FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE CHIMIE PHYSIOLOGIQUE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA TRANSFECTION HYDRODYNAMIQUE : EFFET DE L'INJECTION HYDRODYNAMIQUE SUR L'ENDOCYTOSE PAR LE FOIE

Promoteur:
Prof. M. Jadot
Co-promoteur:
Prof. S. Wattiaux-De Coninck
2004

Dissertation présentée par Fanjambolatiana F. Andrianaivo en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

FACULTE DE MEDECINE

UNITE DE RECHERCHE EN PHYSIOLOGIE MOLECULAIRE
DEPARTEMENT DE CHIMIE PHYSIOLOGIQUE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA TRANSFECTION HYDRODYNAMIQUE: EFFET DE L'INJECTION HYDRODYNAMIQUE SUR L'ENDOCYTOSE PAR LE FOIE.

Composition du jury:

Prof. M. Wibo (UCL. Département de Physiologie et Pharmacologie)

Prof. O. De Backer (FUNDP. Département de Physiologie et Pharmacologie)

Prof. P. Devos (FUNDP. Département de Biologie)

Mme J. Mertens-Strijthagen (FUNDP. Département de Physiologie et Pharmacologie)

Prof. M. Jadot (Promoteur. FUNDP. Département de Chimie Physiologique)

Prof. S. Wattiaux-De Coninck (Co-promoteur. FUNDP. Département de Chimie Physiologique)

Abstract

Background The mechanism of gene transfer into hepatocytes by the hydrodynamics based transfection procedure is not clearly understood. It has been shown that, after a hydrodynamic injection, a large proportion of plasmid DNA, encoding luciferase, remains intact in the liver where it remains bound at the outer face of the plasma membrane, avoiding degradation in the endosomo-lysosomal system. However this doesn't explain the efficiency the hydrodynamics based transfection as treatment with pancreatic DNAse results in a 70-80 % degradation of cell-associated plasmid DNA without affecting luciferase expression at aIl. It has been suggested that a hydrodynamic injection could deliver DNA directly to the hepatocyte cytosol. Elucidation of the mode of entry and of the specificity or non-specificity of this fact would require a thorough investigation of the influence of such an injection on the manner of uptake and intracellular fate of other macromolecules by the liver.

Methods: We have investigated the problem by following the uptake and intracellular distribution of asialofetuin by mouse liver. Asialofetuin is taken up by hepatocytes through receptor-mediated endocytosis. The protein was labelled with 1251 and administered in the tail vein by a conventional or a hydrodynamic injection. Subcellular distribution of radioactivity was established at increasiI1g times after injection by centrifugation methods.

Results After a conventional or a hydrodynamic injection of 1251-asialofetuin C251-ASF), radioactivity quickly accumulates in the liver. The distributions of sedimentable components of the homogenates after differential and isopycnic centrifugation in a sucrose gradient show important differences in the behavior of radioactivity associated membrane structures depending on whether a conventional or a hydrodynamic injection was given. A comparison with the distributions of reference enzymes, alkaline phosphodiesterase (plasma membrane) and cathepsin C (lysosomes) suggest that these differences are due

to the fact that after a hydrodynamic injection asialofetuin remains associated with plasma membrane for a longer time. Results obtained with asialofetuin labelled with 125I-tyramine cellobiose show that the protein reaches lysosomes after both kinds of injection but that proteolysis is delayed after a hydrodynamic injection. The proportion of radioactivity recovered in the unsedimentable part of the homogenates is markedly higher after a hydrodynamic injection. Experiments performed on perfused liver and isolated hepatocytes indicate that a certain proportion of 125I-asialofetuin is present in hepatocyte cytoplasm after an hydrodynamic injection. We have also reinvestigated some aspects of plasmid DNA uptake, intracellular journey and expression. Our results strongly suggest that some molecules of DNA and ASF enter the cell by a mechanism different from endocytosis, and reach the cytosol by crossing the plasma membrane through defects or pores induced by the hydrostatic pressure

Au terme de ces quatre années passées au Département de Chimie Physiologique, j'adresse mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont guidé, aidé et encouragé.

J'exprime mes remerciements au Professeur Michel Jadot pour m'avoir permis de travailler dans son équipe de recherche, et pour l'aide compétente qu'il m'a apportée tout au long de ma formation.

Je remercie le Professeur Robert Wattiaux pour ses conseils judicieux et sa rigueur scientifique, ses avis critiques m'ont été très précieux pour structurer et pour améliorer la qualité de ce travail.

Par son enthousiasme, sa patience et son encouragement pour terminer ce travail je remercie particulièrement Madame le Profèsseur Simone Wattiaux-De Coninck.

Je sais qu'il me reste maintenant à leur faire honneur dans ma carrière d'enseignement et de recherche.

Mes remerciements s'adressent aussi aux autres membres du jury, le Professeur M Wibo, le Professeur O. *De Backer, le Professeur P. Devos, Madame J Mertens Strijthagen pour avoir consacré un temps précieux à l'évaluation de ce travail.*

Je remercie le CERUNA et le Conseil d'Administration des Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix de m'avoir accordé leur soutien financier durant ces années de travail.

L'aide technique de Monsieur F. Dubois et Marie-Therèse Warnier, la discussion et les remarques de Michèle Lecocq sur le chapitre ADN, les conseils d'Isabelle Hamer, l'encadrement aux TP de Biochimie par Francis Mainferme et Jacqueline Thirion, la disponibilité de Michel Savels à tout moment pour réaliser les figures illustrant cette thèse me furent précieux. Je n'oublie pas évidemment Marie-Jeanne Vertez, Arlette Dautreloux, Marie-France-Leruth, Jean-Marie Van Dyck, Marielle Boonen, Marie Christine Gasingirwa, Anne-Françoise Delsaute, Aurélie Fondaire, Françoise Mercier pour leur aide et leurs encouragements.

Finalement je remercie ma famille, pour sa confiance et ses encouragements, mon épouse Hasina, et ma fille Mandy pour leur soutien moral et leur amour.

L'aboutissement de ce travail est le fruit de la coopération entre la Faculté de Médecine de l'Université de Mahajanga (Madagascar) et la Faculté de Médecine des FUNDP de Namur (Belgique).

Juin 2004

Publications:

Andrianaivo, F., Lecocq, M., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R., Jadot, M.

Hydrodynamics-based transfection of the /iver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection. Journal of Gene Medicine_2004 (Early View)

Lecocq, M., Andrianaivo, F., Warnier, M- T., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. and Jadot M. ,*Uptake by mouse liver and intracellular fate of plasmid DNA after a rapid tail vein injection of a small or a large volume.* Journal of Gene Medicine. *Vo15*, 142-156 *(2003)*

Jadot, M., Andrianaivo, F., Dubois, F., and Wattiaux, R. *Effects of methylcyciodextrin on lysosomes.* European Journal ofBiochemistry. *Vol* 269, 1 9 (2001)

Communications:

Andrianaivo, F., Wattiaux-De Coninck, S., Warnier, M-T., Wattiaux, R. and Jadot, M.

Uptake by mouse /iver and intracellular fate of asialofetuin and invertase after a rapid tail vein injection of a small or a large volume. American Society of Gene Therapy, 5 th Annual Meeting, Boston,June 5-9. (2002)

Lecocq, M., Wattiaux-De Coninck, S., Andrianaivo, F., Warnier, M-T., Wattiaux R. and Jadot. M. *Subcellular localisation of pDNA in mouse /iver after a hydrodynamic injection.* American Society of Gene Therapy, 5th Annual Meeting, Boston,June 5-9. (2002)

Wattiaux-De Coninck, S., Lecocq, M., Andrianaivo, F., Warnier, M-T., Wattiaux, R. and M.Jadot *Uptake by mouse /iver and intracellular fate of plasmid DNA after a rapid tail vein injection of a small or a large volume.* Gene Delivery Systems, Washington, December 6-7 (2001)

Liste des abréviations

ADA : adénosine déaminase

ADN : acide désoxyribonucléique

ALP: phosphatase alcaline

AL T : alanine aminotransferase

ARN : acide ribonucléique

ASF : asialofétuine

ASGP : asialoglycoprotéine

ASP : aspartate aminotransférase

CMV : cytomégalovirus

CURL : compartiment uncoupling receptor ligand

dATP : désoxyadénosinetriphosphate

DEAE : diethylaminoethylacétate

SCID : déficience du système immunitaire combiné sévère

DNAse : désoxyribonucléase

DOGS : dioactodécylamidoglycylspermine

DOTAP: 1,2-dioléoyloxypropyl-N,N,N-triméthylammonium chloride

DOTMA : N-(2,3-dioleyloxypropyl)-N,N,N- trimethylammonium chloride

DS : espace de Disse

ECG : éléctrocardiogramme

EDTA : acide éthylénediaminetétraacétique

Fraction L : fraction mitochondriale légère

Fraction M : fraction mitochondriale lourde

Fraction N : fraction nucléaire

Fraction P : fraction microsomale

Fraction S : fraction soluble

GPI : glycosylphosphatidylinositol

M6P : mannose-6-phosphate

MLV : murine leukemia virus

MVB : corps multivésiculaire

NPC : cellule non parenchymateuse ou cellule sinusoïdale

PC : cellule parenchymateuse

plg A: immmunoglobuline A polymérique

TC-ASF : tyramine cellobiose asialofétuine

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1. INTRODUCTION 6

1.1. L'ENDOCYTOSE 6

1.1.1. Les différentes voies d'endocytose 7

1.1.1.1. L'endocytose fluide 7

1.1.1.2. L'endocytose négociée par récepteur 7

1.1.1.3. Les cavéoles dans l'endocytose 12

1.2. L'ENDOCYTOSE DES GLYCOPROTEINES PAR LES CELLULES DE FOIE 13

1.2.1. L'endocytose par les hépatocytes 14

1.2.2. L'endocytose par les cellules sinusoïdales 15

1.3. LA TRANSFECTION ET SES ACTEURS 16

1.3.1. Les vecteurs 18

1.3.1.1. Les vecteurs viraux 18

1.3.1.2. Les vecteurs non viraux 19

1.3.2. Les méthodes physiques de transfection 20

1.3.2.1. L'électroporation 21

1.3.2.2. Le bombardement par des particules 22

1.3.2.3. Les ultrasons 23

1.3.3. L'injection d'ADN nu 23

1.3.3.1. L'injection intramusculaire 24

1.3.3.2. L'injection intra-vasculaire et par voie biliaire avec occlusion transitoire 25

1.3.3.3. L'injection hydrodynamique 26

1.3.3.3.1. Modifications physiologiques et biologiques 27

1.3.3.3.2. Mécanisme de facilitation de la transfection par injection hydrodynamique 28

1.3.3.3.3. Le foie : organe cible de l'injection hydrodynamique 31

1.3.3.3.4. Les obstacles à franchir par l'ADN nu lors de l'injection hydrodynamique 35
Nucléases 35
Le mur endothélial 36
Alternative à l'endocytose 37
La traversée du cytoplasme vers le noyau 38
1.4. OBJET DU TRAVAIL 39
CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES 42
2.1. LES INJECTIONS 42
2.1.1. Injection hydrodynamique et conventionnelle 42
2.1.2. Double injection 43
2.1.3. Injection de Triton WR-1339 43
2.2. MARQUAGES AUX ISOTOPES RADIOACTIFS 43
2.2.1. Marquage de l'ADN 43
2.2.2. Marquage de l'asialofetuine et de l'invertase 45
2.2.2.1. Méthode à la chloramine T 45
2.2.2.2. Marquage de la TC et liaison à l'ASF 45
2.3. PURIFICATION ET MARQUAGE DU PLASMIDE 46
2.4. EXTRACTION DE L'ADN ET LA RADIOACTIVITE 46
2.5. ISOLEMENT DES CELLULES DU FOIE 47
2.5.1. Séparation des cellules par centrifugation différentielle 48
2.5.2. Gradients Percoll et Nycodenz 49
2.6. METHODES DE CENTRIFUGATION 50
2.6.1. Fractionnement par centrifugation différentielle 50
2.6.2. Centrifugation isopycnique 51
2.7. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES, DES PROTEINES ET DE LA RADIOACTIVITE 52
2.8. ACTION DE LA PROTEINASE K 54

CHAPITRE 3. RESULTATS 56

3.1. CAPTURE ET SORT DE L'ASIALOFETUINE MARQUEE A L'IODE 125 (^{125}I-ASF) 56

3.1.1. Introduction 56

3.1.2. Capture 56

3.1.3. Distribution intracellulaire, aspect général 59

3.1.4. Distribution de la radioactivité associée aux fractions sédimentables 60

3.1.5. Distributions de la phosphodiestérase alcaline, de la cathepsine C et des protéines totales 65

3.1.6. Analyse de la fraction L+P par centrifugation isopycnique 66

3.1.7. Fraction N 71

3.1.8. Effet de la protéinase K 72

3.1.9. Radioactivité associée à la fraction non sédimentable 76

3.1.10. Influence d'une injection hydrodynamique administrée avant une injection conventionnelle d'ASF 79

3.2. CAPTURE ET SORT DE L'ASIALOFETUINE MARQUEE A LA TYRAMINE CELLOBIOSE IODE 125 (^{125}I-TC-ASF) 83

3.2.1. Introduction 83

3.2.2. Capture de ^{125}I-TC-ASF 84

3.2.3. Distribution intracellulaire: aspect général 86

3.2.4. Radioactivité associée aux fractions sédimentables 87

3.2.5. Analyse des fractions sédimentables par centrifugation isopycnique 91

3.2.5.1. Analyse de la fraction L+P par centrifugation dans un gradient de saccharose 91

3.2.5.2. Analyse de la fraction ML par centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose 93

3.2.5.3. Radioactivité acido-soluble dans le système endosomo-lysosomal 95

3.2.6. Radioactivité associée à la fraction non sédimentable 97
3.2.7. Injection hydrodynamique avant l'injection conventionnelle 99
3.3. CAPTURE ET SORT DE L'INVERTASE MARQUEE A L'^{125}I 101
3.3.1. Introduction 101
3.3.2. Capture de l'^{125}I invertase 101
3.3.3. Distribution intracellulaire: aspect général 102
3.3.4. Radioactivité associée aux fractions sédimentables 103
3.4. TRANSFECTION HYDRODYNAMIQUE : EFFET DE L'INJECTION HYDRODYNAMIQUE DE NACL AVANT L'INJECTION DE L'ADN 107
3.4.1. Introduction 107
3.4.2. Activité de la luciférase 107
3.4.3. Sort de l'ADN plasmidique 108
3.4.4. Distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle et dégradation intracellulaire de l'ADN 111
CHAPITRE 4. DISCUSSION 118
4.1. ASIALOFETUINE 118
4.1.1. Radioactivité non sédimentable de l'homogénat 118
4.1.2. Radioactivité associée aux éléments sédimentables de l'homogénat 120
4.2. INVERTASE 125
4.3. ADN PLASMIDIQUE 126
CHAPITRE 5. CONCLUSIONS GENERALES 131
5.1. TRANSFECTION HYDRODYNAMIQUE 131
5.2. INTRODUCTION DE PROTEINES DANS LA CELLULE 132

1. INTRODUCTION

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Notre travail concerne la transfection génique. Celle-ci nécessite l'envoi au noyau cellulaire d'ADN exogène, c'est-à-dire, d'une grosse molécule hydrophile, qui, normalement ne peut pénétrer dans la cellule que par endocytose. Or, un tel processus conduit habituellement à une dégradation de la molécule, en grande partie dans les lysosomes. Dans notre introduction, après un bref rappel sur l'endocytose, nous présenterons les moyens qui permettent à l'ADN exogène d'échapper à une hydrolyse intracellulaire et d'atteindre le noyau sous une forme fonctionnelle.

1.1. L'ENDOCYTOSE

Elie Metchnikov a constaté la première fois comment du matériel extracellulaire est englouti par la cellule. Il a décrit la phagocytose, la dégradation d'un microorganisme et son arrivée dans un environnement interne acide (Metchnikoff 1893). Issu du grec "endon" : dedans et "kutos" : cellule, l'endocytose est un mécanisme par lequel nos cellules internalisent des molécules extracellulaires (Mark 2001). L'endocytose joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire par l'apport spécifique de nutriments et d'autres matériaux (Mukherjee, et al. 1997; Rothman 1994; Smythe 1996). Elle intervient également dans d'autres fonctions comme :

- La réponse cellulaire aux hormones et le transport des facteurs de croissance ;
- Le recyclage des vésicules synaptiques des terminaisons nerveuses ;
- La capture des antigènes par les cellules présentatrices (Mellman 1990) et l'entrée de certains pathogènes comme les bactéries et corps étrangers (phagocytose) ;

- La modulation de l'expression des récepteurs à la surface cellulaire (Mukherjee, et al. 1997) ;
- L'épuration de l'organisme, comme la transcytose de l'immunoglobuline A polymérique (pIg A) dans le foie de rat (Courtoy 1985).

1.1.1. LES DIFFERENTES VOIES D'ENDOCYTOSE

D'une manière générale, on distingue l'endocytose fluide et l'endocytose par récepteur.

1.1.1.1. L'ENDOCYTOSE FLUIDE

L'endocytose fluide est un processus d'internalisation qui ne présente aucune spécificité, son efficacité dépend de la concentration des particules ou solutés dans le milieu extracellulaire. Il s'agit d'un procédé constitutif par lequel les substances sont internalisées sans liaison préalable à la membrane plasmique (Willingham and Pastan 1985).

La peroxydase de raifort est un traceur fidèle de l'endocytose fluide dans les fibroblastes lorsqu'elle est utilisée à forte concentration, par exemple, à des concentrations supérieures à 1 mg/ml dans le milieu d'incubation, la clairance de la peroxydase de raifort par des fibroblastes est en effet strictement proportionnelle à sa concentration (Cupers, et al. 1994). D'autres auteurs ont montré l'utilité de ce marqueur de l'endocytose fluide dans le foie (Dufour, et al. 1992; Hayakawa, et al. 1990; Lowe, et al. 1985; Marinelli and Penalva 1992; Renston, et al. 1980).

1.1.1.2. L'ENDOCYTOSE NÉGOCIÉE PAR RÉCEPTEUR

L'endocytose par récepteur implique la liaison spécifique, généralement de haute affinité, de ligands bien définis à un nombre limité de copies d'un seul type de récepteur trans-membranaire, exposés à la surface cellulaire. Par

convention de langage en biologie cellulaire, on utilise depuis Brown et Goldstein en 1986 (Brown and Goldstein 1986), le terme "récepteur" même si cette protéine n'a pas de fonction de signalisation trans-membranaire directe (par exemple, les récepteurs des lipoprotéines porteuses de cholestérol ou de la transferrine porteuse de fer). Ces complexes ligands-récepteurs se concentrent dans les puits mantelés et pénètrent dans des vésicules mantelées (recouvertes de clathrine). Au contraire de l'endocytose fluide, l'endocytose médiée par récepteur est donc de type saturable et caractéristique d'un seul type de vésicule endocytaire primaire, les vésicules recouvertes de clathrine (Schmid 1997).

L'endocytose liée aux récepteurs est le processus d'internalisation le plus efficace pour la capture sélective de macromolécules présentes en faible concentration dans le milieu extracellulaire. De nombreuses publications d'ensemble ont été consacrées à ce phénomène (Courtoy 1993; Luzio, et al. 2000; Murk, et al. 2003; Pillay, et al. 2002). Nous nous référerons au modèle structural de l'endocytose par les hépatocytes proposé par Courtoy (Courtoy 1993). Ce modèle décrit : 1) la complexité des endosomes, 2) une définition des compartiments fonctionnels et 3) les interactions entre ceux-ci (**figure 1**).

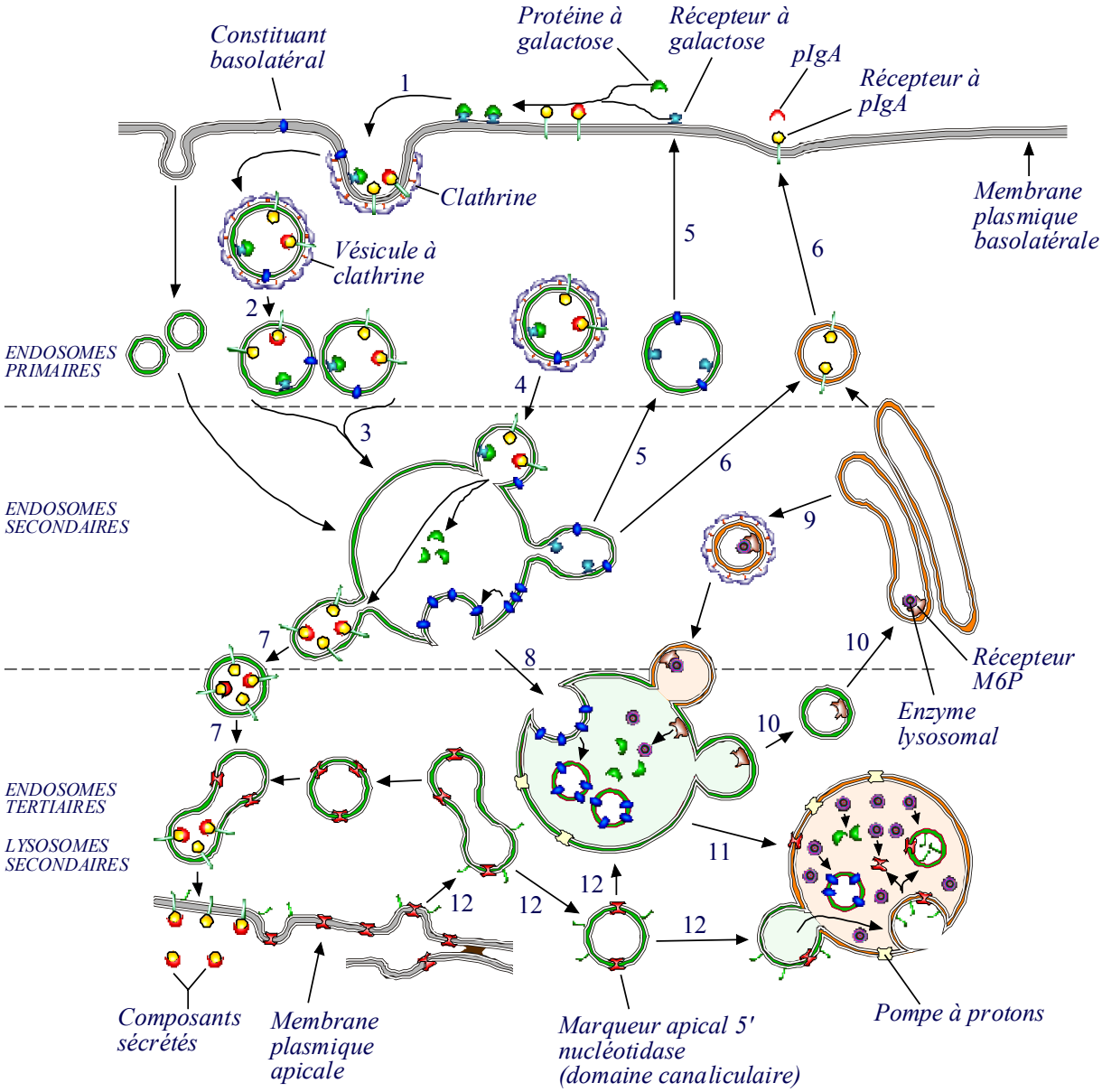


Figure 1. Les différentes voies d'endocytose négociées par récepteurs. *Schéma établi suivant le modèle proposé par Courtoy (Courtoy 1993). Les membranes des endosomes sont en vert,la membrane plasmique en gris, les autres en orange.*

Les endosomes primaires basolatéraux. Des morceaux de la membrane sinusoïdale (basolatérale) garnis des différents complexes ligands-récepteurs formés se concentrent à la surface cellulaire et sont internalisés au niveau des puits mantelés à (étape 1) pour former les vésicules mantelées à clathrine (Mukherjee, et al. 1997) (étape 1). Celles-ci génèrent les endosomes primaires basolatéraux (étape 2). Ces endosomes primaires dépourvus de clathrine ont un

diamètre de plus ou moins 100 nm et s'accumulent à la jonction des domaines basolatéral et latéral (Geuze, et al. 1987). Les endosomes primaires contiennent des ligands et des récepteurs divers et les complexes ligands-récepteurs à ce stade demeurent couplés (Kindberg, et al. 1984), peut-être à cause d'une absence d'acidification (Fuchs, et al. 1989a; Fuchs, et al. 1989b). En effet, le pH interne de ces endosomes primaires est de 6,0-6,5 (Forgac 1992; Mellman, et al. 1986). Ces organites dans un gradient de saccharose s'équilibrent à une densité de 1,13g/ml (Evans and Flint 1985; Mueller and Hubbard 1986).

Les endosomes secondaires tubulosphériques résultent de la coalescence (étape 3) des endosomes primaires dépourvus de manteau ou de la fusion de vésicules mantelées avec des endosomes secondaires préexistants (étape 4). Le découplage des ligands-récepteurs qui s'y opère est attribué au pH de ces endosomes nettement plus faible (Krueger, et al. 1997). Il s'agit donc d'une station de mixage de tous les constituants internalisés, mais c'est aussi une station de tri (CURL), où les ligands destinés à la dégradation sont envoyés aux lysosomes (étape 8) (Geuze, et al. 1983; Hopkins, et al. 1990; Tooze and Hollinshead 1991; Ukkonen, et al. 1986; Wilson, et al. 1991). Les récepteurs réutilisables sont recyclés vers différents domaines de la membrane plasmique (étapes 5, 6, 7) ainsi que l'excès de membrane qui résulte de la fusion de nombreuses petites vésicules en une seule de plus grande dimension. Les endosomes secondaires sédimentent principalement dans la fraction mitochondriale légère, probablement la *fluffy layer* qui correspond à la couche floconneuse qui se depose au sommet de la fraction mitochondriale légère (Limet, et al. 1985; Quintart, et al. 1983). Leur densité d'équilibration en gradient de saccharose se situe aux environs de 1,1 g/ml.

Les endosomes tertiaires tardifs (multivésiculaires) dérivent de la portion centrale des endosomes secondaires (étape 8) et sont destinés au processus de dégradation. Plusieurs changements s'y opèrent : 1) une nouvelle baisse de pH

due à la présence d'une pompe à proton, (Al-Awqati 1986; Van Dyke, et al. 1985a; Van Dyke, et al. 1985b), 2) une densification en microscopie électronique de la lumière de l'organite qui s'accompagne d'un accroissement de la densité de la particule, 3) la formation de petites vésicules intra-endosomales, un autre moyen de pallier à l'excès de membrane. Celles-ci contiendraient les récepteurs destinés à la dégradation tel le récepteur à EGF (Sorkin and Carpenter 1993; Sorkin and Waters 1993), 4) ces endosomes tardifs sont enrichis en enzymes lysosomaux provenant du Golgi (étape 9) et fixés sur les récepteurs mannose-6-phosphate, lesquels dans le milieu acide de l'endosome se dissocient et sont recyclés vers le Golgi (étape 10). Ces endosomes tertiaires contiennent donc des substrats, un milieu acide, des enzymes lysosomaux néo-synthétisés mais en faible concentration ; la protéolyse y est donc restreinte. Celle-ci ne sera réellement effective qu'après la fusion avec les lysosomes secondaires (étape 11). La densité de ces endosomes tertiaires en gradient de saccharose s'étale entre 1,18g/ml et 1,2g/ml au fur et à mesure de la maturation du compartiment lysosomal.

Les endosomes apicaux situés dans la zone canaliculaire sont destinés à la dégradation (étape 12) soit via les endosomes tertiaires soit par fusion directe avec les lysosomes. L'existence d'un chemin vésiculaire en sens inverse qui connecterait la membrane canaliculaire au domaine basolatéral n'a pas pas encore été démontrée sauf en condition pathologique où la pression canaliculaire est augmentée (Chen 1987; Matter, et al. 1969).

Les endosomes de transcytose : sur les endosomes secondaires dérivés du domaine basolatéral se forment des extensions dans lesquels se concentrent (étape 7) des constituants déstinés à la transcytose tel le récepteur à immunoglobuline A polymérique (pIgA). Les endosomes de transcytose ainsi formés fusionnent au niveau de la membrane canaliculaire (apicale). Le composant de sécrétion du récepteur sur lequel reste couplé le pIgA est libéré et

le domaine membranaire du récepteur poursuit la course vers les lysosomes secondaires et jusqu'à la bile.

1.1.1.3. LES CAVÉOLES DANS L'ENDOCYTOSE

Dans une forme particulière de l'endocytose indépendante de la clathrine seraient impliquées des structures appelées cavéoles (Hansen, et al. 1991). Il s'agit d'une invagination membranaire de très petite taille qui fait environ 50 à 100 nm de diamètre (Palade 1953; Yamada 1955) et recouverte sur sa face cytoplasmique par un manteau formé de la polymérisation de cavéoline (Kurzchalia, et al. 1994; Rothberg, et al. 1992). Cette protéine est capable de s'insérer profondément dans la membrane et d'y stabiliser des microdomaines riches en cholestérol appelés *rafts* (Anderson 1998). L'existence des cavéoles a été initialement observée dans les cellules endothéliales (Palade 1953; Yamada 1955), les adipocytes et les cellules musculaires lisses (Gustavsson, et al. 1996), mais on les trouve dans presque toutes les cellules, hormis les lymphocytes. La purification des cavéoles couplée à l'immunocytochimie a montré qu'elles sont enrichies en cholestérol, en sphingolipides telle que la sphingomyéline (Rothberg, et al. 1990a) et en protéines ancrées à la membrane par un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Sargiacomo, et al. 1993) tels que le récepteur de l'acide folique (Anderson, et al. 1992) et la phosphatase alcaline placentaire. Le cholestérol est nécessaire à la formation des cavéoles (Chang, et al. 1992; Rothberg, et al. 1990a). En effet, leur formation et fonction sont inhibées par la déplétion en cholestérol ou par le traitement à la filipine, qui le complexe (Matveev, et al. 2001; Rothberg, et al. 1990a; Schnitzer, et al. 1994; Smart, et al. 1996; Smart, et al. 1994).

Le rôle des cavéoles dans l'endocytose reste incertain. Initialement, ces structures ont été impliquées dans la transcytose c'est à dire dans le transport de solutés à travers les cellules endothéliales, (Mellman 1996). Toutefois, il n'est pas clair si les cavéoles fusionnent simplement entre elles pour former les

canaux transendothéliaux (Frokjaer-Jensen 1980), ou si des vésicules autonomes se forment à partir des cavéoles. Les cavéoles sont directement impliquées dans l'internalisation de composants membranaires (glycosphingolipides, protéines), de ligands extracellulaires (acide folique, albumine) et de toxines bactériennes (toxine de choléra, toxine de tétanos) (Montesano, et al. 1982; Pelkmans and Helenius 2002; Rothberg, et al. 1990b; Sargiacomo, et al. 1993; Smart, et al. 1996).

1.2. L'ENDOCYTOSE DES GLYCOPROTEINES PAR LES CELLULES DE FOIE

Les cellules de foie sont pourvues de nombreux récepteurs qui sont, non seulement responsables de la réponse cellulaire aux divers stimuli, mais sont aussi impliqués dans l'endocytose de nombreux composants.

Parmi les récepteurs aux hydrates de carbone les plus connus, citons les récépteurs à galactose. Leur rôle majeur est de veiller à la disparition de glycoprotéines du plasma dont le galactose est démasqué (Ashwell and Harford 1982; Ashwell and Morell 1974; Berg, et al. 1985). C'est le cas de l'asialofétuine dont la structure glucidique est montrée à la Figure 2. Ces récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP) pourraient participer au maintien de l'homéostasie de l'organisme (Weigel 1994) .

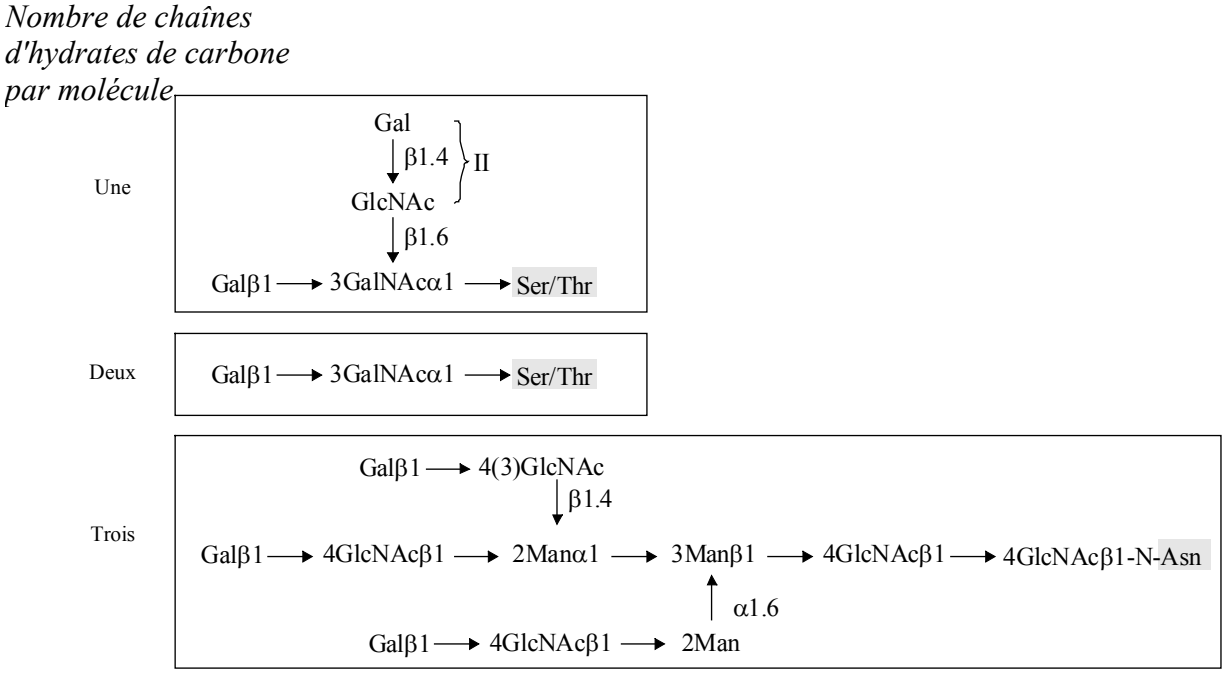


Figure 2. Structure des chaînes d'hydrates de carbone de l'asialofétuine*. Le nombre total de chaînes d'hydrates de carbone par molécule d'asialfétuine est de six, dont trois O-liées, de deux strructures différentes, et 3 N-liées (Wu AM, 2003)*

1.2.1. L'ENDOCYTOSE PAR LES HEPATOCYTES

Les glycoprotéines du plasma sont extraites sélectivement du sang si les extrémités galactose des chaînes d'hydrates de carbone, de type complexe, sont exemptes de l'acide sialique terminal (Ashwell and Morell 1974), normalement présent sur les glycoprotéines de type complexe comme la fétuine (Morell, et al. 1971), l'orosomucoïde et autres.

Les récepteurs à galactose des asialoglycoprotéines sont les premières lectines connues (Soukharev, et al. 2000) ; ils sont principalement présents sur les cellules parenchymateuses du foie (Park, et al. 2003; Wall, et al. 1980; Weigel 1993). Ce sont des hétéro-oligomères constitués de deux polypeptides de 46 Kda (H1) probablement et 50 kDa (H2) sous forme de trimère (2H1 et 1H2) (Bischoff, et al. 1988; Henis, et al. 1990; Shia and Lodish 1989; Spiess and Lodish 1985)

et qui possèdent un domaine exoplasmique COOH (Bischoff, et al. 1988; Spiess and Lodish 1985).

L'internalisation du récepteur à ASGP est constitutive et donc indépendante de la liaison du ligand (Schwartz, et al. 1984). Les asialoglycoprotéines se lient à ce récepteur membranaire et sont internalisées par l'intermédiaire des vésicules recouvertes de clathrine (Geuze, et al. 1983).

1.2.2. L'ENDOCYTOSE PAR LES CELLULES SINUSOÏDALES

D'une manière générale, les cellules de la paroi des capillaires sinusoïdes sont de quatre types: cellules endothéliales, cellules de Kupffer, cellules périsinusoïdales riches en vitamine A et en graisses, d'où leur nom *fat storing cell* et les cellules à granulation ou *pit cells* (Wisse, et al. 1996).

Les cellules endothéliales du sinusoïde diffèrent de celles des autres endothélium vasculaires de l'organisme en ce qu'elles n'ont pas de membrane basale et sont fenestrées, assurant aux hépatocytes un accès facile aux nutriments et aux macromolécules du plasma (Barbera-Guillem and Vidal-Vanaclocha 1988; Braet and Wisse 2002; De Leeuw, et al. 1990; Wisse 1970). L'existence de ces fenestrations a été vérifiée par Widman et Ogawa en microscopie électronique à transmission (Ogawa, et al. 1973; Widmann, et al. 1972). Ces fenestrations occupent 6 à 8 % de la surface endothéliale en microscopie électronique à balayage (Wisse, et al. 1985). Les cellules endothéliales interviennent aussi dans l'endocytose de molécules et de particules (Smedsrod, et al. 1994) et dans le métabolisme des lipoprotéines (Fraser, et al. 1995; Naito and Wisse 1978). Les protéines mannosylées comme l'invertase et la peroxydase sont reconnues par les cellules du système réticulo-endothélial possédant à leur surface des récepteurs à mannose/N-acétylglucosamine (Magnusson and Berg 1993; Smedsrod, et al. 1990; Stahl, et al. 1976).

