction pour l'enzyme KpnI, en vert à l'extrémité 3' le site de restriction pour l'enzyme XbaI et en orange la région charnière permettant la dimérisation de l'immunoglobuline.

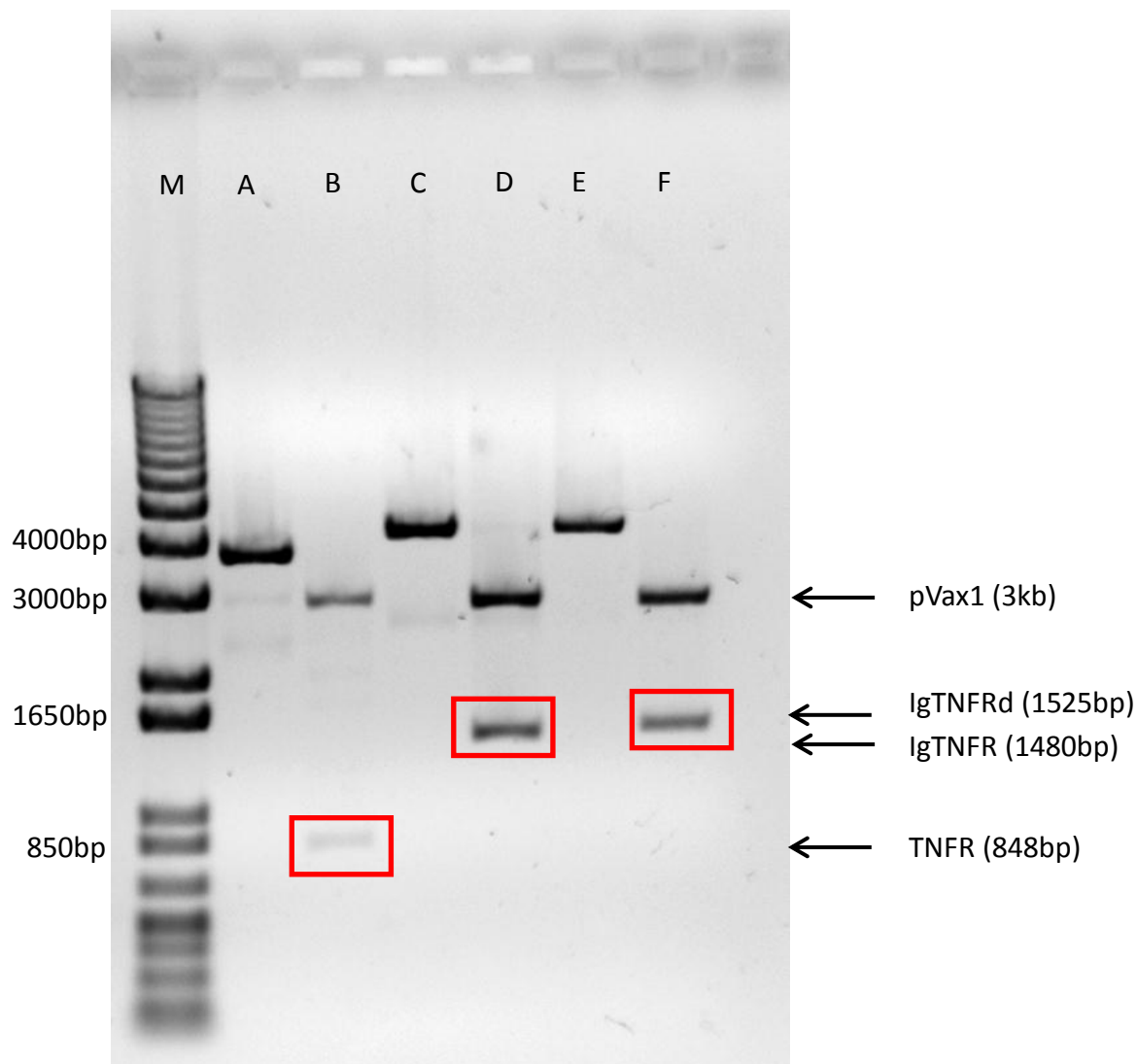


Figure 3-7 Digestion des constructions pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd par les enzymes de restriction permettant d'extraire les fragments TNFR, IgTNFR et IgTNFRd

Ligne M : marqueur 1kb+; Ligne A : plasmide pVax/TNFR digéré par HindIII; ligne B : plasmide pVax/TNFR digéré par HindIII et KpnI; ligne C : plasmide pVax/IgTNFR digéré par HindIII; ligne D plasmide pVax/IgTNFR digéré par hindIII et XbaI; Ligne E : Plasmide pVax/IgTNFRd digéré par HindIII; ligne F : plasmide pVax/IgTNFRd digéré par hindIII et XbaI.

Encadrés en rouge les fragments d'ADN correspondant aux protéines TNFR,ITNFR,IgTNFRd libérées lors de la double digestion du plasmide.

3.2 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ADNp

3.2.1 Analyse par DLS

La DLS nous a permis de déterminer la taille et le potentiel ζ de nos nanoparticules composées de chitosane 92-10 (DDA, MM) et des vecteurs d'expressions contenant les séquences codantes pour les bloqueurs de TNF α : pVax/TNFR, pVax/IgTNFR et pVax/IgTNFRd. Ces nanoparticules ont été générées avec un ratio groupement azote sur groupement phosphate (N:P) de 5, 92-10-5-pvax/TNFR, 92-10-5-pVax/IgTNFR et 92-10-5-pVax/IgTNFRd. Ces deux paramètres sont importants, car une petite taille est favorable pour traverser la membrane cytoplasmique et un potentiel ζ positif permet à la nanoparticule d'interagir avec la surface de la cellule chargée de façon négative, comme nous l'avons vu dans la revue de littérature. Les résultats de DLS qui sont résumés dans le Tableau 3-1, nous donne des particules dont le diamètre hydrodynamique moyen est autour de 95 nm, dont le potentiel ζ est aux alentours de 30 mV et un indice de polydispersité (Pdl) autour de 0,2. Le Pdl est une mesure de la distribution en masse moléculaire de notre échantillon (un PDI de 1 indique un échantillon très uniforme composé de nanoparticules de même masse moléculaire)

Tableau 3-1 résultats de DLS

Nanoparticule	Diamètre hydrodynamique moyen	Pdl	Potentiel ζ
92-10-5-pVax/TNFR	95.1 nm	0,22	27.3 mV
92-10-5-pVax/IgTNFR	97.2 nm	0,18	28 mV
92-10-5-pVax/IgTNFRd	90.3 nm	0.18	25.8 mV

3.2.2 Analyse par microscopie électronique à Balayage

La microscopie électronique à balayage nous a fourni de l'information sur la taille de nos nanoparticules ce qui nous a permis de confirmer les résultats de l'analyse par DLS mais aussi une information visuelle sur la forme, et l'hétérogénéité des nanoparticules (Figure 3-8, Figure 3-9, Figure 3-10). Pour les nanoparticules de chitosane complexées aux plasmides 92-10-5-pVax/TNFR, 92-10-5-pVax/IgTNFR et 92-10-5-pVax/IgTNFRd, des formes similaires majoritairement sphériques ou cylindriques sont observées. Leurs tailles varient de 50 et 100 nm et sont relativement hétérogènes ce qui supporte bien avec les résultats de DLS qui donnaient des tailles de l'ordre de 95 nm avec un PDI de 0.2.

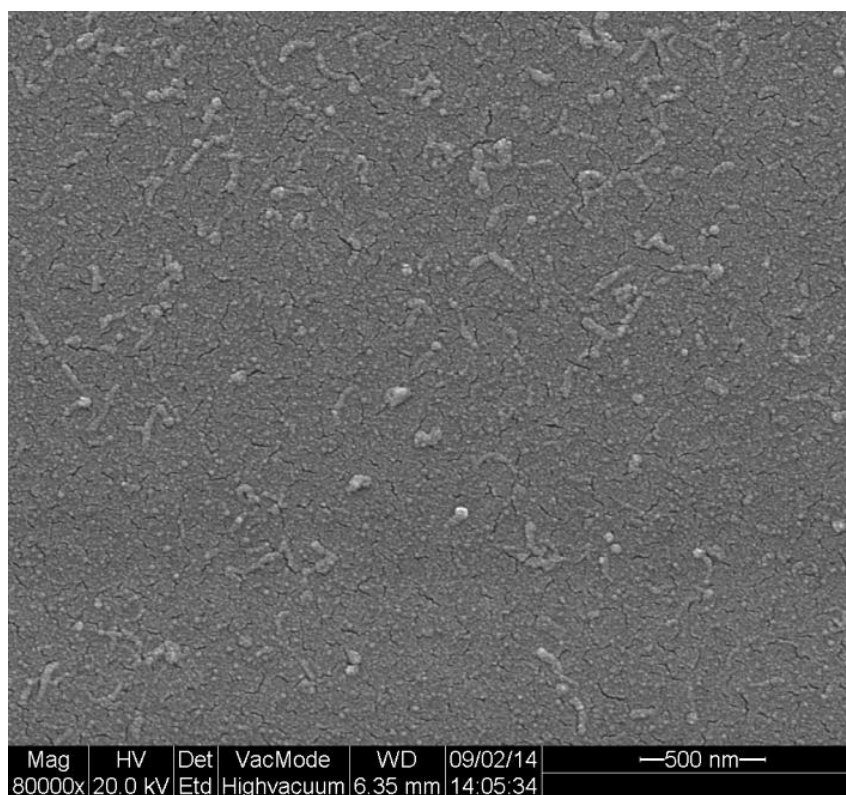


Figure 3-8 Observation en microscopie électronique à balayage des nanoparticules 92-10-5pVax/TNFR au grossissement 80000 x

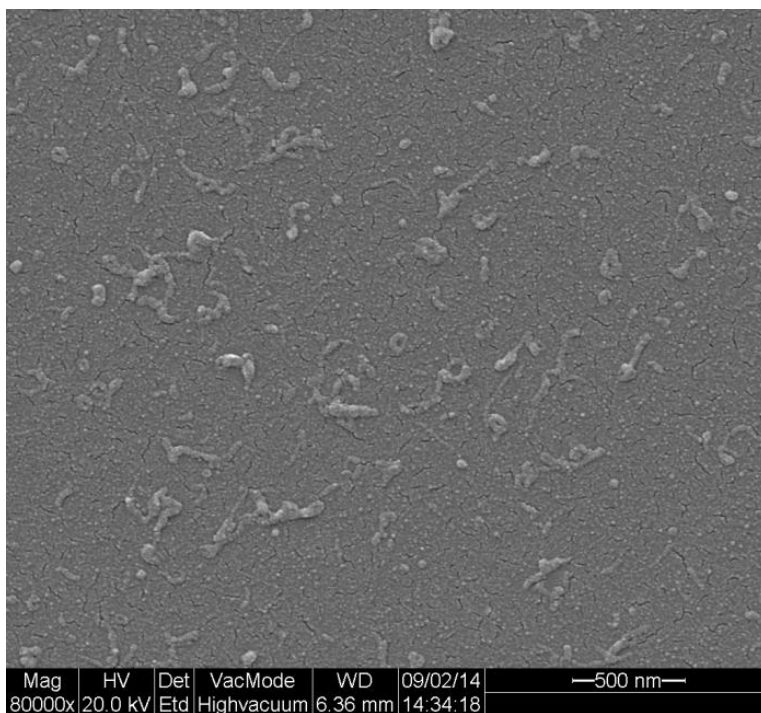


Figure 3-9 Observation en microscopie électronique à balayage des nanoparticules 92-10-5-pVax/IgTNFR au grossissement 80000 x

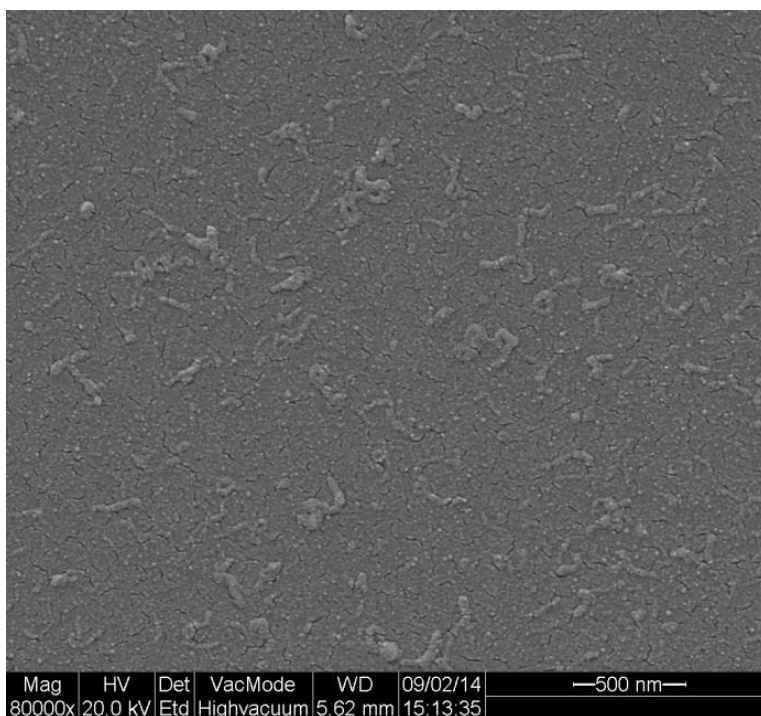


Figure 3-10 Observation en microscopie électronique à balayage des nanoparticules 92-10-5-pVax/IgTNFRd au grossissement 80000 x

3.2.3 Protection de l'ADN plasmidique apportée par le chitosane contre la digestion par les nucléases

Un bon véhicule de livraison génique doit être capable de protéger sa cargaison contre les différentes nucléases du milieu sanguin. Une en particulier est dommageable dans notre cas, la DNase, capable de digérer l'ADN. Pour cette expérience différentes formulations de nanoparticules ont été comparées 92-10-0.5, 92-10-2, 92-10-5, 92-10-10, 92-10-20 ; en présence de concentrations de DNase allant de 0 à 4 U. Les résultats sont présentés à la Figure 3-11, la formulation 92-10-0.5 qui comporte un excès de plasmide par rapport au chitosane n'apporte aucune protection pour les trois plasmides, la formulation 92-10-2 apportent quant à elle une protection de très faible à nulle. Les formulations 92-10-10 et 92-10-20 apportent une protection jusqu'à 2 U (0.066 U/ μ L) de DNase. Seul la formulation de nanoparticule 92-10-5 apportent une protection complète des ADNp contre la digestion par DNase jusqu'à 4 U.