Les récepteurs à mannose 6 phosphate participent à la capture et à la présentation des antigènes microbiens dans les macrophages et les cellules dendritiques (Avrameas, et al. 1996; Pontow, et al. 1992). Ils possèdent une affinité importante pour le D-mannose, L-fucose et les résidus N acetyl-glucosamine (Engering, et al. 1997; Sorensen, et al. 2001) et jouent un rôle majeur dans la biogenèse des lysosomes (Griffiths, et al. 1988; Kornfeld and Mellman 1989; Olson, et al. 2002; Rohrer and Kornfeld 2001; Seaman 2004).

En effet, les récepteurs à mannose sont concentrés dans les puits recouverts de clathrine et l'internalisation se produit même en l'absence du ligand (Wileman, et al. 1984). L'endocytose de l'invertase au niveau du foie a été bien étudiée par Stahl et al., Jadot et al. (Harding, et al. 1985; Jadot, et al. 1986; Stahl, et al. 1976). Le trajet intracellulaire des complexes ligands-récepteurs est celui de la voie classique de l'endocytose. Les ligands mannosylés se trouvent successivement associés aux puits recouverts et vésicules recouvertes, à un compartiment rappelant le CURL et à des endosomes multivésiculaires pour aboutir enfin aux lysosomes (Harding, et al. 1985).

1.3. LA TRANSFECTION ET SES ACTEURS

La transfection est utilisée actuellement *in vitro* et *ex vivo* et s'avère extrêmement importante d'un point de vue expérimental. Elle est également utilisée *in vivo* où elle est liée à la thérapie génique.

Vers les années 1980, la thérapie génique a été développée au début, surtout, pour corriger les maladies héréditaires monogéniques, telles l'hémophilie ou les myopathies. En septembre 1990, fut tenté pour la première fois par trois chercheurs américains un essai de thérapie génique sur une petite fille, atteinte d'une maladie génétique qui provoquait un effondrement total de ses défenses immunitaires. Cette déficience, due à l'absence d'une enzyme l'adénosine déaminase ou ADA nécessitait le maintien de l'enfant dans un environnement totalement stérile, en attendant une greffe de moelle ou, comme ce fut le cas,

une greffe génétique. Cette petite fille reçut une greffe de lymphocytes T (globules blancs qui assurent la défense immunitaire) dans lesquels avait été introduit le gène permettant de produire l'enzyme dont elle était dépourvue (Blaese, et al. 1995)

Après cette première tentative, les essais de thérapie génique se sont multipliés. Un groupe français mené par Alain Fischer et Cavazzana Calvo a pu soigner des "enfants bulles", enfants atteints d'une maladie génétique se traduisant par une deficience du système immunitaire combinée sévère (SCID) liée au chromosome X (XL-SCID) (Cavazzana-Calvo, et al. 2000a; Cavazzana-Calvo, et al. 2000b; Fischer 2000a; Fischer 2000b; Fischer, et al. 2000a; Fischer, et al. 2000b). Le XL-SCID compte pour plus de la moitié des SCID. Dans cette maladie, les éléments essentiels du système immunitaire, les lymphocytes T et les cellules tueuses NK ne sont pas produits car leurs cellules souches, dépourvues des récepteurs clés de plusieurs cytokines dont IL7 et IL15 les rendent incapables de se différencier et de se multiplier (Fischer, et al. 2000a). En effet dans XL-SCID le gène codant pour la sous unité γc de ces récepteurs subit des mutations. Or IL7 est requis pour le développement des cellules T et IL15 pour celui des cellules NK.

Sur le plan fondamental, la génétique moléculaire a permis de localiser et d'identifier les gènes dont la mutation est à l'origine d'affections graves, telles que la myopathie de Duchenne et de Becker (Bindoff and Gilhus 2003; Bogdanovich, et al. 2004; Braun, et al. 2000; Cereda, et al. 2004; Miike and Osawa 2004; Takeda 2004), la maladie de Steiner (Depardon, et al. 2001; Ueda, et al. 2000), la chorée de Huntington, (Emerich, et al. 1997a; Emerich, et al. 1997b), la mucoviscidose (Brennan and Geddes 2004; Gill, et al. 2004; Keswani and Crombleholme 2004; Kurre and Kiem 2000; Limberis, et al. 2002; Mall, et al. 2004a; Mall, et al. 2004b; Montier, et al. 2004; Parsons, et al. 2000; Parsons

and Williams 1996; Pin, et al. 2003; Williams, et al. 2001), la drépanocytose (Bank 2003; Conran, et al. 2004; Persons 2003) et bien d'autres.

Le transfert de gène ou transfection est une alternative thérapeutique qui pourrait représenter un formidable espoir pour traiter une multitude de maladies héréditaires et non-héréditaires (Mulligan 1993). Les déficiences et anomalies chromosomiques occupent une large part des maladies actuellement incurables par l'utilisation de la médecine conventionnelle. La capacité d'ajouter, remplacer ou enlever des gènes spécifiques pourrait fournir un nombre illimité d'opportunités, mais actuellement, le transport et la délivrance de gène demeurent un objectif difficile à atteindre.

Il est donc devenu essentiel de trouver et d'élaborer des moyens efficaces et sûrs pour conduire à une expression du gène correcteur dans les cellules cibles. Un des moyens est de complexer l'ADN avec des vecteurs.

D'une manière générale, il existe deux classes majeures de vecteurs, les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux (Kay, et al. 1997)

1.3.1. LES VECTEURS

1.3.1.1. LES VECTEURS VIRAUX

Les vecteurs viraux utilisent la capacité naturelle des virus à pénétrer dans les cellules et à transférer dans leur noyau leur matériel génétique. Les virus sauvages ont pour seule ambition au cours de leur cycle, d'infecter des cellules permissives afin de se répliquer et se propager, au détriment de la cellule infectée.

Les premiers vecteurs viraux employés pour le transfert de gène dérivent d'un groupe de rétrovirus infectant la souris (*murine leukemia virus*, MLV). L'application directe *in vivo* est d'une efficacité réduite car la cellule cible doit être en division pour que le transfert de gène ait lieu. Les vecteurs dérivés d'une

autre famille rétrovirale, les lentivirus et en particulier du VIH sont eux, capables de transfecter des cellules qui ne se divisent pas. Leur supériorité pour l'application directe *in vivo* (cerveau, rétine, muscle, foie) a été démontrée (Kafri, et al. 1997; Zufferey, et al. 1997). Les vecteurs adénoviraux demeurent les vecteurs les plus efficaces pour le transfert de gène *in vivo* (Cascallo and Alemany 2004; Connelly and Mech 2004; Van Heeckeren, et al. 2004; Zhu, et al. 2004), mais présentent de sérieux problèmes qui restreignent leur utilisation. L'infection par des adénovirus est commune dans la population humaine. Il en résulte, chez la plupart des sujets, une immunité qui rend difficile l'utilisation de ces vecteurs. Enfin, l'adénovirus n'est pas naturellement capable de maintenir son génome dans la cellule infectée et en conséquence, le gène transféré par un vecteur pourra être perdu au cours des divisions de la cellule cible.

1.3.1.2. LES VECTEURS NON VIRAUX

Les vecteurs non viraux devraient éviter certains problèmes se produisant avec des vecteurs viraux telles la recombinaison endogène de virus (Nusse 1990) et la réaction immune inattendue (Kay, et al. 1997). De plus, les vecteurs non viraux ont des avantages en terme de simplicité d'utilisation et de facilité de production à grande échelle.

Si le DEAE-dextran a été le premier composant synthétique utilisé pour la transfection il y a 35 ans passés, de nos jours, plusieurs vecteurs synthétiques ont été développé (Kaplan, et al. 1998; Liu, et al. 2004; Schenborn 2000). Les plus efficaces conduisent à la complexation et la compaction de l'ADN par des liaisons ioniques vecteur/ADN. Pour ce faire, des lipides cationiques, des polymères ou des peptides cationiques sont utilisés (Felgner, et al. 1987; Lee and Huang 1997). Les lipides cationiques se condensent spontanément avec l'ADN formant un complexe lipide-ADN (Felgner, et al. 1987). Il est montré que l'excès de charge positive ainsi formé est nécessaire pour une transfection efficace (Chesnoy and Huang 2000; Gao and Huang 1995). Les polymères

cationiques, par exemple, les polyamines, possèdent des fonctions amines primaires, secondaires et tertiaires, qui leur confèrent un large spectre de protonation et donc plus d'efficacité. En effet, les particules ADN/polyamine sont encore capables de se protoner, lorsqu'au cours de leur endocytose, elles se retrouvent emprisonnées dans les endosomes. Cet effet "d'éponge à protons" expliquerait l'activité endosomolytique associée à ces polyamines qui favorisent, de façon intrinsèque, un passage transmembranaire de l'ADN vers le cytosol. La polyéthylènimine (PEI) est la première polyamine qui a été développée selon ce concept, (Boussif, et al. 1995) ; il a été montré que ce vecteur est capable de délivrer des oligonucléotides ou des plasmides tant *in vitro* (Boussif, et al. 1996) que *in vivo* (Gautam, et al. 2000; Lecocq, et al. 2000; Rudolph, et al. 2000). Depuis, des conjugués PEI-ligands ont été réalisés pour diriger les complexes ADN/vecteur vers des cellules cibles exprimant les récepteurs membranaires des conjugués PEI-ligands (Kichler, et al. 2001; Laurent, et al. 1999; Lecocq, et al. 2000; Moret, et al. 2001).

1.3.2. LES METHODES PHYSIQUES DE TRANSFECTION

Actuellement, il est possible de ne pas faire appel à ces deux types de vecteurs viraux et non viraux pour véhiculer l'ADN dans les cellules, grâce à une nouvelle approche simple et sûre, issue d'une combinaison de techniques physiques telles que l'électroporation (Maruyama, et al. 2001; Somiari, et al. 2000), le bombardement des particules ou "gene gun" (Davidson, et al. 2000; Lin, et al. 2000), l'ultrasonication (Amabile, et al. 2001; Taniyama, et al. 2002), l'injection intramusculaire, (Wolff, et al. 1990) et l'injection hydrodynamique (Liu, et al. 1999; Zhang, et al. 1999).

Ces techniques ont prouvé leur aptitude à conduire à des expressions intéressantes même *in vivo*.

1.3.2.1. L'ÉLECTROPORATION

L'électroporation est utilisée de longue date pour réaliser *in vitro* la transfection cellulaire (Neumann and Rosenheck 1972; Wong and Neumann 1982). De plus, l'électroporation s'est avérée efficace pour délivrer *in vivo* un gène exogène. C'est une méthode qui rend la membrane plasmique perméable aux macromolécules grâce à une courte impulsion électrique de haut voltage qui assure la formation de pores transitoires (électroperméabilisation) et donc, ouvre aux macromolécules le passage vers le cytoplasme (Somiari, et al. 2000). Il est important de noter que, en appliquant simplement un champ électrique aux tissus, après injection d'ADN nu en intramusculaire, il y a :

1. Une augmentation de la capture d'ADN plasmidique ;
2. Les niveaux du transfert de gène et de l'expression de celui-ci s'élèvent de l'ordre de 100 à 1000 fois comparé à l'ADN injecté en absence d'électroporation (Mir, et al. 1999). Cette expression s'observe *in vivo* et persiste pendant un certain temps (Mir, et al. 1998).

Pour Herweijer H. et Wolff, le niveau d'expression du gène de la créatine kinase dans le muscle est au moins 10 fois plus fort, comparé à l'injection de l'ADN plasmidique correspondant sans électroporation et est accompagné d'une élévation de la créatine kinase dans le sérum (Herweijer and Wolff 2003). Il n'est pas clair si cette augmentation d'expression de transgène (particulièrement des protéines sécrétées) est due au transfert de gène dans les myofibres ou fibres musculaire, ou au transfert simultané dans d'autres cellules (par exemple, cellules endothéliales). Les niveaux d'expression sont considérés comme suffisants pour justifier davantage la recherche sur cette méthode de la thérapie génique, par exemple, les différents types de dystrophie musculaire: la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker (Chapdelaine, et al. 2000; Murakami, et al. 2003; Vilquin, et al. 2001; Wells, et al. 2003). Un autre avantage de cette technique est la possibilité d'optimaliser la réponse en modulant la quantité d'ADN administrée, la dimension et le nombre

d'électrodes, la force du champ électrique. L'une des cibles idéale de l'électroporation est la peau car l'administration y est facile (Drabick, et al. 2001) ; Drabick a proposé l'injection intra-dermale avec électroperméabilisation pour administrer l'ADN vaccin, Bachy et al. ont remarqué une augmentation de l'expression de l'hemagglutinine du virus influenzae après injection intra-dermale d'ADN nu suivi d'un électrotransfert et donc de l'efficacité de la vaccination (Bachy, et al. 2001). L'injection d'ADN simultanément à l'électroporation dans le muscle squelettique ou la peau, devrait augmenter l'efficacité des procédures d'immunisation par l'ADN (Niidome and Huang 2002). A part la peau, les reins (Tsujie, et al. 2001), les tumeurs (Rols, et al. 1998), la cornée (Blair-Parks, et al. 2002) sont aussi des organes cibles de cette application. Bien que les protocoles de l'électroporation aient été développés pour le muscles, une telle approche est devenue possible actuellement pour d'autres tissus vasculaires, pulmonaires (Dean 2003) et tumoraux (Rols, et al. 1998).

L'électroporation couplée à une injection systémique d'ADN nu conduit aussi à une expression importante dans **le foie** (Liu and Huang 2002). Récemment, un article a montré qu'il est possible de combiner l'injection hydrodynamique et l'électroporation amenant à une expression importante dans le foie de souris (Teissie 2002). D'autre part, une simple injection locale d'ADN au niveau d'un lobe de foie suivi d'un électrotransfert conduit aussi à une expression hépatique (Heller, et al. 1996; Suzuki, et al. 1998).

1.3.2.2. LE BOMBARDEMENT PAR DES PARTICULES

C'est une méthode développée au départ par Sanford et al. en 1987 pour délivrer un gène dans la plante (Klein, et al. 1992). La technique consiste à bombarder les cellules avec des billes d'or recouverte d'ADN; les billes d'or entraînent la pénétration de l'ADN à travers la membrane cellulaire dans le cytoplasme et arrivent au niveau du noyau, évitant ainsi le compartiment endosomal. Cette

technique a été appliquée avec succès pour la vaccination anti-rougeole (Polack, et al. 2000). Ces derniers temps, la majorité des efforts a été consacrée à la délivrance des gènes au niveau de la peau (Davidson, et al. 2000; Lin, et al. 2000) ou du foie (Muangmoonchai, et al. 2002; Yoshida, et al. 2000). Cependant, l'inconvénient de cette méthode est la pénétration peu profonde de l'ADN dans le tissu.

1.3.2.3. LES ULTRASONS

L'ultrasonication augmente la perméabilité de la membrane plasmique aux macromolécules. Une injection d'ADN suivie d'un traitement aux ultrasons (Amabile, et al. 2001; Newman, et al. 2001) augmente la capture de l'ADN. La flexibilité et la sécurité offertes par cette technique, rendent son application très avantageuse en pratique clinique. C'est une technique dont on peut se servir pour véhiculer un gène aux cellules vasculaires (Song, et al. 2002; Taniyama, et al. 2002) ou musculaires (Shohet, et al. 2000; Song, et al. 2002).

1.3.3. L'INJECTION D'ADN NU

Les études *in vivo* chez l'animal demeurent un élément critique pour l'étude de la fonction d'un gène et de la thérapie génique (Knapp and Liu 2004). Wolff et al., les premiers, ont découvert qu'une simple injection **intramusculaire** d'une molécule d'ADN nu *in vivo* menait à l'expression du gène d'intérêt par les cellules musculaires (Wolff, et al. 1990). Budker et al. ont publié en 1996 des résultats sur l'**injection intra-vasculaire** (intra-portale) d'ADN plasmidique nu avec expression dans les hépatocytes (Budker, et al. 1996). Trois années plus tard, il a été démontré que l'**injection systémique** d'ADN nu offre la possibilité d'une expression importante dans les hépatocytes de souris (Liu, et al. 1999; Zhang, et al. 1999), procédé nommé **injection hydrodynamique** (Liu, et al. 1999). Depuis, de nombreux chercheurs ont utilisé cette nouvelle méthodologie pour véhiculer l'ADN plasmidique nu (Kobayashi, et al. 2001; Lecocq, et al.

2003; Niidome and Huang 2002; Zhang, et al. 2001; Zhang, et al. 2004b), technique qui offre une alternative valable aux vecteurs viraux ou non viraux pour la transfection du foie (Knapp and Liu 2004). Nous examinerons successivement ces différentes voies d'administration.

1.3.3.1. L'INJECTION INTRAMUSCULAIRE

L'injection d'ADN nu *in vivo* sans recours à quelque type de vecteur que ce soit, remonte aux années 90. C'est en 1950 qu'a eu lieu avec succès le premier transfert efficace d'un gène par simple incubation d'ADN nu avec des cellules bactériennes (transfection *in vitro*). 40 ans plus tard, l'équipe de Wolff, en un travail réellement pionnier, ont démontré que l'expression d'un transgène peut être obtenue après injection directe de l'ADN nu dans le muscle squelettique (transfection *in vivo*) (Wolff, et al. 1990). Ce travail a ouvert la voie à de nombreuses recherches qui ont démontré l'aptitude de l'ADN nu porteur d'une cassette d'expression de fonctionner *in vivo*. C'est la base du concept de vaccination génique, un des meilleurs exemples de cette application (Liu and Ulmer 2000). Cette méthode est déjà efficace même avec une quantité faible de transgène de l'ordre de centième de microgramme (Kobayashi, et al. 2004; Ulmer, et al. 1999; Zhang, et al. 2004a).

On sait que l'efficacité du transfert de gène dans le muscle est relativement faible (muscles squelettiques ou cardiaques), ce transfert est limité presque exclusivement au site d'application et est surtout instable. Les tentatives d'augmenter la capture de l'ADN, par exemple, en induisant la régénération du muscle, n'ont pas abouti à des résultats satisfaisants pour un protocole de thérapie génique efficace au point de vue clinique. Ces dernières années, plusieurs travaux de laboratoire ont prouvé que l'ADN peut être délivré efficacement aux cellules *in vivo* après une injection intramusculaire suivie d'une électroporation (Bureau, et al. 2004). Le muscle a une forte densité de capillaires en contact étroit avec les myofibres. La livraison de l'ADN au muscle

par l'intermédiaire de ces capillaires éviterait sa dispersion dans l'espace interstitiel. Cependant, l'endothélium des capillaires musculaires est continu et dépourvu de fenestrations, ce qui le rend faiblement perméable aux solutés et particulièrement aux macromolécules.

1.3.3.2. L'INJECTION INTRA-VASCULAIRE ET PAR VOIE BILIAIRE AVEC OCCLUSION TRANSITOIRE

Suite au travail de l'équipe de Wolff, Budker et al. ont démontré que l'injection d'ADN plasmidique nu est capable de conduire à une expression importante, non seulement au niveau du muscle, mais aussi au niveau des hépatocytes (Budker, et al. 1996). Les auteurs ont montré dans ce travail qu'une expression importante par des cellules parenchymateuses du **foie**, après injection intraportale, peut être obtenue chez la souris à condition d'effectuer une occlusion transitoire de la veine hépatique. Cette expression a été observée non seulement chez le rongeur mais aussi chez le chien (Zhang, et al. 1997). Cette méthode *in vivo* a été étudiée par Zhang pour véhiculer l'ADN nu à partir des principaux vaisseaux efférents et afférents du foie. L'injection par voie rétrograde d'ADN nu dans une solution hypertonique (par la veine hépatique), avec occlusion de la veine porte ou l'injection par le cholédoque chez la souris conduisent à l'expression du transgène dans plus de 10 % des hépatocytes (Zhang, et al. 1997).

Par ailleurs la voie biliaire a été étudiée par Poussin et al. (Poussin, et al. 2002).

Le premier essai d' application d'une injection intravasculaire d'ADN nu est le traitement d'une **atteinte musculaire** du rat (Budker, et al. 1998). Cette méthode combine une injection intravasculaire rapide et un grand volume au niveau d'un membre avec occlusion transitoire des vaisseaux efférents. Le mécanisme précis de l'extravasation de l'ADN provenant de la circulation demeure encore inconnu. Ces auteurs ont avancé qu'il pourrait être lié à la

structure de l'endothélium vasculo-musculaire, structure à endothélium continu dépourvu de fenestrations. Rippe et al. soulignent que la membrane endothéliale du muscle est pourvue d'un grand nombre de petits pores de 20 à 30 nm de rayon (Rippe and Haraldsson 1994). Il a été suggéré que l'augmentation de la perméabilité vasculaire ne peut être que le résultat d'une augmentation de la taille ou du nombre de ces micropores vasculaires.

1.3.3.3. L'INJECTION HYDRODYNAMIQUE

Nous nous étendrons plus en détail sur ce processus puisqu'il concerne directement nos travaux. D'une manière générale, nous schématisons à la **figure 3** les différents chemins suivis par les molécules injectées.

L'injection hydrodynamique est un procédé relativement récent qui permet d'incorporer un gène étranger dans les hépatocytes de souris *in vivo* avec une expression très importante. La méthode consiste en une injection intraveineuse très rapide d'un grand volume d'une solution d'ADN plasmidique nu, c'est-à-dire, sans vecteur viral ou non viral (Liu, et al. 1999).

L'efficacité de la livraison du gène par injection hydrodynamique dépend du volume et la vitesse d'injection. Le volume optimal oscille autour de 10 % du poids corporel de la souris et la durée de l'injection doit se situer entre 5 et 7 secondes pour une souris de 15 à 20 g.

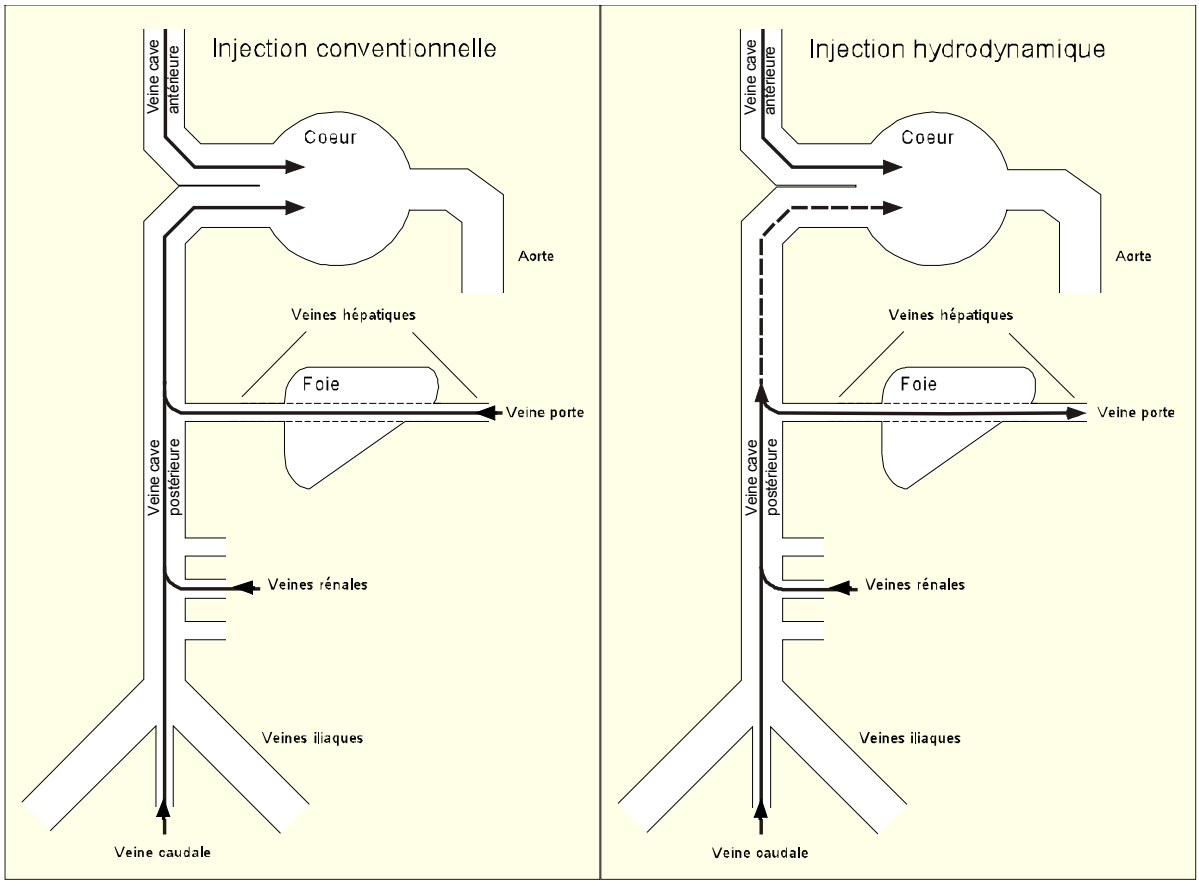


Figure 3. *Circulation veineuse en injection conventionnelle et en injection hydrodynamique*

1.3.3.3.1. Modifications physiologiques et biologiques

Le volume injecté qui correspond à peu près au volume total sanguin de la souris (Liu, et al. 1999; Zhang, et al. 1999) et la durée de l'injection qui se fait en un temps très court provoquent des perturbations importantes au niveau de la circulation. L'injection hydrodynamique induit un accroissement abrupt de la pression veineuse qui coincide avec une réduction du rythme cardiaque. La pression veineuse normale (en moyenne 12 mmHg chez la souris) atteint pendant l'injection un pic d'environ 40 mmHg lorsque le volume d'injection équivaut à 10% du poids corporel et retombe très rapidement à 10-15 mmHg au dessus de la pression normale. Cette première retombée rapide se poursuit par une diminution plus lente jusqu'à atteindre la pression veineuse normale (Fraser,

et al. 1980; Zhang, et al. 2004b). La chute rapide de la pression veineuse immédiatement après l'injection et la récuperation de la fonction cardiaque sont les indices d'une équilibration rapide de la pression veineuse. Par ailleurs une expansion significative du foie s'observe de même qu'un blanchissement du foie au moment de l'injection, lequel recupère ensuite sa couleur normale. Ceci suggère que la solution contenant l'ADN penètre dans le foie avant d'être mélangée au sang.

Au niveau du foie, des modifications transitoires de paramètres biologiques ont été observées après une injection hydrodynamique. Les enzymes sériques étudiés sont l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST), deux enzymes de référence en cas d'atteinte hépatique (Kobayashi, et al. 2004), ainsi que la phosphatase alcaline (ALP) et la biluribine (Liu, et al. 1999). Liu a montré que seule l'ALT est augmentée nettement le premier jour après l'injection ; le taux d'ALT diminue ensuite et retourne à la normale vers le troisième jour après l'injection. Cette observation a été faite sur des animaux ayant reçu une injection hydrodynamique du NaCl isotonique contenant ou non le gène d'intérêt (Liu, et al. 1999). Cette altération au niveau du foie n'est que transitoire car, très vite, un retour à la normale se fait quelques jours après l'injection (Liu, et al. 1999; Miao, et al. 2001; Rossmanith, et al. 2002).

Dans une étude réalisée récemment, Kobayashi a constaté une augmentation de l'ALT et de l'AST dès les 10 premières minutes suivant l'injection, augmentation qui persiste durant au moins 4 heures (Kobayashi, et al. 2004).

1.3.3.3.2. Mécanisme de facilitation de la transfection par injection hydrodynamique

Les études menées par Wolff et al. ont démontré que différents types de cellules parenchymateuses peuvent être transfectées via la circulation sanguine, mais c'est vers la moitié de l'année 1999, après le travail de Liu et al., que cette

approche intra-vasculaire s'est largement répandue (Budker, et al. 2000; Budker, et al. 1996; Hagstrom 2003; Herweijer and Wolff 2003; Herweijer, et al. 2001; Kobayashi, et al. 2004; Lecocq, et al. 2003; Liang, et al. 2004a; Liang, et al. 2004b; Liu, et al. 1999; Sato, et al. 2003; Zhang, et al. 1999).

Un nombre important de travaux ultérieurs ont tenté d'expliquer le mécanisme par lequel l'ADN nu accède aux hépatocytes et donne lieu à une expression importante après injection hydrodynamique (Knapp and Liu 2004; Zhang, et al. 2004b) (in press), (Kobayashi, et al. 2004) (in press), (Budker, et al. 2000; Kobayashi, et al. 2001; Lecocq, et al. 2003). Un travail réalisé dans notre laboratoire, après injection hydrodynamique de l'ADN plasmidique nu, a permis de démontrer qu'une quantité importante d'ADN reste intacte durant au moins 1 heure et est localisée à la face externe de la membrane plasmique, alors que l'expression du gène reporter est indépendante de cet ADN extracellulaire (Lecocq, et al. 2003; Lecoq 2003). En effet des hépatocytes isolés 2 minutes après l'injection hydrodynamique d'ADN plasmidique codant pour la luciférase et traités à la désoxyribonucléase restent à même d'exprimer la luciférase, sans que l'action de la désoxyribonucléase ne diminue en rien le taux d'expression de l'enzyme (Andrianaivo 2004; Lecocq 2003; Lecocq, et al. 2003).

Un phénomène qui, vraisemblablement, joue un rôle est la dilatation des fenêtres endothéliales des sinusoïdes hépatiques organisées en "sieve plates" sous l'influence de la pression, facilitant l'entrée de l'ADN plasmidique dans l'espace de Disse et de ce fait son accès aux hépatocytes (**figure 4**). Toutefois, cela s'avère insuffisant. En effet, même après une injection conventionnelle, une fraction d'ADN aboutit aux hépatocytes, sans que cela ne conduise à une expression (Lecocq, et al. 2003). Il faut également noter que l'ADN plasmidique nu est incapable de s'exprimer si on l'ajoute au milieu de culture d'hépatocytes, où aucune barrière d'accès aux cellules n'est présente. Par contre, une bonne expression est obtenue si l'ADN est complexé à un vecteur lipide cationique, qui

facilite son entrée dans le cytosol d'hépatocytes en culture (Lecocq 2003). Il est, par conséquent, très vraisemblable que l'injection hydrodynamique doive son efficacité au fait qu'elle facilite l'entrée de l'ADN dans le cytosol des hépatocytes.

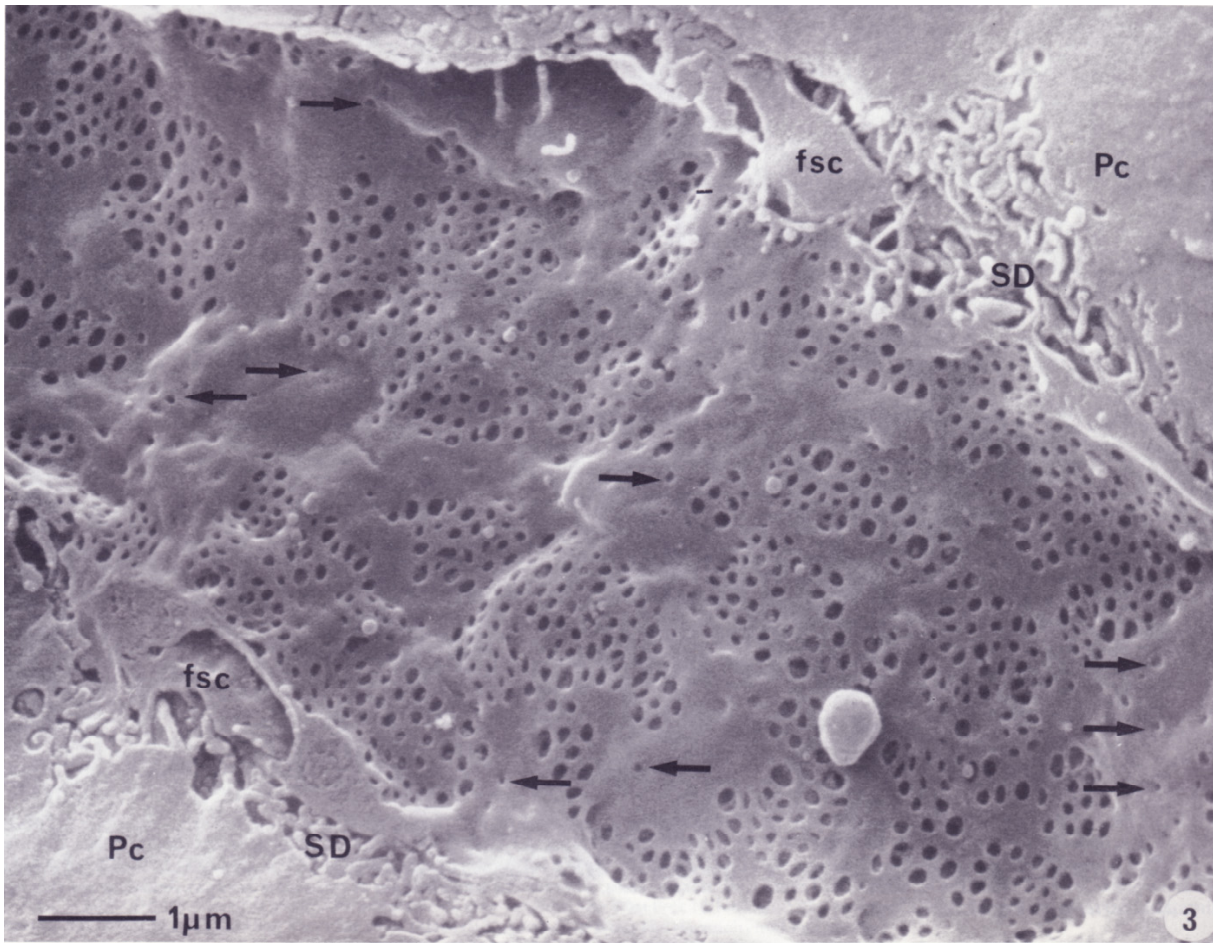


***Figure 4**. Micrographie électronique montrant la differénce de taille des fenestrations qui sont organisées en "sieve plates". On peut également observer les puits mantélés sous forme de dépressions (flèches), les "fat storing cells" (fsc) et les cellules parenchymateuses avec de nombreuses microvillosités visibles au niveau de l'espace de Disse (SD)(Wisse, et al. 1985).*

La grande question que nous nous sommes posée au début de notre travail est :

"EN QUOI CONSISTE CETTE FACILITATION ?"

En effet, vu la taille et l'hydrophilie de la molécule, l'entrée normale d'ADN nu dans la cellule doit se faire par endocytose. Cet ADN doit sortir ensuite de

l'appareil endocytaire pour atteindre le cytosol. S'il est associé à un vecteur viral, c'est l'appareil spécialisé du virus qui lui permet de s'échapper du système endosomo-lysosomal ou éventuellement d'entrer dans la cellule directement, après fusion de la membrane plasmique avec la membrane virale (virus HIV). S'il est complexé à un vecteur non viral, ce sont les propriétés membranolytiques de ce vecteur, un lipide cationique par exemple, qui vraisemblablement, interviennent. Dans le cas qui nous préoccupe, l'ADN est nu, son entrée dans la cellule et dans le cytosol ne peut être facilitée que par la pression hydrodynamique résultant de l'injection.

D'autre part, le foie est l'organe cible d'une injection hydrodynamique. En effet, dans ces conditions, la transfection par un gène reporter est maximal dans le foie. Elle est 10^4 fois plus faible dans le rein, 10^5 fois plus faible dans le poumon et dans le cœur et 10^6 fois plus faible dans la rate. C'est pourquoi, nous ferons ici un bref rappel de la structure du foie de souris, organe-clé, lors d'une transfection hydrodynamique (Budker, et al. 1998; Kobayashi, et al. 2004; Lollo, et al. 1997).

1.3.3.3.3. Le foie : organe cible de l'injection hydrodynamique

Le foie, en particulier les cellules hépatiques, est non seulement le siège principal de différentes voies métaboliques importantes concernant les protéines, les glucides, les lipides, mais est aussi caractérisé par la richesse de sa vascularisation. D'autre part, il est clair que le foie est un organe extrêmement intéressant pour la transfection (Budker, et al. 1998; Lollo, et al. 1997) et en particulier les hépatocytes car ces cellules expriment le transgène avec une haute efficacité. Cela devrait permettre de corriger un gène déficient dans le foie ou d'exprimer des protéines sériques synthétisées par cet organe.

Le foie consiste en une multitude d'unités fonctionnelles individuelles appelées lobules. Chaque lobule est limité par des espaces portes, là où se rejoignent la veine porte et l'artère hépatique.

La vascularisation du foie est assurée par deux principaux vaisseaux afférents (**figure 5**). : la veine porte qui assure la majorité du débit sanguin total et l'artère hépatique qui apporte le reste. De petites branches de chaque vaisseau (la veinule portale terminale et l'artériole hépatique terminale) pénètrent dans l'acinus au niveau de l'espace porte. Puis, le sang circule dans les sinusoïdes entre les lames d'hépatocytes vers la veinule hépatique terminale où le sang provenant de plusieurs acini adjacents converge. Les veinules hépatiques terminales convergent pour former les veines sus-hépatiques qui transportent tout le sang efférent vers la veine cave inférieure. La paroi sinusoïdale est fenêtrée (Wisse 1970); cette fenestration permet aux nutriments d'atteindre l'espace de Disse intermédiaire et de là, l'hépatocyte (Braet, et al. 1995; Braet and Wisse 2002; Wisse, et al. 1996; Wisse, et al. 1985). **Les hépatocytes** constituent la plus grande partie de l'organe. Ils sont organisés en travées de 15 à 25 cellules de long, longées par les sinusoïdes et délimitées d'une part, par la veine centrolobulaire et d'autre part, par l'espace porte. Celui-ci contient une veinule portale et une artériole hépatique. Le sang amené par ces vaisseaux emplit le côté porte des sinusoïdes, perfuse la travée d'hépatocytes de façon unidirectionnelle, quitte la travée hépatique par la veine centrolobulaire et retourne à la circulation systémique. On distingue les hépatocytes voisins de l'espace porte et les hépatocytes proches de la veine centro-lobulaire.