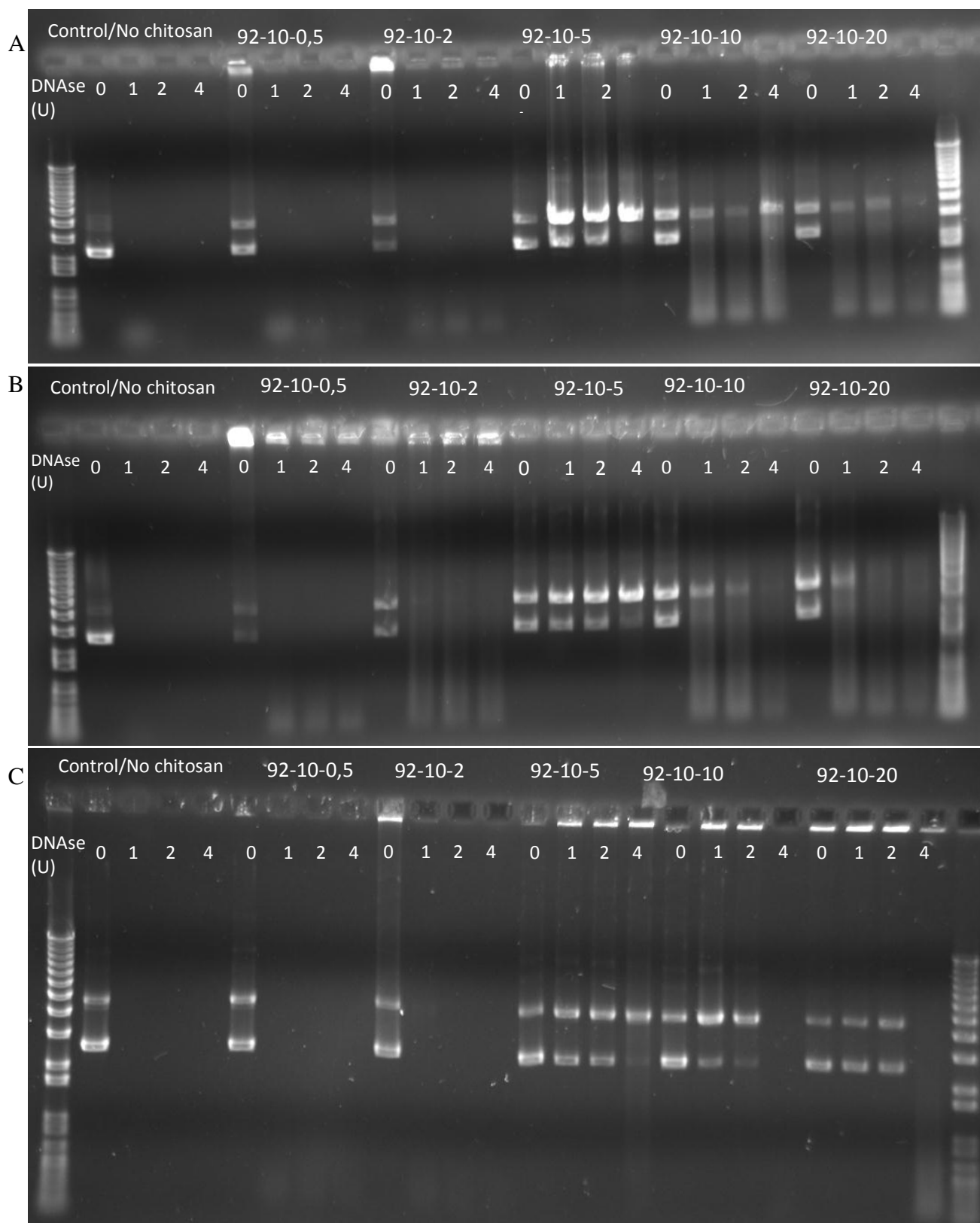


Figure 3-11 Protection de l'ADN plasmidique contre la digestion par l'ADNase

Gel A : nanoparticules chitosane-pVax/TNFR de formulation 92-10-0.5,92-10-2,92-10-5,92-10-10,92-10-20 et un contrôle plasmide pVax/TNFR non complexé digéré en présence de 0, 1, 2, 4 U de DNase dans volume de 30 μ L, Gel B : nanoparticules chitosane-pVax/IgTNFR de formulation 92-10-0.5,92-10-2,92-10-5,92-10-10,92-10-20 et un contrôle plasmide pVax/IgTNFR non complexé digéré en présence de 0,1,2,4U de DNase dans volume de 30 μ L, Gel C : nanoparticules chitosane-pVax/IgTNFRd de formulation 92-10-0.5,92-10-2,92-10-5,92-10-10,92-10-20 et un contrôle plasmide pVax/IgTNFRd non complexé digéré en présence de 0, 1, 2, 4 U de DNase dans volume de 30 μ L.

3.3 Expression des ARN messagers (ARNm)

Les lignées cellulaires HEK293 et CHO ont été transfectées par des nanoparticules de chitosane 92-10-5 contenant les trois plasmides, pVax/TNFR, pVax IgTNFR et pVax/IgTNFRd. Les ARN totaux ont été extraits et reverse transcrits en ADN complémentaire sur lequel nous avons effectué une RPC avec des amorces permettant l'amplification de fragment d'ADN correspondant spécifiquement aux TNFR, IgTNFR ou IgTNFRd. Une première paire d'amorces est choisie de façon à amplifier une région qui chevauche le fragment Ig et TNFR qui permet la détection du transgène IgTNFR et IgTNFRd, seule la taille de l'amplicon va être différente, car les amorces englobent la région charnière. La seconde paire d'amorces amplifie une région chevauchant le fragment TNFR et la séquence de pVax1, elle permet la détection du transgène TNFR. L'amplification par RPC de l'ADN complémentaire (ADNc) issu des ARN extraits des cellules transfectées est effectuée en utilisant les amorces décrites ci-dessus, et est visualisé après électrophorèse sur gel d'agarose. La présence d'un produit d'amplification nous indique que nos ARNm transgènes sont transcrits par les cellules transfectées, une preuve directe que nos plasmides sont pris en charge par la machinerie cellulaire de transcription. La présence d'ADN amplifié dans les lignes 3, 4 et 5 pour les deux lignées cellulaires (Figure 3-12) témoigne de la présence de l'ARNm correspondant à nos transgènes dans les cellules. Ces amplicons ont été extraits et séquencés pour confirmer l'identité et l'intégrité des séquences de nos fragments clonés. L'amplicon présent dans le contrôle négatif A2 a été également séquencé pour montrer qu'il s'agit d'un artefact de RPC et ne correspond à aucune séquence connue. La présence des ARNm correspondants à nos transgènes dans les cellules transfectées par nos constructions est un

indice fort de la production par les cellules transfectées des protéines recombinantes correspondantes.

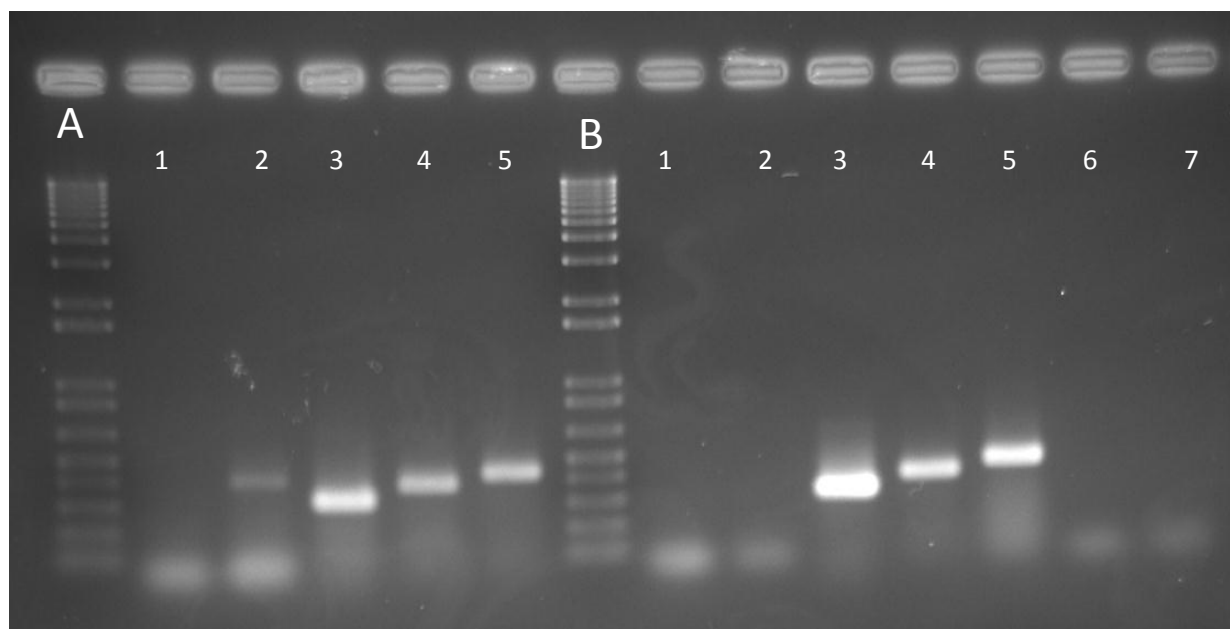


Figure 3-12. Photo du Gel d'agarose montrant les produits RPC à partir des ADNc correspondant à l'ARN extrait des cellules transfectées par nos constructions.

Figure 3-12-A, réaction RPC sur les ADNc issu des ARN extraits des cellules transfectées de la lignée HEK293

Figure 3-12-B, réaction RPC sur les ADNc issus des ARN extraits des cellules transfectées de la lignée HEK293

Sur la ligne 1, contrôle négatif : produit de réaction RPC où l'ADNc a été remplacé par de l'eau avec des amorces permettant l'amplification du transgène TNFR. Sur la ligne 2, contrôle négatif : une réaction RPC où l'ADNc a été remplacé par de l'eau en présence d'amorces permettant l'amplification d'un fragment correspondant au transgène IgTNFR ou IgTNFRd. Sur la ligne 3, produit de réaction RPC de l'ADNc issu de l'ARN produit par des cellules transfectées par des nanoparticules chitosane 92-10-5/TNFR avec des amorces pour la détection de TNFR. Sur la ligne 4, produit de réaction RPC de l'ADNc issu de l'ARN produit par des cellules transfectées par des nanoparticules chitosane 92-10-5/IgTNFR avec des amorces pour la

détection d'IgTNFR ou IgTNFRd. Sur la ligne 5, produit de réaction RPC de l'ADNc issu de l'ARN produit par des cellules transfectées par des nanoparticules chitosane 92-10-5/IgTNFRd avec des amorces pour la détection de IgTNFR ou IgTNFRd.

3.4 Bioactivité des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd

Les trois protéines recombinantes miment le récepteur du TNF α et sont donc capables en le liant d'inhiber son activité en solution. Cette activité inhibitrice a été évaluée par un test de cytotoxicité utilisant les cellules WEHI-var-13 qui en présence conjointe de TNF α (qui activent via ces récepteurs une voie menant à l'apoptose) et d'actinomycine D (agissant comme inhibiteur métabolique) subissent une mort cellulaire [154]. Pour tester la bioactivité de nos protéines recombinantes la survie des WEHI-var-13 cultivées avec du TNF α et de l'actinomycine D est évaluée en présence du surnageant de cellules HEK293 transfectées avec nos constructions géniques. Le surnageant de ces cellules qui doivent contenir nos protéines recombinantes doit être capable de protéger les cellules contre la mort cellulaire induite par TNF α , en se liant à TNF α . L'effet des surnageants de cellules non transfectées, transfectées par des nanoparticules chitosane/plasmideGFP, par du chitosane seul et par le plasmide GFP seul est également testé comme contrôles négatifs. Le surnageant de cellules non transfectées mises en présence d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α est utilisé comme contrôle positif. La bioactivité de nos protéines recombinantes est évaluée par un test de cytotoxicité sur les cellules WEHI-var-13, nos protéines doivent en effet protéger les cellules contre la mort cellulaire induite par la présence du TNF α . Les résultats présentés aux Figure 3-13, Figure 3-14, Figure 3-15 et Figure 3-16. Une protection significative de nos protéines recombinantes par rapport aux contrôles est observée, puisque les cellules en présence des surnageants de cellules transfectées conservent une survie proche de 100% au-delà de 3 pg/ μ L de TNF α . Les cellules en présence des contrôles ne survivent pas (Figure 3-13). L'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé utilisé à 10pg/ μ L n'offre pas de protection contre la mort cellulaire par rapport aux contrôles négatifs.

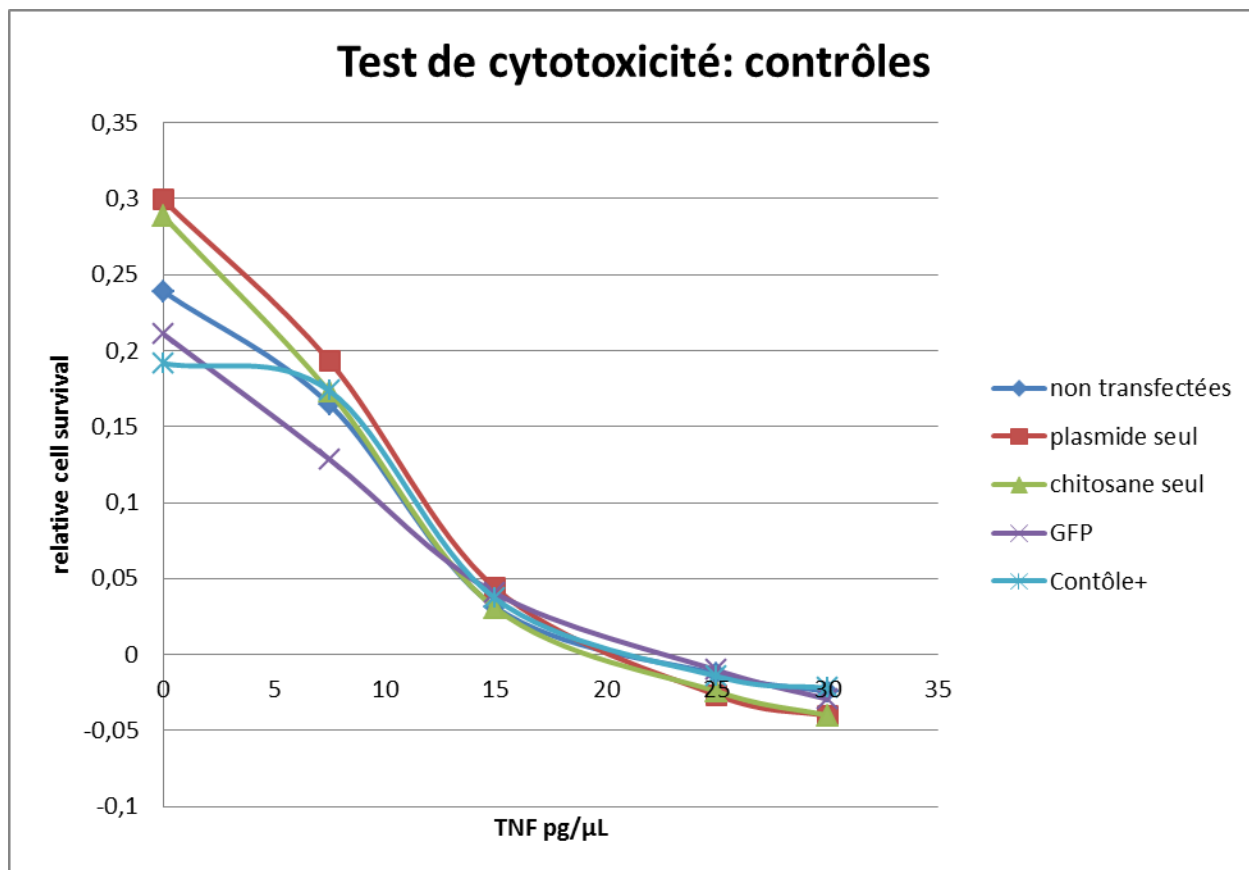


Figure 3-13 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par le TNF.

Cette figure conserve uniquement les contrôles : surnageant de cellules transfectées par un complexe codant GFP, surnageant de cellules cultivées en présence du plasmide GFP seul et de chitosane seul, et le contrôle positif : surnageant de cellules non transfectées mises en présence de 10 pg/μL de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNFα biotinylé.

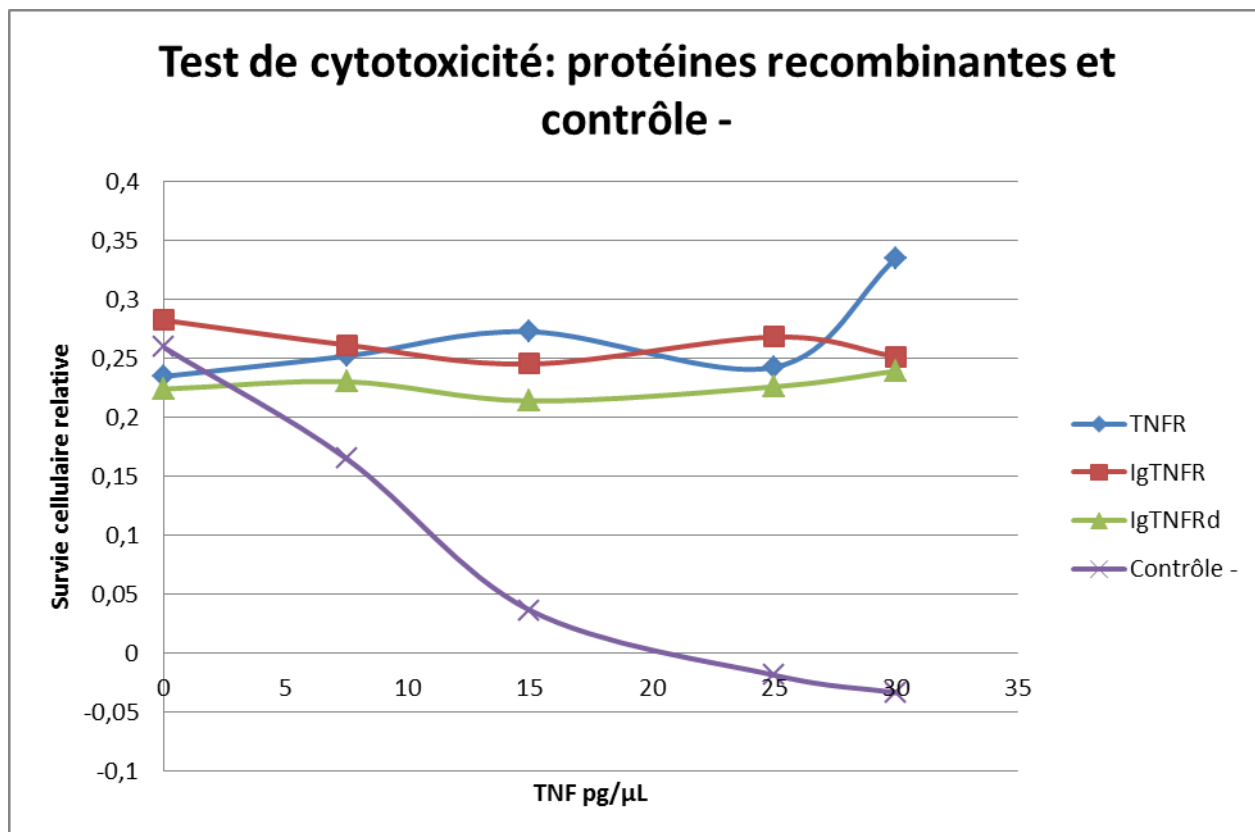


Figure 3-14 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par TNF: protéines recombinantes et contrôles négatifs

La survie cellulaire est évaluée en utilisant la lignée cellulaire WEHI-var-13 mise en présence conjointe d'actinomycine D, de concentration progressive de TNF α induisant la mort cellulaire et les surnageant issus des cellules transfectées par les constructions géniques codant TNFR, IgTNFR, IgTNFRd

Cette figure montre la protection contre la mort cellulaire des WEHI-var-13 induite par TNF α conférée par les échantillons : surnageant de cellules transfectées par les complexes codant TNFR, IgTNFR et IgTNFRd, et le contrôle négatif (moyenne des courbes surnageant des cellules non transfectées, des cellules transfectées par un complexe chitosane/GFP , des cellules cultivées en présence du plasmide GFP seul, de chitosane seul).

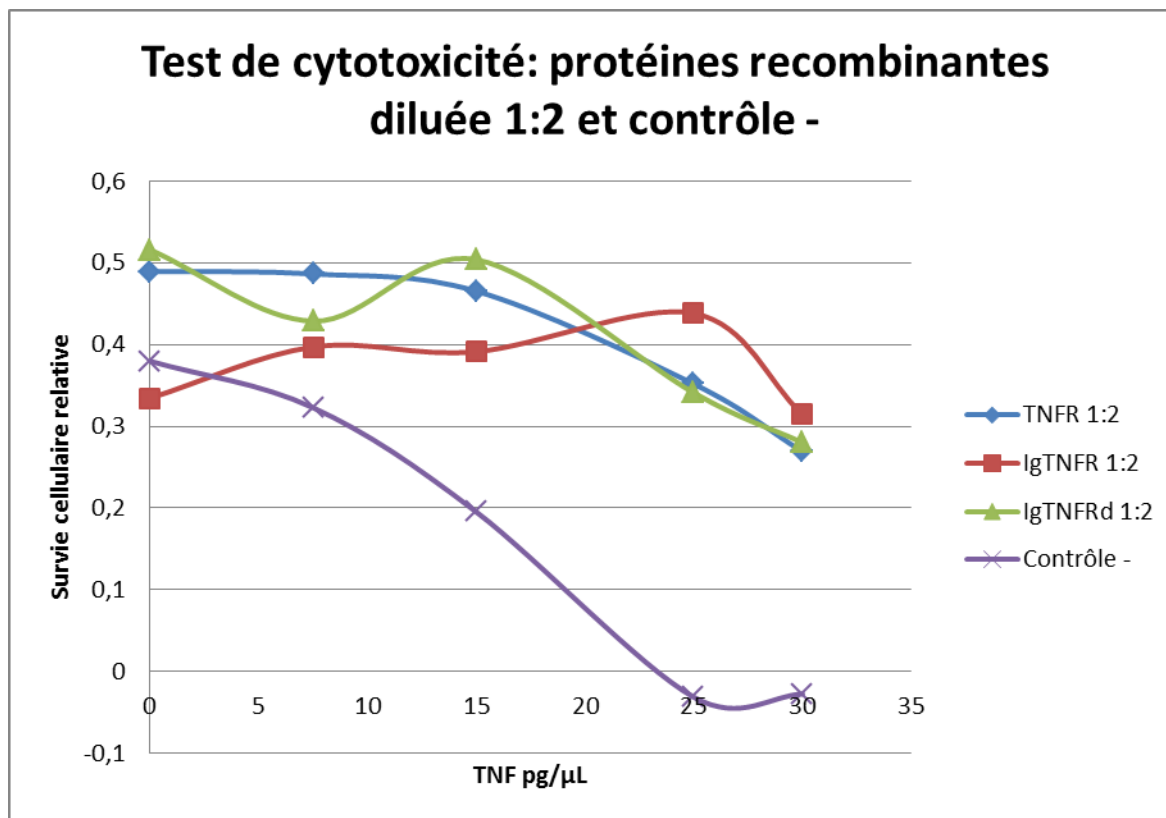


Figure 3-15 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par TNF: protéines recombinantes diluées 1 :2 et contrôles négatifs

Cette figure montre la protection contre la mort cellulaire des WEHI-var-13 induite par TNF α conférée par les échantillons : surnageant de cellules transfectées par les complexes codant TNFR, IgTNFR et IgTNFRd dilués 1:2 dans du milieu de culture frais, et le contrôle négatif (moyenne des courbes surnageant des cellules non transfectées, des cellules transfectées par un complexe chitosane/GFP, des cellules cultivées en présence du plasmide GFP seul, de chitosane seul).

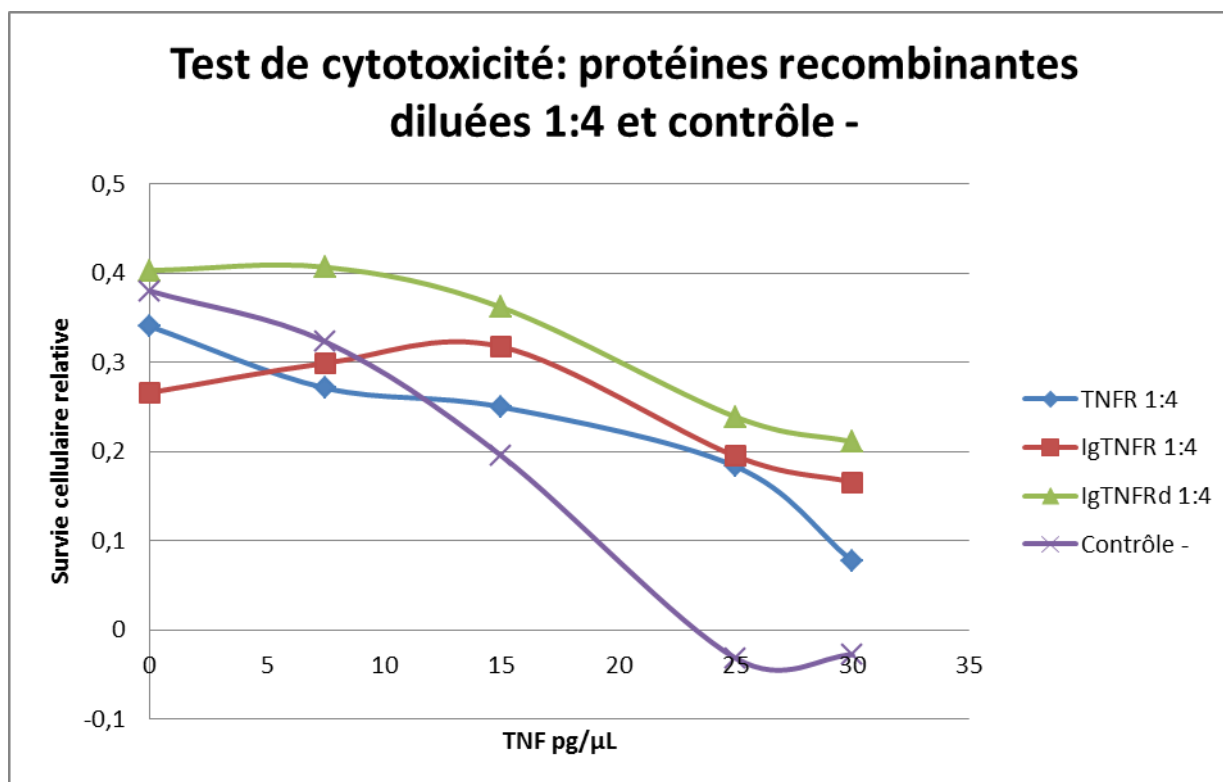


Figure 3-16 Test de cytotoxicité pour l'évaluation de la bioactivité par protection contre l'effet cytotoxique induit par TNF: protéines recombinantes diluées 1:4 et contrôles négatifs

Cette figure montre la protection contre la mort cellulaire des WEHI-var-13 induite par TNF α conférée par les échantillons : surnageant de cellules transfectées par les complexes codant TNFR, IgTNFR et IgTNFRd dilués 1:4 dans du milieu de culture frais, et le contrôle négatif (moyenne des courbes surnageant des cellules non transfectées, des cellules transfectées par un complexe chitosane/GFP, des cellules cultivées en présence du plasmide GFP seul, de chitosane seul).

3.5 Capacité d'inhibition des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd contre TNF α : ELISA de compétition.

La capacité d'inhibition des protéines recombinantes a été évaluée à l'aide d'un test ELISA de compétition contre un anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé. Le TNF α est fixé à différentes concentrations dans les puits d'une plaque ELISA et l'anticorps polyclonal de chèvre

anti-TNF α biotinylé vient les détecter. Une compétition entre nos protéines recombinantes contenues dans le surnageant de cellules transfectées (qui fixe TNF α) et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé est préalablement ajouté. Plus nos protéines recombinantes fixent de TNF α , moins l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé en fixe. Le signal émis par l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé est donc réduit par la compétition contre nos protéines recombinantes. Les résultats de ce test ELISA (Figure 3-17) montrent une compétition entre nos protéines recombinantes et l'anticorps de détection pour le TNF α , prouvant à nouveau la production par les cellules de protéines recombinantes bioactives. Afin d'aller plus en détail dans l'analyse des résultats la Figure 3-18 ne présente plus que la courbe correspondant à la compétition due au surnageant des cellules transfectées par la construction codant IgTNFRd et la courbe contrôle. Cette figure montre la réduction du signal due à la compétition de la protéine IgTNFRd contre l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé. Par rapport à l'expérience de bioactivité, cette expérience nous permet d'apprécier les différences d'efficacité de chacune de nos protéines recombinantes à inhiber le TNF α . C'est IgTNFR et IgTNFRd qui entre le plus en compétition avec l'anticorps pour la fixation au TNF α et à des niveaux pratiquement égaux. La présence d'IgTNFR et IgTNFRd réduit fortement le signal émis par l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé comparé à la courbe contrôle. La protéine recombinante TNFR à en revanche une activité de compétition plus faible contre l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé. TNFR inhibe moins de sites sur la molécule TNF α pour la liaison de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé comparé à IgTNFR et IgTNFRd.