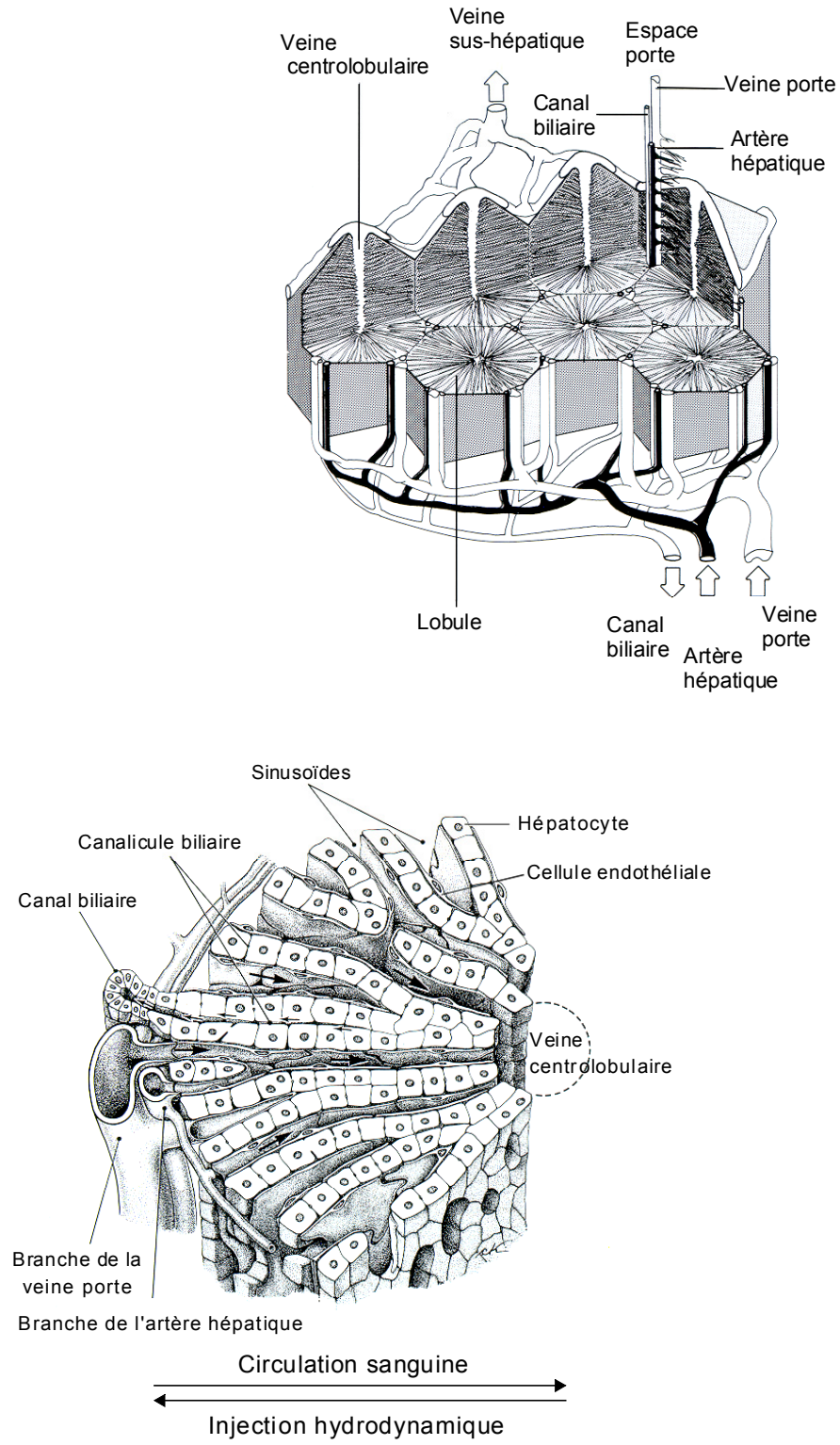


Figure 5a et b. *Vascularisation hépatique et système biliaire. Le sang apporté au foie par la veine porte et l'artère hépatique circule dans les sinusoïdes et aboutit à la veine centrolobulaire. La bile est sécrétée à travers le réseau de canalicules biliaires et est drainée vers le canal biliaire.*

Les cellules sinusoïdales sont de quatre types cellules endothéliales, cellules de Kupffer, cellules périsinusoïdales riches en graisses "fat storing cells" et cellules à granulation (Wisse, et al. 1996):. **Les cellules endothéliales** du sinusoïde diffèrent de celles des autres endothélium vasculaires de l'organisme en ce qu'elles n'ont pas de membrane basale et sont pourvues de **fenestrations** (Barbera-Guillem and Vidal-Vanaclocha 1988; Braet and Wisse 2002; De Leeuw, et al. 1990; Ogawa, et al. 1973; Widmann, et al. 1972; Wisse 1970), agencées en *sieve plates* et assurant aux hépatocytes un accès facile aux nutriments et aux macromolécules du plasma. Ces **fenestrations** endothéliales sont des structures dynamiques (Braet and Wisse 2002), elles jouent un rôle important dans le maintien des hépatocytes et le fonctionnement du foie en général (Wisse, et al. 1985). Des études ont montré l'impact des différentes conditions physio-pathologiques sur les fenestrations telles la cirrhose hépatique due à l'endotoxine bactérienne, des troubles de la cholesterolémie (Dobbs, et al. 1994; Fraser, et al. 1980; Mori, et al. 1993; Steffan, et al. 1995; Vidal-Vanaclocha, et al. 1990). **Les cellules de Kupffer**, fusiformes, sont des macrophages tissulaires. Elles constituent une partie importante du système réticulo-endothélial (Kawai, et al. 1998; Smedsrod, et al. 1994; Wake, et al. 2001). Parmi leurs principales fonctions se trouvent la phagocytose de particules étrangères, l'élimination d'endotoxines et d'autres substances nocives et la modulation de la réponse immunitaire par la libération de médiateurs et d'agents cytotoxiques. **Les cellules périsinusoïdales** riches en graisses (cellules d'Ito) emmagasinent la vitamine A. Elles se transforment en fibroblastes en réaction aux lésions hépatiques, jouant ainsi un rôle important dans la fibrose hépatique. Elles jouent également un rôle important dans le stockage d'ester de rétinol (Geerts, et al. 1990). **Les cellules à granulation**, *pit cells* qui représentent les cellules les moins nombreuses de la paroi sinusoïdale, sont de gros lymphocytes granuleux qui agissent comme cellules tueuses naturelles.

1.3.3.3.4. Les obstacles à franchir par l'ADN nu lors de l'injection hydrodynamique.

Les hypothèses qui tentent d'expliquer l'efficacité de l'injection hydrodynamique et donc la levée des obstacles à franchir concernent **l'action des nucléases, le franchissement de la barrière endothéliale et de la membrane plasmique et la traversée du cytoplasme** avant d'aboutir au noyau.

Avant d'atteindre sa cible, l'ADN doit franchir différents obstacles. L'un des premiers, et non des moindres, est d'éviter l'action des nucléases présentes dans le sang. Il est bien connu qu'après son administration parentérale, l'ADN est très rapidement dégradé par les nucléases présentes dans le sang (Houk, et al. 1999; Houk, et al. 2001). Comment après une injection hydrodynamique l'ADN échappe-t-il à l'action de ces enzymes ?

1. Les murs formés par l'endothélium avec des fenestrations d'une taille d'environ 100 nm séparent la solution d'ADN de leur cible, les hépatocytes (Zhang, et al. 1999). En effet, la taille d'un plasmide sous forme superenroulée est de plus ou moins 190 nm (Yoshida, et al. 1987) et sous la forme *open circular* d'environ 400 nm.

2. La membrane plasmique (Liu and Knapp 2001) limite l'accès au noyau des macromolécules qui sont préférentiellement internalisées par endocytose et sont sujettes à la dégradation par le système lysosomal. Une alternative à l'endocytose est-elle à envisager ?

3. Le franchissement du cytoplasme et l'arrivée au noyau. Vu la taille d'un plasmide, son coefficient de diffusion est très faible et donc le transfert au noyau doit être très lent.

Nucléases

Le premier obstacle, à savoir l'action des nucléases sanguines, serait évité de la façon suivante. Lorsque l'on utilise l'injection hydrodynamique, l'ADN pénètre dans la veine caudale dans un grand volume équivalent au volume sanguin, à une vitesse relativement élevée, ce qui empêche le mélange immédiat de la majorité de l'ADN avec le sang. De plus, le gros volume d'ADN qui entre dans la veine cave inférieure dépasse très rapidement la capacité du cœur et l'accumulation du volume injecté augmente la pression au niveau veineux. Cette pression excède la pression sanguine normale entre la veine porte et la veine hépatique : le sang reflue dans le sens rétrograde et la solution d'ADN aboutit au foie. Donc, les molécules d'ADN aboutissent au foie avec peu ou pas de contact avec les composants du sang (Liu and Knapp 2001)**.**

Le mur endothélial

Comment l'ADN traverse-t-il le mur des cellules endothéliales et aboutit-t-il aux hépatocytes ?

Les capillaires du foie, appelés sinusoïdes, sont bordés d'une couche unique de cellules qui forment une barrière entre le sang et le parenchyme hépatique. Elles sont pourvues de fenestrations d'un diamètre de plus ou moins 100 nm en microscopie éléctronique à balayage et de 175 nm ou 145 nm en microscopie électronique à transmission dans les zones péri-portales et centro-lobulaires respectivement (Braet and Wisse 2002; Wisse, et al. 1985; Wisse, et al. 1983). Ces fenestrations sont organisées en *sieve plates*. C'est là que se font les échanges entre le sang et le parenchyme hépatique, échange contrôlé et régulé par la dimension physique de la substance (Braet and Wisse 2002; Fraser and Bowler 1975; Fraser, et al. 1995; Naito and Wisse 1978). Pour un plasmide dont le poids moléculaire se situe entre 3.10^6 et 4.10^6 Daltons, la dimension sous la forme superenroulée est de plus ou moins 200 nm et d'environ 400 nm sous la forme *open circular* (Yoshida, et al. 1987). Par contre, des protéines de grande taille avec de nombreuses sous-unités telle que Gro EL (chaperonine) d'un poids

moléculaire de 840 kD a une dimension de 15x14 nm, (Garrett and Grisham 2000). L'hémoglobine d'un poids moléculaire de 64500 Daltons a un diamètre de 5,5 nm (Lehninger 1993).Le poids moléculaire de la fétuine varie selon les auteurs entre 44600 et 48400 Daltons et 22 % de son contenu sont des hydrates de carbone (Schultze and Heremans 1964) donc sa dimension peut être estimée à ± 5 nm, pour Price le poids moléculaire de la fétuine est de l'ordre de 59000 Daltons (Price and Lim 2003). Sur cette base, les fenestrations du foie constituent une barrière physique pour l'ADN, mais non pour des protéines même de dimensions importantes. Puisque l'injection hydrodynamique permet une transfection efficace, la preuve existe que cette barrière est franchie à l'aide de la pression induite par une injection rapide d'ADN dans un grand volume. Par exemple, le diamètre des fenestrations pourrait être agrandi sous l'effet de la pression développée qui est au moins de 40 mmHg dans le cas d'une injection hydrodynamique (Frenzel, et al. 1977; Zhang, et al. 2004b). D'autre part, on ne peut exclure que sous l'effet de la pression le domaine apical des hépatocytes ne devienne accessible aux solutés injectés. En effet, les jonctions intercellulaires, jonctions serrées, desmosomes et *gap junctions* pourraient ne pas résister à la pression hydrodynamique exercée.

Alternative à l'endocytose

Comment l'ADN pénètre-t-il dans l'hépatocyte ? L'injection hydrodynamique pourrait favoriser l'entrée de l'ADN par l'une ou l'autre zone apicale ou basolatérale, sous l'action de la pression locale fortement augmentée.

L'entrée de l'ADN dans l'hépatocyte pourrait aussi être facilitée par une endocytose accrue. Budker et al. ont avancé l'hypothèse de l'implication d'un récepteur à ADN (Budker, et al. 2000) . Cependant, ceci nécessite un trajet différent de la voie classique de l'endocytose pour au moins une partie de l'ADN, afin d'éviter l'aboutissement aux lysosomes et la dégradation inévitable

de l'ADN. Par ailleurs, l'hépatocyte est polarisé et sa membrane plasmique est subdivisée en zone basolatérale (sinusoïdale) et apicale (canaliculaire). Le domaine sinusoïdal est plissé en microvillosités et fait face à l'espace de Disse (espace entre l'hépatocyte et le mur des cellules endothéliales), la zone apicale est renforcée par différents types de jonctions serrées et desmosomes et les gap junctions. On peut supposer que la pression générée par l'injection hydrodynamique et la transmission à travers les fenestrations élargies étirent les microvillosités et provoque l'apparition des trous ou pores ou la rupture de la membrane plasmique poussant de ce fait l'ADN dans la cellule. Les pores pourraient se résoudre lorsque la pression retombe et de toutes façons, le contenu cellulaire ne pourrait pas s'échapper de la cellule, vu la pression élevée. Ceci implique aussi que, du moins pour les hépatocytes qui expriment la protéine encodée par l'ADN et qui survivent donc à cette injection hydrodynamique, la membrane plasmique doive nécessairement recouvrer une structure intacte.

La traversée du cytoplasme vers le noyau

Le dernier obstacle est la traversée du cytoplasme vers le noyau. Comment l'injection hydrodynamique pourrait-elle accélérer ce passage ? On peut supposer que le volume de liquide qui pénètre dans l'hépatocyte ait un effet positif et accelère le transfert au noyau.

L'équipe de Kobayashi suggère que le volume de solution qui pénètre dans l'hépatocyte joue un rôle dans l'expression du gène (Kobayashi, et al. 2004). Pour tester cette possibilité, le plasmide porteur du gène reporter GFP (*Green Fluorescent Protein*) a été micro-injecté dans des hépatocytes en culture dans des volumes croissants et l'expression du gène d'interêt examinée 6 heures plus tard (Kobayashi, et al. 2004). Le pourcentage des hépatocytes exprimant la GFP augmente avec le volume micro-injecté.

1.4. OBJET DU TRAVAIL

Comme nous venons de l'indiquer, le mécanisme de la transfection hydrodynamique est encore mal connu car le mode d'entrée de l'ADN plasmidique dans l'hépatocyte et son cheminement intracellulaire n'ont pas été clairement élucidés. Normalement une telle molécule vu sa taille et son hydrophilicité doit entrer dans la cellule par endocytose. S'il en est ainsi, pourquoi l'injection conventionnelle du plasmide ne conduit-elle à aucune expression? Le problème de l'effet de l'injection hydrodynamique sur l'endocytose de l'ADN par le foie est par conséquent important à étudier . Deux difficultés majeures se présentent dans une telle étude. La première résulte de ce que l'ADN est capté non seulement par les hépatocytes mais également, et même préférentiellement par les cellules sinusoïdales. Or, l'expression après injection hydrodynamique ne se manifeste que dans les hépatocytes. Il faut donc pouvoir identifier la fraction d'ADN plasmidique captée par le foie qui est associé aux hépatocytes. La seconde difficulté provient du fait que les fenêtres de l'endothélium des sinusoïdes hépatiques limitent jusqu'à un certain point l'entrée du plasmide dans l'espace de Disse (nécessaire à sa capture par les hépatocytes) et que la taille de ces fenêtres risque d'être affectée par la pression hydrodynamique. Une étude extensive de la question a été réalisée par M. Lecocq dans notre laboratoire (Lecocq 2003; Lecocq, et al. 2003). Ses résultats apportent des précisions intéressantes sur la capture par le foie et le cheminement intracellulaire du plasmide après injection hydrodynamique sans permettre toutefois de préciser avec certitude quel mécanisme est à la base de l'efficacité de la transfection hydrodynamique. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier d'une façon plus générale l'effet éventuel de l'injection hydrodynamique sur la capture de protéines par le foie et leur cheminement intracellulaire. Les raisons sont les suivantes:

a) L'endocytose des protéines par le foie est très bien connue et a été très étudiée par des méthodes telles que celles que nous utilisons couramment au laboratoire.

b) Suivant le type de protéine, elle se fera spécifiquement par les hépatocytes ou par les cellules sinusoïdales, ce qui nous permettra d'étudier l'influence de l'injection hydrodynamique sur l'endocytose par ces deux types de cellules.

c) La taille des molécules protéiques est telle que leur passage dans l'espace de Disse se fait sans problème et l'influence de la pression hydrodynamique sur les fenestrations de l'endothélium des sinusoïdes n'est pas à considérer.

d) Outre l'intérêt d'une telle approche pour mieux comprendre le mécanisme de la transfection hydrodynamique, il existe un intérêt plus direct: celui de rechercher si l'injection hydrodynamique ne pourrait être utilisée pour introduire des protéines (et peut-être d'autres macromolécules) dans les hépatocytes.

Certains résultats que nous avons obtenus nous ont conduit à réinvestiguer certains aspects de la capture et du cheminement intracellulaire de l'ADN plasmidique utilisé lors de la transfection hydrodynamique et de leur relation avec l'expression.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. LES INJECTIONS

2.1.1. INJECTION HYDRODYNAMIQUE ET CONVENTIONNELLE

Les injections se font sur des souris NMRI femelles (Charles River, IFFA Credo, Belgique) anesthésiées (voir plus loin) d'un poids entre 20 et 24 g et maintenues dans une atmosphère de 37° C durant une vingtaine de minutes. Les injections se font par la veine caudale à raison de 3,3 µg par injection d'asialofétuine -^{125}I, asialofétuine-tyramine cellobiose-^{125}I, invertase-^{125}I et de 5 µg d'ADN non marqué additionné de 0,25 µg d'ADN marqué au ^{35}S. Les protéines (ou l'ADN) sont dilués soit dans un volume de 2 ml de NaCl isotonique (injection hydrodynamique), soit dans un volume de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les injections se font en 5 secondes maximum. Le volume de 2 ml correspond à 8 % du poids d'une souris de 25 g ; ce volume est adapté au poids de la souris et est donc, par exemple, de 1,6 ml pour une souris de 20 g. Après l'injection hydrodynamique, les souris reçoivent une assistance respiratoire durant une quinzaine de minutes.

Les hépatocytes sont isolés directement endéans les 2 minutes qui suivent l'injection. Les expériences se font avec des souris NMRI femelles d'un poids entre 20 et 24 g ; elles sont anesthésiées par une injection sous-cutanée de Medetomidine HCl dilué 10 fois dans du NaCl isotonique à raison de 0,006 ml/gr du poids corporel de l'animal (*Orion, Espoo, Finlande*), suivie 5 minutes plus tard par une injection intrapéritonéale de Kétamine HCl diluée 10 fois dans du NaCl isotonique à raison de 0,012 ml/gr du poids corporel (*Rhône Mérieux, Bruxelles, Belgique)*.

L'isolement des cellules de foie est réalisé selon la technique décrite par Seglen (Seglen 1976), sauf que la perfusion se fait par la veine cave cannulée par un catheter (*20G, Angiocath Becton Dickinson, Sandy, Utah 84070*) et que le

liquide de perfusion s'écoule par la veine porte, sectionnée auparavant. Cette perfusion rétrograde via la veine cave inférieure (en sens opposé à la circulation normale) (10 ml/minutes à 37° C) débute avec un milieu dépourvu de Ca^{++} (Tampon de perfusion) durant 4 minutes afin de disloquer les contacts intercellulaires, elle se poursuit durant 8 minutes avec le tampon collagénase (*Worthington, Lakewood, USA*) qui dissout la matrice extracellulaire. Après l'arrêt de la perfusion, le foie est prélevé et les cellules libérées au moyen d'un peigne à chien, resuspendues dans le tampon de suspension et filtrées sur un filtre de nylon de 250 µm.

2.1.2. DOUBLE INJECTION

Une double injection a été réalisée comme suit : la souris reçoit une injection hydrodynamique de NaCl suivie à des temps variables d'une injection conventionnelle contenant le composé étudié : l'asialofétuine, l'asialofétuine-tyramine cellobiose, l'invertase ou l'ADN.

2.1.3. INJECTION DE TRITON WR-1339

Les souris reçoivent une injection intrapéritonéale ou intraveineuse de 0,1 ml de Triton WR-1339 à 17 % 4 jours avant l'injection conventionnelle ou hydrodynamique (Wattiaux 1963).

2.2. MARQUAGES AUX ISOTOPES RADIOACTIFS

2.2.1. MARQUAGE DE L'ADN

La technique de *nick translation* a été utilisée pour **marquer sélectivement le plasmide** pCMV-Luc. La réaction de *nick translation* est basée sur la triple activité que possède l'ADN polymérase I de bactéries E. Coli : activité de polymérase dans le sens 5'-3', d'exonucléase 5'-3' et d'exonucléase 3'-5'. La réaction de *Nick Translation* utilise la capacité de l'ADN polymérase I de coupler ces deux premières activités de façon à ajouter séquentiellement des

nucléotides à l'extrémité 3' d'une encoche (*nick*) dans un double brin d'ADN, tout en éliminant des nucléotides à l'extrémité 5' voisine. Les entailles sont introduites de manière aléatoire par la désoxyribonucléase pancréatique I (DNAse I) de sorte que l'effet net est de produire une population de molécules uniformément marquées.

Le marquage du plasmide avec le ^{35}S-dATP marqué en α (*ICN, Costa Mesa, USA*) est réalisé selon le protocole prévu par le fabricant (*Amersham Pharmacia Biotech kit 5500 for preparation of radioactive or non radioactive probe*) sauf que la quantité de plasmide est multipliée par 10 et que l'on rajoute un excès de 10 unités d'ADN polymérase I (*Promega, Madison, USA*). Ces modifications n'altèrent pas la capacité du plasmide d'induire l'expression de la luciférase.

La réaction de *nick translation* est réalisée dans un volume total de 100 µl contenant les réactifs suivants :

- 10 µl d'une mixture de dNTP 1mM chacun (sauf le dATP) ;
- 10 µl d'un tampon Tris 500 mM, pH 7,5, $MgSO_4$ 100 mM, Dithiothreitol 1 mM, sérum albumine bovine 0,5 % ;
- 10 µg de plasmide ;
- 2 µl de mixture enzymatique (10 pg/µl de DNAse I et 0,5 unités/µl d'ADN polymérase I) ;
- 2 µl d'ADN polymérase I (10 unités) ;
- 5 µl de ^{35}S-dATP marqué en α dont l'activité spécifique est supérieure à 1000 Ci/mmole ;
- 61 µl d'eau.

On incube cette préparation à 15°C durant 2 heures. La réaction est ensuite arrêtée en ajoutant 4 µl d'EDTA 0,5 M pH 8 et l'ADN est précipité à l'éthanol (100 µl d'acétate d'ammonium 4 M pH 4,5 et 800 µl d'éthanol absolu glacé). La précipitation s'effectue à –70°C durant au moins 30 minutes. Après une centrifugation à 13000 RPM (*Biofuge, Hereaus*) durant 15 minutes en chambre froide, on élimine le surnageant. On ajoute au culot 800µl d'une solution

d'acétate d'ammonium 0,67 M pH 4,5 contenant 67 % d'éthanol et on effectue la même centrifugation, le culot est lavé une dernière fois avec 800 µl d'éthanol 90 % et on centrifuge une dernière fois. On sèche alors le culot sous vide (*Hetovac VR-1, Heto*) et on le resuspend dans 200 µl de tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4). Un échantillon de 2 µl sert à contrôler la radioactivité et un autre à réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % pour vérifier la taille du plasmide.

2.2.2. MARQUAGE DE L'ASIALOFETUINE ET DE L'INVERTASE

2.2.2.1. MÉTHODE À LA CHLORAMINE T

Le marquage de **l'asialofétuine et de l'invertase** à l'iode 125 s'effectue selon la méthode à la chloramine T (Greenwood, et al. 1963). Tous les composés sont dissous dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. En bref, dans un tube Eppendorf, on ajoute à température ambiante, à 100 µg de protéine dans un volume de 100 µl, 5 µl de NaI^{125} (5mCi, Amersham) et 100 µg de Chloramine T dans un volume de 100 µl ; après 3 minutes, on ajoute 100 µg de métabisulfite de sodium dans un volume de 100 µl. On dépose ensuite, immédiatement, le milieu réactionnel sur une colonne PD10 (Séphadex G-25M-Pharmacia) lavée au préalable avec 25 ml de tampon phosphate / sérum albumine bovine à 1 %, en prenant soin de rincer le contenu du tube Eppendorf 3 fois avec 100 µl de tampon phosphate; la colonne est ensuite éluée avec ce même tampon. La protéine marquée se retrouve après le volume mort (vers 4 ml de l'éluat).

2.2.2.2. MARQUAGE DE LA TC ET LIAISON À L'ASF

Le marquage de la **tyramine cellobiose**, **ainsi que sa liaison ultérieure à l'asialofétuine**, est réalisé selon (Pittman, et al. 1983) modifié par (Hysing and Tolleshaug 1986). Le marquage se fait en 2 étapes : 1) Marquage de la tyramine cellobiose: 10µg d'iodogène, dissous dans 1µl d'acétonitrile fraîchement distillé, sont déposés dans un tube Eppendorf et l'acétonitrile est évaporé. Ensuite, 30

nMoles de tyramine cellobiose dissoutes dans le tampon phosphate (0,02 M pH 7,2) y sont additionnées, puis 10 mCi de NaI^{125}. Après une attente de 30 minutes, la réaction est stoppée par l'addition de 5 µl de KI 0,1 M et 10 µl de Na_2SO_3 0,05 M. 2) Durant la seconde étape se réalise le couplage de la tyramine cellobiose marquée à la protéine d'intérêt. A cet effet, dans un deuxième tube Eppendorf contenant 20 µl de Trichlorotriazine 1,5 mM, on ajoute le contenu du premier tube Eppendorf et 5 µl de NaOH 10 mM et 30 secondes plus tard, 2 mg de la protéine à marquer dissoute dans 20 µl de tampon phosphate 0,1 M. Après 10 minutes, le contenu de ce tube est déposé sur une colonne PD 10 (voir le marquage de l'asialofétuine et de l'invertase).

2.3. PURIFICATION ET MARQUAGE DU PLASMIDE

Le plasmide utilisé pour la transfection et les expériences concernant l'ADN est le pCMV-Luc qui encode pour la luciférase et contient le promoteur fort du cytomégalovirus (CMV) (Sobolev, et al. 1998). Ce plasmide est obtenu après électroporation de bactéries DH5α compétentes et est purifié selon le protocole fourni avec le Qiafilter Plasmid Maxi kit (*Qiagen, Hilden, Allemagne*).

2.4. EXTRACTION DE L'ADN ET LA RADIOACTIVITE

Les foies de souris sont homogénéisés dans le tampon de lyse (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 100 mM, SDS 0,5 %). A 600 µl d'homogénat, on ajoute 2 µl de ribonucléase A (correspondant à 20 µg), après une incubation de 1 heure à 37°C, on y additionne 15 µl de protéinase K (correspondant à 150 µg) et on procède à une deuxième incubation à 55°C, cette fois durant 5 heures. Après une centrifugation de 40 minutes à 13000 RPM (Biofuge en chambre froide), on récupère un premier surnageant traité ou non à l'acide perchlorique glacé à 5 %. Un aliquot traité à l'acide perchlorique est centrifugé dans les mêmes conditions et le deuxième surnageant ainsi obtenu permet de déterminer la radioactivité

acido-soluble. La radioactivité totale est mesurée sur le premier surnageant non traité à l'acide perchlorique (adapté d'après Liu et al. 1997).

2.5. ISOLEMENT DES CELLULES DU FOIE

Les hépatocytes.

Les expériences se font avec des souris NMRI femelles d'un poids entre 20 et 24 g ; elles sont anesthésiées par une injection sous-cutanée de Medetomidine HCl dilué 10 fois dans du NaCl isotonique à raison de 0,006 ml/gr du poids corporel de l'animal (*Orion, Espoo, Finlande*), suivie 5 minutes plus tard par une injection intrapéritonéale de Kétamine HCl diluée 10 fois dans du NaCl isotonique à raison de 0,012 ml/gr du poids corporel (*Rhône Mérieux, Bruxelles, Belgique)*.

L'isolement des cellules de foie est réalisé selon la technique décrite par Seglen (Seglen 1976), sauf que la perfusion se fait par la veine cave cannulée par un catheter (*20G, Angiocath Becton Dickinson, Sandy, Utah 84070*) et que le liquide de perfusion s'écoule par la veine porte, sectionnée auparavant. Cette perfusion rétrograde via la veine cave inférieure (en sens opposé à la circulation normale) (10 ml/minutes à 37° C) débute avec un milieu dépourvu de Ca^{++} (Tampon de perfusion) durant 4 minutes afin de disloquer les contacts intercellulaires, elle se poursuit durant 8 minutes avec le tampon collagénase (*Worthington, Lakewood, USA*) qui dissout la matrice extracellulaire. Après l'arrêt de la perfusion, le foie est prélevé et les cellules libérées au moyen d'un peigne à chien, resuspendues dans le tampon de suspension et filtrées sur un filtre de nylon de 250 µm.

La composition des différents tampons, selon Seglen est précisée dans le tableau ci-dessous :

Tampon de perfusion	142 mM NaCl 6,8 mM KCl	10 mM Hepes 6 mM NaOH
Tampon collagénase	4,8 mM CaCl2 6,67 mM KCl 66 mM NaOH	690 mM NaCl 100 mM Hepes 1, 25 g collagenase dans 500 ml
Tampon de suspension	68 mM NaCl 1,1 mM KH2PO4 50 mM Hepes 36 mM Tricine 0,64 mM MgCl2	5,4 mM KCl 0,7 mM Na2SO4 30 mM TES 52,5 mM NaOH 1,22m M CaCl2
Tampon de lavage	Tampon de perfusion + 1,2 mM CaCl2	

2.5.1. SEPARATION DES CELLULES PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

La différence de taille des hépatocytes (9000 μm^3) et des cellules sinusoïdales (900 μm^3) permet leur séparation aisée par centrifugation différentielle (**figure 6**) (Boyum 1983; Nilsson and Berg 1977). Après une centrifugation à 400 RPM durant 2 minutes et 3 lavages du culot dans les mêmes conditions de centrifugation (*Sorvall RT7 ou Allegra X22-R, Beckman Coulter*). Dans le tampon de lavage, les hépatocytes sont sédimentés, tandis que les cellules sinusoïdales restent dans le surnageant. Les deux premiers surnageants sont rassemblés et centrifugés à 1800 RPM durant 5 minutes ; le culot obtenu est resuspendu à la pipette de Pasteur par 20 aller-retour et est centrifugé à 400 RPM durant 2 minutes dans le but d'éliminer les hépatocytes contaminants. Finalement, le surnageant est centrifugé une dernière fois à 1800 RPM durant 5 minutes, le culot final étant constitué principalement de cellules sinusoïdales.

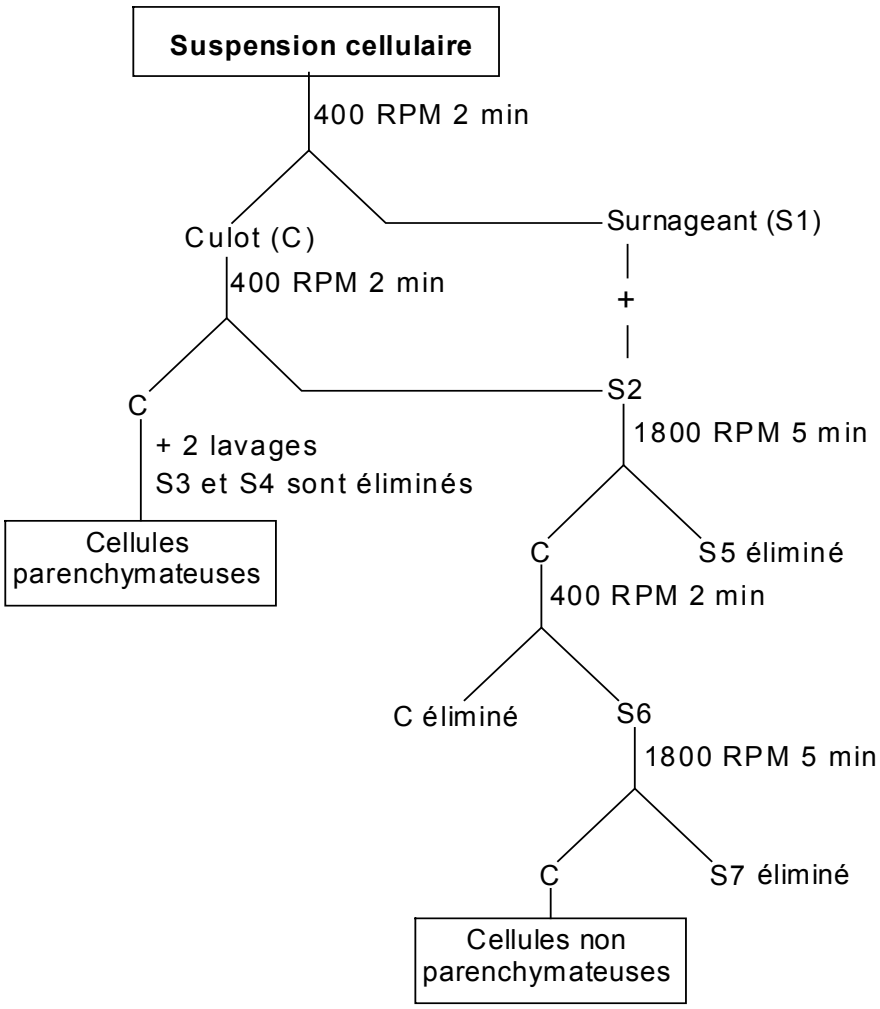


Figure 6. Schéma montrant les étapes de la séparation de cellules de foie de souris par centrifugation différentielle

2.5.2. GRADIENTS PERCOLL ET NYCODENZ

Les hépatocytes sont ensuite purifiés sur un gradient Percoll (*Sigma, St Louis, USA*) (Smedsrod and Pertoft 1985). 3 ml de la suspension d'hépatocytes sont déposés au-dessus de 12ml d'une solution de Percoll 40 % dans le PBS et ceci dans des tubes de verre. Après une centrifugation de 10 minutes à 1000 RPM, les cellules vivantes sédimentent en dessous du gradient Percoll tandis que les cellules mortes restent à l'interface. Après resuspension et un lavage dans le

PBS à 400 RPM durant 2 minutes, les cellules sont comptées et leur viabilité contrôlée par exclusion au bleu Trypan (supérieure à 85 %).

Un gradient Nycodenz (*Nycomed, Oslo, Norvège*)(densité 1,15 g/ml) est utilisé pour purifier les cellules sinusoïdales (Boyum 1983; Tolleshaug, et al. 1984). Dans des tubes de verre, on mélange 8,5ml de la suspension de cellules non parenchymateuses avec 25 ml d'une solution de Nycodenz à 27,5 % (w/v) à une densité 1,15 g/ml contenant du Tris-HCl 5 mM pH 7,4, du KCL 3 mM et de l'EDTA CaNa2 0,3 mM. Au dessus de ce mélange, on dépose avec précaution 5 ml de PBS et les tubes sont ensuite centrifugés à 2500 RPM durant 14 minutes (Allegra) ou 3 minutes à 600 RPM et 12 minutes à 2500 RPM (*Sorvall*). Les cellules intactes situées à l'interface PBS/Nycodenz sont aspirées à la pipette de Pasteur et ensuite lavées au PBS et recentrifugées à 1800 RPM durant 5 minutes.

2.6. METHODES DE CENTRIFUGATION

2.6.1. FRACTIONNEMENT PAR CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

Le foie est homogénéisé dans du saccharose isotonique 0,25 M glacé à l'homogénéiseur de Potter et Elvehjem type grand modèle (A) pour le foie de rat et petit modèle (C) pour le foie de souris, formé d'un tube de verre et d'un piston en téflon (Arthur Thomas Co, Philadelphie, USA) tournant à 3000 RPM. L'homogénéisation des cellules se fait manuellement avec un homogénéiseur de Dounce (2x7 passages).

Le schéma de la centrifugation différentielle est celui de de Duve et al. (de Duve, et al. 1955). Pour les hépatocytes, les temps de centrifugation sont adaptés selon le volume utilisé. Les forces de centrifugation croissantes permettent d'isoler 5 fractions successives.

La fraction nucléaire N contient principalement des noyaux, de grands fragments de membrane plasmique, des cellules demeurées intactes et de grands débris cellulaires.

La fraction mitochondriale lourde M est enrichie en mitochondries mais contient aussi des lysosomes et peroxysomes.

La fraction mitochondriale légère L est enrichie en lysosomes et peroxysomes.

La fraction microsomale P contient la majeure partie du réticulum endoplasmique et le Golgi, de même que de petits fragments de membrane plasmique.

Le surnageant final S contient tous les éléments non sédimentables dans les conditions de centrifugation utilisées.

Les **résultats** sont représentés sous forme d'histogrammes où chaque fraction est représentée par un rectangle. L'ordonnée représente le pourcentage d'activité mesurée dans la fraction par rapport à la somme des radioactivités mesurées dans les fractions N+M+L+P+S ou par rapport à la somme des radioactivités mesurées dans les fractions N+M+L+P (fractions sédimentables). L'abscisse est de grandeur arbitraire.

2.6.2. CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

Cette technique permet la séparation d'organites subcellulaires selon le critère de densité. Les organites migrent dans un gradient linéaire jusqu'à atteindre une densité égale à leur densité propre (Beaufay, et al. 1964). La densité de certains organites subcellulaires, tels les lysosomes et les mitochondries, varie en fonction de l'osmolarité du gradient (Wattiaux 1983). Après la centrifugation différentielle, la préparation de granules (M+L ou L+P) est déposée au sommet du gradient de saccharose préformé. Après une centrifugation de 2 heures 30

minutes à 39000 RPM, les fractions sont collectées en coupant le tube de centrifugation au moyen d'un sectionneur semblable à celui décrit par Beaufay et al. (Beaufay, et al. 1964). La linéarité du gradient est contrôlée en mesurant par réfractométrie la concentration du soluté, en l'occurrence le saccharose, dans chaque fraction, ce qui permet en même temps de déterminer la densité de chaque fraction.

Afin de faciliter la comparaison entre différentes expériences, les résultats de centrifugation isopycnique sont présentés sous forme d'histogrammes selon Amar Costesec et al. (Amar-Costesec, et al. 1974a; Amar-Costesec, et al. 1974b; Beaufay, et al. 1974). Les diagrammes sont tracés sur une échelle de densité (ρ) exprimée en g/cm^3 et divisée en 12 ou 13 fractions caractérisées par un incrément de densité $\Delta\rho$. L'ordonnée exprime la fréquence en fonction de la densité correspondante. La fréquence égale à $Q/(\Sigma Q^*\Delta\rho)$ où Q est la valeur absolue du constituant présent dans la fraction et ΣQ la somme des valeurs absolues des constituants mesurés dans l'ensemble des fractions. La fréquence est donc exprimée en cm^3/g. La surface de chaque section du diagramme, qui est le produit, fréquence $*$ incrément de densité est donc égale à $Q/\Sigma Q$ et représente la proportion du constituant présent dans la fraction.

La densité qui répartit 50 % des activités de part et d'autre de celle-ci correspond à la **densité médiane** d'équilibration des organites considérés. Elle n'a de signification que si la distribution des marqueurs de ces organites est unimodale.

2.7. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES, DES PROTEINES ET DE LA RADIOACTIVITE

La **cathepsine C** est mesurée selon Jadot et al. (Jadot, et al. 1984). Les granules sont incubés à 37°C dans un volume de 0,5 ml contenant de la glycyl-L-arginine 2-naphtylamide 0,25 mM, du tampon acétate 50 mM, pH 5, de la

thioéthylamine. HCl 5mM et du Triton X-100 0,05%. La réaction est arrêtée par l'addition de 1ml de tampon glycine 50 mM, pH 10,5 contenant de l'EDTA 5 mM et du Triton X-100 0,5 %. La naphtylamine libérée est déterminée en mesurant la fluorescence (excitation à 335 nm, émission à 415 nm) dans un spectrofluorimètre *SPF Aminco.*

Pour la mesure de la **phosphodiestérase alcaline**, les granules sont incubés à 25°C dans un volume de 0,25 ml contenant du p-nitrophénylthymidine-5'-phosphate 1,5 mM, du tampon glycine 0,1 M, pH 9,6 et de l'acétate de zinc 2 mM. La réaction se termine par l'addition de 1ml de NaOH 0,1 N. Le paranitrophénol libéré est déterminé en mesurant l'absorbance à 400 nm.

Pour mesurer l'expression de la **luciférase** dans le foie total, le foie est prélevé et homogénéisé dans 10 volumes de Triton X-100 à 1 %. L'homogénat est centrifugé durant 1 minute à 13000 RPM (Biofuge, Heraeus) et l'activité de la luciférase mesurée sur le surnageant selon le protocole fourni par le fabricant (*Promega, Madison, USA*). A 20 µl de surnageant, dilué dans le Triton X-100 à 1 % si nécessaire, on ajoute 100µl de réactif luciférase, le tout est vortexé et l'activité est mesurée au luminomètre (FB12 luminomètre, Berthold, Pforzheim, Allemagne). Les unités relatives de lumière (RLU) sont converties en nanogrammes ou picogrammes de luciférase en utilisant les étalons de Promega et représentées en activité spécifique (pg de luciférase/mg de protéines).

Les protéines sont mesurées selon le test de Lowry et al. (Lowry, et al. 1951) en utilisant le kit Biorad (*BioRad DC Protein assay, Hercules, CA 94547, USA*) qui apporte les améliorations suivantes: le temps de développement maximum de la coloration est atteint en 15 minutes et la coloration reste stable durant 1 heure, la modification ne dépassant pas 5 %.

La radioactivité de l'^{35}S-ADN est mesurée par scintillation liquide et la radioactivité des protéines marquées à ^{125}I, soit par scintillation liquide, soit au

compteur gamma. La radioactivité acido-soluble est déterminée par l'addition à chaque échantillon d'un volume équivalent d'acide perchlorique froid à 10 % (ADN) ou d'acide trichloracétique à 10 % (asialofétuine, asialofétuine-tyramine cellobiose). Après centrifugation à 13000 RPM durant 5 minutes, la radioactivité est déterminée sur le surnageant et la radioactivité acido-soluble est exprimée en pourcent de la radioactivité totale.

2.8. ACTION DE LA PROTEINASE K

Les fractions résultant de la centrifugation différentielle sont incubées en milieu isotonique de saccharose avec du tampon Tris 50 mM pH 8 de la protéinase K (10 µg/ml) (Sigma St Louis USA) et en présence ou non de Triton X-100 à 0,1 %. La réaction est arrêtée par fixation avec un volume équivalent de TCA à 10 %. La radioactivité acido-soluble mesurée en absence de Triton X-100 et donc directement accessible à la protéinase K est exprimée en pourcent par rapport à la radioactivité acido-soluble mesurée en présence de ce détergent.

3. RESULTATS

CHAPITRE 3. RESULTATS

3.1. CAPTURE ET SORT DE L'ASIALOFETUINE MARQUEE A L'IODE 125 (^{125}I-ASF)

3.1.1. INTRODUCTION

L'asialofétuine est une glycoprotéine endocytée spécifiquement par les hépatocytes, grâce à la présence de récepteurs au galactose localisés dans la membrane plasmique (Courtoy 1993; Courtoy, et al. 1984). Elle chemine dans l'appareil endosomo-lysosomal où elle est dégradée dès la dixième minute après l'injection (Courtoy 1993). Les produits d'hydrolyse radioactifs sont libérés dans le cytosol. L'utilisation de l'asialofétuine-^{125}I est particulièrement bien adaptée pour suivre le début de l'endocytose, période pendant laquelle la molécule n'est que peu dégradée et la radioactivité que l'on mesure correspond essentiellement à des molécules intactes. C'est à cette période que nous nous sommes intéressé d'abord en recherchant les effets éventuels de l'injection hydrodynamique sur l'endocytose par le foie lors des premières minutes qui suivent l'injection.

3.1.2. CAPTURE

La figure 7 représente la quantité de radioactivité présente dans des homogénats de foie en pourcentage de la dose injectée. La radioactivité augmente progressivement pour atteindre une valeur maximale entre la deuxième et la dixième minute. Cette valeur est obtenue plus rapidement et est plus élevée après une injection conventionnelle à 2 minutes.

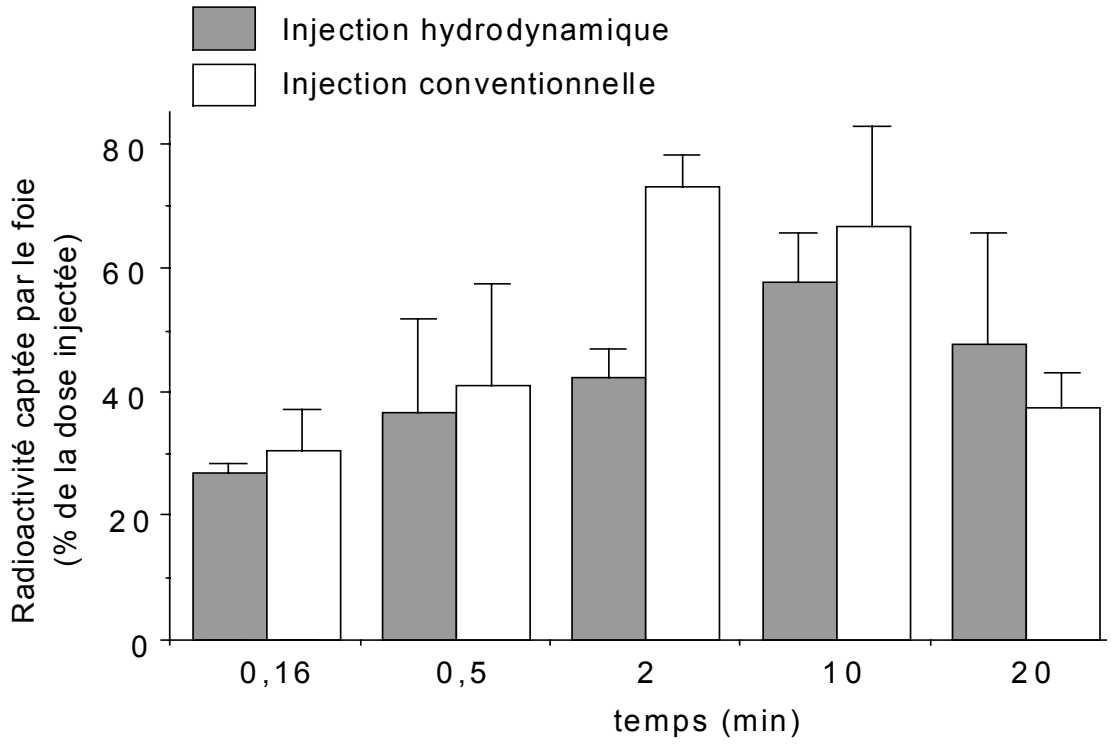


Figure 7. Capture par le foie de souris de l'asialofétuine marquée à l'^{125}I *: La radioactivité est mesurée dans les homogénats de foies de souris à des temps croissants après l'injection. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les valeurs sont exprimées en pourcents de la dose injectée. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux*

A **la figure 8** est rapportée la radioactivité du sang à des temps croissants après l'injection. On constate que la concentration sanguine d'^{125}I-ASF tombe rapidement, que ce soit après une injection conventionnelle ou après une injection hydrodynamique. Il est à noter que dans ce dernier cas, jusqu'à 1 minute, les valeurs sont certainement plus faibles qu'après une injection conventionnelle vue la dilution du sang par le grand volume injecté. On constate toutefois qu'après plus ou moins 2 minutes quand la circulation s'est normalisée (Zhang, et al. 2004b), (*in press*), les concentrations sanguines de l'ASF sont comparables pour les deux types d'injection.

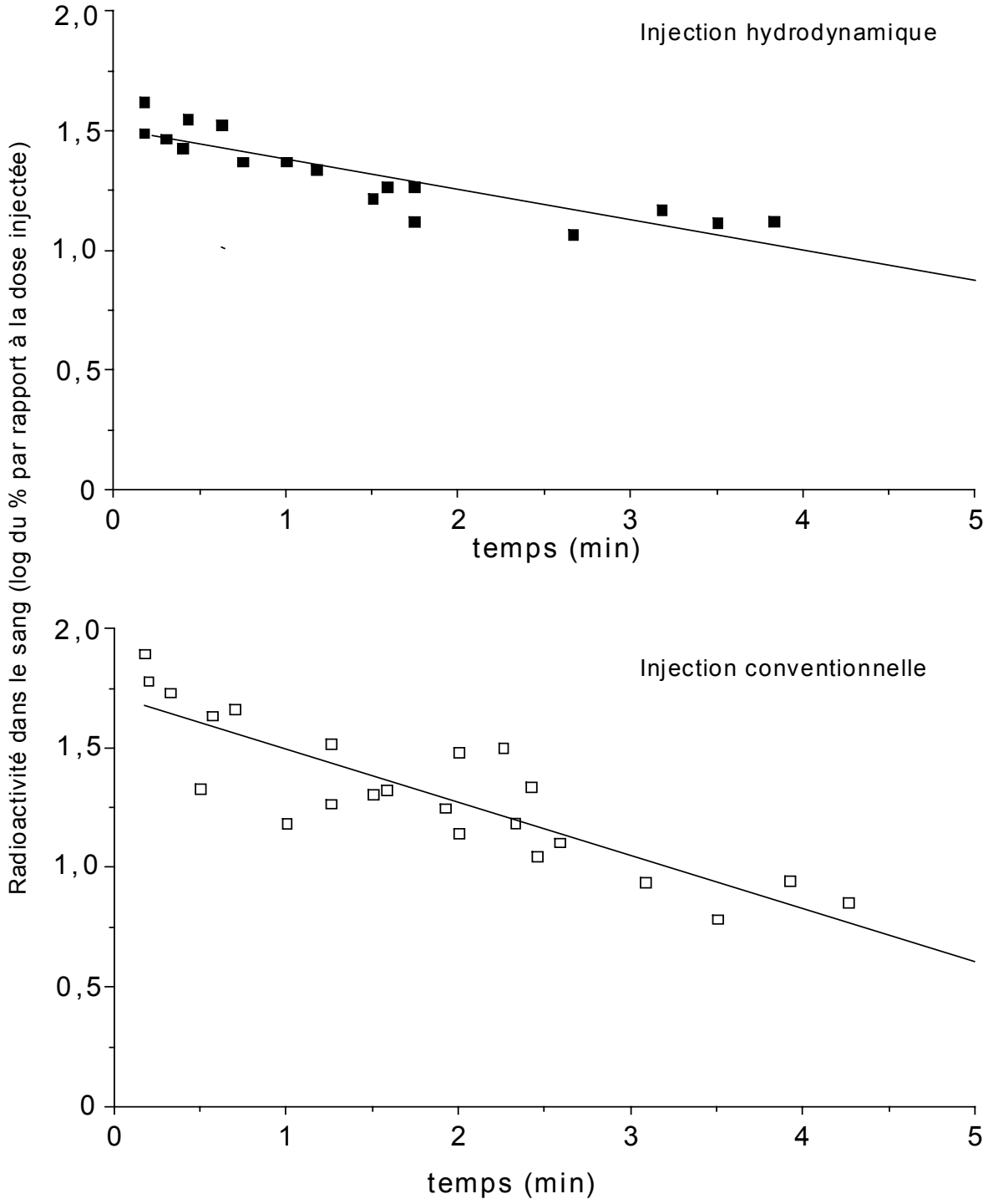


Figure 8. Cinétique d'élimination de l'asialofétuine marquée à l'^{125}I*: radioactivité dans le sang total en logarithme du % de la dose injectée. La radioactivité est mesurée dans le sang à des temps croissants après l'injection. Le volume total du sang utilisé pour le calcul est égal à 8 % du poids corporel. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125, dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les résultats sont exprimés sous forme logarithmique.*

3.1.3. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE, ASPECT GENERAL

Un aperçu général des distributions de la radioactivité dans les fractions isolées par centrifugation différentielle est donné au **tableau 1**. On observe la présence d'une proportion nettement plus élevée de radioactivité dans la fraction S (éléments non sédimentables) après injection hydrodynamique. Au niveau des fractions sédimentables, on constate que le pourcentage de radioactivité récupéré dans les fractions P et L est plus faible après une injection hydrodynamique mais qu'il est plus élevé dans la fraction N.

La fraction S est constituée d'éléments qui proviennent de composants intracellulaires présents dans le cytosol et de molécules du sang retenu dans le foie après le sacrifice de l'animal et que l'on récupère dans l'homogénat. A ces éléments peuvent s'ajouter des molécules libérées à partir de structures subcellulaires détériorées par l'homogénéisation du tissu. Quant aux fractions sédimentables (N, M, L, P), elles sont constituées des structures subcellulaires, surtout celles qui sont impliquées dans l'endocytose. En particulier la fraction nucléaire N contient principalement des noyaux, de grands fragments de membrane plasmique, des cellules demeurées intactes et de grands débris cellulaires, la fraction mitochondriale lourde M est enrichie en mitochondries mais contient aussi des lysosomes et peroxysomes, la fraction mitochondriale légère L est enrichie en lysosomes et peroxysomes, la fraction microsomale P contient la majeure partie du réticulum endoplasmique et le Golgi, de même que de petits fragments de membrane plasmique, le surnageant final S contient tous les éléments non sédimentables dans les conditions de centrifugation utilisées.

Par conséquent, l'^{125}I-ASF endocytée est celle que l'on retrouve dans les fractions sédimentables. Nous nous intéresserons d'abord à la radioactivité sédimentant dans les fractions N, M, L, P, nous reviendrons plus loin sur celle que l'on retrouve dans la fraction S.

Tableau 1. Distribution intracellulaire de la radioactivité dans le foie. *Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les foies ont été prélevés à des temps variables après l'injection d'*^{125}*I-ASF. Les homogénats ont ensuite été fractionnés par centrifugation différentielle. Les déviations standard proviennent d'expérience sur au moins 3 animaux.*

Temps	Volume injecté (ml)	Radioactivité totale (%)				
		N	M	L	P	S
10 sec	0,2	12,91 ± 1,41	4,84 ± 0,87	5,69 ± 1,85	36,86 ± 1,84	39,71 ± 2,32
	2	16,05 ± 1,53	8,50 ± 1,48	2,93 ± 1,10	14,00 ± 2,00	58,51 ± 2,89
0,5 min	0,2	12,33 ± 0,22	8,46 ± 0,24	6,49 ± 0,89	41,49 ± 0,90	31,23 ± 0,79
	2	20,81 ± 2,06	9,78 ± 1,43	3,11 ± 0,60	15,85 ± 1,63	50,45 ± 5,06
2 min	0,2	15,26 ± 3,53	6,84 ± 1,09	11,69 ± 1,15	40,34 ± 6,33	25,87 ± 5,18
	2	22,54 ± 4,53	7,32 ± 1,21	3,92 ± 0,85	21,35 ± 1,34	44,86 ± 6,56
10 min	0,2	10,32 ± 3,50	12,13 ± 0,90	20,06 ± 3,19	31,87 ± 3,02	25,62 ± 7,00
	2	22,60 ± 2,44	10,43 ± 0,84	10,87 ± 3,32	24,80 ± 4,12	31,30 ± 3,54

3.1.4. DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE ASSOCIEE AUX FRACTIONS SEDIMENTABLES

La **figure 9** représente l'évolution de la radioactivité associée aux éléments sédimentables du foie en fonction du temps suivant l'injection. Les différences entre les quantités trouvées suivant le type d'injection sont encore accentuées, indiquant que la quantité d'^{125}I-ASF réellement endocytée par les cellules hépatiques est probablement plus faible après une injection hydrodynamique que celle que l'on mesure dans l'homogénat total.

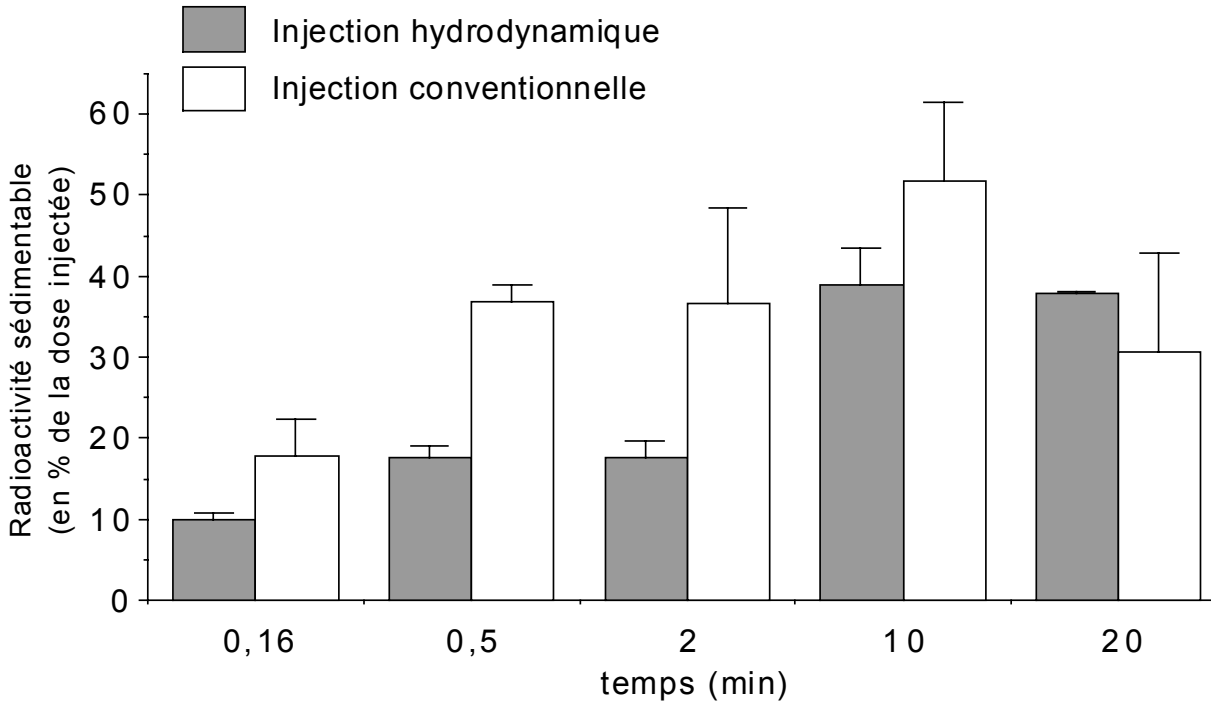


Figure 9. Capture par le foie de souris de l'asialofétuine marquée à l'Iode 125: *la radioactivité présente dans les fractions sédimentables. La radioactivité est mesurée dans les fractions sédimentables de foies de souris à des temps croissants après l'injection. Les homogénats ont été soumis à une centrifugation différentielle et la somme des radioactivités des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la dose injectée. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux*

La **figure 10** illustre comment la radioactivité récupérée dans chacune des fractions sédimentables évolue en fonction du temps après l'injection. Après injection conventionnelle, la radioactivité reste principalement associée à la fraction P pendant les dix premières minutes. Elle diminue toutefois au cours du temps au profit de la fraction L. C'est ainsi qu'elle correspond dans P à 62% de ce qui est récupéré dans NMLP, 10 secondes après l'injection et ne représente plus que 41% après 10 minutes. Par contre, la radioactivité de L pendant ce même laps de temps passe de 8 à 26%. L'évolution est sensiblement distincte après injection hydrodynamique.

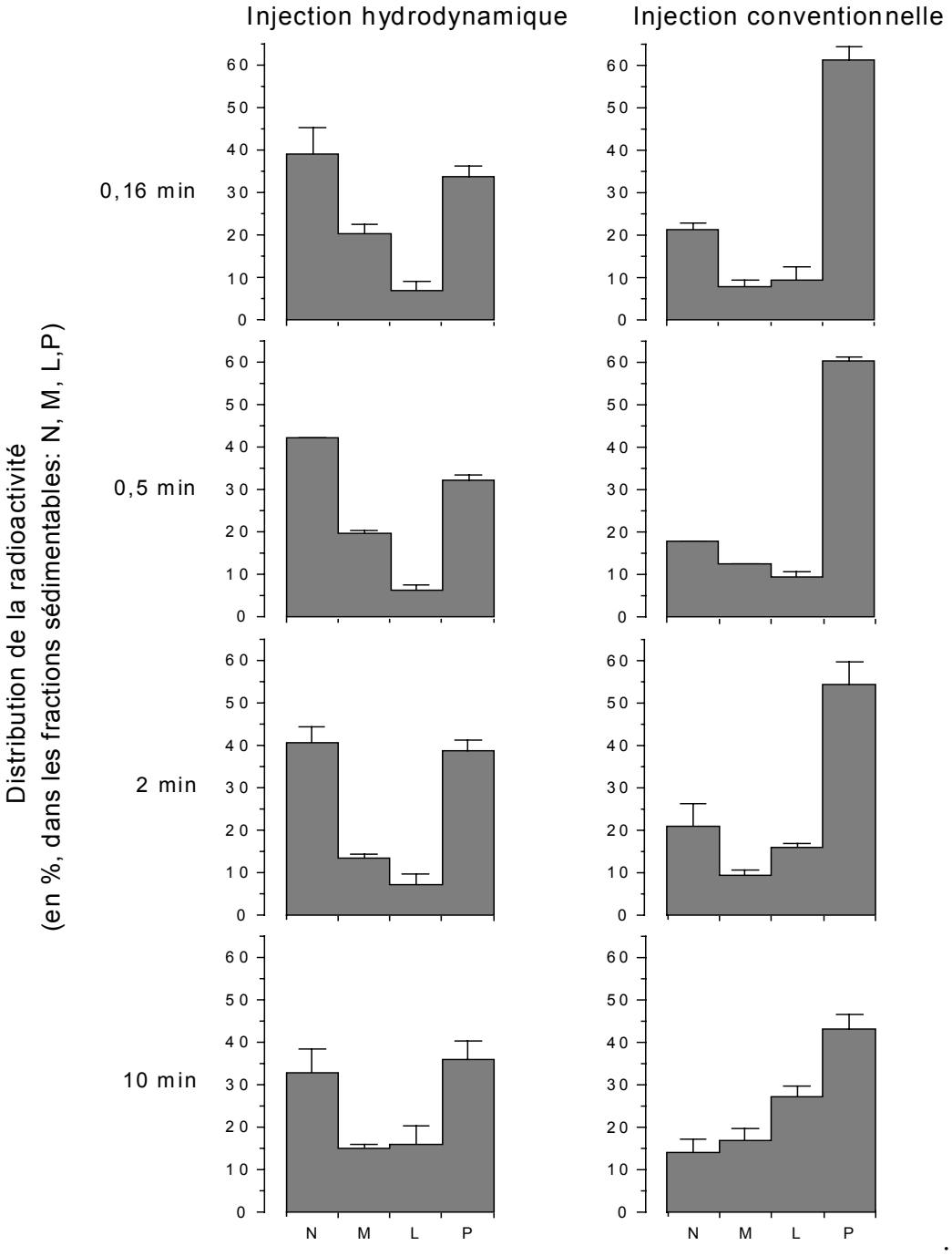


Figure 10. *Distribution intracellulaire de l'asialofétuine marquée à l' Iode 125 dans les fractions sédimentables du foie de souris après centrifugation différentielle. La radioactivité est mesurée dans les fractions sédimentables de foies de souris à des temps croissants après l'injection. Les homogénats ont été soumis à une centrifugation différentielle. La radioactivité des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la radioactivité de N+M+L+P. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

En fait, le profil général de distribution est peu modifié au cours du temps qui suit l'injection. Il se caractérise par une proportion de la radioactivité plus élevée dans les fractions N et P mais quasi identique dans chacune de ces deux fractions. Les différences suivant le type d'injection peuvent encore être illustrées en exprimant la radioactivité des fractions en fonction de la quantité injectée. C'est ce qui est montré à titre d'exemple à la **figure 11**. On constate que la quantité de radioactivité associée à la fraction P est nettement inférieure aux temps courts après injection hydrodynamique.

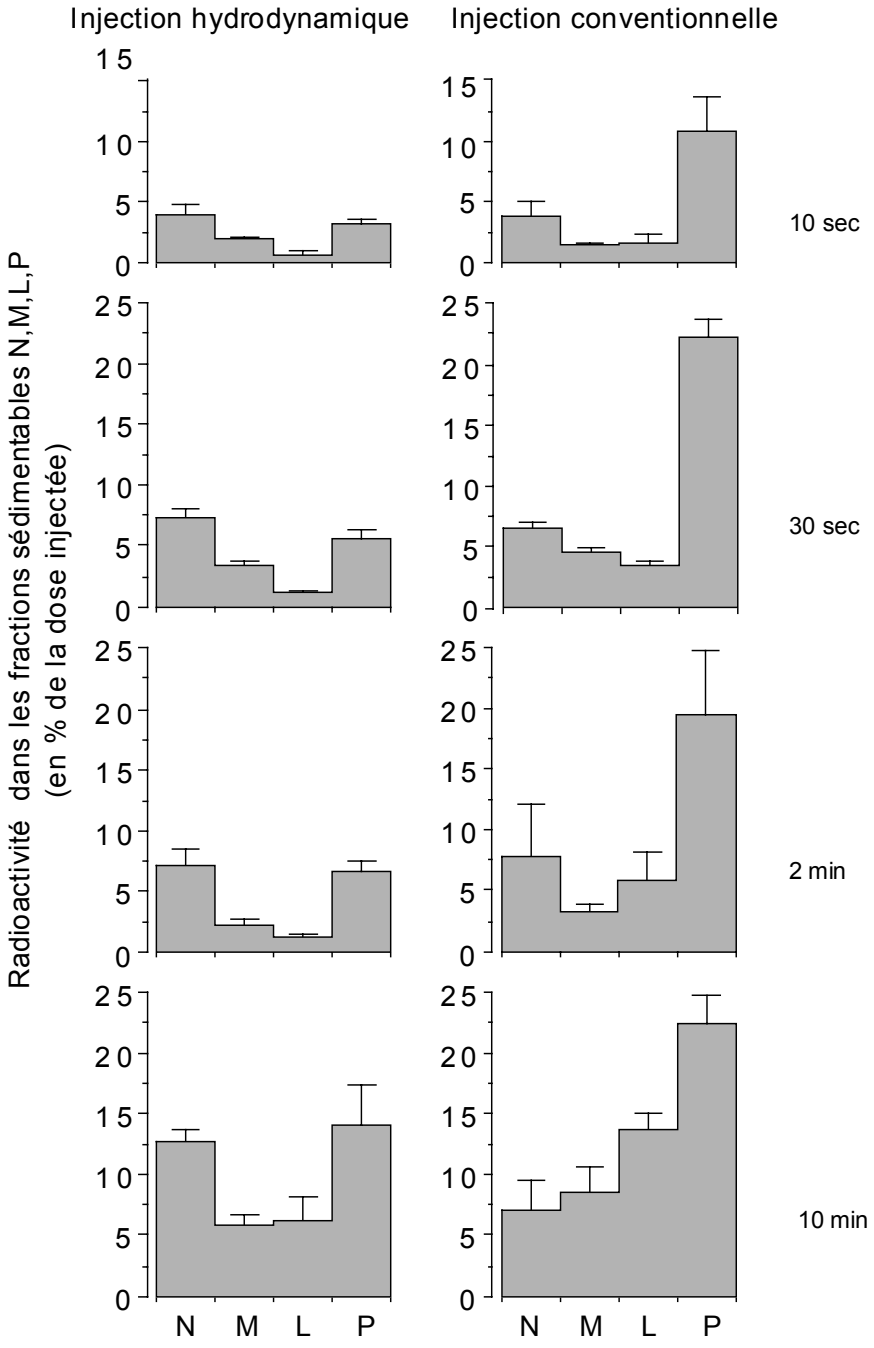


Figure 11. Distribution intracellulaire, en fonction de la dose injectée, de l'asialofétuine marquée à l' I125 dans les fractions sédimentables de foies de souris. *La radioactivité est mesurée dans les fractions sédimentables de foies de souris 10, 30 secondes, 2 et 10 minutes après l'injection. Les homogénats ont été soumis à une centrifugation différentielle et la radioactivité des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la dose injectée. Les souris ont reçu une injection de 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml ou de 0,2 ml de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

3.1.5. DISTRIBUTIONS DE LA PHOSPHODIESTERASE ALCALINE, DE LA CATHEPSINE C ET DES PROTEINES TOTALES

Dans la plupart des expériences de centrifugation signalées ci-dessus, nous avons déterminé la distribution de deux enzymes marqueurs de systèmes membranaires impliqués dans l'endocytose: la phosphodiestérase alcaline, enzyme de référence de la membrane plasmique et des petites vésicules d'endocytose (Bartles, et al. 1985) et la cathepsine C, marqueur des lysosomes (Jadot, et al. 1984). De plus, nous avons mesuré la proportion des protéines totales de l'homogénat associée à chaque fraction. Comme ces distributions ne semblaient pas affectées par le temps suivant les injections, nous avons calculé les moyennes des mesures faites pour chaque fraction dans tous les fractionnements effectués après injection hydrodynamique ou après injection conventionnelle. Les résultats sont rapportés à **la figure 12**. La comparaison des données provenant de chaque type d'injection ne laisse apparaître que peu de différence si ce n'est la présence de plus de cathepsine C et de protéines dans la fraction N et moins dans la fraction P après injection hydrodynamique mais les profils de distribution des deux enzymes et des protéines sont très semblables que l'^{125}I-ASF soit injecté par la méthode conventionnelle ou hydrodynamique. On peut donc conclure que l'injection hydrodynamique n'affecte que peu le comportement en centrifugation différentielle des lysosomes et des éléments membranaires provenant de la membrane plasmique. A propos des lysosomes, il est intéressant de constater que cette injection ne conduit pas à une fragilisation de ces organites. En effet, l'activité de la cathepsine C dans la fraction S, qui provient essentiellement de lysosomes altérés lors de l'homogénéisation et des centrifugations n'est pas plus élevée après injection hydrodynamique.

Quant à la phosphodiestérase alcaline, rappelons que cet enzyme se distribue dans l'ensemble de la membrane plasmique, sans localisation particulière dans la zone apicale ou basolatérale (Bartles, et al. 1985). Après centrifugation

différentielle du foie de rat, la distribution est bimodale, l'enzyme se retrouvant principalement dans les fractions N et P (**figure 12**) (Amar-Costesec, et al. 1974a; Beaufay, et al. 1974). Dans la fraction N, elle est associée à de gros fragments principalement dérivés des zones apicale et latérale. Dans la fraction P, elle est localisée dans de petits fragments vésiculés originaires de la région basolatérale riche en microvillosités et dans de petites vésicules de pinocytose (Evans 1980). Les distributions que nous avons observées, après fractionnement du foie de souris, indiquent une nette prépondérance de l'enzyme dans la fraction N avec toutefois une proportion très significative dans la fraction P. Cette différence de distribution avec celle que l'on observe après fractionnement du foie de rat pourrait provenir d'une résistance plus grande à l'homogénéisation des membranes plasmiques d'hépatocytes de souris, augmentant la proportion de gros fragments qui sédimentent dans N.

Quant à la cathepsine C, elle se retrouve en majorité dans M comme cela s'observe pour le foie de rat (Jadot, et al. 1984). C'est dans cette fraction qu'est récupérée la plus grande partie des lysosomes (de Duve, et al. 1955).

3.1.6. Analyse de la fraction L+P par centrifugation isopycnique

Comme nous le rapportons ci-dessus, dans les premiers temps qui suivent une injection conventionnelle d'^{125}I-ASF, la radioactivité se trouve en grande partie dans les fractions L et P. On observe au cours du temps une diminution progressive de ce qui est associé à P au profit de L. Les résultats sont sensiblement différents après une injection hydrodynamique: les pourcentages de radioactivité associée aux deux fractions sont plus faibles et d'autre part le transfert d'une fraction à l'autre est nettement moins marqué. Comme l'ont montré des travaux antérieurs (pour une revue, voir Courtoy 1993), le transfert d'une protéine endocytée d'un organite à l'autre dans les fractions L et P, peut être mis en évidence en analysant une fraction L+P par centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose.