Elisa de compétition

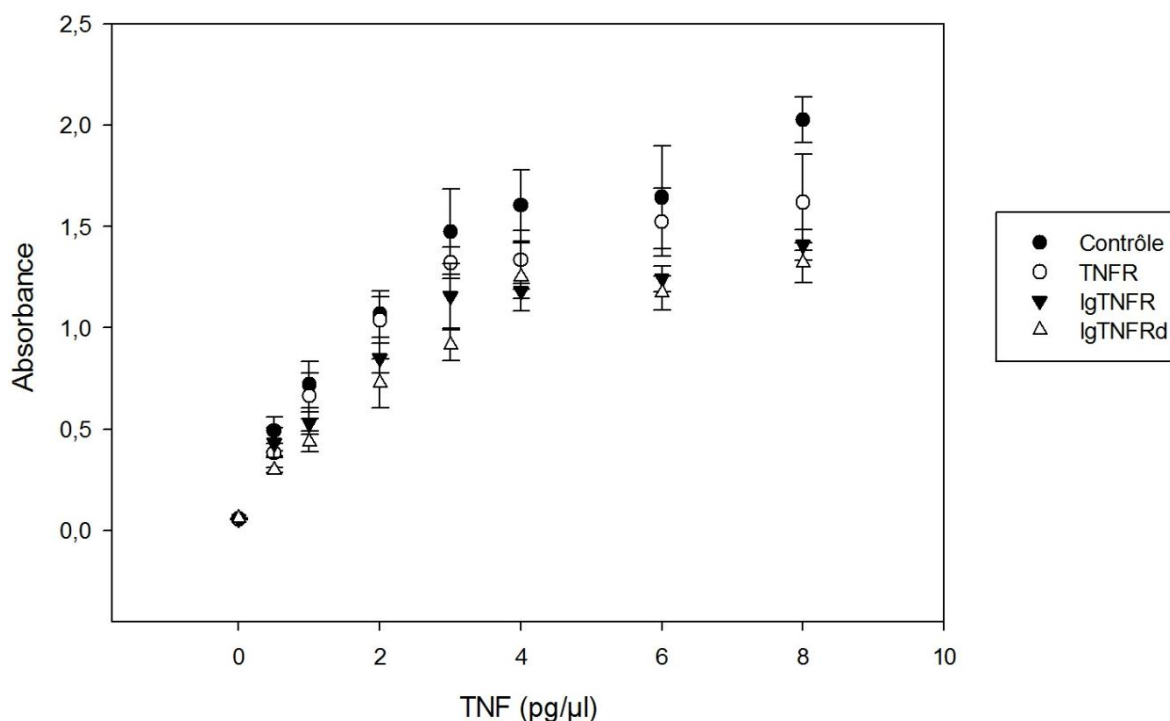


Figure 3-17. Résultats du test ELISA de compétition

Compétition entre TNFR présent dans les surnageants de cellules transfectées et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé (rond vide).

Compétition entre IgTNFR présent dans les surnageants de cellules transfectées et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé (triangle plein).

Compétition entre IgTNFRd présent dans les surnageants de cellules transfectées et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé (triangle vide).

Contrôle : compétition entre le surnageant de cellules non transfectées et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé (rond plein).

Nos protéines recombinantes ainsi que l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé sont capables de fixer le TNF α à différentes concentrations (de 0 à 8 pg/μL). Le TNF α fixé sur les plaques ELISA est d'abord mis en contact avec les surnageants de cellules transfectées par nos constructions codant les protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd, puis mises en

contact avec l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé. L'interaction préalable avec les protéines recombinantes réduit le nombre de sites disponibles pour l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé et donc réduit le signal émis par ce dernier après réaction colorimétrique dépendante du marqueur.

Elisa de compétition: contrôle et IgTNFRd

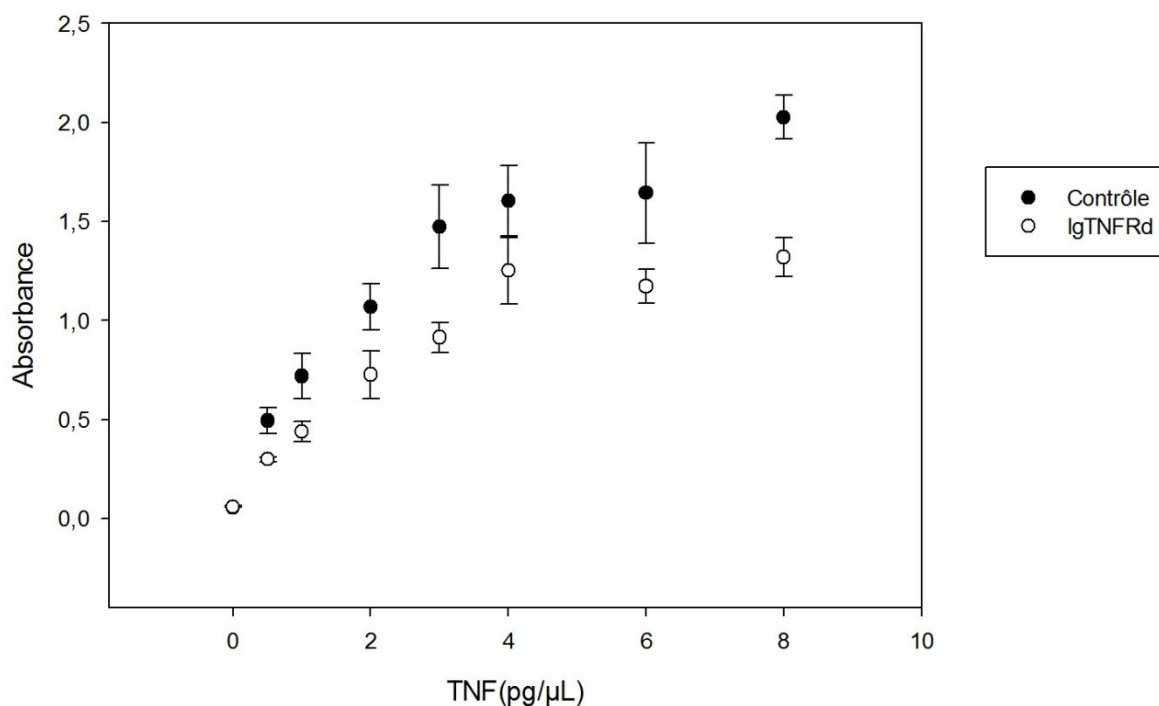


Figure 3-18. Résultats du test ELISA de compétition entre IgTNFRd et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé.

Compétition entre IgTNFRd présent dans les surnageants de cellules transfectées et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé (rond vide).

Contrôle : compétition entre le surnageant de cellules non transfectées et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé (rond plein).

sur cette figure une seule protéine recombinante IgTNFRd est montrée pour une meilleure appréciation de l'effet de compétition de cette dernière avec l'anticorps anti-TNF α pour la fixation au TNF α .

CHAPITRE 4 DISCUSSION

L'arthrite rhumatoïde est une inflammation chronique des articulations déclenchée par une réaction auto-immune. Un des traitements les plus efficaces aujourd'hui est l'utilisation d'agents biologiques bloqueurs de TNF α [5]. Mais cette approche comporte des défauts, la durée de vie des protéines en circulation est faible et nécessite une augmentation des doses et des injections et conduit à une augmentation de la toxicité de ses protéines [6]. La thérapie génique au contraire permet une production stable de la protéine dans la durée et une expression localisée du transgène, entraînant moins de complication [10]. C'est dans ce contexte que nous nous orientons dans le cadre de ce projet de recherche à la construction de trois transgènes codant pour trois protéines recombinantes mimant le récepteur du TNF α . Le système de livraison génique choisi et développé au sein du laboratoire est basé sur le chitosane. Le chitosane est capable de former des nanoparticules stables avec l'ADN plasmique. Les nanoparticules ont été formées et caractérisées, afin de vérifier que leur propriété convenait à la transfection de cellules. Il a également été vérifié que les cellules transfectées étaient capables de produire les protéines recombinantes et que celles-ci sont bioactives. C'est-à-dire qu'elles sont capables d'inhiber l'effet de la cytokine TNF α connu pour son rôle dans la polyarthrite rhumatoïde.

4.1 Clonage

La première partie du projet est la construction de trois vecteurs d'expression codant pour des bloqueurs de TNF α . Ceux-ci sont inspirés du bloqueur TNF α commercial Etanercept distribué par AMGEN. Il s'agit d'une protéine de fusion dimère type immuno-adhésine composée de la partie extracellulaire du récepteur humain du TNF α de type II (TNFRII) couplée au domaine Fc (fragment cristallisable) d'une immunoglobuline de type G₁ humaine (IgG₁). Il est connu depuis longtemps que la partie extracellulaire du récepteur du TNF α libérée naturellement par les cellules agit comme un inhibiteur soluble naturel du TNF α [155], un clone recombinant soluble de cette partie extracellulaire du récepteur du TNF α possède également une forte affinité pour le TNF α , est capable d'inhiber son activité cytotoxique *in vitro* [156] et est même utilisé sur des modèles *in vivo* de traitement de l'arthrose [157]. C'est sur ce modèle qu'est construit, dans notre projet, le transgène codant la protéine recombinante TNFR. Seul l'ADN correspondant à la partie extracellulaire du récepteur comprenant les sites de liaison pour le TNF α est cloné.

La fusion de la partie extracellulaire du récepteur TNF α (TNFR) à la partie constante d'une immunoglobuline (aussi appelé fragment cristallisable ou Fc) est également utilisée comme stratégie pour obtenir une protéine dimérique ayant une demi-vie augmentée dans le sérum et une capacité à lier le TNF α accru par rapport au simple TNFR soluble [158]. La demi-vie est augmentée via des mécanismes de recyclage déclenchés par liaison de la partie Fc présente sur la protéine, au récepteur Fc néonatal [159]. Une telle protéine de fusion TNFR-Fc a été utilisée avec succès pour le traitement de l'arthrose dans des modèles animaux chez la souris [160-162]. Etanercept est également une protéine de fusion TNFR-Fc dimérique qui est actuellement utilisée pour le traitement de l'arthrose chez l'humain [163]. C'est sur le modèle d'Etanercept qu'est construit notre transgène codant pour la protéine recombinante IgTNFRd. IgTNFRd est une protéine de fusion entre la partie extracellulaire du récepteur du TNF α du rat avec la partie Fc (région CH2, CH3 et charnière) d'une immunoglobuline de type G1 (IgG1) du rat. Cette dernière construction, comme la plupart des molécules anti-TNF α utilisées pour le traitement de l'arthrose, est capable d'induire la cytotoxicité dépendante de l'anticorps (CCDA) via la reconnaissance du Fc de l'IgG1 avec le récepteur Fc gamma présent sur les macrophages et les cellules NK [164, 165]. Cependant l'intérêt d'induire l'CCDA dans le traitement de l'AR est mal compris. L'argument en faveur de l'CCDA est qu'elle permet la destruction des cellules productrices de TNF α via fixation de la protéine recombinante sur les molécules de TNF α membranaires [165, 166]. La reconnaissance par les macrophages et les cellules NK du Fc exhibé par la protéine recombinante provoque la destruction des cellules productrices de TNF α . Cependant l'CCDA est également soupçonnée d'être la cause de toxicité indésirable [167, 168]. C'est pourquoi des molécules anti-TNF α , comme Certolizumab, utilisées dans le traitement de l'arthrose ont été développées pour ne pas activer l'CCDA [167].

La Fc de l'immunoglobuline G utilisée pour la construction de IgTNFRd est composée de trois domaines CH2, CH3 et la région charnière. L'affinité du fragment Fc pour récepteur Fc gamma (présent sur les macrophages et cellules NK) est fortement dépendant de région charnière [169]. La présence des ponts disulfures dans la région charnière du Fc est également responsable du caractère dimérique des protéines de fusion TNFR-Fc. Une protéine de fusion TNFR-Fc sans cette région charnière devrait donc à la fois devenir monovalente et moins susceptible d'induire l'CCDA. Le récepteur Fc néonatal qui participe à l'augmentation de la demi-vie de la protéine est

lui capable de reconnaître une portion CH2 de la Fc [170]. La suppression de la région charnière ne devrait donc pas avoir de conséquence sur l'interaction avec le récepteur Fc néonatal.

C'est basé sur ses observations que nous construisons le transgène codant la protéine recombinante monomérique IgTNFR fusion de la partie extracellulaire du récepteur du TNF α du rat avec la partie Fc (région CH2, CH3) d'une immunoglobuline G de rat. Cette forme ne comportant pas la région charnière n'aura pas la même rigidité qu'IgTNFRd car elle ne comporte pas de pont disulfure entre les deux parties CH2-CH3 de l'Ig. Bien que ce changement peut affecter son efficacité pour inhiber TNF α cette protéine pourrait induire moins de toxicité, mais cela sera évalué lors de l'essai *in vivo* qui va suivre ce projet.

Le plasmide pVax1 est un vecteur d'expression eucaryote développé pour les vaccins à ADN. Il répond aux exigences en la matière de la *Food and Drugs Administration* (FDA) [171]. Les séquences non nécessaires à la réplication chez la bactérie et à l'expression de la protéine recombinante dans les cellules de mammifère sont enlevées afin de réduire de possible homologie avec le génome humain et de minimiser les possibilités d'intégration chromosomal [171]. Il contient un promoteur CMV(*Human cytomegalovirus*) lui apportant un niveau expression élevé dans une large gamme de cellules de mammifères [172], un signal de polyadénylation BGH(*Bovine growth hormone*) pour une transcription efficace des ARNm et un gène de résistance à l'antibiotique bactérien kanamycine. Ce système a de plus été utilisé plusieurs fois avec des nanoparticules à base de chitosane [173, 174]. Ce plasmide répondant au critère de la FDA est choisi pour l'expression de nos transgènes, car ce projet a pour but d'être suivi d'une étude animale et éventuellement clinique.

Un système de nanoparticule de chitosane est utilisé pour la transfection de nos transgènes :pVaxTNFR, pVaxIgTNFR et pVax/IgTNFRd, car ce système de transfection est maîtrisé par notre équipe que ce soit *in vitro* [118] ou *in vivo* [13, 175]. De plus, ces nanoparticules de chitosan sont biocompatibles, biodégradables, peu toxiques, peu immunogènes n'activent pas le complément, facile de production et de manipulation [14, 176]. Ce système est également plus simple à mettre en place pour des études *in vivo* comparées à des méthodes de transfusions physiques tels que l'électroporation qui bien que plus efficaces pour des cellules *in vitro*, deviennent plus compliquées à mettre en place sur un modèle animal ou même humain, puisqu'il nécessite une chirurgie [91].

4.2 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules Chitosane/ADNp

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules à base de chitosane affectent l'efficacité de livraison du gène à la cellule et donc l'efficacité de transfection de la cellule. Le degré de désacétylation (DD) de 92 % et la masse moléculaire (MM) de 10 kDa choisis pour notre chitosane sont cohérents avec les résultats préliminaires du groupe qui ont montré l'expression du transgène est plus important pour les formulations de chitosane avec un haut DDA et une faible MM[118]. Les analyses de DLS et ESEM, nos nanoparticules de chitosan 92-10-5 contenant le plasmide codant pour le transgène ont des tailles aux alentours 95 nm, c'est suffisamment petit pour permettre d'échapper à la filtration rénale [177], à l'absorption par les macrophages du foie ou cellules de Kupffer (internalise préférentiellement des particules >140 nm) [178] et d'entrer dans la cellule.

Les potentiels ζ positifs, aux alentours de 30mV, observés chez nos nanoparticules, est classique des formulations de chitosane possédant un degré de désacétylation (DD) élevé tel que le nôtre qui est de 92 % [13, 175, 179]. Cette charge positive importante est également associée à un excès de chitosane dans nos nanoparticules par rapport à l'ADN, le ratio base anionique : base phosphaté (N:P) relativement élevé de 5 entraîne un excès de charge positive. Cette charge positive de la nanoparticule est favorable à la transfection puisqu'elle permet à la nanoparticule d'interagir avec les protéines de surface chargées négativement de la cellule [180]. De plus l'excès de chitosane par rapport à l'ADN associé aux particules chargées positivement permet en augmentant la pression osmotique, le relargage du lysosome dans laquelle la nanoparticule est séquestrée [145].

Les formes sphériques et cylindriques observées pour les nanoparticules chitosane/ADNp par microscopie électronique à balayage est conforme à ce qui a été observé par notre groupe pour des nanoparticules chitosan92-10-5-ADNp [13, 175] et le reste de la littérature [181] où l'on retrouve des nanoparticules d'environ 100nm sphériques et cylindriques. Ces formes sont associées à des complexes chitosane/ADNp capables de transfecter les cellules de façon efficace.

L'étude de protection contre les nucléases montre que la formulation de chitosane 92-10-5 protège contre des concentrations d'ADNase de l'ordre de 133 U/mL (4 U dans 30 μ L) on est

bien au-dessus de la concentration physiologique d'ADNase qui se situe autour de 0,5 U/mL [182]. La formulation 92-10-5 semble apporter une meilleure protection que les formulations 92-10-10 et 92-10-20 ce qui est contre-intuitif et n'a pas été précédemment observé: Plus il y a de chitosane autour de l'ADN (ratio N:P élevé) plus celui-ci devrait être protégé contre la digestion par les nucléase. L'EDTA est utilisé pour inhiber l'ADNase avant de décomplexer les nanoparticules et de vérifier l'intégrité de l'ADN quelle contient. Or l'EDTA est capable d'interagir à pH 6 proche du pH 6.5 de notre réaction [183]. Cette interaction entre le chitosane et l'EDTA provoque probablement une inhibition affaiblie de la DNase pour les formulations avec le plus de chitosane (les plus grands N:P) amenant à une dégradation plus importante de l'ADN. Cependant, il a été montré que l'efficacité de transfection est plus importante pour les nanoparticules de chitosanes ayant un ratio N:P relativement faible, mais permettant un excès de chitosane (autour de 3-5) [14]. Le ratio N:P de 5 de notre formulation de chitosane 92-10-5 est le parfait compromis puisque son ratio N:P est suffisamment élevé pour protéger les nanoparticules contre la dégradation par les nucléases tout en restant relativement faible.

Le compromis entre protection face à la dégradation, l'excès de chitosane et le relativement faible ratio N:P nous a conduits à préférer les nanoparticules 92-10-5. Cette formulation a par ailleurs déjà fait ses preuves dans des travaux précédents du groupe que ce soit *in vitro* sur les cellules HEK293 [118] ou *in vivo* chez la souris [13, 175]. Les caractéristiques physico-chimiques (taille, charge, DD, MM) de nos nanoparticules à base de chitosane leurs permettent de traverser le système sanguin en évitant la destruction et la dégradation de sa cargaison génique, tout en lui permettant d'entrer dans la cellule. Ceci en fait un système tout à fait adéquat pour la transfection des cellules.

4.3 Production de protéines recombinantes bioactives par les cellules transfectées

Les nanoparticules chitosanes 92-10-5-pVax/TNFR, 92-10-5-pVax/IgTNFR et 92-10-5-pVax/IgTNFRd ont des propriétés physico-chimiques adéquates pour être utilisées dans la transfection cellulaire. Elles ont été testées afin de déterminer leur capacité à transférer *in vitro* des cellules et à exprimer les protéines recombinantes bioactives associées aux transgènes. Les cellules de la lignée HEK 293 et CHO sont transfectées par nos nanoparticules et l'ensemble des

ARNm produits ont été collectés. Parmi ces ARNm se trouvent des ARNm issus de la transcription de nos transgènes codant pour les protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd. Ceci prouve que les nanoparticules de chitosane 92-10-5-ADNp sont capables de transfecter les cellules de la lignée HEK293 et CHO. L'efficacité du système chitosane-ADNp comme système de livraison est supportée par les résultats de notre groupe. Cette efficacité est montrée *in vitro* sur les cellules de la lignée HEK293 pour le transfert d'un plasmide contenant un transgène codant pour la protéine GFP (« green fluorescent protein ») [118]. L'efficacité du système chitosane-ADNp a également été montré *in vivo* notamment par les travaux de Jean avec le transfert du plasmide pVax contenant un transgène codant la protéine GLP-1 pour le traitement du diabète chez les souris Zucker Diabetic Fatty [13], ou encore avec le plasmide pVax contenant un transgène codant pour les facteurs de croissance FGF-2 et PDGF-BB pour mener à l'expression génique chez la souris Balb/c [175].

La bioactivité des protéines recombinantes dans les surnageants des cellules transfectées, est prouvée par leur pouvoir à inhiber la mort cellulaire induite par la présence de TNF α . Après transfection des cellules, nos protéines recombinantes sont récupérées dans les surnageant. La capacité de 100 μ L de ces surnageants contenant TNFR, IgTNFR ou IgTNFRd à inhiber la mort des cellules WEHI-var-13 exposées à des doses croissantes de TNF est évaluée. Ils sont tous les trois capables d'inhiber la mort des WEHI-var-13 exposées des doses de TNF α allant au-delà de 3 pg/ μ L. D'autre part 10 pg/ μ L de l'anticorps polyclonal anti-TNF α produit chez la chèvre ne suffisent pas à protégé WEHI-var-13 contre la mort induite par TNF α (voir Figure 3-13). L'explication la plus probable est qu'à cette concentration l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α , ne bloque pas suffisamment de site sur la molécule TNF α pour inhiber son action biologique. En effet, le TNF α forme un homotrimère capable de lié jusqu'à trois de ses récepteurs [36], il suffit donc que l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α laisse libre une unité monomérique sur l'homotrimère pour que le TNF α puisse tout de même fixer son récepteur et causer la mort des cellules. Les 100 μ L des surnageants contenant TNFR, IgTNFR ou IgTNFRd dilués 1:2 (Figure 3-15) et 1:4 (Figure 3-16) dans du milieu de culture protège également de la mort cellulaire au-delà de 3 pg/ μ L de TNF α dans le milieu. Mais on observe trois régimes un régime où la protection est de 100 % (jusqu'à 25 pg/ μ L pour les surnageants dilués 1:2 et jusqu'à 15 pg/ μ L pour les surnageants dilués 1:4), puis un régime où la protection diminue faiblement en fonction et enfin un décrochage. Le décrochage est observé pour les surnageants

issu des cellules transfectées par TNFR dilué 1:4 à partir de 25 pg/μL de TNFα. Cela suggère deux explications, soit TNFR est moins efficace pour inhiber TNFα, soit TNFR est produit en moins grande quantité lors de la transfection. L'effet protecteur des surnageants contenant nos protéines recombinantes est tout à fait comparable au résultat de Scallon et coll. [184]. L'équipe de Scallon a construit une protéine de fusion entre la partie constante d'une immunoglobuline de souris (domaine CH2-CH3 et région charnière) et le récepteur TNFRII murin, qu'il nomme p75P-sf3. Cette protéine est donc très semblable à notre IgTNFRd. Il démontre qu'une concentration de 100 pM de p75P-sf3 est suffisante à inhiber la cytotoxicité induite par 2 pg/μL de TNF sur les cellules WEHI-var-13. Nos trois constructions inhibent la mort des WEHI-var-13 au-delà de 3 pg/μL qui est la concentration maximale de TNFα utilisé. Sur la gamme de concentration de TNFα utilisé, nos constructions sont donc toutes les trois aussi efficaces dans les surnageants de transfections non dilués. Il faut aller jusqu'à la dilution 1:4 pour commencer à observer une différence qui suggère que la protéine recombinante TNFR est moins efficace ou moins exprimée que IgTNFR et IgTNFRd.

Afin de différencier l'efficacité de chacune de nos protéines recombinantes à inhiber le TNFα un ELISA de compétition est réalisé. Il est important pour l'inhibition de TNFα de bloquer le maximum de sites de liaison, car cette molécule est capable de lier jusqu'à trois de ses récepteurs [36]. Ces résultats montrent que l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNFα qui est le même que celui utilisé dans l'expérience de bioactivité est bien capable de fixer TNFα. Cela confirme que sa non-efficacité à protéger les WEHI contre la mort cellulaire dans l'expérience de bioactivité est due à la trop faible concentration utilisée de 10 pg/μL. Les résultats (Figure 3-17 et Figure 3-18) montrent que nos protéines recombinantes ne Co compétitionnent pas à 100% avec l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNFα biotinylé. L'incubation avec un excès de nos protéines recombinantes sur une quantité limitante de TNFα laisse tout de même des sites libres pour que l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNFα biotinylé se fixe. Ce résultat trouve son explication dans la littérature. L'Etanercept protéine de fusion nous ayant servi de modèle pour la construction de nos transgènes ne peut fixer qu'un homotrimer de TNFα [52]. L'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNFα biotinylé est lui, en revanche capable de se lier à une plus grande variété de sites sur la molécule de TNFα. L'interaction entre nos protéines recombinantes et le TNFα laisse des sites de liaison vacants disponibles pour l'anticorps polyclonal de chèvre anti-

TNF α biotinylé. Bien qu'étant toujours inférieure à 100 % cette compétition est nette : la compétition la plus forte vis-à-vis de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-TNF α biotinylé est obtenue de la part des protéines recombinantes IgTNFR et IgTNFRd. Cela suggère que IgTNFR et IgTNFRd sont capables de bloquer plus de sites sur l'homotrimère de TNF α et conduisent à une inhibition plus importante comparée à TNFR. Ce résultat est le même que l'on soit à haute ou à faible quantité de TNF α lorsque nos constructions sont en excès et n'est donc pas dû à une différence de production de nos protéines par les cellules transfectées. Cela est consistant avec les résultats de l'expérience de bioactivité où un décrochage de la protection contre la mort des cellules WEHI-var-13 est observé pour TNFR (Figure 3-16) à haute concentration de TNF α et non chez IgTNFR et IgTNFRd. La protéine recombinante TNFR est donc moins efficace pour inhiber TNF α par rapport à IgTNFR et IgTNFRd. L'expression *in vitro* de nos transgènes via le système de nanoparticule chitosane 92-10-5-ADNp conduit à l'expression dans le surnageant des cellules transfectées des protéines recombinantes TNFR, IgTNFR et IgTNFRd bioactives pour l'inhibition du TNF α .

CONCLUSION

La pathologie de l'arthrose rhumatoïde repose sur la surproduction de la cytokine inflammatoire TNF α responsable de la lente destruction des cartilages et des os au niveau des articulations. Les molécules biologiques inhibitrices du TNF α utilisées jusqu'ici pour le traitement des cas les plus sévères comportent des risques sérieux d'infections et peuvent provoquer une réaction immunitaire dirigée contre elles. Ces risques ajoutés aux difficultés intrinsèques des traitements à base d'injection de protéines, tel que la digestion par les protéases et l'élimination par le foie et les reins sont contournables en passant par une stratégie de transfert génique.

Notre projet de recherche nous a permis de concevoir trois transgènes codants des protéines recombinantes inhibitrices du TNF α , TNFR, IgTNFR et IgTNFRd. TNFR est une protéine monomérique correspondant à la partie extracellulaire du récepteur du TNF de type II du rat. IgTNFR est une protéine correspondant à la partie extracellulaire du récepteur du TNF de type II du rat fusionnée à la partie constante d'une immunoglobuline de type G1 de rat n'ayant pas la rigidité de la liaison pont disulfure entre ses parties Ig. IgTNFRd est une protéine dimérique correspondant à la partie extracellulaire du récepteur du TNF de type II du rat fusionnée à la partie constante d'une immunoglobuline de type G1 de rat.

Nos travaux de recherche ont montré que les nanoparticules formées du chitosane de formulation 92-10-5 complexé avec le plasmide pVax1 contenant nos transgènes forment des nanoparticules cylindriques et sphériques, de 30 mV et de 95 nm. Ceci permet aux nanoparticules d'interagir et d'entrer dans la cellule. Les nanoparticules de chitosanes protègent également les transgènes de la dégradation par les nucléases sanguines à des niveaux supra-physiologique. Toutes ces caractéristiques font de nos nanoparticules de chitosane un système de livraison favorable à une utilisation pour la transfection de cellule *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans un futur modèle animal.

Nous avons réussi via l'utilisation des nanoparticules de chitosane transportant nos transgènes à transférer des cellules humaines HEK293 *in vitro*. Ces cellules produisent les ARN messager correspondant à nos transgènes, prouvant la prise en charge de nos transgènes par la machinerie cellulaire. Les transgènes présents dans les surnageants des cellules transfectées sont capables de fixer le TNF α comme nous l'avons montré à l'aide d'un ELISA de compétition. Ces protéines

recombinantes produites sont également capables d'inhiber l'activité biologique du TNF α sur la mort cellulaire des cellules de la lignée WEHI-var-13.

Ces résultats prometteurs prouvent l'efficacité de notre système *in vitro* et permettent d'envisager la prochaine étape de cette recherche qui consiste à tester ce système *in vivo* sur un modèle d'arthrose du rat induit par collagène (CIA :*collagene induce arthritis*).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. Alamanos, *et al.*, "Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 36, pp. 182-188, 2006.
- [2] R. C. Lawrence, *et al.*, "Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 41, pp. 778-799, 1998.
- [3] S. R. Goldring, "Inflammatory Mediators as Essential Elements in Bone Remodeling," *Calcified Tissue International*, vol. 73, pp. 97-100, 2003/08/01 2003.
- [4] D. M. Findlay and D. R. Haynes, "Mechanisms of bone loss in rheumatoid arthritis," *Modern Rheumatology*, vol. 15, pp. 232-240, 2005/08/01 2005.
- [5] F. Atzeni, *et al.*, "Different effects of biological drugs in rheumatoid arthritis," *Autoimmunity Reviews*, vol. 12, pp. 575-579, 2013.
- [6] T. Bongartz, *et al.*, "Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials," *JAMA*, vol. 295, pp. 2275-85, May 17 2006.
- [7] J. B. Galloway, *et al.*, "Anti-TNF therapy is associated with an increased risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis especially in the first 6 months of treatment: updated results from the British Society for Rheumatology Biologics Register with special emphasis on risks in the elderly," *Rheumatology*, vol. 50, pp. 124-131, January 1, 2011 2011.
- [8] I. Solovic, *et al.*, "The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement," *European Respiratory Journal*, vol. 36, pp. 1185-1206, November 1, 2010 2010.
- [9] G. M. Bartelds, *et al.*, "Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: a cohort study," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 69, pp. 817-821, May 1, 2010 2010.
- [10] F. D. Ledley and T. Shapiro Ledley, "Pharmacokinetic considerations in somatic gene therapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 30, pp. 133-150, 1998.
- [11] C. E. Thomas, *et al.*, "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy," *Nat Rev Genet*, vol. 4, pp. 346-358, 2003.
- [12] M. Jean, *et al.*, "Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies," *Gene Ther*, vol. 16, pp. 1097-1110, Sep 2009.