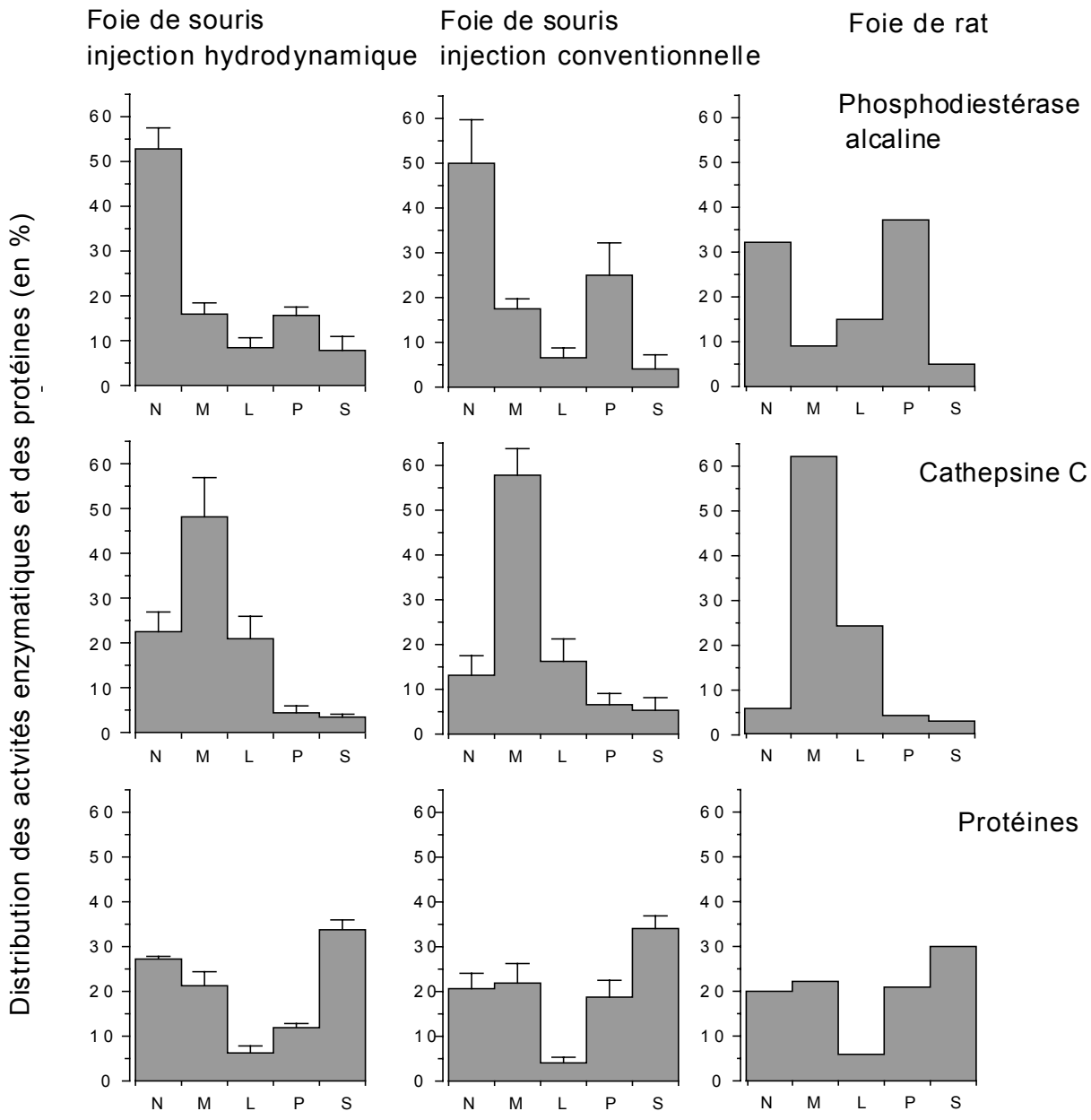


Figure 12. Distribution intracellulaire des enzymes de référence et des protéines dans les foies de souris et de rat. *Les activités de la phosphodiestérase alcaline, de la cathepsine C et les protéines ont été mesurées dans les fractions isolées à partir de foies de souris ayant reçu une injection de 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 0,2 ml ou de 2,0 ml de NaCl isotonique et de foie de rat non traité. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour six animaux.*

Les distributions observées après une telle centrifugation de fractions L+P isolées après une injection conventionnelle ou hydrodynamique d' ^{125}I-ASF, sont illustrées à **la figure 13**. Dans **la figure 14**, sont jointes aux distributions de la radioactivité, celles de la phosphodiestérase alcaline, un marqueur de la membrane plasmique. Elles nous permettront de localiser les fragments de cette membrane dans les gradients et, par comparaison avec les distributions de la radioactivité, d'estimer la proportion d'ASF qui est fixée à cette membrane. Après injection conventionnelle, les distributions sont semblables à celles décrites par Courtoy (Courtoy 1993) pour une glycoprotéine endocytée par les hépatocytes. Elles montrent que dans les minutes qui suivent l'injection, le transfert de la protéine s'opère vers une population d'organites plus légers : la densité médiane d'équilibration (**tableau 2**), passe de 1,14 g/cm^3 à 1,11 g/cm^3. Il s'agit vraisemblablement d'un passage de la molécule endocytée, des vésicules de pinocytose et des endosomes primaires aux endosomes secondaires, nous y reviendrons plus loin. Après l'injection hydrodynamique, ce qui est le plus manifeste est la similitude de distribution de la radioactivité après 2 minutes et 10 minutes. On n'observe pratiquement pas de glissement de la distribution vers des zones de densités plus faibles comme on le voit après une injection conventionnelle, les densités médianes d'équilibration étant de 1,17 g/cm^3 à 2 minutes et à 10 minutes (**tableau 2**).

Tableau 2. Valeur des densités médianes d'équilibration en g/cm^3 de la radioactivité et de la phosphodiestérase alcaline. *Une fraction L+P a été isolée 2 minutes ou 10 minutes après injection hydrodynamique ou conventionnelle de 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'^{125}I et analysée par centrifugation isopycnique en gradient de saccharose (voir* ***figures 13 et 14****).*

	2ml		0,2ml	
	Radioactivité	PDAse	Radioactivité	PDAse
2 min	1,168	1,176	1,137	1,188
10 min	1,167	1,173	1,112	1,183

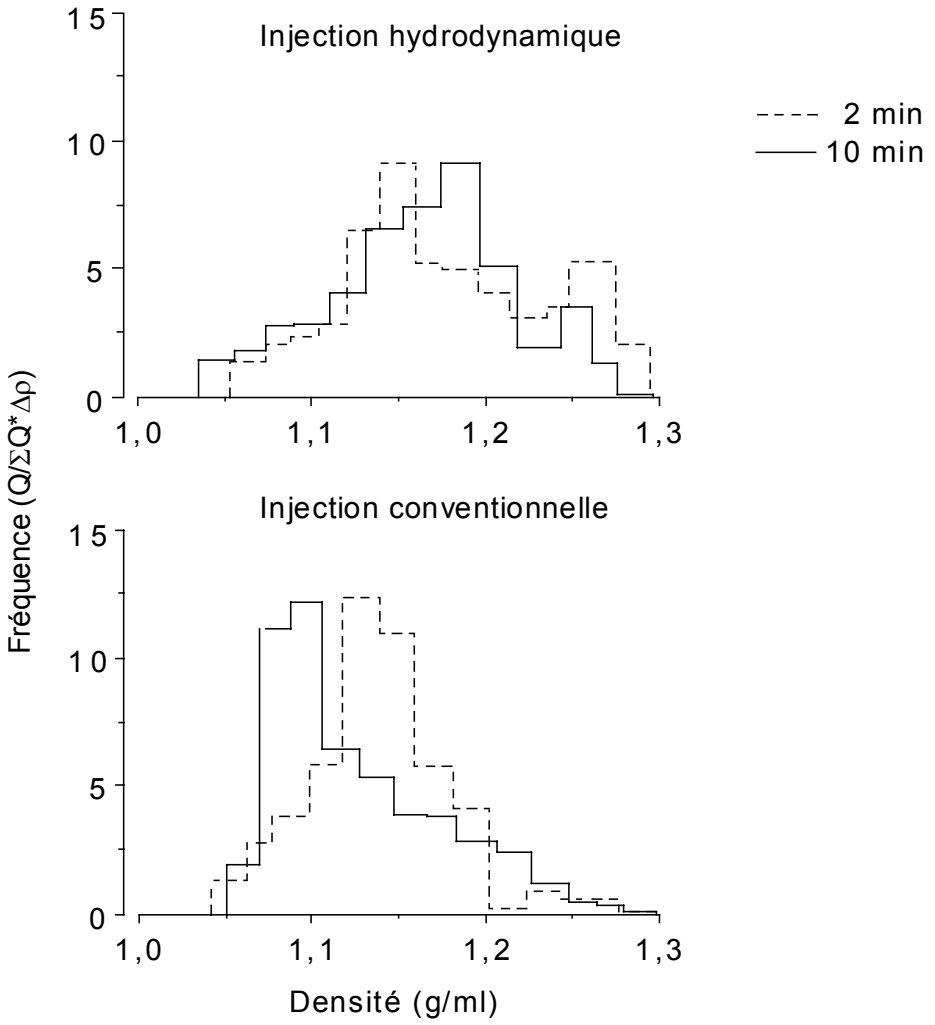


Figure 13. Distribution de la radioactivité de fractions L+P en gradient isopycnique de saccharose à des temps courts après l'injection. *Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique et le foie prélevé soit 2 min, soit 10 min après l'injection.*

La **figure 14** permet de comparer les distributions de la radioactivité avec celles de l'enzyme marqueur de la membrane plasmique: la phosphodiestérase alcaline. Elle illustre bien que la distribution de la radioactivité est toujours bien distincte de celle de la phosphodiestérase après une injection conventionnelle. Les distributions après une injection hydrodynamique, que ce soit 2 minutes ou 10 minutes après l'injection quoique plus étalées que celle de la phosphodiestérase, se retrouvent principalement dans les mêmes zones de

densité du gradient. Cela suggère qu'une partie importante de l'^{125}I-ASF captée par le foie après injection hydrodynamique reste fixée à la membrane plasmique pendant au moins 10 minutes et n'est pas internalisée ou n'aboutit pas aux endosomes pendant cette période de temps comme cela s'observe après une injection conventionnelle.

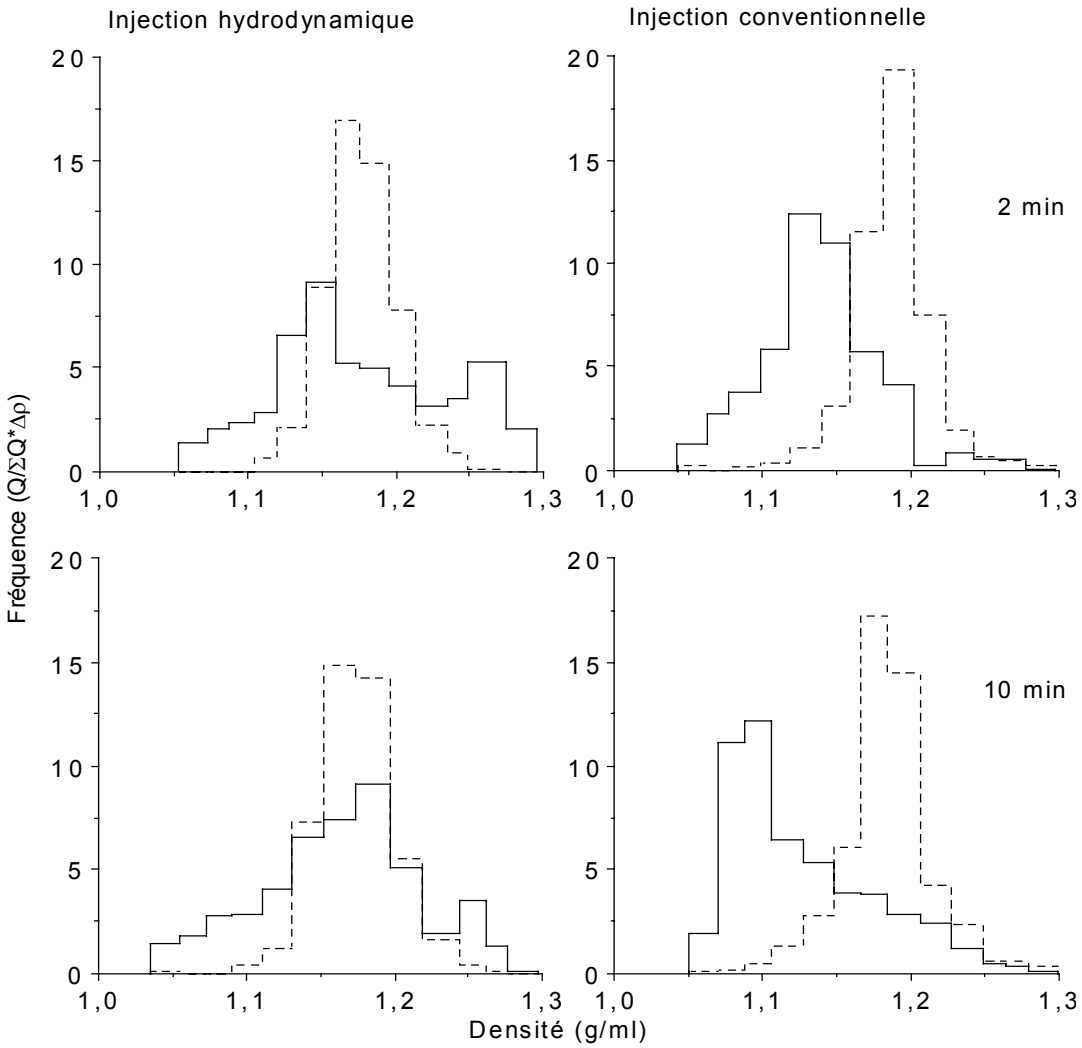


Figure 14. Distribution de la radioactivité et de la phosphodiestérase alcaline de fractions L+P en gradient isopycnique de saccharose à des temps courts après l'injection*. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique et le foie prélevé soit 2 min, soit 10 min après l'injection. La radioactivité est représentée en traits pleins, la phosphodiestérase alcaline en pointillés.*

3.1.7. FRACTION N

La distribution de la radioactivité après une injection hydrodynamique d' ^{125}I-ASF, est égale ment caractérisée par la présence d'une proportion élevée dans la fraction N. Nous avons analysé cette fraction par centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose. Les résultats sont présentés à la **figure 15**

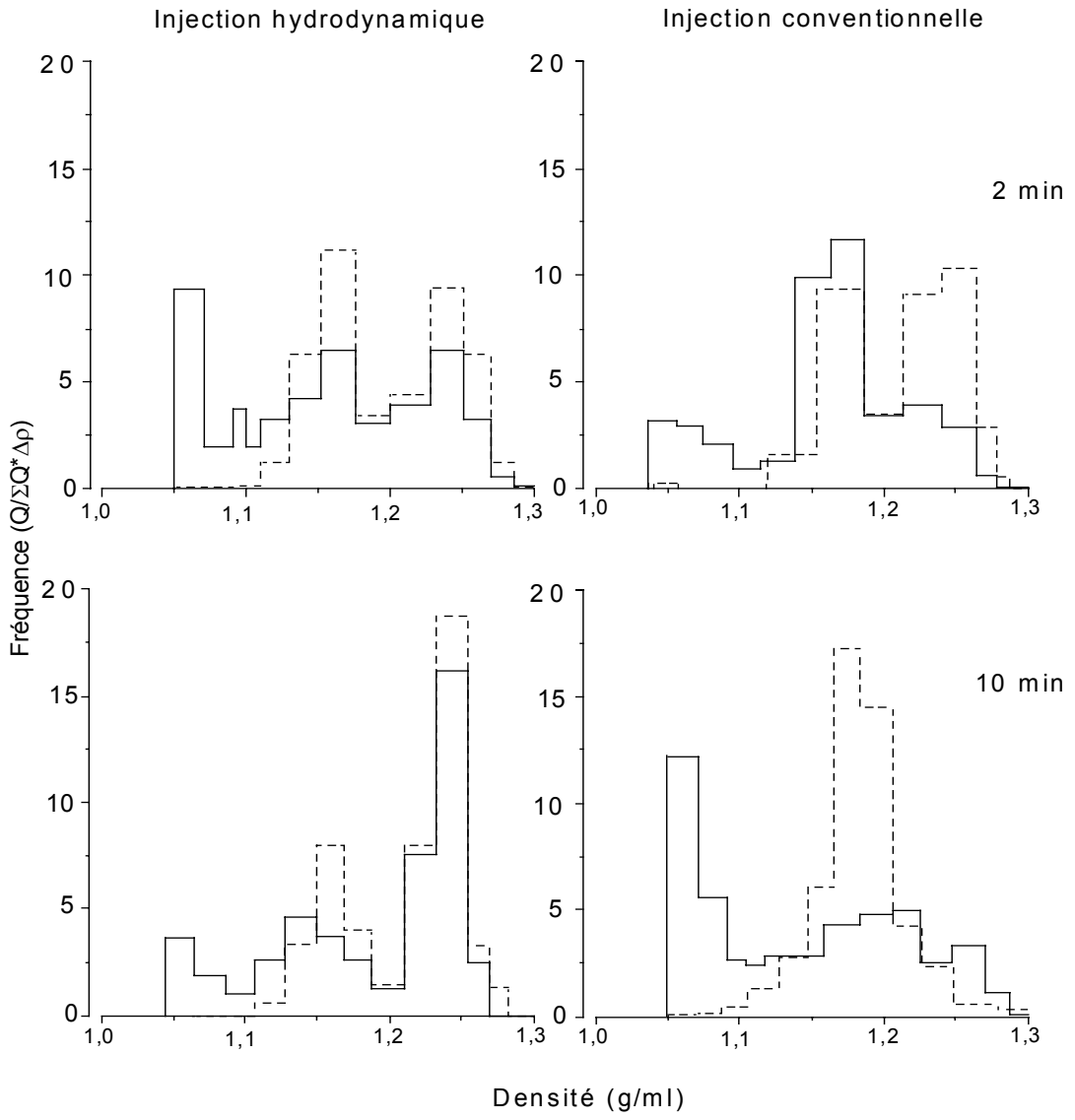


Figure 15. Distribution de la radioactivité et de la phosphodiestérase alcaline de fractions N en gradient isopycnique de saccharose à des temps courts après l'injection. *Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique et le foie prélevé soit 2 min, soit 10 min après l'injection. La radioactivité est représentée en traits pleins, la phosphodiestérase alcaline en pointillés.*

La distribution de la radioactivité est très hétérogène et reflète vraisemblablement la forte hétérogénéité de la fraction N (de Duve 1971). Celle-ci contient évidemment surtout des noyaux mais aussi de gros fragments de membrane plasmique en particulier dérivant de la zone basolatérale (Bartles, et al. 1985; Evans 1980). Ces fragments peuvent provenir de deux hépatocytes voisins et rester accolés l'un à l'autre par les jonctions intercellulaires. On trouve également de grosses vésicules provenant de la région biliaire (Bartles, et al. 1985; Evans 1980). On observe la présence d'une quantité significative de radioactivité au sommet du gradient que ce soit après injection conventionnelle ou hydrodynamique. Il s'agit, croyons-nous, en grande partie de molécules marquées qui se sont détachées des structures auxquelles elles étaient associées au cours des manipulations de la fraction N et qui, par conséquent, ne migrent pas au cours de la centrifugation du gradient. La distribution de la phosphodiestérase alcaline, marqueur de la membrane plasmique a été établie. Elle est également hétérogène sauf 10 minutes après l'injection conventionnelle où l'enzyme présente une distribution unimodale. On constate une certaine superposition de la distribution de l'enzyme avec celle de la radioactivité sédimentable surtout après injection hydrodynamique. Cela laisse supposer que l'ASF présente dans N après injection conventionnelle ou hydrodynamique est principalement associée à la membrane plasmique.

3.1.8. Effet de la proteinase K

Une glycoprotéine destinée à être endocytée par récepteur, se fixe d'abord à son récepteur à la face externe de la membrane plasmique puis est internalisée dans les vésicules de pinocytose, elle chemine ensuite dans le système endosomo-lysosomal. Il est un moyen fréquemment utilisé pour estimer la proportion d'une protéine de ce type qui est internalisée un temps déterminé après son injection. On traite l'homogénat ou les fractions isolées par centrifugation avec une protéase dans des conditions ménagées ne conduisant pas à une détérioration des

membranes mais permettant une hydrolyse des protéines associées à leur face externe sans que celles qui sont à l'intérieur de l'organite ne soient dégradées. La même opération est ensuite réalisée mais en ajoutant au milieu d'incubation un détergent qui rompt les membranes et permet ainsi à la protéase d'avoir accès aussi aux protéines présentes à l'intérieur des organites. Le rapport entre les degrés d'hydrolyse mesurée par l'apparition de radioactivité acido-soluble en absence et en présence de détergent donne une idée du degré d'accessibilité à la protéase exogène d'une protéine associée à des structures subcellulaires. Cette mesure permet d'estimer la proportion d'une protéine captée par endocytose, qui est associée à la membrane plasmique et n'est pas encore internalisée. En effet, dans un homogénat, les fragments de membrane plasmique se retrouvent essentiellement sous forme de vésicules qui orientent vers l'extérieur la face externe de cette membrane (Evans 1980; Stanley, et al. 1980; Trams and Lauter 1974). C'est sur la face externe de la membrane plasmique qu'est localisée la protéine avant son internalisation. Après son internalisation, la protéine se retrouve à l'intérieur d'une structure: vésicules d'endocytose, endosomes, lysosomes.

Nous avons fractionné par centrifugation différentielle des homogénats de foie isolés 0,5, 2 et 10 minutes après une injection conventionnelle ou une injection hydrodynamique d' ^{125}I ASF. Les fractions N, M et L+P résultant de ces fractionnements ont été incubées en présence d'une protéase: la protéinase K, en absence ou en présence de Triton X-100, pendant 10, 20 et 60 minutes. Après quoi, la réaction protéolytique a été arrêtée par addition d'acide trichloracétique et les radioactivités totales et acido-solubles ont été mesurées. Vu que dès la dixième minute d'incubation le maximum de la radioactivité acido-soluble est obtenue. Ce sont les valeurs moyennes pour les trois temps d'incubation qui ont été retenues. Au **tableau 3** sont indiqués les rapports des activités acido-solubles mesurées en absence et en présence de Triton X-100.

Tableau 3. Accessibilité de l'asialofétuine à la protéinase K. *Les fractions N, M et L+P ont été isolées 30 secondes, 2 minutes ou 10 minutes après injection hydrodynamique ou conventionnelle de 3,3µg d'asialofétuine marquée à l'Iode* 125. *Elles ont ensuite été incubées à 25° C en présence de 10µg de protéinase K avec ou sans Triton X-100. Ces fractions ont ensuite été traitées au TCA à 5 %, centrifugées à 13000 RPM durant 5 minutes et la radioactivité acido-soluble déterminée sur les surnageants. L'accessibilité à la protéinase K est égale au rapport des radioactivités acido-solubles mesurées en absence et en présence de Triton X-100. Les déviations standard proviennent d'expérience sur au moins 3 animaux.*

	30 sec		2 min		10 min	
	0,2ml	2,0ml	0,2ml	2,0ml	0,2ml	2,0ml
N	36,4 ± 6,7	85,6 ± 8,7	37,7 ± 4,9	78,9 ± 4,4	44,7 ± 7,8	67,2 ±6,0
M	45,4 ± 3,8	77,5 ± 10,8	30,0 ± 5,8	75,0 ± 12,7	10,4 ± 9,6	63,3 ± 4,4
LP	21,0 ± 3,5	92,5 ± 9,9	19,9 ± 4,6	55,5 ± 7,2	17,1 ± 2,6	36,3 ± 8,8

Ces valeurs multipliées par 100 correspondent au pourcentage des organites où l'^{125}I-ASF est directement accessible à la protéinase K et est donc présenté à la face externe de leur membrane; ces organites sont essentiellement des vésicules provenant de fragments de la membrane plasmique. On constate que dans toutes les fractions, le rapport est beaucoup plus élevé après une injection hydrodynamique aux trois temps considérés. Pour estimer l'accessibilité de l'^{125}I-ASF à la protéinase K dans l'ensemble des structures sédimentables de l'homogénat, nous avons multiplié ces rapports par le pourcentage de radioactivité totale récupéré dans la fraction et nous avons additionné ces valeurs. Les sommes ainsi obtenues sont représentées à la **figure 16** en fonction du temps suivant l'injection. Après une injection conventionnelle, la proportion de structures où l'^{125}I-ASF est directement accessible à la protéinase K est faible aux temps courts, supposant une internalisation extrêmement rapide de la protéine. Par contre, cette proportion est très élevée 30 secondes après l'injection hydrodynamique, elle diminue ensuite progressivement tout en

restant nettement plus élevée qu'après une injection conventionnelle jusqu'à au moins 10 minutes après l'injection. Ces résultats sont donc en accord avec les résultats de centrifugation suggérant que l'internalisation de l'ASF captée par le foie est nettement ralentie après une injection hydrodynamique. Toutefois, on ne peut totalement exclure que l'injection hydrodynamique conduise à une perméabilisation de la membrane plasmique qui persisterait pendant un temps relativement long. Cette perméation rendrait accessible à la protéinase K l'asialofetuine internalisée.

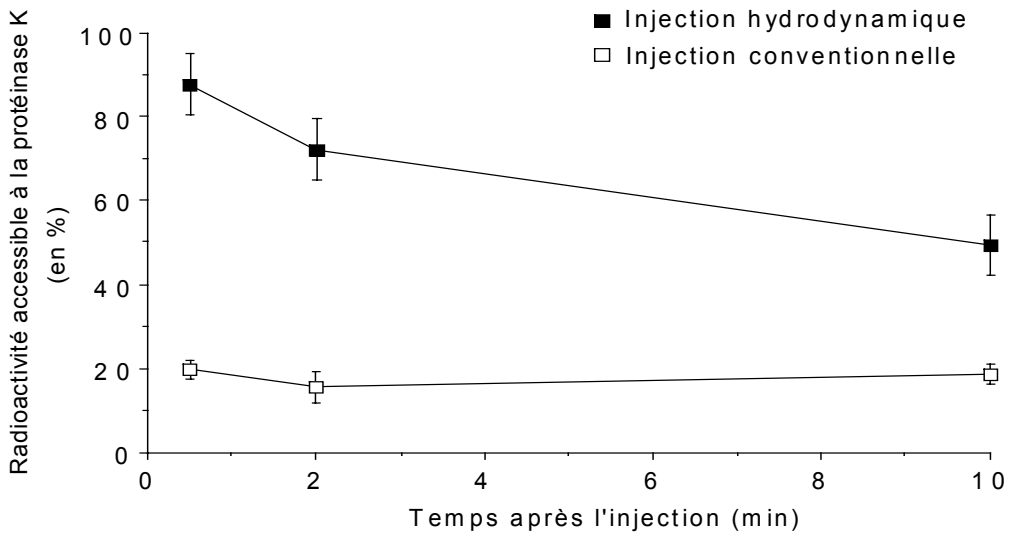


Figure 16. *Accessibilité à la protéinase K de l'asialofétuine présente dans les fractions sédimentables. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml ou de 0,2 ml de NaCl isotonique et le foie prélevé à des temps variables après l'injection. Les fractions sédimentables N, M, L+P ont été incubées avec la protéinase K (10 µg/ml) à 25°C avec du tampon Tris 50 mM à pH 8 , et en absence ou en présence de Triton X100 à une concentration de 0,1 %. La radioactivité acido soluble est déterminée après précipitation au TCA à 5 %. La radioactivité accessible à la protéinase K dans chaque fraction est égale au rapport de la radioactivité acido soluble mesurée en absence et en présence de Triton X-100. La totalité de la radioactivité accessible à la protéinase K égale la somme des produits des radioactivités acido-solubles de chaque fraction par le pourcent de radioactivité mesurée dans la fraction correspondante. (voir* ***tableau 3****).*

3.1.9. RADIOACTIVITE ASSOCIEE A LA FRACTION NON SEDIMENTABLE

Revenons maintenant à la radioactivité non sédimentable de l'homogénat. Comme il était signalé au **tableau 1**, la proportion de la radioactivité de l'homogénat présente dans S est plus élevée après injection hydrodynamique. Le problème qui se pose est celui de l'origine de cette radioactivité. Provient-elle du cytosol ou du milieu extérieur à la cellule, essentiellement du sang qui reste dans le foie après son isolement et qui se retrouve dans l'homogénat ? Nous avons abordé cette question de deux façons. Nous avons tout d'abord établi la distribution de la radioactivité dans des homogénats de foies perfusés, c'est-à-dire, débarrassés en grande partie de sang. Toutefois, la perfusion du foie après injection hydrodynamique s'est révélée souvent difficile. Aussi, avons-nous choisi, pour le fractionnement dans ce cas, les foies qui visuellement apparaissaient bien décolorés et par conséquent, largement dépourvus de sang. Néanmoins, il est certain que ces foies retiennent plus de sang après perfusion que lorsqu'ils sont isolés après injection conventionnelle.

Comme le montre la **figure 17**, après injection conventionnelle, la perfusion conduit à une nette diminution de la radioactivité présente dans S qui tombe de 30 à 10 %. Celle-ci provient donc en grande partie du sang présent dans l'homogénat. L'effet de la perfusion est nettement moins marqué après injection hydrodynamique et, de toute façon, la proportion de radioactivité dans S reste plus élevée après ce type d'injection. Ces résultats suggèrent que l'excès de radioactivité dans S après injection hydrodynamique n'est pas dû uniquement à une rétention plus grande de sang dans le foie. Deux possibilités peuvent être envisagées. Une partie de la radioactivité après injection hydrodynamique est localisée à l'extérieur de la cellule dans des territoires dépourvus de sang comme les canalicules biliaires et/ou elle est intracellulaire et se retrouve dans le cytosol. Pour répondre à cette question, nous avons isolé des hépatocytes après injection conventionnelle ou hydrodynamique d'^{125}I-ASF et mesuré la

proportion de radioactivité récupérée dans la fraction non sédimentable de l'homogénat de ces cellules, les animaux étant sacrifiés plus ou moins 2 minutes après l'injection d'ASF.

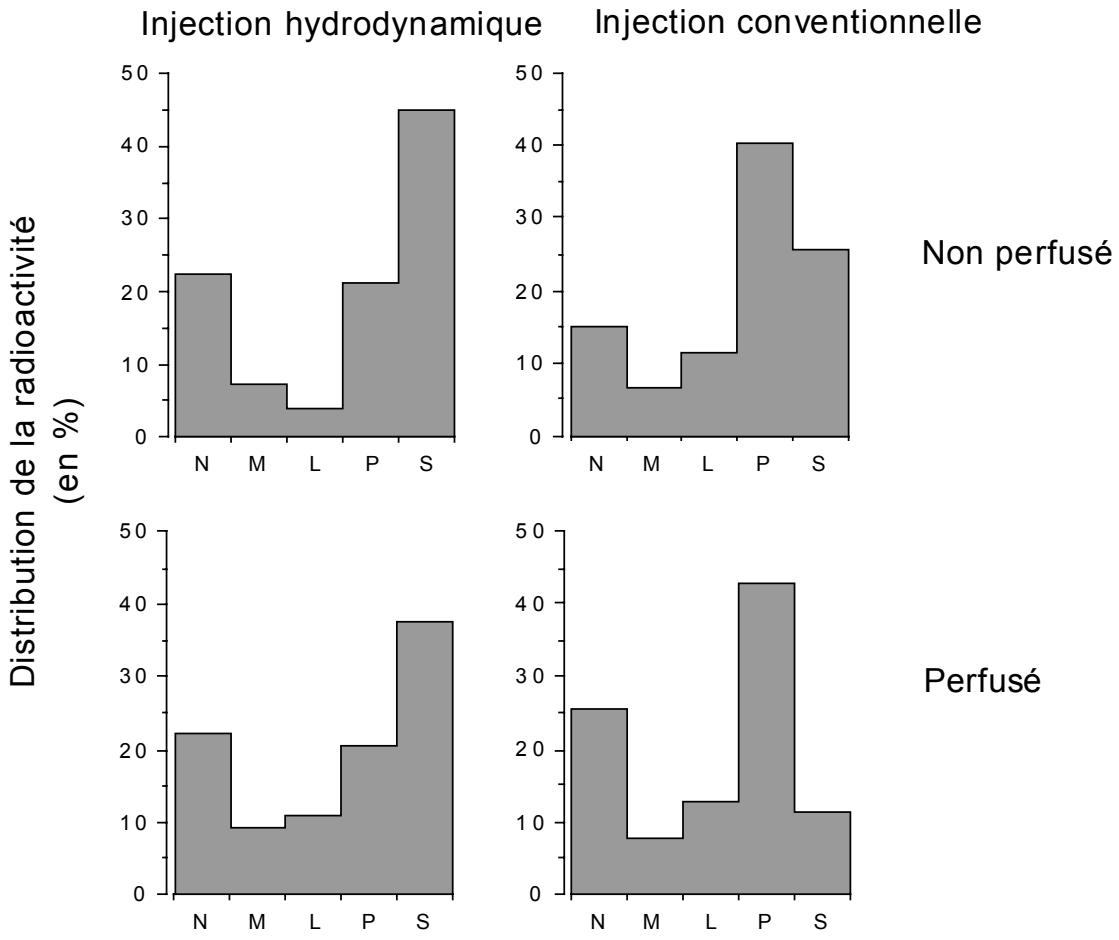


Figure 17. Distribution de la radioactivité dans les fractions N, M, L, P et S après centrifugation différentielle. Effet de la perfusion : L*es souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les foies ont été prélevés 2 min après l'injection et perfusés ou non avec du NaCl isotonique glacé*

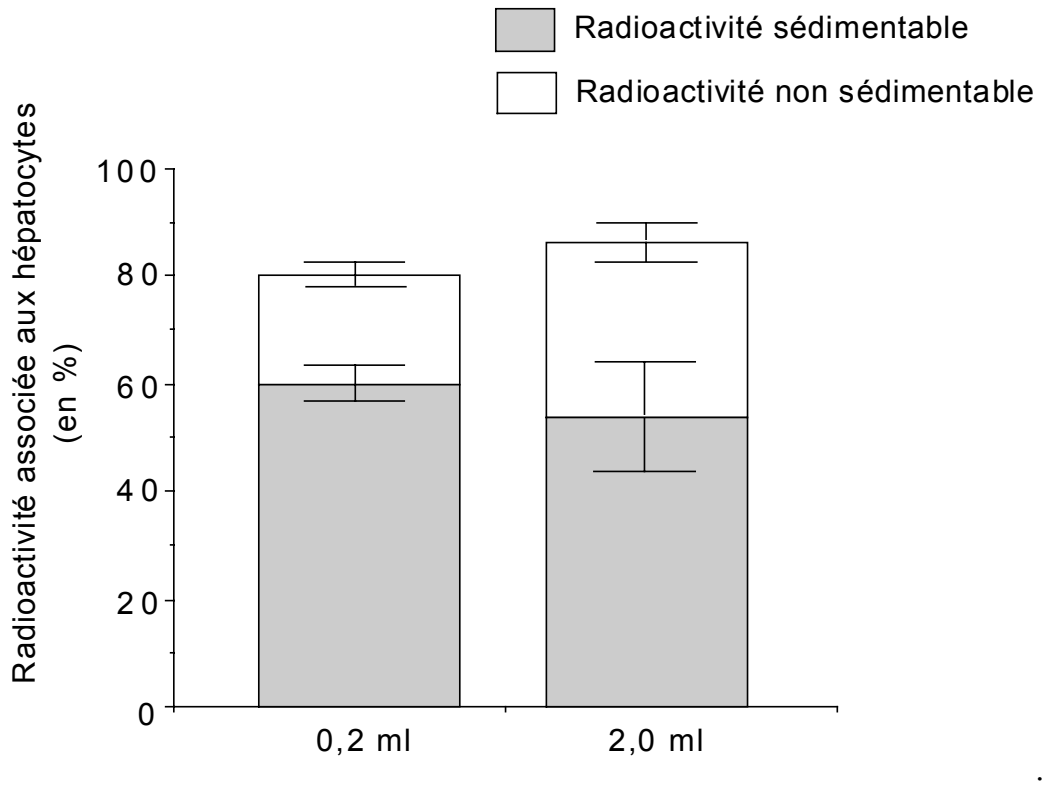


Figure 18. Répartition intercellulaire de l'asialofétuine et pourcentage de radioactivité non sédimentable dans les hépatocytes. *Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique et les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses isolées 1 min 45 sec après l'injection. Les hépatocytes sont homogénéisés et les homogénats soumis à une centrifugation différentielle. Le pourcentage de radioactivité est mesuré dans la fraction non sédimentable S. Les surfaces blanches représentent la radioactivité non sédimentable et la somme des surfaces blanches et grises le pourcentage de radioactivité du foie associé aux hépatocytes. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

Comme l'indique la **figure 18**, en moyenne 80 % de la radioactivité du foie étaient associés aux hépatocytes dans ces conditions. Les moyennes de la radioactivité non sédimentable pour les deux types d'injection sont très significativement différentes ($p<0,01$). Cela montre qu'une certaine proportion de la radioactivité non sédimentable trouvée dans les homogénats de foie après injection hydrodynamique est d'origine intracellulaire.

3.1.10. INFLUENCE D'UNE INJECTION HYDRODYNAMIQUE ADMINISTREE AVANT UNE INJECTION CONVENTIONNELLE D'ASF

Les résultats que nous venons de présenter montrent que l'injection hydrodynamique d'ASF affecte l'endocytose de cette protéine par le foie. Nous avons recherché si les modifications du foie responsables de ce phénomène persistaient pendant un certain temps. Dans ce but, nous avons injecté du NaCl à des souris par la méthode hydrodynamique, ensuite après des temps croissants, nous leur avons injecté un petit volume d'ASF I^{125}. Deux minutes après cette injection, les animaux ont été sacrifiés et la distribution de la radioactivité du foie établie par centrifugation différentielle. Les résultats sont présentés au **tableau 4** et à la **figure 19**.

Il est manifeste que jusqu'à au moins 60 minutes après l'injection hydrodynamique de NaCl, la distribution de la radioactivité est similaire à celle que l'on observe après une injection hydrodynamique unique d' ^{125}I-ASF et se caractérise entre autre par la présence d'une proportion importante de celle-ci dans la fraction non sédimentable de l'homogénat. Une telle distribution est très nettement différente de celle que l'on obtient après une injection conventionnelle. La distribution de la radioactivité dans les fractions sédimentables est également affectée par l'injection séquentielle comme elle l'est après une injection hydrodynamique directe de la protéine avec une augmentation de la proportion associée à la fraction N au détriment semble-t-il de la fraction P (**figure 20**)

Tableau 4. *Radioactivité totale en fonction de la dose injectée et Distribution intracellulaire de la radioactivité après une double injection. Les souris ont reçu une injection hydrodynamique de 2 ml de NaCl isotonique et ensuite, à des temps variables 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les foies ont été prélevés 2 min après l'injection d'ASF-^{125}I. Les homogénats ont ensuite été fractionnés par centrifugation différentielle. Les déviations standard proviennent d'expériences sur 2 animaux. A titre de contrôle sont représentées les données concernant une injection simple conventionnelle (0,2 ml) et une injection simple hydrodynamique (2,0 ml)*

Double Injection

Temps	% capté	Radioactivité (%)				
		N	M	L	P	S
1 min	43,8	16,64	5,09	3,89	20,72	53,67
10 min	56,8	15,03	8,51	4,5	19,81	52,14
60 min	38,5	10,77	3,97	2,88	21,4	60,98

Injection simple

Volume injecté	% capté	Radioactivité (%)				
0,2 ml	90,8	15,0	5,7	9,5	48,6	21,2
2,0 ml	74,6	21,1	6,34	4,52	20,48	47,54

Le phénomène semble toutefois moins marqué lorsque le temps entre les deux injections augmente. Ces résultats indiquent que la ou les modifications du foie provoquées par l'injection hydrodynamique et qui affectent la distribution intracellulaire de l'ASF ^{125}I, persistent de nombreuses minutes après cette injection.

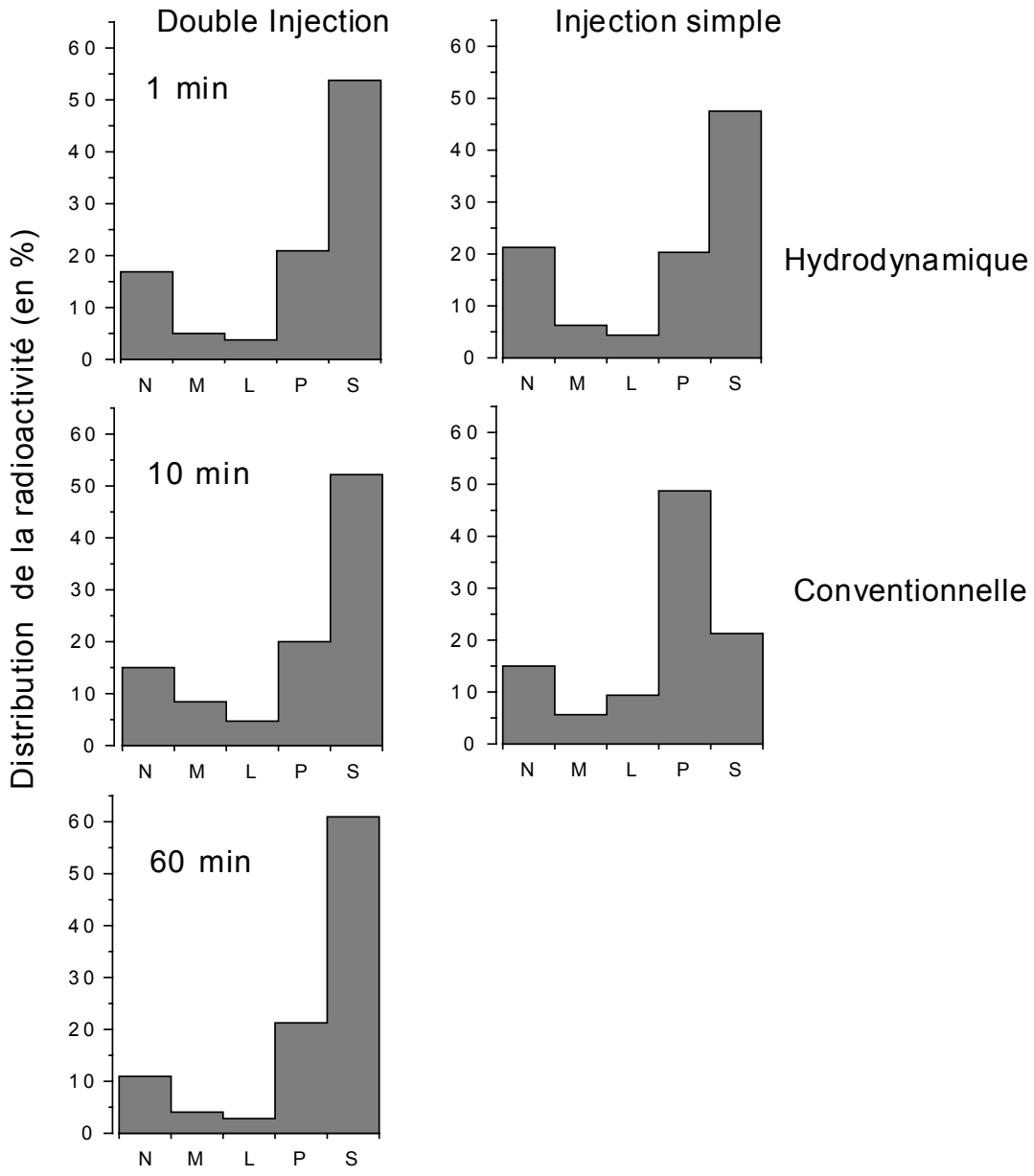


Figure 19. Double injection:distribution de la radioactivité dans les fractions N, M, L, P et S après centrifugation différentielle. *Les souris ont reçu 1) une double injection de 2,0 ml de NaCl isotonique et ensuite 1 min, 10 min ou 60 min plus tard de 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 0,2 ml. 2) une seule injection de la même quantité d'ASF marqué soit dans un volume de 2 ml (injection hydrodynamique) soit de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les foies sont prélevés 2 min après la dernière injection.*

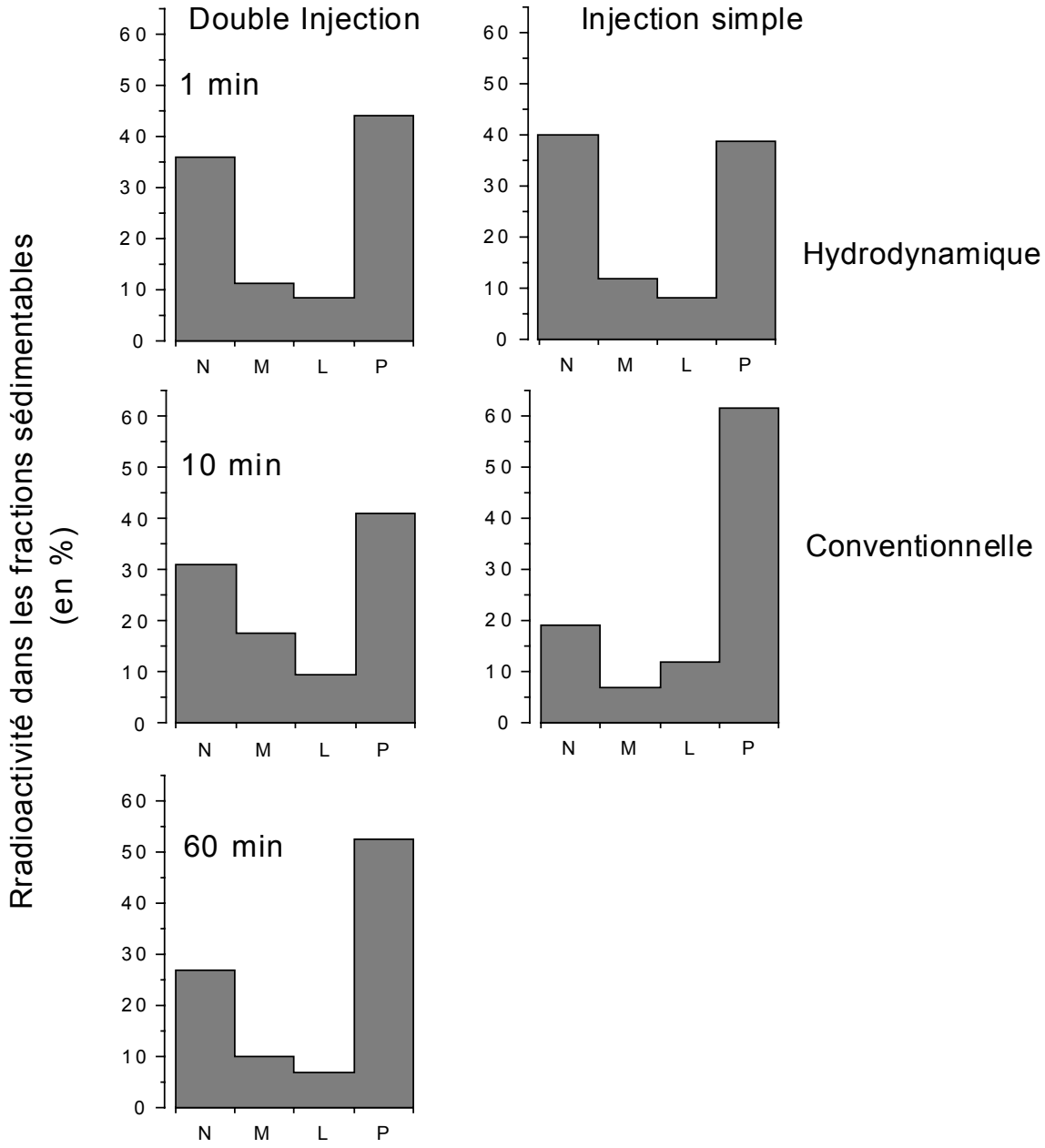


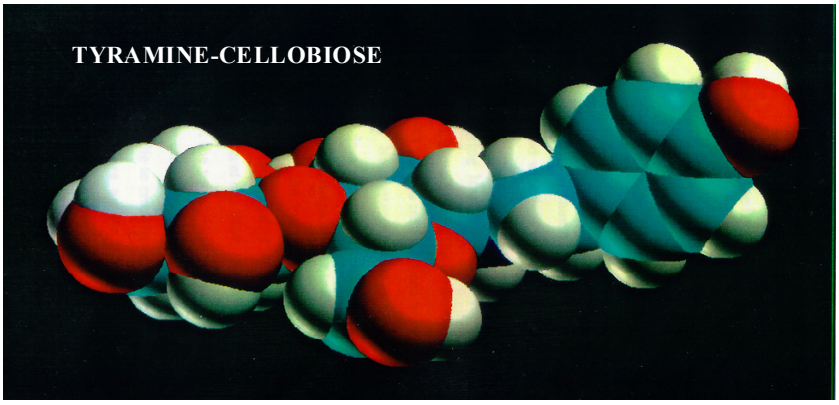
Figure 20. Double injection:distribution de la radioactivité dans les fractions sédimentables N, M, L et P après centrifugation différentielle*. Les souris ont reçu 1) une double injection de 2,0 ml de NaCl isotonique et ensuite 1 min, 10 min ou 60 min plus tard de 3,3 µg d'asialofétuine marquée à l'iode 125 dans un volume de 0,2 ml. 2) une seule injection de la même quantité d'ASF marqué soit dans un volume de 2 ml (injection hydrodynamique) soit de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les foies sont prélevés 2 min après la dernière injection. La radioactivité des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la radioactivité de N+M+L+P.*

3.2. CAPTURE ET SORT DE L'ASIALOFETUINE MARQUEE A LA TYRAMINE CELLOBIOSE IODE 125 (^{125}I-TC-ASF)

3.2.1. INTRODUCTION

L'endocytose d'une glycoprotéine par le foie conduit cette molécule aux lysosomes où elle est dégradée. Les petites molécules provenant de cette protéolyse diffusent à travers la membrane de ces organites, sont métabolisées ou passent dans le sang. Lorsqu'il s'agit de protéines radioactives, l'interprétation des mesures de radioactivité dans l'homogénat et dans les fractions subcellulaires peut être compliquée par la présence de ces produits de dégradation et de molécules qui en dérivent. On peut même imaginer que la protéine soit rapidement dégradée dès son entrée dans les lysosomes avec comme conséquence, la quasi impossibilité de mettre en évidence l'aboutissement de cette protéine à ces organites. Evidemment, une telle situation ne se produit pas avant l'arrivée de la protéine aux lysosomes. Dans le cas de l'asialofétuine au cours des dix premières minutes qui suivent l'injection, période pendant laquelle la protéine chemine dans les endosomes primaires et secondaires (Courtoy 1993), la radioactivité que l'on mesure correspond essentiellement à la protéine intacte et permet de la situer. Pour identifier l'arrivée d'une protéine dans les lysosomes, sans être gêné par la fuite extra-lysosomale des produits de protéolyse, on peut réaliser un marquage de la protéine avec une molécule qui empêche la migration de ces produits à l'extérieur des lysosomes. C'est ce que nous avons fait dans la deuxième partie de notre travail. Nous avons utilisé de l'asialofétuine liée à la tyramine cellobiose ^{125}I. La structure de la tyramine cellobiose est représentée à la **figure 21**. L'iodination se fait au niveau de la tyramine. L'hydrolyse de la protéine marquée par cette molécule libère des produits radioactifs qui, du fait de la présence de la cellobiose, ne peuvent diffuser à travers la membrane des organites tels les lysosomes, qui est imperméable aux disaccharides. Il est donc

possible dans ce cas, après fractionnement de l'homogénat, de repérer par une mesure de radioactivité les structures subcellulaires où la protéolyse a été réalisée (Misquith, et al. 1988). L'utilisation expérimentale du TC-ASF présente toutefois certaines difficultés. Le marquage de la protéine est plus compliqué, la radioactivité spécifique est nettement plus faible et la protéine risque d'être davantage modifiée que par un simple marquage à l'^{125}I. C'est la raison pour laquelle nous avons fait appel d'abord dans nos expériences à l' ^{125}I- ASF . Vu nos résultats, nous avons utilisé le TC-ASF dans des expériences semblables à celles décrites dans la première partie de ce travail, afin de pouvoir suivre pendant un temps plus long l'influence de l'injection hydrodynamique sur le sort intracellulaire de l'ASF, impliquant normalement le transfert aux lysosomes.



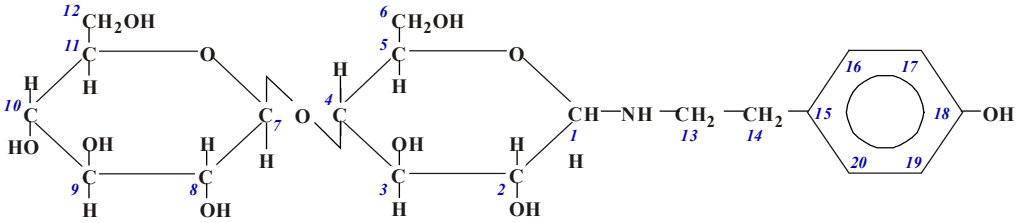


Figure 21 Structure et modèle moléculaire de la tyramine cellobiose

3.2.2. CAPTURE DE ^{125}I-TC-ASF

Comme l'illustre la **figure 22**, la radioactivité du foie augmente progressivement au cours des dix premières minutes qui suivent l'injection conventionnelle de TC-ASF pour atteindre des valeurs de 60 à 70 % de la dose injectée. Elle

diminue ensuite lentement mais correspond encore à 50 % de cette dose après 60 minutes.

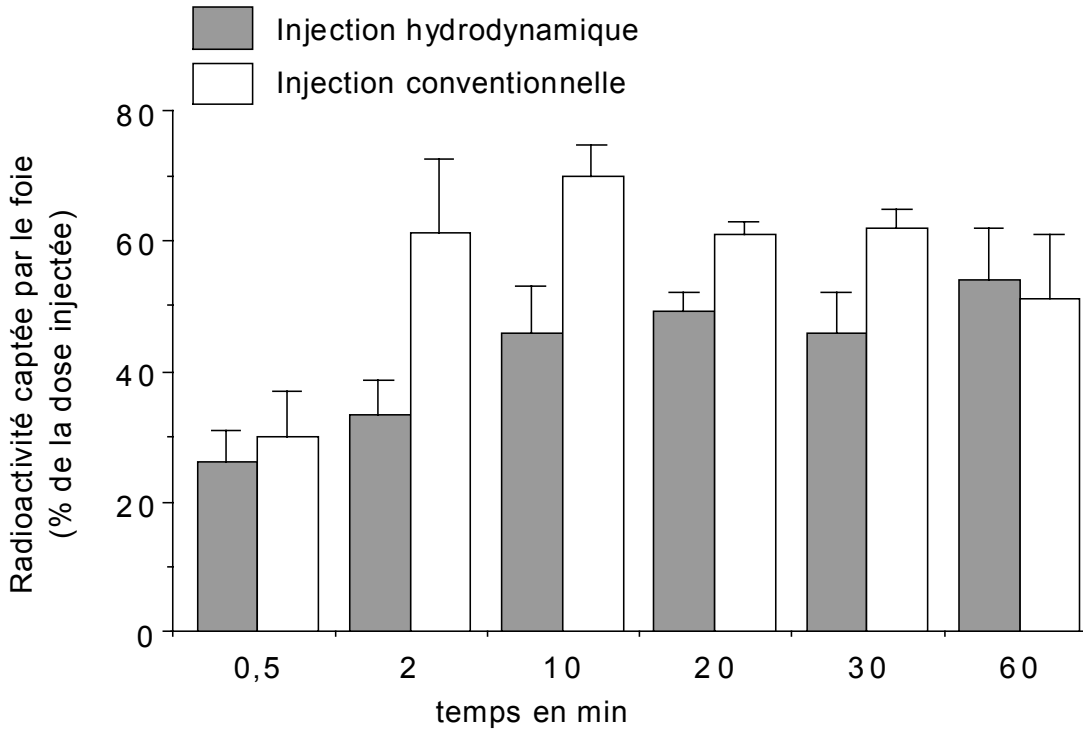


Figure 22. Capture par le foie de souris de l'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l' ^{125}I. *La radioactivité est mesurée dans les homogénats de foies de souris à des temps croissants après l'injection. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

La molécule commence à subir une protéolyse entre la dixième et la vingtième minute. Après 60 minutes, plus de 70 % de la radioactivité du foie est sous forme acido-soluble (**figure 23**). Jusqu'à au moins 30 minutes après une injection hydrodynamique de TC-ASF, la radioactivité du foie est nettement inférieure à celle que l'on obtient après une injection conventionnelle. Après 60 minutes, les radioactivités hépatiques sont comparables pour les deux types d'injection. Cependant la protéolyse est retardée après injection hydrodynamique, la vitesse d'apparition de la radioactivité acido-soluble dans l'homogénat est nettement plus faible entre la dixième et la vingtième minute

suivant l'injection. Plus tard, elle est comparable à celle que l'on observe après une injection conventionnelle (**figure 23**).

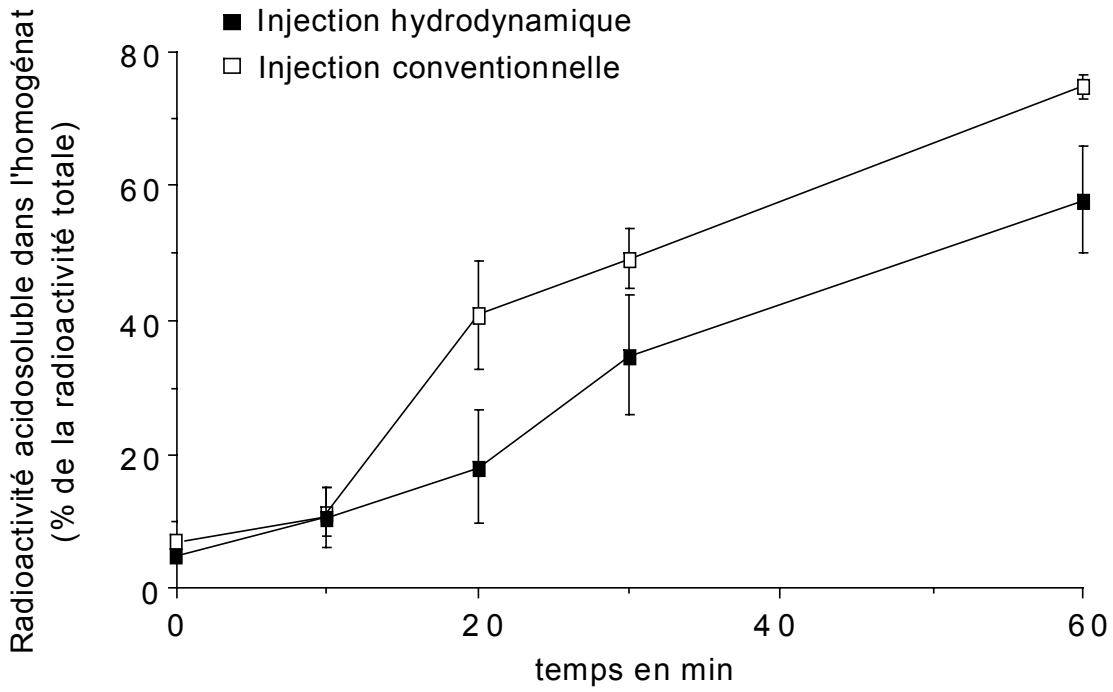


Figure 23. Capture par le foie de souris de l'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l' Iode 125*: radioactivité acido-soluble dans l'homogénat. La radioactivité acido-soluble est déterminée après précipitation au TCA à 5 % des homogénats de foies de souris et rapportée à la radioactivité totale à des temps croissants après l'injection. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

3.2.3. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE: ASPECT GENERAL

Un aperçu général des distributions de la radioactivité dans les fractions isolées par centrifugation est donné au **tableau 5**. Comme on l'observait après l'injection de ^{125}I-ASF, la radioactivité récupérée dans la fraction non sédimentable S est beaucoup plus élevée surtout pendant les dix premières minutes après une injection hydrodynamique. On observe également dans ce cas

un pourcentage de radioactivité plus faible dans la fraction P et plus élevé dans la fraction N.

Tableau 5. Distribution intracellulaire de la radioactivité dans le foie. *Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les foies ont été prélevés à des temps variables après l'injection d'*^{125}*I-ASF. Les homogénats ont ensuite été fractionnés par centrifugation différentielle. . Les déviations standard proviennent d'expérience sur 3 animaux.*

Temps (min)	Volume injecté (ml)	Radioactivité totale (%)				
		N	M	L	P	S
0,5	0,2	15,19 ± 0,59	8,07 ± 1,96	10,87 ± 5,30	43,40 ± 2,10	22,47 ± 3,34
	2	17,44 ± 2,49	7,45 ± 0,87	7,37 ± 0,71	12,40 ± 0,87	55,34 ± 3,60
2	0,2	7,59 ± 0,37	8,34 ± 1,42	23,16 ± 2,97	35,39 ± 4,59	25,52 ± 0,29
	2	13,96 ± 0,16	9,39 ± 1,28	8,36 ± 1,79	12,57 ± 0,51	55,72 ± 2,53
10	0,2	12,50 ± 2,19	15,67 ± 1,65	26,90 ± 3,10	32,03 ± 5,44	12,90 ± 4,39
	2	23,57 ± 7,25	14,80 ± 3,76	7,90 ± 2,36	18,67 ± 3,53	35,07 ± 3,03
20	0,2	15,12 ± 3,88	22,71 ± 2,33	26,59 ± 4,18	24,86 ± 2,43	10,72 ± 1,31
	2	24,56 ± 9,10	13,39 ± 0,78	18,02 ± 6,71	18,57 ± 5,32	25,46 ± 3,65
30	0,2	12,00 ± 1,09	28,24 ± 1,86	34,78 ± 1,53	14,75 ± 2,04	10,23 ± 0,80
	2	19,31 ± 3,55	22,17 ± 2,49	17,40 ± 2,81	15,52 ± 2,66	25,60 ± 3,02
60	0,2	15,99 ± 0,89	55,01 ± 4,12	14,01 ± 2,27	4,05 ± 0,14	10,94 ± 1,20
	2	18,41 ± 3,93	41,13 ± 7,37	13,40 ± 2,81	8,48 ± 2,15	18,59 ± 2,79

3.2.4. RADIOACTIVITE ASSOCIEE AUX FRACTIONS SEDIMENTABLES

La **figure 24** illustre la façon dont évolue la radioactivité récupérée dans les éléments sédimentables en fonction du temps qui suit l'injection. Elle montre bien que cette part de la radioactivité de l'homogénat correspondant à ce qui est

endocyté (voir précédemment) est nettement plus faible après injection hydrodynamique jusqu'à au moins 30 minutes après l'injection.

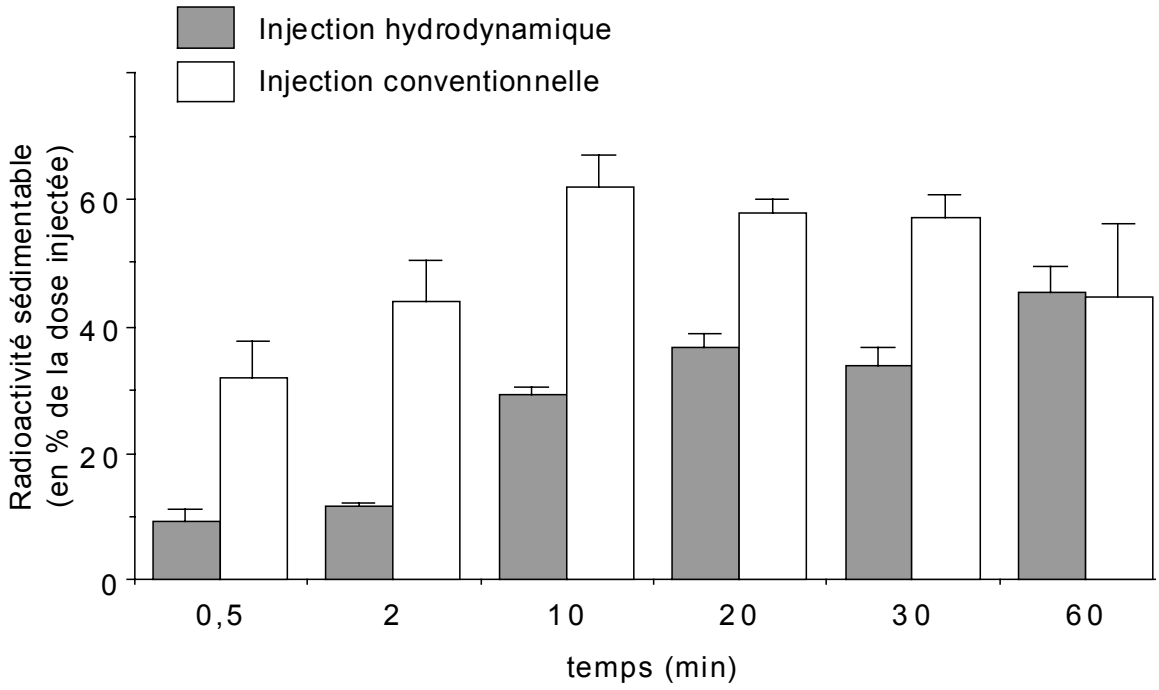


Figure 24. Capture par le foie de souris de l'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l' Iode 125: radioactivité présente dans les fractions sédimentables.. *La radioactivité est mesurée dans les fractions sédimentables de foies de souris à des temps croissants après l'injection. Les homogénats ont été soumis à une centrifugation différentielle et la somme des radioactivités des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la dose injectée. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

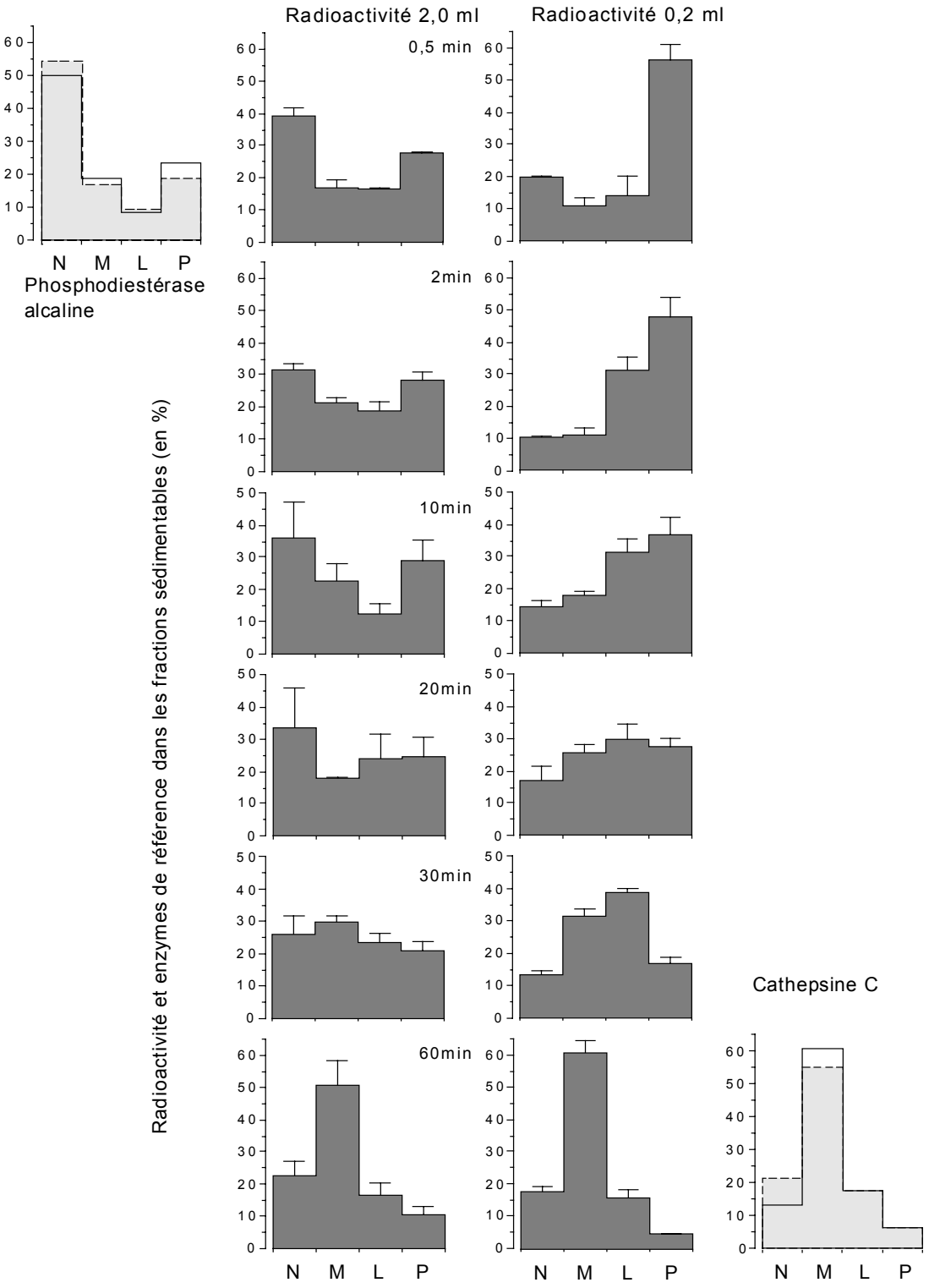


Figure 25. Distribution de l'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l' I125 dans les fractions sédimentables de foie de souris après centrifugation différentielle. *Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique et les foies prélevés à des temps croissants après l'injection. Les homogénats ont été soumis à une centrifugation différentielle et la somme des radioactivités des*

fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la radioactivité de N+M+L+P. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux. Les distributions de la cathepsine C et de la phosphodiestérase alcaline sont des moyennes ± SD de 6 fractionnements après injection de 0,2 ml (traits pointillés) ou de 2,0 ml (traits pleins).

A la **figure 25** nous rapportons les profils de distribution de la radioactivité dans les fractions sédimentables isolées par centrifugation différentielle. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité récupérée dans la somme des fractions (N+M+L+P).

Après injection conventionnelle, l'évolution de la distribution correspond globalement à un transfert progressif de la radioactivité de la fraction P à la fraction L puis la fraction M.

Les distributions après injection hydrodynamique sont sensiblement différentes. Elles se caractérisent par la présence du pourcentage de radioactivité le plus élevé dans les fractions N et P jusqu'à 10 minutes et par une distribution qui reste pratiquement la même pendant ces 10 minutes. Ces résultats sont semblables à ceux que nous avons montrés après injection d'^{125}I-ASF. Plus tard, on constate une diminution progressive de la radioactivité de ces deux fractions au profit des fractions L et M jusqu'à atteindre après 60 minutes une distribution comparable à celle que l'on voit après une injection conventionnelle caractérisée par la présence d'une proportion importante de la radioactivité dans la fraction M et qui est similaire à celle de la cathepsine C, marqueur des lysosomes.

Aux temps courts après l'injection conventionnelle de ASF ou de TC-ASF, la présence de la radioactivité en majorité dans la fraction P peut s'expliquer par le fait qu'à ce moment, comme nous le signalions pour l'ASF, le TC-ASF est encore essentiellement associé aux petites vésicules de pinocytose et aux fragments de la membrane basolatérale où se trouvent les récepteurs aux asialoglycoprotéines (Ashwell and Harford 1982; Berg, et al. 1985; Courtoy

1993; Geuze, et al. 1983; Kolb-Bachofen 1981). Ces éléments membranaires sont localisés dans la fraction P. Progressivement, la radioactivité de la fraction P diminue au profit des fractions L et M où sont localisés les endosomes et les lysosomes. L'évolution de la distribution de la radioactivité, après injection conventionnelle, est celle que l'on observe classiquement pour une protéine endocytée et correspond à un transfert progressif de cette protéine, des vésicules de pinocytose (fraction P) provenant du pôle sinusoïdal de l'hépatocyte aux lysosomes (fraction M+L) via le système endosomal (fractions P et L). Après une injection hydrodynamique, l'évolution de la distribution laisse supposer qu'un retard dans le transfert se produit au moins pendant les dix premières minutes qui suivent l'injection, en accord avec ce que nous avons présenté pour l'ASF. Pendant ce temps, la distribution de la radioactivité reste pratiquement inchangée indiquant que pendant cette période, le TC reste associé aux même structures. Plus tard, l'évolution de la distribution est semblable à celle observée après injection conventionnelle, supposant que le transfert de TC-ASF aux lysosomes se réalise. Tout se passe comme si l'injection hydrodynamique contrecarrait le transfert de TC-ASF du compartiment membrane plasmique-vésicules de pinocytose au compartiment endosomo-lysosomal.

3.2.5. ANALYSE DES FRACTIONS SEDIMENTABLES PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

Pour obtenir plus de renseignements sur le cheminement intracellulaire du TC-ASF, après les deux types d'injection, nous avons analysé les fractions L+P et M+L par centrifugation isopycnique.

3.2.5.1. ANALYSE DE LA FRACTION L+P PAR CENTRIFUGATION DANS UN GRADIENT DE SACCHAROSE

Nous avons signalé précédemment l'intérêt que présentait la fraction L+P, pour obtenir des renseignements sur le cheminement intracellulaire d'une protéine

endocytée, dans les premiers temps après l'injection. Les résultats obtenus avec le TC-ASF (**figure 26**) sont comparables à ceux obtenus avec l'ASF (**figure 14**).

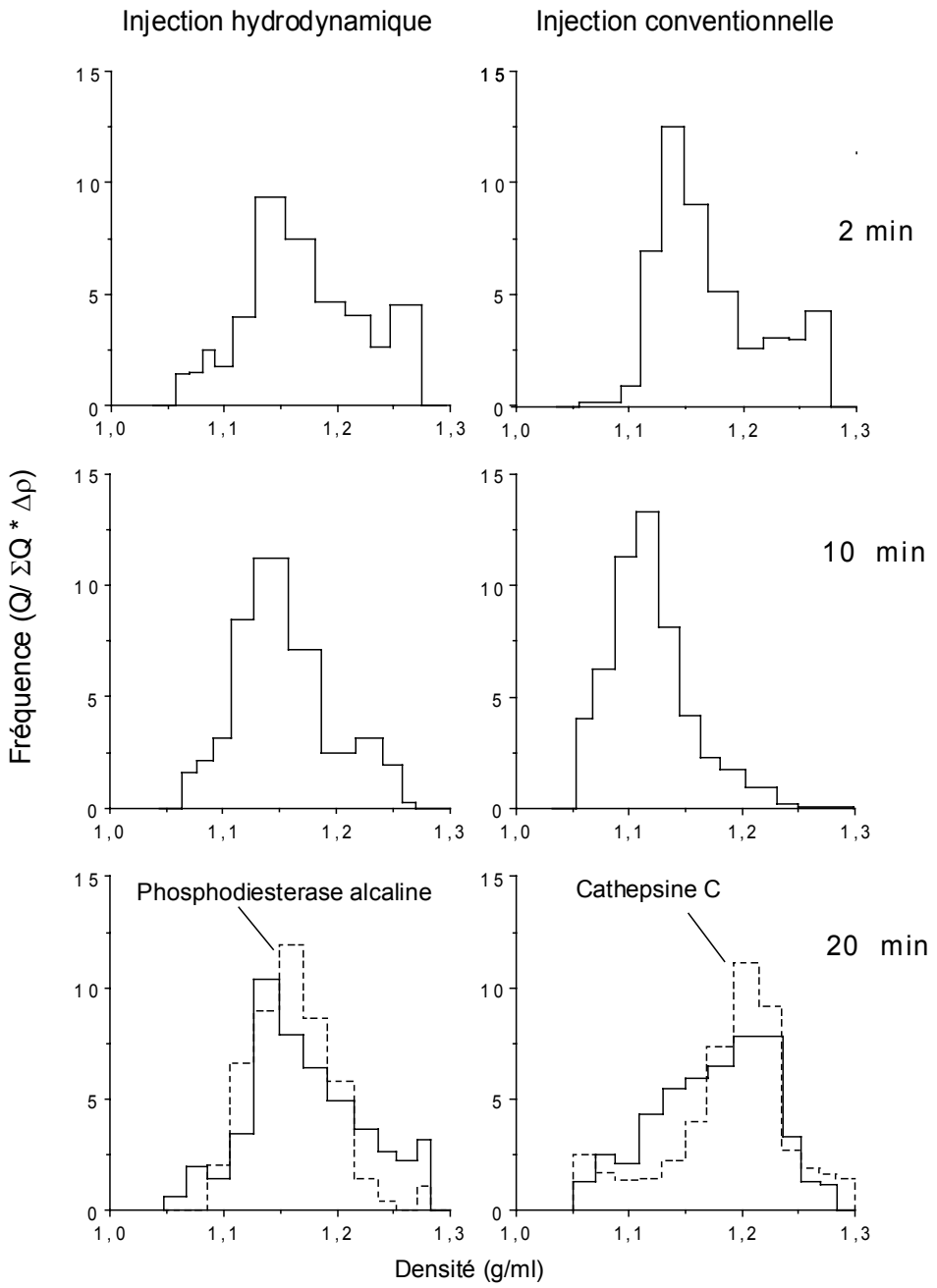


Figure 26. Distribution de la radioactivité, de la cathepsine C et de la phosphodiestérase alcaline de fractions L+P en gradient isopycnique de saccharose*. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique et le foie prélevé 2 min, 10 min ou 20 min après l'injection. La radioactivité est représentée en traits pleins, les enzymes en traits pointillés.*

Après injection conventionnelle, on observe dans les premières minutes, un transfert de la radioactivité vers une population de structures légères, correspondant vraisemblablement aux endosomes secondaires. Un tel changement n'est pas observé après injection hydrodynamique. Cela laisse supposer un retard dans le transfert du TC-ASF de la membrane plasmique aux endosomes secondaires via les vésicules de pinocytose et les endosomes primaires. Vingt minutes après l'injection conventionnelle, la courbe de distribution se situe dans une zone plus dense, là où comme le montre la distribution de la cathepsine C se retrouvent les lysosomes. A ce temps, après une injection hydrodynamique, la distribution de la radioactivité n'a pas changé, elle se superpose à la distribution de l'enzyme marqueur de la membrane plasmique, la phosphodiestérase alcaline.