- [13] M. Jean, *et al.*, "Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes," *Gene Ther*, vol. 18, pp. 807-816, 2011.
- [14] M. D. Buschmann, *et al.*, "Chitosans for delivery of nucleic acids," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, pp. 1234-1270, 2013.
- [15] F. Wolfe and D. J. Hawley, "The longterm outcomes of rheumatoid arthritis: Work disability: a prospective 18 year study of 823 patients," *The Journal of rheumatology*, vol. 25, pp. 2108-2117, 1998.
- [16] A.-C. Rat and M.-C. Boissier, "Rheumatoid arthritis: direct and indirect costs," *Joint Bone Spine*, vol. 71, pp. 518-524, 2004.
- [17] E. Yelin, *et al.*, "Medical care expenditures and earnings losses among persons with arthritis and other rheumatic conditions in 2003, and comparisons with 1997," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 56, pp. 1397-1407, 2007.
- [18] (2013). *Fact and figures - The Arthritis Society*. Available: <http://www.arthrite.ca/page.aspx?pid=6148> (april 2013)
- [19] (2009). *ARCHIVED - Research About – Musculoskeletal Health and Arthritis (Canadian institutes of health research ed.)*. Available: <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/43379.html> (April 2013)
- [20] A. J. M. Schuerwegh, *et al.*, "Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, pp. 2586-2591, February 9, 2010 2010.
- [21] G. A. Schellekens, *et al.*, "The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 43, pp. 155-163, 2000.
- [22] T. Cantaert, *et al.*, "Presence and Role of Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Experimental Arthritis Models," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 65, pp. 939-948, 2013.
- [23] H. Tilg, *et al.*, "Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts," *Gut*, vol. 57, pp. 684-694, May 1, 2008 2008.
- [24] P. Bruns, "Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste," *Beitr. Klin. Chir.*, vol. 3, pp. 443-446, 1868.
- [25] W. B. Coley, "Contribution to the knowledge of Sarcoma.," *Ann. Surg.*, vol. 14, pp. 199–220 1891.
- [26] M. J. Shear and F. C. Turner, "Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate," *J. Natl Cancer Inst.*, vol. 4, pp. 81-97, 1943.
- [27] W. E. O'Malley, *et al.*, "Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance," *J. Natl Cancer Inst.*, vol. 29, pp. 1169-1175, 1962.
- [28] E. A. Carswell, "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 72, pp. 3666-3670, 1975.

- [29] T. W. Williams, "Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species," *Nature*, vol. 7, pp. 1076-1077, 1968.
- [30] B. B. Aggarwal, "Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization," *J. Biol. Chem.*, vol. 260, pp. 2345-2354, 1985.
- [31] B. B. Aggarwal, "Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by [gamma]-interferon," *Nature*, vol. 318, pp. 665-667, 1985.
- [32] B. B. Aggarwal, "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword," *Nat Rev Immunol*, vol. 3, pp. 745-756, 2003.
- [33] P. Vassalli, "The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors," *Annual Review of Immunology*, vol. 10, pp. 411-452, 1992/04/01 1992.
- [34] S. J. Levine, "TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)," in *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, G. J. Laurent and S. D. Shapiro, Eds., ed Oxford: Academic Press, 2006, pp. 307-311.
- [35] M. Grell, *et al.*, "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, pp. 570-575, January 20, 1998 1998.
- [36] F. S. Kleijwegt, *et al.*, "Critical Role for TNF in the Induction of Human Antigen-Specific Regulatory T Cells by Tolerogenic Dendritic Cells," *The Journal of Immunology*, vol. 185, pp. 1412-1418, August 1, 2010 2010.
- [37] N. A. Danke, *et al.*, "Autoreactive T Cells in Healthy Individuals," *The Journal of Immunology*, vol. 172, pp. 5967-5972, May 15, 2004 2004.
- [38] A. Nesbitt, *et al.*, "Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): In vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor α agents," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 13, pp. 1323-1332, 2007.
- [39] G. Eissner, *et al.*, "Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 15, pp. 353-366, 2004.
- [40] D. Tracey, *et al.*, "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 117, pp. 244-279, 2008.
- [41] F. Van Hauwermeiren, *et al.*, "Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 22, pp. 311-319, 2011.
- [42] D. L. Scott, *et al.*, "Rheumatoid arthritis," *The Lancet*, vol. 376, pp. 1094-1108.
- [43] C. Varas-Lorenzo, *et al.*, "Myocardial infarction and individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs meta-analysis of observational studies," *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, vol. 22, pp. 559-570, 2013.
- [44] C. Sostres, *et al.*, "Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract," *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 24, pp. 121-132, 2010.

- [45] K. G. Saag, *et al.*, "American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis," *Arthritis Care & Research*, vol. 59, pp. 762-784, 2008.
- [46] T. Möttönen, *et al.*, "Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination–disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 46, pp. 894-898, 2002.
- [47] J. F. Fries, *et al.*, "Reduction in long-term disability in patients with rheumatoid arthritis by disease-modifying antirheumatic drug–based treatment strategies," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 39, pp. 616-622, 1996.
- [48] B. Ng, *et al.*, "A retrospective cohort study: 10-year trend of disease-modifying antirheumatic drugs and biological agents use in patients with rheumatoid arthritis at Veteran Affairs Medical Centers," *BMJ Open*, vol. 3, 2013.
- [49] S. Chandrashekar, "Pharmacokinetic consideration of synthetic DMARDs in rheumatoid arthritis," *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, Apr 11 2013.
- [50] M. Schiff, *et al.*, "Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 67, pp. 1096-1103, August 1, 2008 2008.
- [51] M. C. Hochberg, *et al.*, "The Benefit/Risk Profile of TNF-Blocking Agents: Findings of a Consensus Panel," *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, vol. 34, pp. 819-836, 2005.
- [52] A. G. AM Nesbitt, G Fossati, AJ Henry, PE Stephens, "Assessment of the affinity for soluble TNF and the neutralising potency against soluble and membrane TNF of the anti-TNF agents certolizumab pegol, adalimumab, etanercept and infliximab," *Ann Rheum Dis*, vol. 65 (suppl 2), p. p. 456, 2006.
- [53] B. Scallon, *et al.*, "Binding and Functional Comparisons of Two Types of Tumor Necrosis Factor Antagonists," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 301, pp. 418-426, May 1, 2002 2002.
- [54] G. F. AM Nesbitt, "In vitro complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity by the anti-TNF agents certolizumab pegol, adalimumab, etanercept, and infliximab," *Ann Rheum Dis*, vol. 65 (suppl 2), p. p. 455, 2006.
- [55] I. M. Verma and N. Somia, "Gene therapy - promises, problems and prospects," *Nature*, vol. 389, pp. 239-242, 1997.
- [56] S. A. Rosenberg, *et al.*, "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction," *N Engl J Med*, vol. 323, pp. 570-8, Aug 30 1990.
- [57] M. Cavazzana-Calvo, *et al.*, "Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease," *Science*, vol. 288, pp. 669-672, April 28, 2000 2000.
- [58] S. L. Ginn, *et al.*, "Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update," *The Journal of Gene Medicine*, vol. 15, pp. 65-77, 2013.

- [59] (2014). *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*. Available: <http://www.abedia.com/wiley/index.html> (fevrier 2014)
- [60] G. N. M. Ferreira, *et al.*, "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications," *Trends in Biotechnology*, vol. 18, pp. 380-388, 2000.
- [61] D. C. Forbes and N. A. Peppas, "Oral delivery of small RNA and DNA," *Journal of Controlled Release*, vol. 162, pp. 438-445, 2012.
- [62] Y. Takakura, *et al.*, "Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 13, pp. 71-76, 2001.
- [63] H. Nam, *et al.*, "Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 32, pp. 639-646, 2009/05/01 2009.
- [64] A. Biffi, *et al.*, "Gene therapy for leukodystrophies," *Human Molecular Genetics*, vol. 20, pp. R42-R53, April 15, 2011 2011.
- [65] D. A. Roth, *et al.*, "Nonviral Transfer of the Gene Encoding Coagulation Factor VIII in Patients with Severe Hemophilia A," *New England Journal of Medicine*, vol. 344, pp. 1735-1742, 2001.
- [66] B. Walia, *et al.*, "Induced Pluripotent Stem Cells: Fundamentals and Applications of the Reprogramming Process and its Ramifications on Regenerative Medicine," *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 8, pp. 100-115, 2012/03/01 2012.
- [67] M. Giacca and S. Zacchigna, "Virus-mediated gene delivery for human gene therapy," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, pp. 377-388, 2012.
- [68] A. D. Miller, "Retroviral Vectors," in *Viral Expression Vectors*. vol. 158, N. Muzyczka, Ed., ed: Springer Berlin Heidelberg, 1992, pp. 1-24.
- [69] I. M. Verma and M. D. Weitzman, "Gene therapy: twenty-first century medicine," *Annu Rev Biochem*, vol. 74, pp. 711-38, 2005.
- [70] S. Huang and M. Kamihira, "Development of hybrid viral vectors for gene therapy," *Biotechnology Advances*, vol. 31, pp. 208-223, 2013.
- [71] R. H. Buckley, "Gene therapy for SCID—a complication after remarkable progress," *The Lancet*, vol. 360, pp. 1185-1186, 2002.
- [72] Y. Suzuki and R. Craigie, "The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses," *Nat Rev Microbiol*, vol. 5, pp. 187-96, Mar 2007.
- [73] L. K. Law and B. L. Davidson, "What does it take to bind CAR?," *Mol Ther*, vol. 12, pp. 599-609, Oct 2005.
- [74] I. Nita, *et al.*, "Direct gene delivery to synovium: An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 39, pp. 820-828, 1996.
- [75] P. J. Mease, *et al.*, "Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase 1 dose-escalation safety and tolerability study," *Ann Rheum Dis*, vol. 68, pp. 1247-54, Aug 2009.

- [76] P. J. Mease, *et al.*, "Safety, tolerability, and clinical outcomes after intraarticular injection of a recombinant adeno-associated vector containing a tumor necrosis factor antagonist gene: results of a phase 1/2 Study," *J Rheumatol*, vol. 37, pp. 692-703, Apr 2010.
- [77] J. Goater, *et al.*, "Empirical advantages of adeno associated viral vectors in vivo gene therapy for arthritis," *J Rheumatol*, vol. 27, pp. 983-9, Apr 2000.
- [78] A. Aiuti, *et al.*, "Gene Therapy for Immunodeficiency Due to Adenosine Deaminase Deficiency," *New England Journal of Medicine*, vol. 360, pp. 447-458, 2009.
- [79] J. W. Bainbridge and R. R. Ali, "Success in sight: The eyes have it! Ocular gene therapy trials for LCA look promising," *Gene Ther*, vol. 15, pp. 1191-1192, 2008.
- [80] S. Hacein-Bey-Abina, *et al.*, "A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency," *New England Journal of Medicine*, vol. 348, pp. 255-256, 2003.
- [81] S. Hacein-Bey-Abina, *et al.*, "LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1," *Science*, vol. 302, pp. 415-419, October 17, 2003 2003.
- [82] S. Hacein-Bey-Abina, *et al.*, "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1," *J Clin Invest*, vol. 118, pp. 3132-42, Sep 2008.
- [83] M. P. McCormack and T. H. Rabbitts, "Activation of the T-Cell Oncogene LMO2 after Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency," *New England Journal of Medicine*, vol. 350, pp. 913-922, 2004.
- [84] T. Niidome and L. Huang, "Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors," *Gene Ther*, vol. 9, pp. 1647-52, Dec 2002.
- [85] B. M. Medi and J. Singh, "Delivery of DNA into skin via electroporation," *Methods Mol Biol*, vol. 423, pp. 225-32, 2008.
- [86] H. Aihara and J.-i. Miyazaki, "Gene transfer into muscle by electroporation in vivo," *Nat Biotech*, vol. 16, pp. 867-870, 1998.
- [87] T. Suzuki, *et al.*, "Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation," *FEBS Letters*, vol. 425, pp. 436-440, 1998.
- [88] M. P. Rols, *et al.*, "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma," *Nat Biotechnol*, vol. 16, pp. 168-71, Feb 1998.
- [89] L. C. Heller and R. Heller, "Electroporation Gene Therapy Preclinical and Clinical Trials for Melanoma," *Current Gene Therapy*, vol. 10, pp. 312-317, 2010.
- [90] M. S. Al-Dosari and X. Gao, "Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress," *The AAPS Journal*, vol. 11, pp. 671-81, Dec 2009.
- [91] J. Gehl, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research," *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 177, pp. 437-447, 2003.
- [92] S. Mehier-Humbert and R. H. Guy, "Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, pp. 733-753, 2005.

- [93] C. Watkins, *et al.*, "Reporter gene expression in dendritic cells after gene gun administration of plasmid DNA," *Vaccine*, vol. 23, pp. 4247-4256, 2005.
- [94] Y. Matsuno, *et al.*, "Nonviral gene gun mediated transfer into the beating heart," *ASAIO J*, vol. 49, pp. 641-4, Nov-Dec 2003.
- [95] G. Zhang and M. E. Selzer, "In Vivo Transfection of Lamprey Brain Neurons by Gene Gun Delivery of DNA," *Experimental Neurology*, vol. 167, pp. 304-311, 2001.
- [96] H. P. Lauritzen, *et al.*, "Gene gun bombardment-mediated expression and translocation of EGFP-tagged GLUT4 in skeletal muscle fibres in vivo," *Pflugers Arch*, vol. 444, pp. 710-21, Sep 2002.
- [97] M. Al-Dosari and X. Gao, "Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress," *The AAPS Journal*, vol. 11, pp. 671-681, 2009/12/01 2009.
- [98] X. Wang, *et al.*, "Gene Transfer with Microbubble Ultrasound and Plasmid DNA into Skeletal Muscle of Mice: Comparison between Commercially Available Microbubble Contrast Agents," *Radiology*, vol. 237, pp. 224-229, 2005.
- [99] D. L. Miller and J. Song, "Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 29, pp. 887-893, 2003.
- [100] C. H. Miao, *et al.*, "Ultrasound enhances gene delivery of human factor IX plasmid," *Hum Gene Ther*, vol. 16, pp. 893-905, Jul 2005.
- [101] H. Koike, *et al.*, "An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney," *J Gene Med*, vol. 7, pp. 108-16, Jan 2005.
- [102] R. Bekeredjian, *et al.*, "Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart," *Circulation*, vol. 108, pp. 1022-6, Aug 26 2003.
- [103] D. Ibraheem, *et al.*, "Gene therapy and DNA delivery systems," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 459, pp. 70-83, 2014.
- [104] D. A. Jackson, *et al.*, "Designing nonviral vectors for efficient gene transfer and long-term gene expression," *Mol Ther*, vol. 14, pp. 613-26, Nov 2006.
- [105] D. W. Pack, *et al.*, "Design and development of polymers for gene delivery," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 4, pp. 581-593, 2005.
- [106] N.-f. Sun, *et al.*, "The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 89, pp. 352-357, 2014.
- [107] P. Pires, *et al.*, "Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1418, pp. 71-84, 1999.
- [108] S. Simoes, *et al.*, "Gene delivery by negatively charged ternary complexes of DNA, cationic liposomes and transferrin or fusigenic peptides," *Gene Ther*, vol. 5, pp. 955-64, Jul 1998.
- [109] J. G. Smith, *et al.*, "Characterization and in vivo testing of a heterogeneous cationic lipid-DNA formulation," *Pharmaceutical Research*, vol. 15, pp. 1356-63, Sep 1998.