3.2.5.2. ANALYSE DE LA FRACTION ML PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE DANS UN GRADIENT DE SACCHAROSE

L'aboutissement normal de l'asialofétuine endocytée est le système lysosomal où la protéine est dégradée. Les données que nous avons présentées résultant des expériences de centrifugation différentielle suggèrent qu'il en est de même après une injection hydrodynamique. Nous avons toutefois voulu nous en assurer en analysant la fraction ML après centrifugation isopycnique. C'est dans cette fraction que se trouvent la majeure partie des lysosomes. La **figure 27** montre la distribution de la radioactivité après centrifugation dans un gradient de saccharose d'une fraction ML isolée du foie, une heure après une injection hydrodynamique de TC-ASF. La distribution de la cathepsine C permet de localiser les lysosomes dans le gradient. Il est manifeste que les courbes de distribution de la radioactivité et de l'hydrolase lysosomale sont comparables.

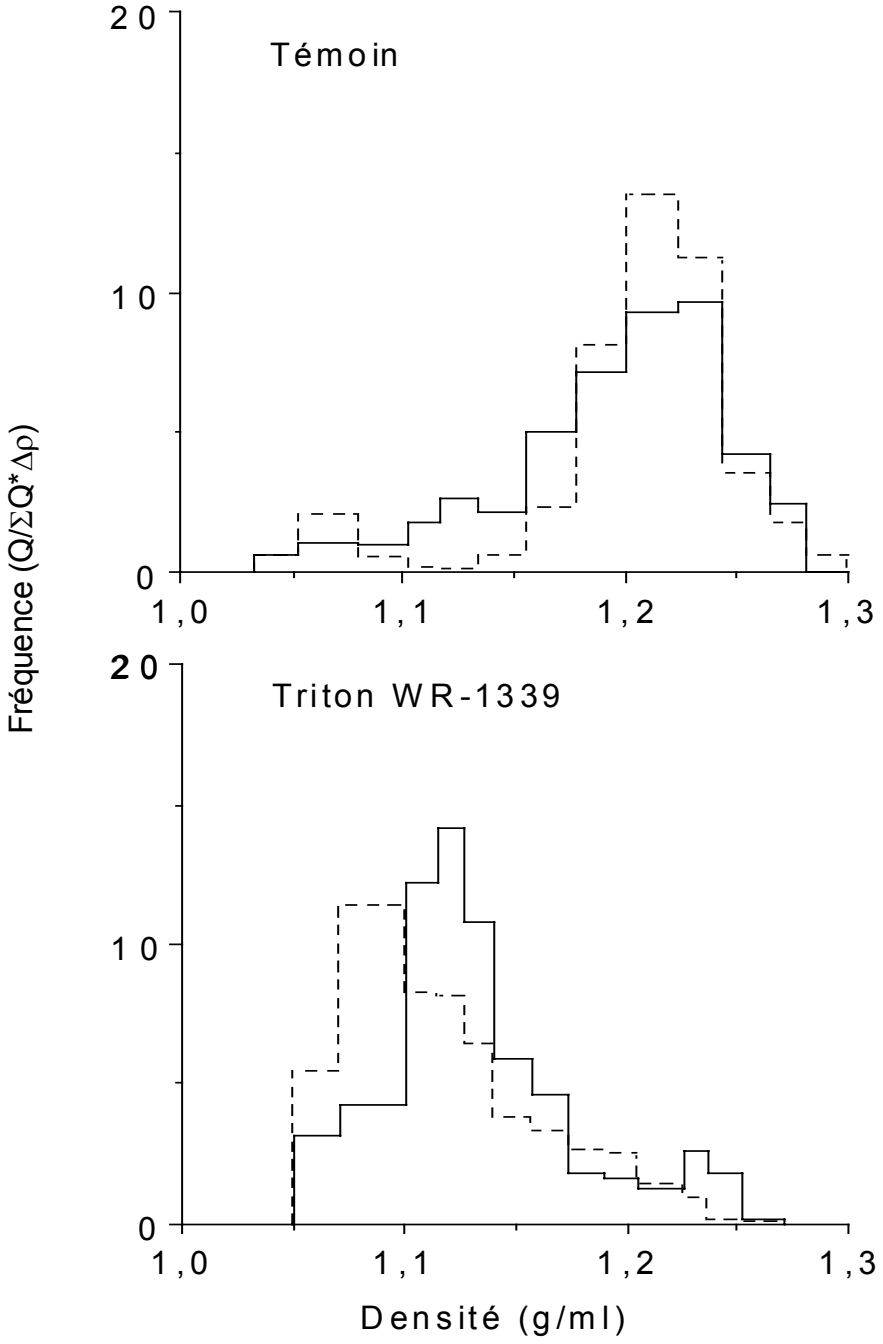


Figure 27. Distribution de la radioactivité et de la cathepsine C d'une fraction M+L en gradient isopycnique de saccharose. *Effet du Triton WR-1339 Les souris ont reçu ou non une injection de Triton WR-1339 et 4 jours plus tard une injection de 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml de NaCl isotonique. Le foie a été prélevé 1 heure après l'injection. La radioactivité est représentée en traits pleins,la cathepsine C en traits pointillés.*

Cette similitude est retrouvée quand la distribution des lysosomes est modifiée à la suite d'une injection à la souris de Triton WR-1339. Ce détergent, après injection, est capté par le foie et s'accumule dans les lysosomes. Vu la faible densité de ce composé, la densité des lysosomes, qui en sont chargés, diminue très nettement comme le montre la distribution de leurs enzymes après centrifugation isopycnique. C'est ce qui est illustré à la figure 24, la distribution de l'hydrolase lysosomale, la cathepsine C est déplacée vers les zones de faible densité du gradient de saccharose lorsque la souris a reçu une injection de Triton WR-1339 (Wattiaux 1963). On constate que la courbe de distribution de la radioactivité subit le même glissement dans le gradient, indiquant en toute certitude la localisation lysosomale des produits marqués.

3.2.5.3. RADIOACTIVITÉ ACIDO-SOLUBLE DANS LE SYSTÈME ENDOSOMO-LYSOSOMAL

Un renseignement supplémentaire qui peut être obtenu avec la TC-ASF concerne, comme nous le disions, la dégradation intracellulaire de la protéine. Comme le montre la **figure 23**, la radioactivité acido-soluble de l'homogénat augmente au cours du temps, traduisant la dégradation intracellulaire de la protéine. Il est manifeste que le processus est retardé lorsque l'injection est du type hydrodynamique. C'est également ce que l'on constate si l'on mesure plus spécifiquement la protéolyse dans le système endosomo-lysosomal en déterminant la radioactivité acido-soluble dans la fraction M+L, qui contient la majeure partie des lysosomes et une grande proportion d'endosomes (**figure 28**). Ce retard est probablement dû à un maintien plus prolongé de la protéine dans un compartiment non protéolytique, du fait d'une inhibition du transfert intracellulaire du TC-ASF dans les premières minutes qui suivent une injection hydrodynamique.

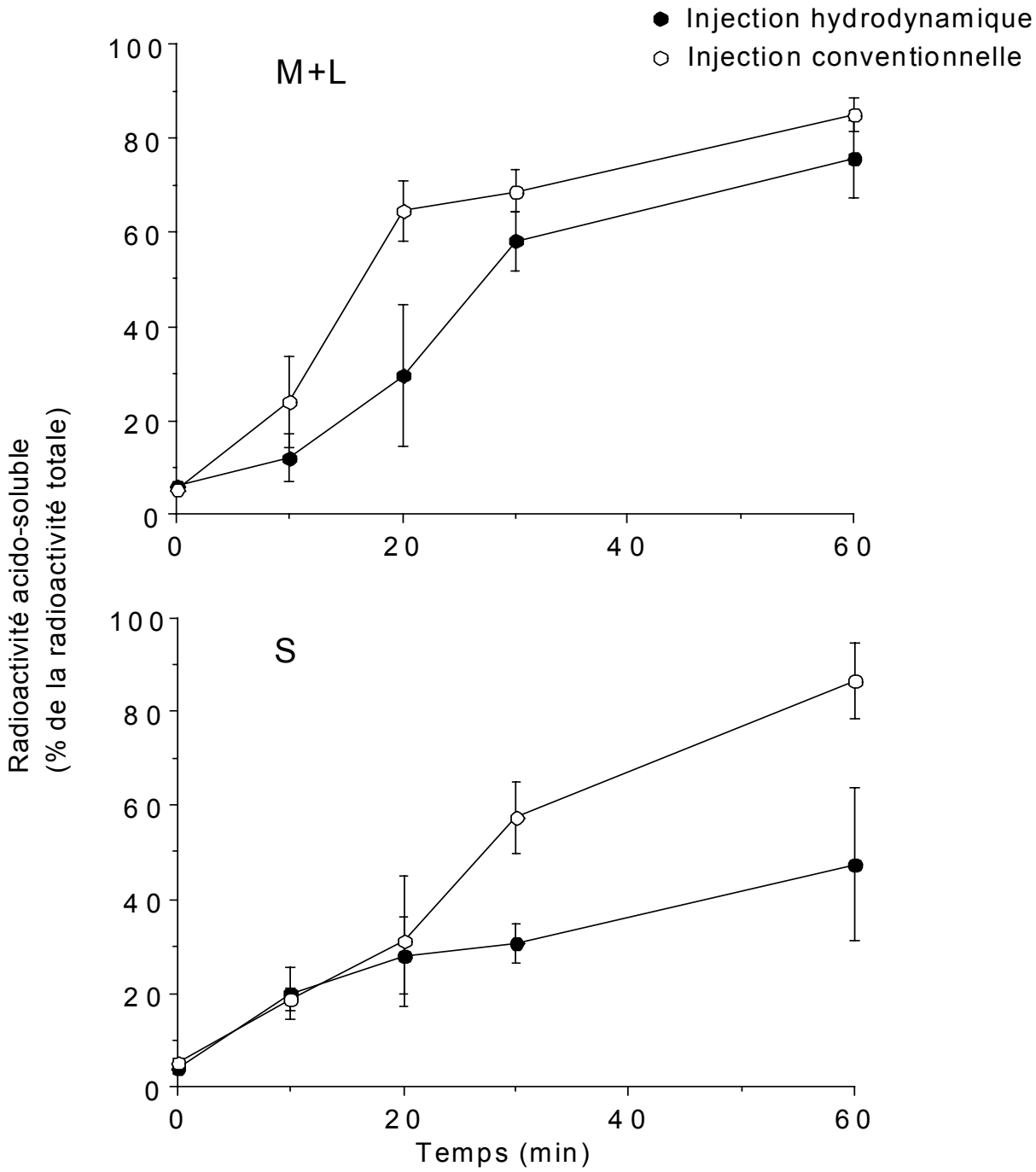


Figure 28. Capture par le foie de souris de l'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l' I125*: radioactivité acido-soluble dans les fractions M+L et S. La radioactivité acido soluble est déterminée après précipitation au TCA à 5% dans les fractions M+L et S de foies de souris et rapportée à la radioactivité totale de ces fractions à des temps croissants après l'injection. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

3.2.6. RADIOACTIVITE ASSOCIEE A LA FRACTION NON SEDIMENTABLE

Tant le **tableau 5** (voir page 87) que la **figure 24** (voir page 88) montrent que la proportion de la radioactivité de l'homogénat récupérée dans la fraction S est plus élevée après injection hydrodynamique. Les résultats sont donc semblables à ceux obtenus avec l'^{125}I- ASF et nous avons discuté de la signification de cette différence précédemment.

Une information supplémentaire peut être obtenue avec le TC-ASF, en déterminant la radioactivité acido-soluble présente dans cette fraction. Comme le montre **la figure 28**, la radioactivité acido-soluble de S augmente au cours du temps qui suit l'injection mais plus rapidement après une injection conventionnelle. En tenant compte des données du **tableau 5** et de **la figure 22**, nous avons calculé quelle était la quantité de radioactivité précipitable et acido-soluble dans la fraction S en proportion de la dose injectée. Cela nous donne une idée de la quantité de TC-ASF non dégradé et dégradé dans cette fraction. Les résultats sont présentés à **la figure 29**.

Ils illustrent que la quantité de protéine non dégradée présente dans la fraction S est toujours nettement plus élevée après injection hydrodynamique. Ils montrent également qu'après 30 et 60 minutes, la quantité de TC-ASF dégradé est pratiquement semblable pour les deux types d'injection. Cela suggère que certaines molécules de TC-ASF récupérées dans la fraction S proviennent de lysosomes lésés au cour de l'homogénéisation. Ceci expliquerait qu'un même pourcentage de radioactivité acido-soluble par rapport à la dose injectée se trouve dans la fraction S dans les deux cas. Il est à noter qu'après 60 minutes, la majeure partie du TC-ASF intralysosomal (plus de 80 %) a été dégradée quel que soit le type d'injection (**figure 28**).

Dans le cas d'une injection hydrodynamique viendrait s'ajouter à ces molécules provenant de lysosomes lésés, des molécules de TC-ASF ayant pénétré

directement dans le cytosol et de ce fait non soumises à la dégradation lysosomale.

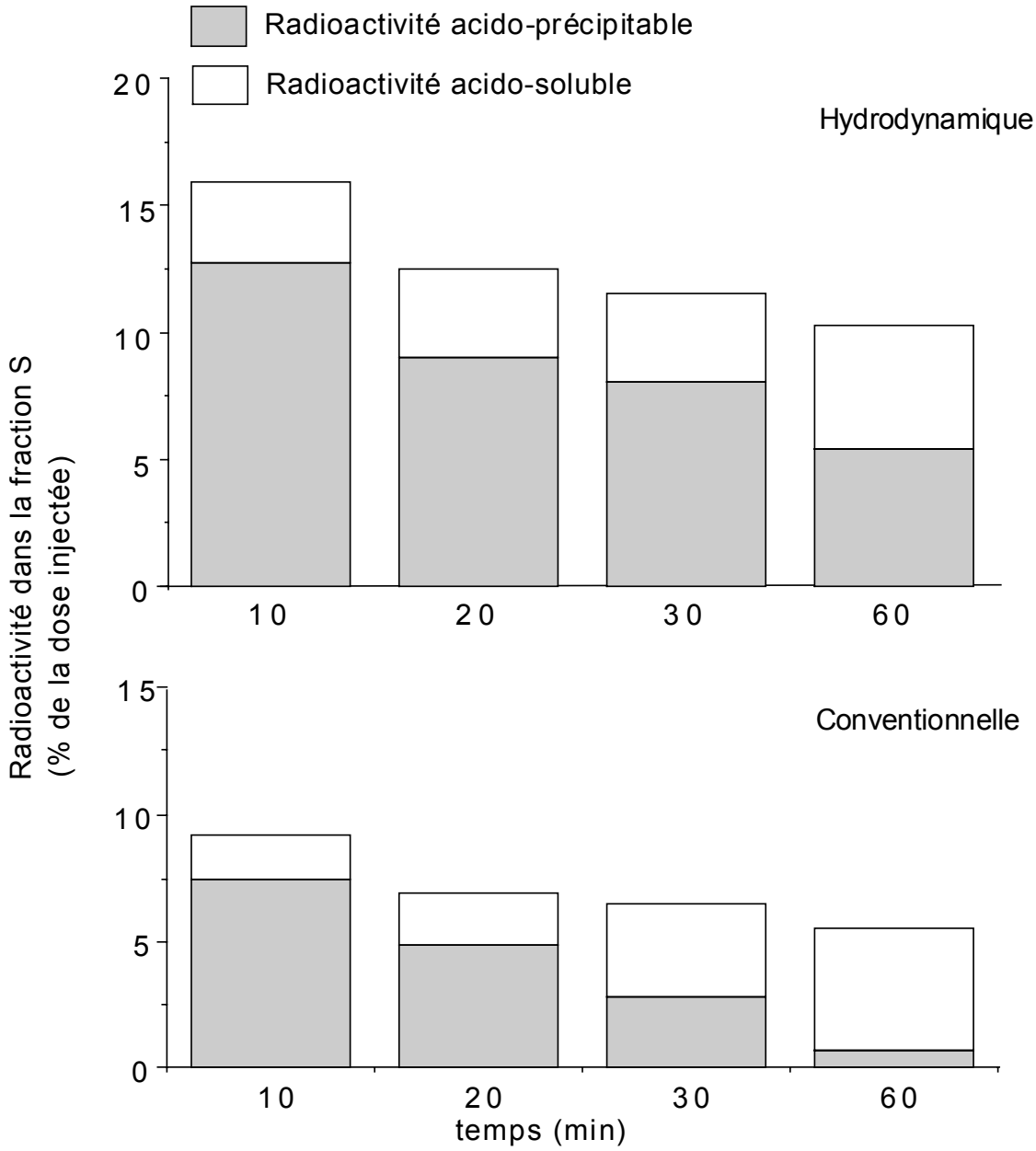


Figure 29. Capture par le foie de souris de l'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l' Iode 125: radioactivité acido-précipitable et acido soluble dans la fraction S. *La surface totale (blanche plus grisée) équivaut au pourcentage de radioactivité présente dans la fraction S par rapport à la dose injectée. Ce pourcentage est calculé en multipliant les pourcentages de radioactivité présentes dans la fraction S* ***(tableau 5)*** *par le pourcentage de radioactivité capté par le foie rapporté à la dose injectée* ***(figure 22)****. La radioactivité acido-précipitable et la radioactivité acido soluble, sont calculées sur base des données de la* ***figure 28.***

3.2.7. INJECTION HYDRODYNAMIQUE AVANT L'INJECTION CONVENTIONNELLE

Les expériences faites avec l'^{125}I-ASF suggèrent que les modifications du foie produites par l'injection hydrodynamique persistaient pendant de nombreuses minutes. Nous avons voulu vérifier qu'il en était bien ainsi en utilisant la TC-ASF. Dans ce but, nous avons d'abord injecté à la souris du NaCl isotonique par voie hydrodynamique, puis, à des temps croissants après cette injection, nous avons injecté du TC-ASF par la méthode conventionnelle. Le procédé expérimental est le même que celui utilisé pour l'^{125}I-ASF. Les résultats confirment ceux que nous avons obtenus avec cette molécule comme l'illustrent le **tableau 6** et la **figure 30**. Ils montrent que l'injection séquentielle affecte la distribution de la radioactivité comme le fait une injection hydrodynamique unique et indiquent que les modifications du foie provoquées par cette injection sont toujours présentes près d'une heure après l'injection.

Tableau 6. Radioactivité totale en fonction de la dose injectée et Distribution intracellulaire de la radioactivité après une double injection. *Les souris ont reçu une injection hydrodynamique de 2 ml de NaCl isotonique et ensuite, à des temps variables 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 0,2 ml (injection conventionnelle). Les foies ont été prélevés 2 min après l'injection de TC-ASF-^{125}I. Les homogénats ont ensuite été fractionnés par centrifugation différentielle. Les moyennes ± les déviations standard proviennent de 2 animaux.*

Temps	% capté	Radioactivité (%)				
		N	M	L	P	S
1 min	25,39 ± 3,93	17,19 ± 4,58	5,48 ± 0,07	3,70 ± 2,36	16,13 ± 1,41	57,5 ± 0,74
20 min	22,45± 10,28	14,18 ± 1,87	5,25 ± 0,69	10,16 ± 2,64	17,26 ± 5,05	53,15 ± 1,23
60 min	14,02 ± 2,50	16,41 ± 6,89	5,82 ± 0,50	6,47 ± 2,08	20,69 ± 0,56	50,62 ± 9,03

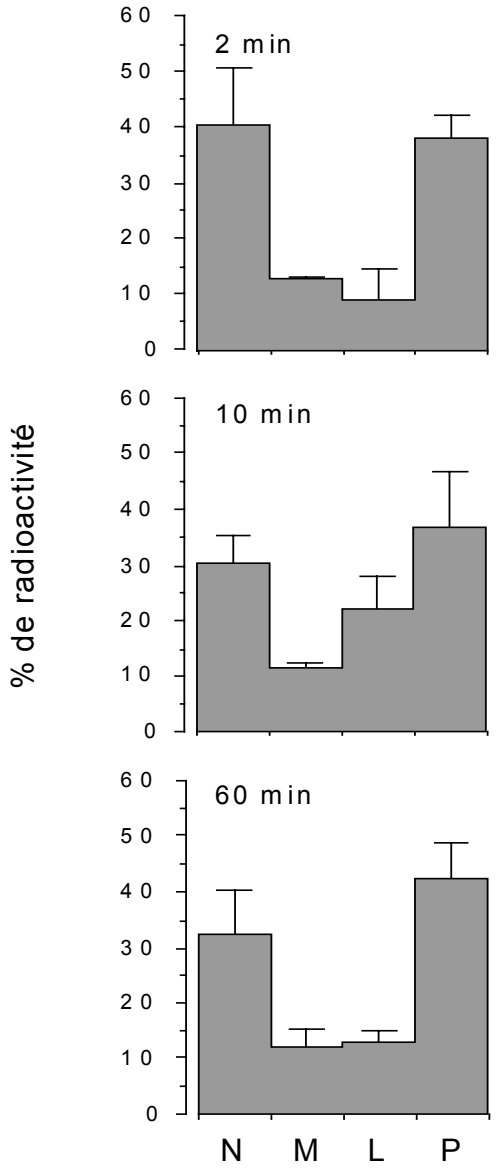


Figure 30. Distribution de l'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l' I125 dans les fractions sédimentables de foie de souris après centrifugation différentielle. Effet d'une double injection. *Les souris ont reçu une première injection de 2,0 ml de NaCl isotonique et à des intervalles variables une deuxième injection de 3,3 µg d'asialofétuine-tyramine cellobiose marquée à l'iode 125 dans un volume de 0,2 ml. Les foies ont été prélevés 2 min après la deuxième injection et les homogénats soumis à une centrifugation différentielle. La radioactivité des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la somme N+M+L+P. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins deux animaux.*

3.3. CAPTURE ET SORT DE L'INVERTASE MARQUEE A L'^{125}I

3.3.1. INTRODUCTION

Les résultats que nous avons présentés concernaient une protéine, l'asialofétuine, spécifiquement captée par les cellules parenchymateuses du foie, par endocytose médiée par récepteur. Nous avons également recherché si l'endocytose par les cellules non parenchymateuses de cet organe était influencée par l'injection hydrodynamique. Ces informations peuvent également nous apporter des renseignements indirects sur la transfection hydrodynamique. En effet, dans les conditions normales, une proportion importante de l'ADN plasmidique est captée par les cellules non parenchymateuses du foie (Lecocq, et al. 2003). Par conséquent, l'influence de l'injection hydrodynamique sur l'endocytose par les cellules sinusoïdales hépatiques est intéressante à rechercher. Par exemple, si celle-ci est inhibée par ce type d'injection, la capture de l'ADN par les cellules sinusoïdales pourrait être défavorisée au profit éventuel d'une capture par les hépatocytes. D'autre part, la possibilité éventuelle d'introduire des protéines dans le cytosol de ces cellules pourrait présenter un intérêt certain. Dans ce but, nous avons suivi la capture et le sort de l'invertase, une glycoprotéine spécifiquement endocytée par les cellules sinusoïdales du foie (Jadot, et al. 1986), après injection conventionnelle et après injection hydrodynamique. Faute de temps, nous nous sommes toutefois limité à l'essentiel en comparant les quantités d'invertase marquée à ^{125}I, endocytée par le foie et la distribution intracellulaire de cette molécule après centrifugation différentielle et ce, après injection conventionnelle ou injection hydrodynamique.

3.3.2. CAPTURE DE L'^{125}I INVERTASE

Comme l'illustre la figure 28, la radioactivité du foie atteint un maximum très tôt après l'injection d'invertase ^{125}I, maximum qui ne diffère pas pour les deux

types d'injection. Elle diminue ensuite lentement mais est encore très importante 60 minutes après l'injection.

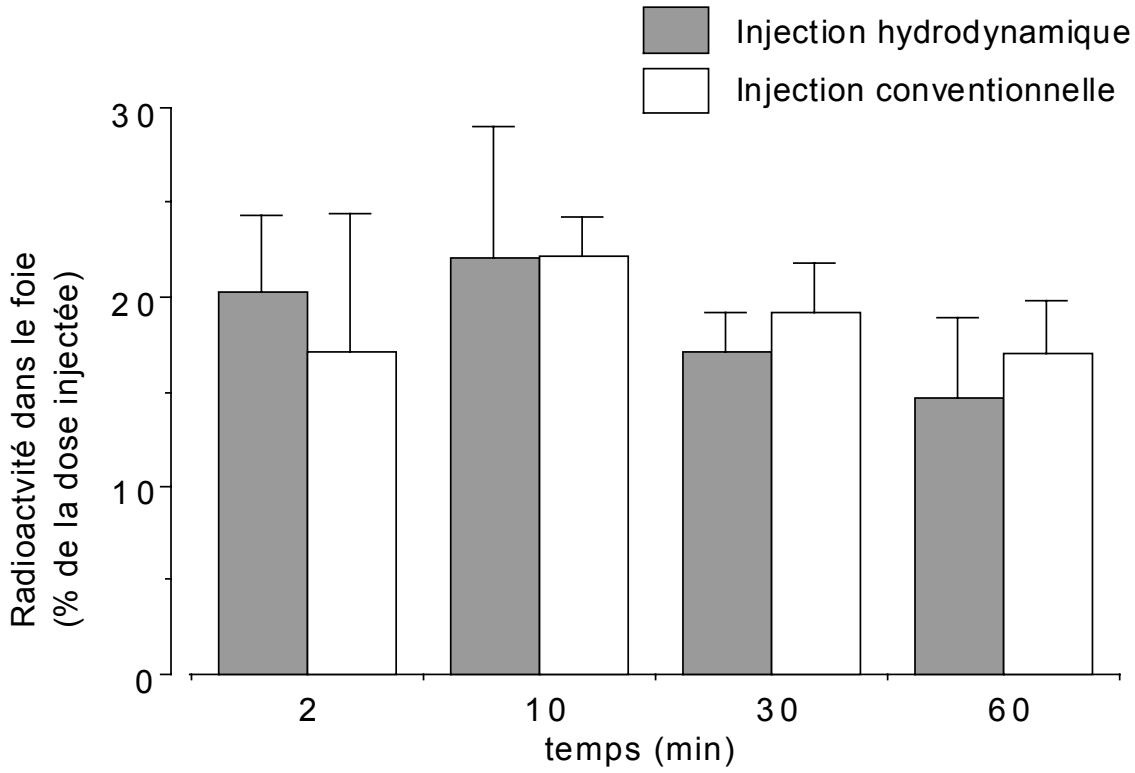


Figure 31. Capture par le foie de souris de l'invertase marquée à l' I 125: radioactivité présente dans le foie. *La radioactivité est mesurée dans l'homogénat de foies de souris à des temps croissants après l'injection. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'invertase marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

3.3.3. DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE: ASPECT GENERAL

Au **tableau 7** sont rapportées les distributions de la radioactivité obtenues après centrifugation différentielle d'homogénats de foies isolés à des temps croissants après l'injection d'invertase ^{125}I. Des différences très importantes sont observées suivant que l'injection est conventionnelle ou hydrodynamique tout particulièrement en ce qui concerne la proportion de radioactivité présente dans la fraction non sédimentable S. Elle est nettement plus élevée après injection

hydrodynamique, même 60 minutes après l'injection. Remarquons toutefois que même après injection conventionnelle, la radioactivité dans S est relativement élevée.

Tableau 7. Distribution intracellulaire de la radioactivité. *Les souris ont été injectées avec 3,3µg d'invertase marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2ml (injection conventionnelle). Les foies ont été prélevés à des temps variables après l'injection d'I^{125}-Invertase. Les homogénats ont ensuite été fractionnés par centrifugation différentielle. Les déviations standard proviennent de la moyenne pour au moins trois animaux..*

Temps (min)	Volume injecté (ml)	Radioactivité totale (%)				
		N	M	L	P	S
2	0,2	10,01±0,62	10,01±5,52	16,86±2,56	21,50±6,98	41,62±1,15
	2	12,83±3,49	2,76±0,64	3,05±1,32	4,69±1,28	76,67±4,72
10	0,2	11,33±0,75	21,25±4,33	21,76±6,80	14,63±2,67	31,03±8,55
	2	13,58±2,30	5,67±2,70	2,98±1,68	7,55±2,47	70,22±4,66
30	0,2	12,36±0,90	23,75±2,76	26,64±0,75	11,00±2,14	26,25±1,70
	2	13,48±3,07	11,02±2,60	8,16±1,81	6,07±0,67	61,27±3,38
60	0,2	11,74±4,26	34,09±2,46	21,41±5,76	8,52±3,12	24,24±8,08
	2	12,00±0,71	17,89±6,37	10,67±3,10	6,00±0,37	53,44±9,30

3.3.4. RADIOACTIVITE ASSOCIEE AUX FRACTIONS SEDIMENTABLES

A la **figure 32** est représentée l'évolution de la radioactivité présente dans les fractions N+M+L+P, donc, résultant de l'endocytose de l'invertase, en fonction du temps après l'injection. On constate qu'elle est plus du double après injection conventionnelle.

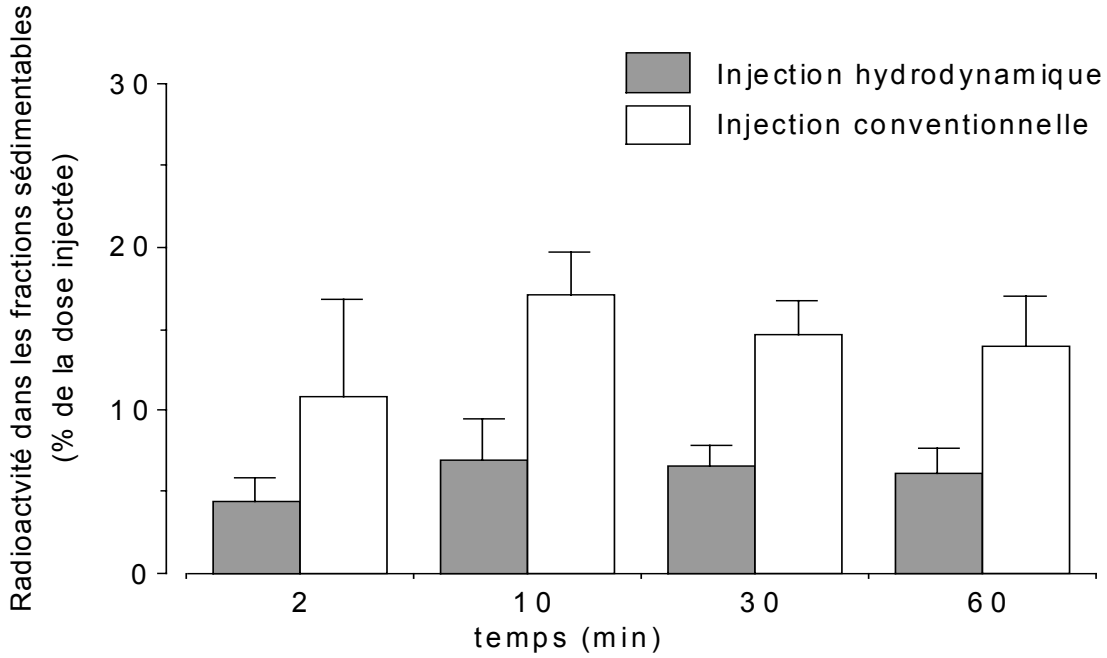


Figure 32. Capture par le foie de souris de l'invertase marquée à l' I 125: radioactivité présente dans les fractions sédimentables. *La radioactivité est mesurée dans les fractions sédimentables de foies de souris à des temps croissants après l'injection. Les homogénats ont été soumis à une centrifugation différentielle et la somme des radioactivités des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la dose injectée. Les souris ont été injectées avec 3,3 µg d'invertase marquée à l'iode 125 dans un volume de 2,0 ml ou de 0,2 ml de NaCl isotonique. Les barres d'erreur représentent les déviations standard de la moyenne pour au moins trois animaux.*

A **la figure 33** sont illustrées les distributions de la radioactivité dans les différentes fractions isolées par centrifugation différentielle, en pourcentage de ce qui est récupéré dans la totalité des fractions sédimentables N+M+L+P. Après injection conventionnelle, on observe une évolution classique de distribution du même type que ce que l'on obtient après injection d'ASF, se traduisant par une migration de la radioactivité de la fraction P vers la fraction L et la fraction M, c'est-à-dire, des vésicules de pinocytose vers le système endosomo-lysosomal.

Après injection hydrodynamique, ce qui est caractéristique est la présence d'une proportion élevée de la radioactivité dans la fraction N dans les minutes qui

suivent l'injection. Cette proportion diminue dans le temps, de même que celle associée à P au profit de la fraction M et la fraction L. Après 60 minutes, la distribution est plus ou moins semblable à celle que l'on obtient après injection conventionnelle, avec une prépondérance de la radioactivité dans la fraction M et la fraction L et un profil de distribution du type lysosomal (voir **figure 25**). La quantité associée à la fraction N est toutefois encore élevée. Tout évolue de nouveau comme si l'injection hydrodynamique contrecarrait le transfert de l'invertase endocytée aux lysosomes tout en permettant toutefois que la protéine aboutisse à ces organites. Il est à noter que l'invertase est une protéine dont la dégradation intracellulaire est lente (Jadot, et al. 1986). De plus, cette dégradation ne peut pas être suivie en se basant sur la radioactivité acido-soluble. En effet, cette protéine n'est pas précipitable, ni par l'acide trichloracétique, ni par l'acide perchlorique, vraisemblablement du fait de sa haute teneur en hydrate de carbone.

Les données précédentes indiquent que la distribution de ^{125}I-invertase en centrifugation différentielle après injection hydrodynamique ressemble à celle de l'asialofétuine. On peut se demander si une telle injection ne modifie pas la distribution intercellulaire de l'invertase; augmentant, comme cela se produit pour l'ADN (Lecocq 2003), la proportion de cette protéine captée par les hépatocytes. C'est en effet ce qui se produit. Nous avons trouvé qu'après une injection conventionnelle de ^{125}I-invertase, 81,6 % ± 6,5 (n=3) de la radioactivité du foie se retrouvaient dans les cellules sinusoïdales. Après injection hydrodynamique, 56,1 % ± 11,6 (n=4) de la radioactivité sont récupérés dans ces mêmes cellules. Cette modification de distribution intercellulaire doit avoir une certaine influence sur les changements de distribution observés après injection hydrodynamique de ^{125}I-invertase et rend plus ambiguë l'interprétation des résultats.