- [110] P. L. Felgner, *et al.*, "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, pp. 7413-7, Nov 1987.
- [111] S. Simoes, *et al.*, "Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides," *Gene Ther*, vol. 6, pp. 1798-807, Nov 1999.
- [112] I. S. Zuhorn, *et al.*, "Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency," *Biophys J*, vol. 83, pp. 2096-108, Oct 2002.
- [113] S. Zhang, *et al.*, "Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 100, pp. 165-180, 2004.
- [114] G. Y. Wu and C. H. Wu, "Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo," *J Biol Chem*, vol. 263, pp. 14621-4, Oct 15 1988.
- [115] O. Boussif, *et al.*, "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, pp. 7297-301, Aug 1 1995.
- [116] H.-Q. Mao, *et al.*, "Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency," *Journal of Controlled Release*, vol. 70, pp. 399-421, 2001.
- [117] T. Ishii, *et al.*, "Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1514, pp. 51-64, 2001.
- [118] M. Lavertu, *et al.*, "High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4815-24, Sep 2006.
- [119] H. Lv, *et al.*, "Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 114, pp. 100-109, 2006.
- [120] S. Y. Wong, *et al.*, "Polymer systems for gene delivery—Past, present, and future," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, pp. 799-837, 2007.
- [121] M. B. Wolfram, *et al.*, "Chitin and Chitosan from Marine Organisms," in *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, ed: CRC Press, 2010, pp. 11-23.
- [122] M. Lavertu, *et al.*, "Kinetics and efficiency of chitosan reacylation," *Carbohydrate Polymers*, vol. 87, pp. 1192-1198, 2012.
- [123] G. G. Allan and M. Peyron, "Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid," *Carbohydrate Research*, vol. 277, pp. 257-272, 1995.
- [124] M. R. Kasaai, "Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, pp. 1667-1676, 2009/03/11 2009.
- [125] S. Mao, *et al.*, "Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, pp. 12-27, 2010.
- [126] M. Huang, *et al.*, "Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation," *Journal of Controlled Release*, vol. 106, pp. 391-406, 2005.

- [127] W. E. Rudzinski and T. M. Aminabhavi, "Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 399, pp. 1-11, 2010.
- [128] D. Filion, *et al.*, "Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 3224-34, Oct 2007.
- [129] S. P. Strand, *et al.*, "Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes," *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 3357-66, Nov-Dec 2005.
- [130] X. Liu, *et al.*, "The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing," *Biomaterials*, vol. 28, pp. 1280-1288, 2007.
- [131] V. Dehousse, *et al.*, "Comparison of chitosan/siRNA and trimethylchitosan/siRNA complexes behaviour in vitro," *Int J Biol Macromol*, vol. 46, pp. 342-9, Apr 1 2010.
- [132] T. Kiang, *et al.*, "The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 5293-301, Oct 2004.
- [133] T. Kean and M. Thanou, "Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 62, pp. 3-11, Jan 31 2010.
- [134] M. Lee, *et al.*, "Water-Soluble and Low Molecular Weight Chitosan-Based Plasmid DNA Delivery," *Pharmaceutical Research*, vol. 18, pp. 427-431, 2001/04/01 2001.
- [135] S. W. Richardson, *et al.*, "Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 178, pp. 231-243, 1999.
- [136] F. C. MacLaughlin, *et al.*, "Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 56, pp. 259-272, 1998.
- [137] S. P. Strand, *et al.*, "Influence of Chitosan Structure on the Formation and Stability of DNA-Chitosan Polyelectrolyte Complexes," *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 3357-3366, 2005/11/01 2005.
- [138] K. Romøren, *et al.*, "The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 261, pp. 115-127, 2003.
- [139] M. Lavertu, *et al.*, "High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4815-4824, 2006.
- [140] P. L. Ma, *et al.*, "New Insights into Chitosan-DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 1490-1499, 2009/06/08 2009.
- [141] J. Malmo, *et al.*, "siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing," *Journal of Controlled Release*, vol. 158, pp. 261-268, 2012.

- [142] S. Prabha, *et al.*, "Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 244, pp. 105-115, 2002.
- [143] N. A. Jones, *et al.*, "Polymer chemical structure is a key determinant of physicochemical and colloidal properties of polymer–DNA complexes for gene delivery," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, vol. 1517, pp. 1-18, 2000.
- [144] P. L. Ma, *et al.*, "One-Step Analysis of DNA/Chitosan Complexes by Field-Flow Fractionation Reveals Particle Size and Free Chitosan Content," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 549-554, 2010/03/08 2010.
- [145] M. Thibault, *et al.*, "Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 4639-4646, 2011.
- [146] E. Hagesaether, *et al.*, "Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 71, pp. 325-331, 2009.
- [147] V. Dodane, *et al.*, "Effect of chitosan on epithelial permeability and structure," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 182, pp. 21-32, 1999.
- [148] J. J. Donnelly, *et al.*, "Antigen Presentation and DNA Vaccines," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 162, pp. S190-S193, 2000/10/01 2000.
- [149] S. Gurunathan, *et al.*, "DNA vaccines: immunology, application, and optimization*," *Annu Rev Immunol*, vol. 18, pp. 927-74, 2000.
- [150] K. Roy, *et al.*, "Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy," *Nat Med*, vol. 5, pp. 387-91, Apr 1999.
- [151] K. Khatri, *et al.*, "Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 354, pp. 235-241, 2008.
- [152] K. Bowman, *et al.*, "Gene transfer to hemophilia A mice via oral delivery of FVIII–chitosan nanoparticles," *Journal of Controlled Release*, vol. 132, pp. 252-259, 2008.
- [153] J. J. Holst, *et al.*, "Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut," *FEBS Letters*, vol. 211, pp. 169-174, 1987.
- [154] T. Espevik and J. Nissen-Meyer, "A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes," *J Immunol Methods*, vol. 95, pp. 99-105, Dec 4 1986.
- [155] T. Kohno, *et al.*, "A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, pp. 8331-5, Nov 1990.
- [156] P. W. Gray, *et al.*, "Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 87, pp. 7380-7384, October 1, 1990 1990.

- [157] P. F. Piguet, *et al.*, "Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor," *Immunology*, vol. 77, pp. 510-4, Dec 1992.
- [158] R. O. Williams, *et al.*, "Successful therapy of collagen-induced arthritis with TNF receptor-IgG fusion protein and combination with anti-CD4," *Immunology*, vol. 84, pp. 433-9, Mar 1995.
- [159] S. M. Chamow and A. Ashkenazi, "Immunoadhesins: principles and applications," *Trends in Biotechnology*, vol. 14, pp. 52-60, 1996.
- [160] K. M. Murray and S. L. Dahl, "Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Receptor (P75) Fc Fusion Protein (Tnfr: Fc) in Rheumatoid Arthritis," *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 31, pp. 1335-1338, November 1, 1997 1997.
- [161] P. H. Wooley, *et al.*, "Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice," *The Journal of Immunology*, vol. 151, pp. 6602-7, December 1, 1993 1993.
- [162] J. M. K. Chan, *et al.*, "Intraarticular Gene Transfer of TNFR:Fc Suppresses Experimental Arthritis with Reduced Systemic Distribution of the Gene Product," *Mol Ther*, vol. 6, pp. 727-736, 2002.
- [163] N. Thalayasingam and J. D. Isaacs, "Anti-TNF therapy," *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, vol. 25, pp. 549-567, 2011.
- [164] P. C. Taylor, "Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 10, pp. 308-315, 2010.
- [165] E. E. Idusogie, *et al.*, "Engineered Antibodies with Increased Activity to Recruit Complement," *The Journal of Immunology*, vol. 166, pp. 2571-2575, February 15, 2001 2001.
- [166] Z. Kaymakcalan, *et al.*, "Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor," *Clinical Immunology*, vol. 131, pp. 308-316, 2009.
- [167] M. Wong, *et al.*, "TNF α blockade in human diseases: Mechanisms and future directions," *Clinical Immunology*, vol. 126, pp. 121-136, 2008.
- [168] H. W. Schroeder Jr and L. Cavacini, "Structure and function of immunoglobulins," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, pp. S41-S52, 2010.
- [169] S. M. Canfield and S. L. Morrison, "The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 173, pp. 1483-1491, June 1, 1991 1991.
- [170] R. Gong, *et al.*, "Shortened Engineered Human Antibody CH2 Domains: INCREASED STABILITY AND BINDING TO THE HUMAN NEONATAL Fc RECEPTOR," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, pp. 27288-27293, August 5, 2011 2011.
- [171] *Federal Register Volume 61, Issue 250, 1996.*

- [172] D. Jianwei, *et al.*, "The combination of a synthetic promoter and a CMV promoter improves foreign gene expression efficiency in myocytes," *Journal of Biotechnology*, vol. 158, pp. 91-96, 2012.
- [173] C.-J. Sun, *et al.*, "Preparation of chitosan-plasmid DNA nanoparticles encoding zona pellucida glycoprotein-3 α and its expression in mouse," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 68, pp. 182-188, 2004.
- [174] M. Jean, *et al.*, "Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, pp. 138-149, 2012.
- [175] M. Jean, *et al.*, "Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies," *Gene Ther*, vol. 16, pp. 1097-1110, 2009.
- [176] C. Marchand, *et al.*, "C3, C5, and factor B bind to chitosan without complement activation," *J Biomed Mater Res A*, vol. 93, pp. 1429-41, Jun 15 2010.
- [177] H. Soo Choi, *et al.*, "Renal clearance of quantum dots," *Nat Biotech*, vol. 25, pp. 1165-1170, 2007.
- [178] S. R. Popielarski, *et al.*, "A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver. 2. In vitro and in vivo uptake results," *Bioconjug Chem*, vol. 16, pp. 1071-80, Sep-Oct 2005.
- [179] S. Mao, *et al.*, "Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 62, pp. 12-27, Jan 31 2010.
- [180] A. Verma and F. Stellacci, "Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions," *Small*, vol. 6, pp. 12-21, 2010.
- [181] P. Erbacher, *et al.*, "Chitosan-Based Vector/DNA Complexes for Gene Delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability," *Pharmaceutical Research*, vol. 15, pp. 1332-1339, 1998/09/01 1998.
- [182] S. N. Tamkovich, *et al.*, "Circulating DNA and DNase Activity in Human Blood," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1075, pp. 191-196, 2006.
- [183] C. Valenta, *et al.*, "Chitosan-EDTA Conjugate: A Novel Polymer for Topical Gels," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 50, pp. 445-452, 1998.
- [184] B. J. Scallon, *et al.*, "Functional comparisons of different tumour necrosis factor receptor/IgG fusion proteins," *Cytokine*, vol. 7, pp. 759-770, 1995.

Annexe 1 Produit du Séquençage du fragment TNFR

TAAGCTTAGAGCGGGAGCTACCGCCGCCCCT**ATG**GCGCCCGCCGCCCTCTGGGTCGC
 GCTGGTCGTCGAACTGCAGCTGTGGGCCACCGGGCACACAGTGCCCGCCAAGGTTGT
 CTTGACACCCTACAAGCCAGAACCTGGGAACCAGTGCCAGATCTCACAGGAGTACTA
 TGACAAGAAGGCTCAGATGTGCTGTGCTAAGTGTCCCCCTGGCCAGTATGCAAAACA
 CTTCTGCAACAAGACTTCAGACACCGTGTGTGCGGACTGTGCGGCAGGCATGTTTACC
 CAGGTCTGGAACCATCTGCATACATGCCTGAGCTGCAGTTCTTCCTGTAGTGATGACC
 AGGTGGAGACCCACAACCTGCACTAAAAACAGAACCGAGTGTGTGCTTGCAACGCTG
 ACAGTTACTGTGCCTTGAAATTGCATTCTGGGAACTGTGACAGTGCATGAAGCTGA
 GCAAGTGTGGCCCTGGCTTCGGAGTGGCCCGTTCAAGAACCTCAAATGGAAACGTGA
 TATGCAGTGCCTGTGCCCCAGGGACGTTCTCTGACACCACATCATCCACAGATGTGTG
 CAGGCCCCACCGCATTGTAGCATCCTGGCTATTCTGGAAATGCAAGCACAGATGC
 AGTCTGTGCATCCGAGTCCCCAACTCCAAGCGCTGTTCCAAGGACAATCTACGTATCT
 CAGCCAGAGCCCACAAGATCCCAGCCCATGGATCAAGAGCCAGGGCCTAGCCAAACT
 CCACACATCCCTGTGTCCTTGGGTTCAACCCCATCATTGAACCAAGCATCACGGGTG
 GCATCTCTCTTCCAATTGGTCTGA**TCGTTGGACTGACAGGTACC**

Les séquences surlignées en jaune correspondent aux amorces utilisées pour le clonage et la séquence surlignée en vert correspond au codon d'initiation.

Annexe 2 - Séquence nucléotidique codante pour le fragment TNFR cloné à l'intérieur de pVax1.

ATGGCGCCCGCCGCCCTCTGGGTCGCGCTGGTCGTCGAACTGCAGCTGTGGGCCAC
 CGGGCACACAGTGCCCGCCAAGGTTGTCTTGACACCCTACAAGCCAGAACCTGGG
 AACCAGTGCCAGATCTCACAGGAGTACTATGACAAGAAGGCTCAGATGTGCTGTG
 CTAAGTGTCCCCCTGGCCAGTATGCAAAACACTTCTGCAACAAGACTTCAGACACC
 GTGTGTGCGGACTGTGCGGCAGGCATGTTTACCCAGGTCTGGAACCATCTGCATAC
 ATGCCTGAGCTGCAGTTCTTCCTGTAGTGATGACCAGGTGGAGACCCACAACCTGCA
 CTAACAAAACAGAACCGAGTGTGTGCTTGCAACGCTGACAGTACTGTGCCTTGAA
 ATTGCAATTCTGGGAACTGTGACAGTGCATGAAGCTGAGCAAGTGTGGCCCTGGC
 TTCGGAGTGGCCCGTTCAAGAACCTCAAATGGAAACGTGATATGCAGTGCCTGTG
 CCCAGGGACGTTCTCTGACACCACATCATCCACAGATGTGTGCAGGCCCCACCGC
 ATTTGTAGCATCCTGGCTATTCCTGGAAATGCAAGCACAGATGCAGTCTGTGCATC
 CGAGTCCCCAACTCCAAGCGCTGTTCCAAGGACAATCTACGTATCTCAGCCAGAG
 CCCACAAGATCCCAGCCCATGGATCAAGAGCCAGGGCCTAGCCAAACTCCACACA
 TCCCTGTGTCCTTGGGTTCAACCCCCATCATTGAACCAAGCATCACGGGTGGC
 TCTCTTCCAATTGGTCTGATCGTTGGACTGACAGGTACCGAGCTCGGATCCACTAG
 TCCAGTGTGGTGGAAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTA
 GAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCA
 TCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCT**TGA**

Surligné en vert le codon d'initiation, surligné en rouge le codon de terminaison, la séquence en gris appartient au plasmide pVax1 et la séquence en noir correspond au fragment TNFR.

**Annexe 3 - Séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique
pVax/TNFR**

MAPAALWVALVVELQLWATGHTVPAKVVLTPYKPEPGNQCCQISQEYYDKKAQM
 CC **AKCPPGQYAK**HFCNKTS **DTVCA**DCAAGMFTQVWNHLHTCLSCSSSCSDDQVE
 THNC **TKK**QNRVCACNADSYCALKLHSGNCRQCMKL **SKCGPGFGVA**RSRTSNGNV
 ICSACAPGTFSDDTSSSTDVCRPHRICALIPG **NAS**TDAVCASESPTPSAVPRTIYVSQP
 EPTRSQPMDDQEPGPSQTPHIPVSLGSTPIIEPSITGGISLPIGLIVGLTGTELGSTSPVW
 WNSADIQHSGGRSSLEGPFKPADQPRLLVASHLLFAPPPCLP

Les acides aminés en noir correspondent à la protéine TNFR les acides aminés en gris correspondent à la traduction d'une partie de pVax. Les séquences surlignées en rouge correspondent au site de liaison pour la protéine TNF α

Annexe 4 - Séquence nucléotidique du fragment Ig à l'intérieur du plasmide pCR2.1/Ig

GGGTACCAGAGTATCATCTGTCTT CATCTTCCCCCAAAGACCAAAGATGTGCTC
 ACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTAGCCAGAATG
 ATCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGTTTATAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCA
 GACTCATGCCCCGGAGAAGCAGTCCAACAGCACTTTACGCTCAGTCAGTGAACTC
 CCCATCGTGCACCGGGACTGGCTCAATGGCAAGACGTTCAAATGCAAAGTCAACA
 GTGGAGCATTCCCTGCCCCATCGAGAAAAGCATCTCC AAACCC GAAGGCACACC
 ACGAGGTCCACAGGTATACACCATGGCGCCTCCCAAGGAAGAGATGACCCAGAG
 TCAAGTCAGTATCACCTGCATGGTAAAAGGCTTCTATCCCCAGACATTTATACG
 GAGTGAAGATGAACGGGCAGCCACAGGAAA ACTACAAGA AACTCCACCTACG
 ATGGACACAGATGGGAGTTACTTCCTCTACAGCAAGCTCAATGTAAAGAAAGAA
 ACATGGCAGCAGGGAAACACTTTCACGTGTTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACA
 ACCACCATACTGAGAAG AGTCTCTAA ACTCTCCTCTAGAC

Les séquences surlignées en jaune correspondent aux amorces utilisées pour le clonage et la séquence surlignée en vert correspond au codon de terminaison. Les séquences surlignées en bleu clair correspondent à la partie CH2 (heavy chain 2) et la partie surlignée en vert foncé à la partie CH3 de la partie Fc de l'immunoglobuline G.

**Annexe 5 - Séquence nucléotidique du fragment d'ADN codant pour la
protéine recombinante IgTNFR**

AAGCTTAGAGCGGGAGCTACC**GCCGCCCT**ATG**GCGCCCGCCGCCCTCTGGGTC**
 GCGCTGGTCGTCGAACTGCAGCTGTGGGCCACCGGGCACACAGTGCCCGCCAAG
 GTTGTCTTGACACCCTACAAGCCAGAACCTGGGAACCAGTGCCAGATCTCACAG
 GAGTACTATGACAAGAAGGCTCAGATGTGCTGTGCTAAGTGTCCCCCTGGCCAGT
 ATGCAAAACACTTCTGCAACAAGACTTCAGACACCGTGTGTGCGGACTGTGCGG
 CAGGCATGTTTACCCAGGTCTGGAACCATCTGCATACATGCCTGAGCTGCAGTTC
 TTCCTGTAGTGATGACCAGGTGGAGACCCACAAC**TGCACTAAAAACAGAACCG**
 AGTGTGTGCTTGCAACGCTGACAGT**TACTGTGCCTTGAAATTGCATTCTGGGAAC**
 TGTCGACAGTGCATGAAGCTGAGCAAGTGTGGCCCTGGCTTCGGAGTGGCCCGTT
 CAAGAACCTCAAATGGAAACGTGATATGCAGTGCCTGTGCCCCAGGGACGTTCT
 CTGACACCACATCATCCACAGATGTGTGCAGGCCCCACCGCATT**TGTAGCATCCT**
 GGCTATTCCTGGAAATGCAAGCACAGATGCAGTCTGTGCATCCGAGTCCCCAACT
 CCAAGCGCTGTTCCAAGGACAATCTACGTATCTCAGCCAGAGCCCACAAGATCC
 CAGCCCATGGATCAAGAGCCAGGGCCTAGCCAAACTCCACACATCCCTGTGTCTT
 TGGGTTCAACCCCATCATTGAACCAAGCATCACGGGTGGCATCTCTCTTCCAAT
 TGGTCTGA**TCGTTGGACTGACA**GGTACC**AGAGTATCATCTGTCTT**CATCTTCCC
 CCCAAAGACCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGT
 GTGGTAGACATTAGCCAGAATGATCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGTTTATAGATG
 ACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGCCCGGAGAAGCAGTCCAACAGCA
 CTTTACGCTCAGTCAGTGA**ACTCCCATCGTGACCGGGACTGGCTCAATGGCAA**
 GACGTTCAAATGCAAAGTCAACAGTGGAGCATTCCCTGCCCCATCGAGAAAAG
 CATCTCCAAACCC**GAAGGCACACCACGAGGTCCACAGGTATACACCATGGCGCC**
 TCCCAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAGTATCACCTGCATGGTAAAAGG
 CTCTATCCCCAGACATTTATACOGAGT**OGAAGATGAACGOGCAGCCACAOGA**
 AACTACAAGA**CACTCCACCTACGATGGACACAGATGGGAGT**TACTTCTCTA
 CAGCAAGCTCAATGTAAAGAAAGAAACATG**GCAGCAGGGAAACACTTTCACGTG**
 TTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCAC**CATACTGAGAAG**AGTCTCTAAACT
CTCCTCTAGA

La séquence en bleue correspond à la séquence du fragment TNFR et la séquence en rouge correspond à la séquence du fragment Ig. Les séquences surlignées en gris correspondent, respectivement aux sites de clivage pour les enzymes de restriction HindIII, KpnI et XbaI. Les séquences surlignées en vert clair correspondent aux codons d'initiation et de terminaison. Les séquences surlignées en jaunes correspondent aux amorces utilisées lors des expériences d'amplification par RPC. Les séquences surlignées en bleu clair correspondent à la partie CH2 (heavy chain 2) et la partie surlignée en vert foncé à la partie CH3 de la partie Fc de l'immunoglobuline G.

Annexe 6 - Séquence en acides aminés déduite à partir de la séquence nucléotidique IgTNFR.

MAPAALWVALVVELQLWATGHTVPAKVVLTPYKPEPGNQCCISQEYYDKKAQMCC**A**
KCPPGQYAKHFCNKTS**DTVCA**DCAAGMFTQVWNHLHTCLSCSSSCSDDQVETHN**CTK**
KQNRVCACNADSYCALKLHSGNCRQCMKL**SKCGPGFGVA**RSRTSNGNVICSACAPGT
 FSDTTSSTDVCRPHRICALIPG**NAS**TDAVCASESPTPSAVPRTIYVSQPEPTRSQPMDQE
 PGPSQTPHIPVSLGSTPIEPSITGGISLPIGLIVGLT**GTR**VSSVFIFPPKTKDVLITLTPKVT
 CVVVDISQNDPEVRFSWFIDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPVHRDWLNGKTF
 KCKVNSGAFPAPIEKSSISKPEGTPRGPQVYTMAPPKEEMTQSQVSITCMVKGFYPPDIYT
 EWKMNGQPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSKLVKKETWQQGNTFTCSVLHEGLHNH
 HTEKSL

La séquence en bleue correspond à la séquence du fragment TNFR et la séquence en rouge à la séquence du fragment Ig. Les séquences surlignées en rouge correspondent au site de liaison pour la protéine TNF α et la séquence surlignée en rose correspond à un triplet d'acides aminés ne correspondant ni à l'immunoglobuline, ni à la partie extracellulaire du récepteur TNF α mais uniquement due au site de restriction utilisé pour fusionner les deux fragments.

Annexe 7 - Séquence du fragment Ig contenant la région charnière

GGTACCAAAATT**GTGCCAAG**GGAATGCAATCCTTGTGGATGTACAGGCTCAGAAGT
 ATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGACCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGAC
 TCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATTAGCCAGAATGATCCCGAGGTCCGGTT
 CAGCTGGTTTATAGATGACGTGGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGCCCCGGAGA
 AGCAGTCCAACAGCACTTTACGCTCAGTCAGTGA~~ACT~~CCCCATCGTGCACCGGGACT
 GGCTCAATGGCAAGACGTTCAAATGCAAAGTCAACAGTGGAGCATTCCCTGCCCCC
 ATCGAGAAAAGCATCTCCAAACCCGAAGGCACACCACGAGGTCCACAGGTATACAC
 CATGGCGCCTCCCAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAGTATCACCTGCATGG
 TAAAAGGCTTCTATCCCCAGACATTTATACGGAGTGGAAGATGAACGGGCAGCCA
 CAGGAAA~~ACT~~TACAAGA~~ACT~~CCACCTACGATGGACACAGATGGGAGTTACTTCT
 CTACAGCAAGCTCAATGTAAAGAAAGAAACATGGCAGCAGGGAAACACTTTCACGT
 GTTCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGTCTCTAAACTC
TCCTCTAGA

Surlignés en jaune les amorces utilisées pour la RPC, en rouge la séquence correspondant à la région charnière, en gras les séquences des sites de restriction KpnI et XbaI, surligné en bleu la séquence correspondant à la région CH2, surligné en vert foncé la séquence correspondant à la région CH3 et surligné en Vert le codon de terminaison.

**Annexe 8 - Séquence nucléotidique du fragment d'ADN codant pour la
protéine recombinante IgTNFRd**

AAGCTTAGAGCGGGAGCTACCGCCGCCCT**ATG**GCGCCCGCCGCCCTCTGGGTC
 GCGCTGGTCGTCGAACTGCAGCTGTGGGCCACCGGGCACACAGTGCCCGCCAAG
 GTTGTCTTGACACCCTACAAGCCAGAACCTGGGAACCAGTGCCAGATCTCACAG
 GAGTACTATGACAAGAAGGCTCAGATGTGCTGTGCTAAGTGTCCCCCTGGCCAG
 TATGCAAAACACTTCTGCAACAAGACTTCAGACACCGTGTGTGCGGACTGTGCG
 GCAGGCATGTTTACCCAGGTCTGGAACCATCTGCATACATGCCTGAGCTGCAGT
 TCTTCCTGTAGTGATGACCAGGTGGAGACCCACAACCTGCACTAAAAACAGAAC
 CGAGTGTGTGCTTGCAACGCTGACAGTTACTGTGCCTTGAAATTGCATTCTGGGA
 ACTGTCGACAGTGCATGAAGCTGAGCAAGTGTGGCCCTGGCTTCGGAGTGGCCC
 GTTCAAGAACCTCAAATGGAAACGTGATATGCAGTGCCTGTGCCCCAGGGACGT
 TCTCTGACACCACATCATCCACAGATGTGTGCAGGCCCCACCGCATTGTAGCAT
 CCTGGCTATTCCTGGAAATGCAAGCACAGATGCAGTCTGTGCATCCGAGTCCCC
 AACTCCAAGCGCTGTTCCAAGGACAATCTACGTATCTCAGCCAGAGCCCACAAG
 ATCCCAGCCCATGGATCAAGAGCCAGGGCCTAGCCAAACTCCACACATCCCTGT
 GTCCTTGGGTTCAACCCCCATCATTGAACCAAGCATCACGGGTGGCATCTCTCTT
 CCAATTGGTCTGATCGTTGGACTGACA**GGTACC**AAAATT**GTGCCAAG**GGAAATGC
AATCCTTGTGGATGTACAGGCTCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAA
AGACCAAAGATGTGCTCACCATCACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGT
AGACATTAGCCAGAATGATCCCGAGGTCCGGTTCAGCTGGTTTATAGATGACGT
GGAAGTCCACACAGCTCAGACTCATGCCCCGGAGAAGCAGTCCAACAGCACTTT
ACGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCGTGCACCGGGACTGGCTCAATGGCAAGAC
GTTCAAATGCAAAGTCAACAGTGGAGCATTCCCTGCCCCATCGAGAAAAGCAT
CTCCAAACCC**GAAGGCACACCACGAGGTCCACAGGTATACACCATGGCGCCTCC**
CAAGGAAGAGATGACCCAGAGTCAAGTCAGTATCACCTGCATGGTAAAAGGCTT
CTATCCCCAGACATTTATACGGAGTGGAAAGATGAACGGGCAGCCACAGGAAA
ACTACAAGAACACTCCACCTACGATGGACACAGATGGGAGTACTTCCTCTACA
GCAAGCTCAATGTAAAGAAAGAAACATGGCAGCAGGGAAACACTTTCACGTGT
TCTGTGCTGCATGAGGGCCTGCACAACCACATACTGAGAAGAGTCTC**TAAACT**

Surlignés en jaune les amorces utilisées pour la RPC, en bleu la séquence d'ADN correspondant à la partie extracellulaire du récepteur TNF(TNFR) en rouge la séquence correspondant à la région charnière, en gras les séquences de restriction pour les enzymes KpnI et XbaI, surligné en bleu la séquence correspondant à la région CH2, surligné en vert foncé la séquence correspondant à la région CH3 et surligné en Vert le codon de terminaison.

Annexe 9 - Séquence déduite en acides aminés correspondant à la séquence nucléotidique du fragment IgTNFRd

MAPAALWVALVVELQLWATGHTVPAKVVLTPYKPEPGNQCCQISQEYYDKKAQMCC
 AKCPPGQYA KHFCNKTS DTVCA DCAAGMFTQVWNHLHTCLSCSSSCSDDQVETHNC
 TTKQNRVCACNADSYCALKLHSGNCRQCMKLSKCGPGFGVARSRTSNGNVICSACAP
 GTFSDTTSSTDVCRPHRICALIPGNASTDAVCASESPTPSAVPRTIYVSQPEPTRSQPM
 DQEPGPSQTPHIPVSLGSTPIIEPSITGGISLPIGLIVGLTGTKI VPRECNFCGCTGSEVSSV
 FIFPPKTKDVLITLTPKVTCVVVDISQNDPEVRFVWFIDDVEVHTAQTHAPEKQSNSTL
 RSVSELPIVHRDWLNGKTFKCKVNSGAFPAPIEKSSISKPEGTPRGPQVYTMAPPKEEMT
 QSQVSITCMVKGFYPPDIYTEWKMNQGPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSKLNKKET
 WQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSL

En bleu la séquence d'acide aminé correspondant à la partie TNFR de la protéine recombinante, en rouge la séquence d'acide aminé correspondant à la partie Ig de la protéine, surlignés en rouge les sites de liaison pour la protéine TNF, surligné en bleu nuit la séquence correspondant à la région charnière et surligné en violet la séquence correspondant à l'introduction du site de restriction KpnI pour effectuer la liaison entre les deux fragments au niveau de l'ADN.