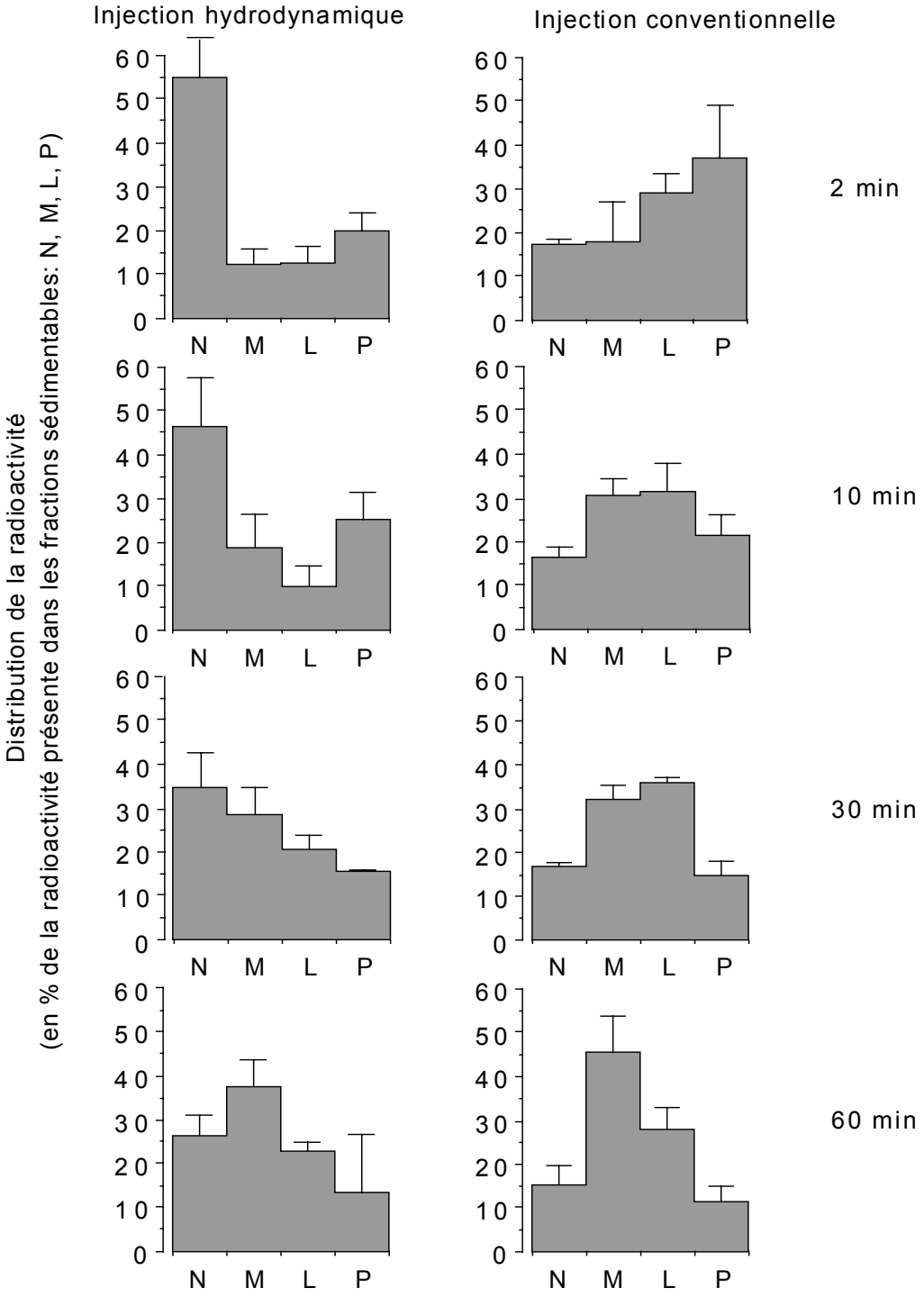


Figure 33. Capture par le foie et sort de l'invertase après une injection hydrodynamique ou conventionnelle. *3,3 µg d'invertase dans un volume de 2 ml (injection hydrodynamique) ou de 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique sont rapidement injectés dans la veine caudale. Les souris sont sacrifiées 2 min, 10 min, 30 min ou 60 min après l'injection. Les homogénats ont été soumis à une centrifugation différentielle et la radioactivité des fractions N, M, L et P est exprimée en pourcents de la radioactivité de N+M+L+P. Les valeurs sont des moyennes pour 3 animaux avec leurs déviations standard.*

3.4. TRANSFECTION HYDRODYNAMIQUE : EFFET DE L'INJECTION HYDRODYNAMIQUE DE NACL AVANT L'INJECTION DE L'ADN

3.4.1. INTRODUCTION

Les résultats présentés ci-dessous ont été récemment publiés (Andrianaivo et al. 2004). Les résultats que nous avons présentés dans la section 3.1.10 impliquent que les modifications du foie induites par une injection hydrodynamique et qui conduisent à une perturbation de l'endocytose persistent pendant au moins 60 minutes. Nous avons recherché quels étaient les effets de ces modifications sur l'expression après injection d'ADN plasmidique et sur le sort de celui-ci. Le but est de déterminer s'il existe une relation entre les perturbations de l'endocytose causées par l'injection hydrodynamique et la transfection du foie résultant de cette injection. Nous avons, dans un premier temps comme décrit à la section 3.1.10., administré à la souris une injection hydrodynamique de NaCl isotonique. Ensuite, à des temps croissants après cette injection, nous avons injecté un petit volume d'une solution d'ADN plasmidique contenant l'ADNc de la luciférase. Pour suivre le sort de cet ADN, dans certains cas une petite quantité d'ADN ^{35}S a été ajoutée à l'ADN froid.

3.4.2. ACTIVITE DE LA LUCIFERASE

La **figure 34** illustre l'influence sur l'expression de la luciférase par le foie, du temps séparant une injection hydrodynamique de NaCl d'une injection conventionnelle de l'ADN. Une diminution considérable de l'expression de l'enzyme est déjà observée si les deux injections sont séparées de quelques secondes. Ces résultats indiquent que les modifications du foie résultant de l'injection hydrodynamique qui permettent à certaines molécules d'ADN d'entrer dans les hépatocytes et d'induire l'expression sont très fugaces.

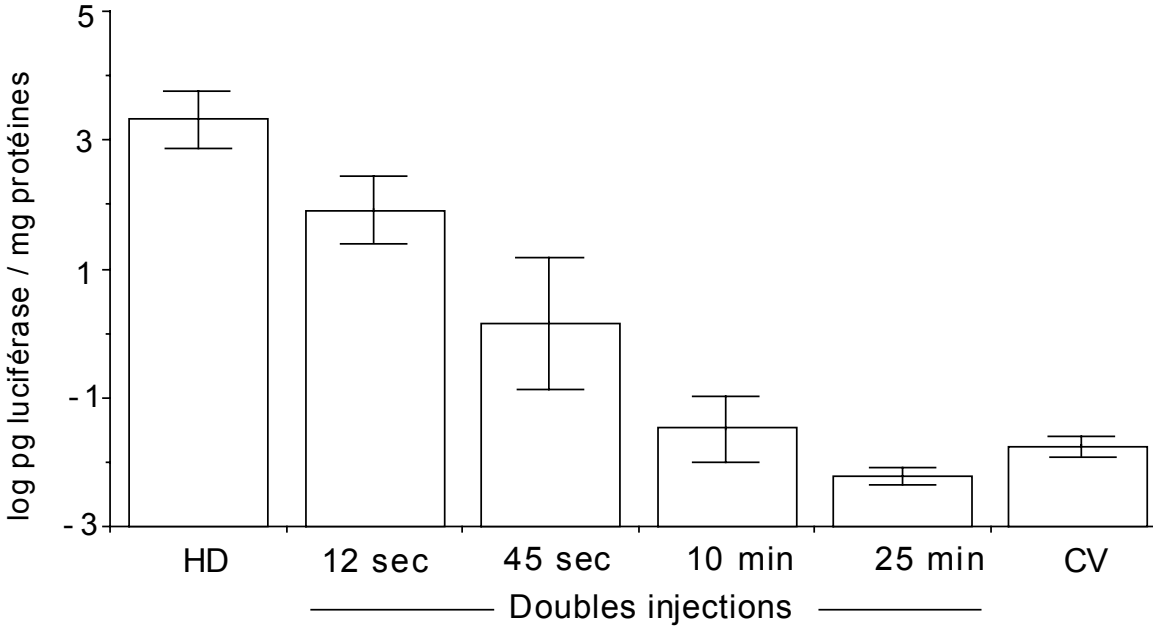


Figure 34. Expression de la luciférase dans le foie de souris après une injection hydrodynamique (HD), une double injection ou une injection conventionnelle (CV). *Les souris ont reçu une injection dans la veine caudale de 5 µg d'ADN dans un volume de 2 ml (injection hydrodynamique) ou 0,2 ml (injection conventionnelle) de NaCl isotonique ou de 2 ml de NaCl isotonique suivie 12 sec, 45 sec, 10 min, 25 min plus tard de 5 µg d'ADN dans un volume de 0.2 ml de NaCl isotonique (doubles injections). Les souris ont été sacrifiées 8 h plus tard et la luciférase mesurée sur les homogénats de foie. Les valeurs sont des moyennes pour 3 animaux ± S.D.*

3.4.3. SORT DE L'ADN PLASMIDIQUE

Il y a deux caractéristiques qui distinguent le sort de l'ADN associé au foie suivant que l'ADN a été injecté de façon hydrodynamique ou conventionnelle (Lecocq, et al. 2003) : 1) La dégradation de l'ADN est fortement retardée après une injection hydrodynamique, 2) Son profil de distribution après centrifugation différentielle des homogénats est clairement distinct de celui observé après une injection conventionnelle. Jusqu'à au moins une heure après une injection hydrodynamique, l'ADN est surtout récupéré dans une fraction N, lié à de grands fragments de membrane plasmique alors que le profil de distribution de l'ADN après une injection conventionnelle est semblable à celui d'une molécule

endocytée (Lecocq, et al. 2003). Nous avons recherché si ces caractéristiques concernant le sort de l'ADN résultant directement de l'injection hydrodynamique étaient encore observées si l'ADN était administré par une injection conventionnelle après une injection hydrodynamique de NaCl. Pour identifier l'ADN capté par le foie, nous avons utilisé comme nous le disions du ^{35}S-ADN. La **figure 35** illustre que la quantité de radioactivité retrouvée dans le foie 60 minutes après l'injection d'ADN S^{35} est semblable, que l'ADN S^{35}soit donné directement par une injection hydrodynamique ou dans un petit volume de solution, 45 secondes après l'injection hydrodynamique de NaCl.

La quantité est plus faible après une simple injection conventionnelle d'ADN S^{35} en accord avec les résultats de Lecocq et al.. Dans les mêmes expériences, la dégradation intracellulaire de l'ADN a été estimée en mesurant la radioactivité acido-soluble de l'homogénat. Comme le montre la **figure 35**, la radioactivité acido-soluble est la même après une injection hydrodynamique unique d'ADN S^{35} ou après une double injection ; elle est nettement plus élevée après une injection conventionnelle unique. Ces résultats illustrent que la dégradation intracellulaire de l'ADN est retardée de la même façon quand une injection conventionnelle d'ADN est dispensée 45 secondes après une injection hydrodynamique de NaCl, (**figure 34**) alors que l'expression diminue d'un facteur 100 dans ces conditions.

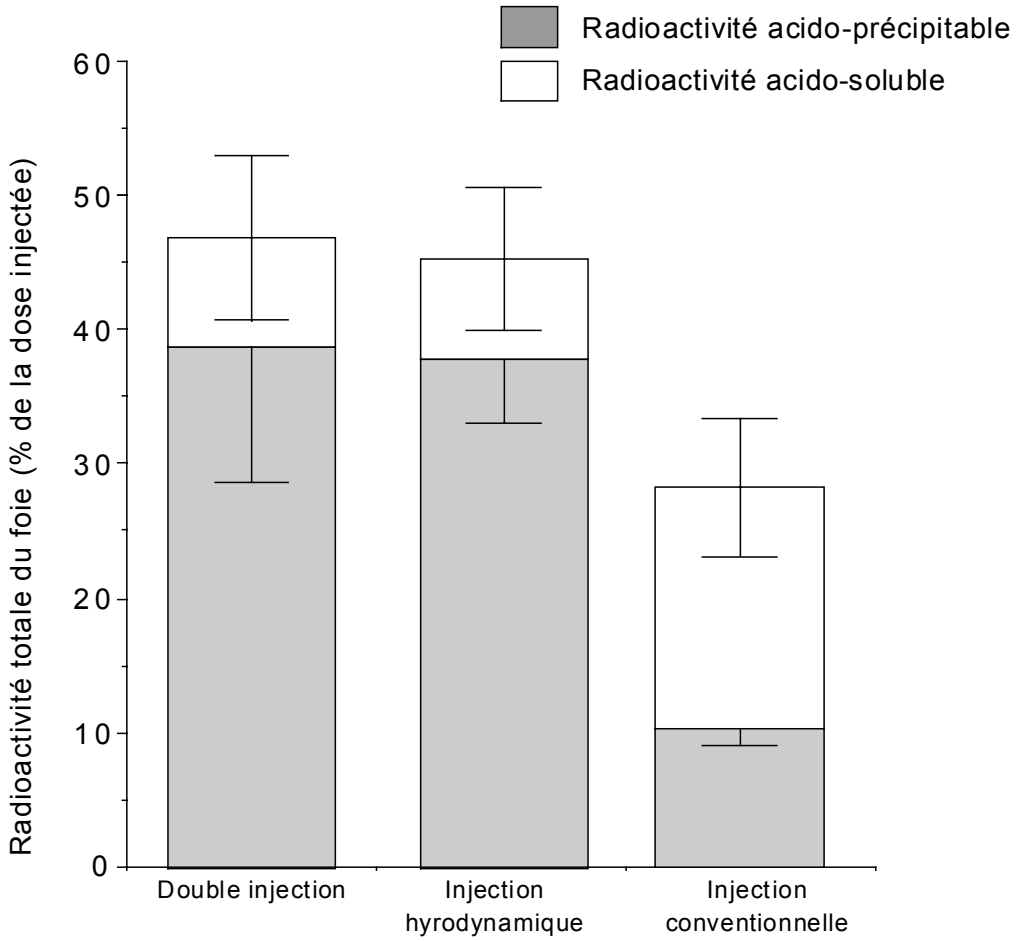


Figure 35. Capture par le foie et sort de l'ADN après une double injection , une injection hydrodynamique ou une injection conventionnelle. *2 ml de NaCl isotonique sont injectés rapidement dans la veine caudale. 45 sec plus tard, une injection de 5 µg d'ADN non marqué et de 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 0.2 ml est administrée (double injection). 5 µg d'ADN froid et 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 2 ml de NaCl isotonique sont rapidement injectés dans la veine caudale (injection hydrodynamique). 5 µg d'ADN non marqué et 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 0.2 ml sont injectés dans la veine caudale (injection conventionnelle). Dans les trois cas les souris sont sacrifiées 60 min après l'injection d'ADN, les foies sont prélevés et homogénéisés. Les radioactivités totales et acido-solubles sont déterminées sur les homogénats. Zone grisée: radioactivité acido-soluble. Les valeurs sont des moyennes pour 3 animaux avec leurs déviations standard.*

3.4.4. DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITE APRES CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE ET DEGRADATION INTRACELLULAIRE DE L'ADN

La figure 36 rapporte les distributions de la radioactivité après centrifugation différentielle. Les foies proviennent de souris qui ont reçu une injection de ^{35}S-ADN unique (hydrodynamique ou conventionnelle) ou une injection conventionnelle d'ADN ^{35}S 45 secondes après injection hydrodynamique de NaCl isotonique. Dans tous les cas, les souris sont sacrifiées 2 minutes ou 10 minutes après l'injection d'ADN. Il est clair que les distributions sont semblables, que l' ADN ^{35}S ait été donné par une injection hydrodynamique unique ou suite à une double injection, la présence caractéristique d'une grande proportion de la radioactivité dans la fraction N est observée dans les deux cas. Le profil de distribution de la radioactivité après une injection conventionnelle unique d' ADN S^{35} est tout à fait différent, en particulier si on se réfère à la proportion de radioactivité récupérée dans la fraction N. Ces résultats montrent que les modifications du foie causées par l'injection hydrodynamique qui affectent la distribution de l'ADN et induisent sa rétention à la membrane plasmique sont encore observées dans des conditions d'injection d'ADN qui ne produisent pas d'expression. La cinétique de dégradation de l'ADN dans ces conditions a été établie en mesurant le pourcentage de radioactivité acido-soluble dans les homogénats et dans l'ADN extrait de ces homogénats suivant Liu et al. (Liu, et al. 1997) pour éliminer les artefacts possibles résultant de la liaison de l'ADN aux structures acido-précipitables présente dans l'homogénat.

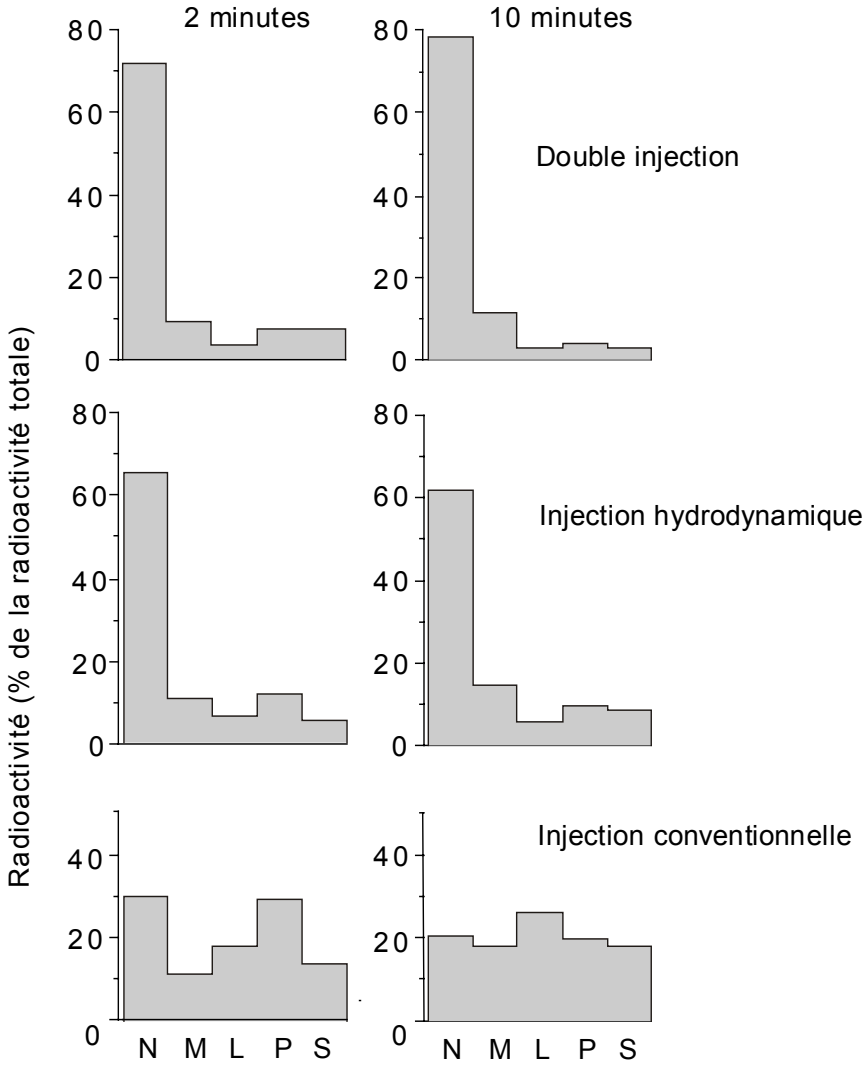


Figure 36. Profil de distribution de la radioactivité dans le foie après centrifugation différentielle: *comparaison entre une injection hydrodynamique, conventionnelle et une double injection. Double injection: 2 ml de NaCl isotonique sont rapidement injectés dans la veine caudale. 45 sec plus tard, une injection de 5 µg d'ADN non marqué et de 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 0.2 ml est administrée. Injection hydrodynamique: 5 µg d'ADN froid et 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 2 ml de NaCl isotonique sont rapidement injectés dans la veine caudale. Injection conventionnelle: 5 µg d'ADN non marqué et 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 0.2 ml sont injectés dans la veine caudale. Les souris ont été sacrifiées 2 min ou 10 min après l'injection d'ADN. Les foies sont homogénéisés, fractionnés par centrifugation différentielle et la radioactivité des fractions est déterminée. N, fraction nucléaire; M, fraction mitochondriale lourde; L, fraction mitochondriale légère; P, fraction microsomale; S, surnageant final.*

Comme le montre **la figure 37**, les résultats sont les mêmes que l'on utilise les homogénats ou l'ADN isolé. Ils montrent comme décrit précédemment (Lecocq,

et al. 2003) que l'augmentation, avec le temps, de la radioactivité acido-soluble résultant de la dégradation de l'ADN est beaucoup moins rapide après une injection hydrodynamique qu'après une injection conventionnelle. C'est également le cas quand une injection conventionnelle d'ADN S^{35} est administrée 45 secondes après une injection hydrodynamique de NaCl.

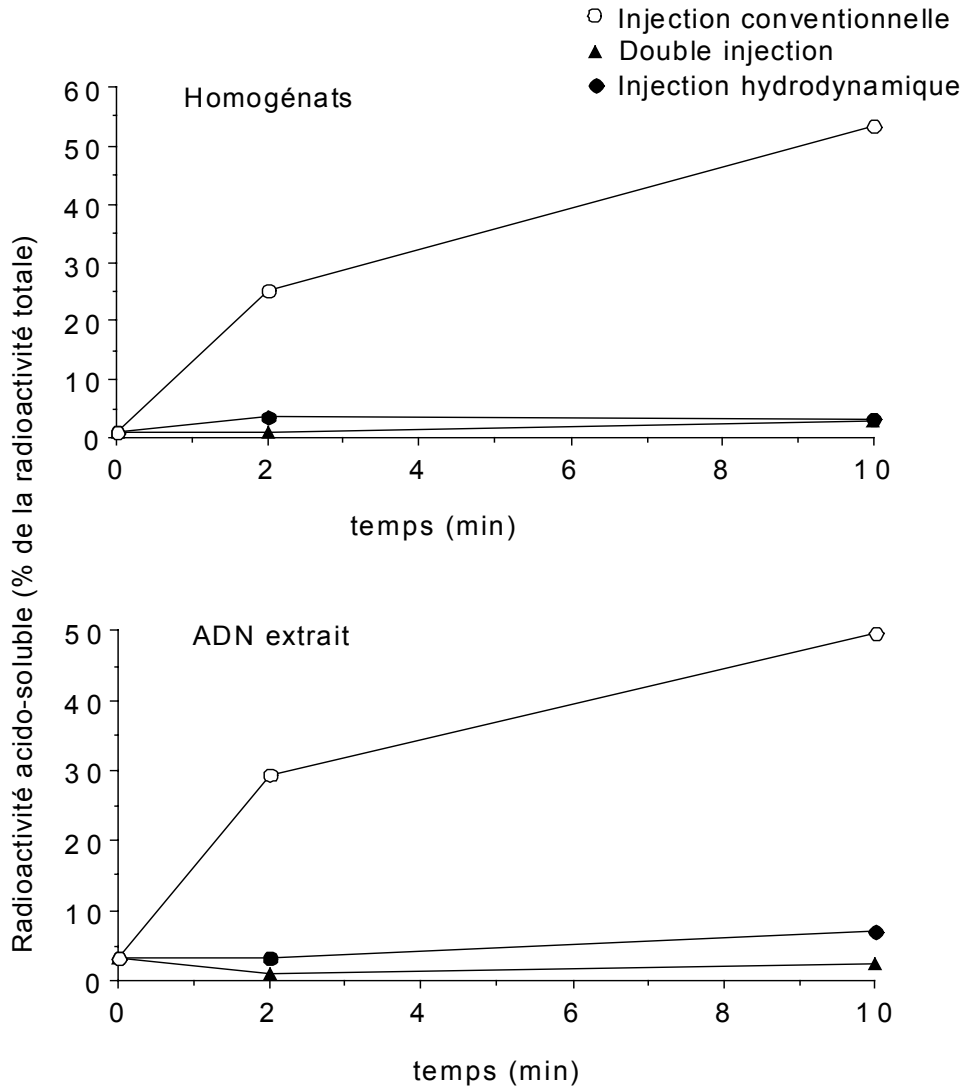


Figure 37. Dégradation de l'ADN. *Injection hydrodynamique: 3 µg d' ADNS^{35} sont injectés dans un volume de 2 ml de NaCl isotonique. Injection conventionnelle: 3 µg de 35S-ADN sont injectés dans un volume de 0,2 ml de NaCl isotonique. Double injection: 2 ml de NaCl isotonique sont injectés rapidement et 45 sec plus tard les souris reçoivent une injection de 3 µg de 35S-ADN dans un volume de 0,2 ml. Les souris ont été sacrifiées 2 min ou 10 min après l'injection d'ADN. La radioactivité acido-soluble est déterminée sur les homogénats ou sur l'ADN extrait de ces homogénats.*

Le changement de la radioactivité acido-soluble en fonction du temps qui suit l'injection d'ADN S^{35} indique clairement que la vitesse de dégradation d'ADN S^{35} est la même après une injection double ou une unique injection hydrodynamique. Le sort de la plus grosse partie de l'ADN plasmidique est apparemment le même qu'il soit donné par une seule injection hydrodynamique ou par une injection conventionnelle 45 secondes après une injection hydrodynamique de NaCl. La persistence d'une proportion élevée de radioactivité dans la fraction N (**figure 38**) et le retard dans la dégradation de l'ADN (**figure 39**) sont observés même si l'injection conventionnelle de l'ADN prend place jusqu'a 120 minutes après l'injection hydrodynamique de NaCl.

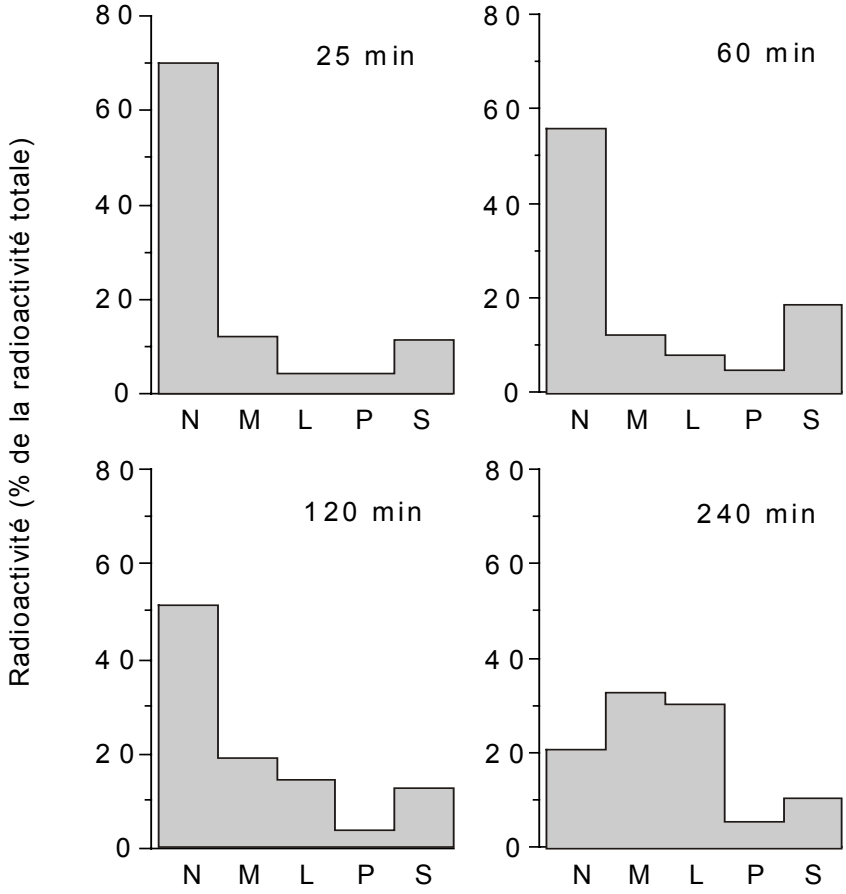


Figure 38. Double injection: influence du temps séparant les deux injections. Profil de distribution de la radioactivité du foie après centrifugation différentielle. *2 ml de NaCl isotonique sont rapidement injectés dans la veine caudale. 25 min, 60 min, 120 min ou 240 min plus tard 5 µg d'ADN non marqué et 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 0,2 ml sont injectés dans la veine caudale. Les souris sont sacrifiées 10 min après l'injection d'ADN. Les foies sont homogénéisés et fractionnés par centrifugation différentielle et la radioactivité des fractions est déterminée.*

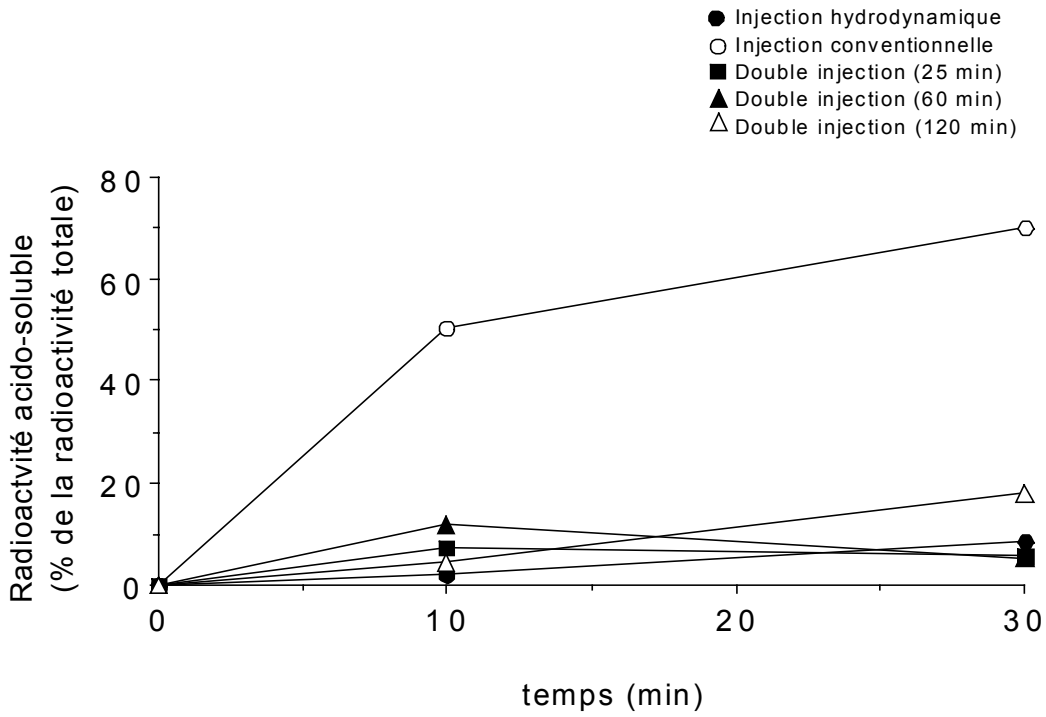


Figure 39. Cinétique de dégradation de l'ADN: influence du temps séparant les deux injections. *Les souris reçoivent une injection de 5 µg d'ADN non marqué et de 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 2,0 ml (injection hydrodynamique) ou une injection directe de 5 µg d'ADN non marqué et de 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 0,2 ml (injection conventionnelle) ou 0.25 µg de 35S-ADN dans un volume de 0,2 ml 25 min, 60 min ou 120 min après une injection rapide de 2,0 ml de NaCl isotonique (doubles injections).Dans les trois cas les souris sont sacrifiées 10 min ou 30 min après l'injection d'ADN, les foies sont prélevés et homogénéisés. Les radioactivités totales et acido-solubles sont déterminées sur les homogénats. Les radioactivités acido-solubles sont exprimées en pourcents de la radioactivité totale des homogénats*

4. DISCUSSION

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1. ASIALOFETUINE

Dans les travaux que nous venons de présenter, nous avons recherché si l'injection hydrodynamique influençait la capture par le foie et le sort intracellulaire d'une glycoprotéine, l'asialofétuine qui, après une injection conventionnelle, est captée par les hépatocytes par une endocytose médiée par des récepteurs spécifiques. Nos résultats montrent que:

1. La quantité totale de radioactivité présente dans les homogénats de foie est sensiblement plus faible après injection hydrodynamique, cette différence est surtout manifeste lorsque l'on se réfère à la radioactivité accompagnant les structures sédimentables de l'homogénat ;

2. L'évolution de la distribution intracellulaire de la radioactivité de l'organe en fonction du temps qui suit l'injection est perturbée par l'injection hydrodynamique.

4.1.1. RADIOACTIVITE NON SEDIMENTABLE DE L'HOMOGENAT

La radioactivité non sédimentable de l'homogénat est nettement plus élevée après injection hydrodynamique et ce, pendant de nombreuses minutes. Comme nous l'avons signalé, cette radioactivité provient du sang qui est présent dans l'homogénat, mais pourrait également résulter d'asialofétuine localisée dans le cytosol des cellules hépatiques. On peut se demander jusqu'à quel point la différence entre les proportions de radioactivité que l'on trouve sous forme non sédimentable dans la fraction S suivant le type d'injection n'est pas due à une rétention excédentaire de sang dans le réseau vasculaire du foie après injection hydrodynamique. Le volume du foie est plus élevé dans les minutes qui suivent l'injection hydrodynamique. Cela résulte d'une rétention de sang dilué par le

liquide d'injection, du fait d'une insuffisance circulatoire transitoire qui se maintient pendant 1 à 2 minutes (Zhang, et al. 2004b). Il est possible d'apprécier la contribution du sang dans un homogénat après injection d'asialofétuine radioactive en se référant à la radioactivité du sang. On peut calculer, d'après la **figure 8**, que 2 minutes après une injection hydrodynamique, alors que la circulation s'est normalisée, on trouve plus ou moins 10 % de la dose injectée par ml de sang. A ce même temps, le foie contient 42 % de la dose injectée (**figure 7**). D'autre part comme l'ont montré Lecocq et al. (Lecocq, et al. 2003), le poids du foie est alors, en moyenne, de 0,3 g supérieur au poids d'un foie normal (après injection conventionnelle). Si nous supposons que cet excès est dû à du sang supplémentaire retenu après injection hydrodynamique, il contribue pour 3,3 % de la dose injectée, à la radioactivité mesurée dans l'homogénat, soit 8 % de ce qu'on mesure dans l'homogénat total que l'on retrouverait évidemment dans la fraction non sédimentable S. Or, 2 minutes après l'injection, la radioactivité de la fraction S trouvée après injection hydrodynamique est de 45 % de ce qu'on trouve dans l'homogénat total et de 26 % après injection conventionnelle. Elle diffère donc de 19 %, soit plus du double de ce qui serait dû à la présence de sang excédentaire dans l'homogénat après injection hydrodynamique. Nous avons vu également que la perfusion du foie n'élimine pas cette différence, que la radioactivité non sédimentable reste plus élevée après injection hydrodynamique. Toutefois, comme nous l'avons signalé, la perfusion de cet organe est plus difficile après injection hydrodynamique et il est possible que le sang soit moins bien éliminé du foie par perfusion après une telle injection. La mesure des composés radioactifs acido-solubles, après injection de TC-ASF, suggère qu'une partie au moins des molécules de cette protéine trouvées dans la fraction S après injection hydrodynamique ne provient pas de lysosomes lésés au cours de l'homogénéisation du foie. D'ailleurs, la distribution de la cathepsine C, après centrifugation différentielle, montre que les lysosomes ne sont pas davantage lésés dans les homogénats de foie provenant d'animaux

ayant reçu une injection hydrodynamique. Enfin, nos expériences sur hépatocytes isolés indiquent que la radioactivité non sédimentable reste plus élevée dans les homogénats d'hépatocytes provenant de foie de souris ayant reçu une injection hydrodynamique. L'ensemble de ces observations suggère que l'excès de radioactivité non sédimentable trouvé après injection hydrodynamique a son origine, au moins en partie, dans la présence d'asialofétuine dans le cytosol des hépatocytes. Cela ne peut s'expliquer que si l'injection hydrodynamique provoque l'entrée de certaines molécules d'asialofétuine dans le cytosol des hépatocytes.

Des travaux très récents montrent qu'une entrée directe d'une protéine dans les hépatocytes pourrait se produire après injection hydrodynamique. Dans un article encore sous presse (Zhang, et al. 2004b), mais dont le texte nous a été aimablement communiqué par les auteurs, ceux-ci rapportent qu'après injection hydrodynamique de β galactosidase d'E. Coli, on retrouve cet enzyme dans les hépatocytes, l'histochimie indiquant sa présence dans le cytoplasme de ces cellules.

4.1.2. RADIOACTIVITE ASSOCIEE AUX ELEMENTS SEDIMENTABLES DE L'HOMOGENAT

Il s'agit des molécules d'asialofétuine associées aux structures subcellulaires du foie, soit fixées à la membrane plasmique, soit internalisées.

Nos résultats montrent tout d'abord que la quantité d'asialofétuine associée à ces éléments est sensiblement plus petite après injection hydrodynamique. Cette injection pourrait inhiber la fixation de la protéine sur ses récepteurs du fait des modifications du milieu extracellulaire résultant du gros volume de liquide injecté. Il est certain que pendant les premières minutes qui suivent l'injection, les hépatocytes sont en présence d'un milieu dilué, dont le pH et la composition ionique sont anormaux. Ce milieu stagne pendant un certain temps avant que la circulation normale ne soit rétablie, de plus, un état d'hypoxie doit exister. Ces

facteurs pourraient inhiber la formation du complexe ligand-récepteur. Toutefois, les modifications du foie causées par l'injection hydrodynamique et influençant l'endocytose persistent pendant au moins 1 heure, comme le montrent les expériences d'injections séquentielles. Dans ces expériences, l'injection hydrodynamique est réalisée grâce à l'administration d'un gros volume de NaCl isotonique bien avant que l'asialofétuine ne soit injectée dans un petit volume de solvant. Au moment de cette injection conventionnelle d'ASF, la circulation et le volume sanguin sont redevenus normaux. Dans le sang, l'ASF injectée se retrouve donc dans des conditions semblables à celles qu'elle rencontre après une injection conventionnelle unique, non précédée d'une injection hydrodynamique. Or, les effets de l'injection hydrodynamique sur l'endocytose de l'ASF sont encore très manifestes. La diminution de la capture par endocytose de l'ASF lors de l'injection hydrodynamique résulte donc des modifications du foie qui touchent des structures impliquées dans les phases initiales de l'endocytose et persistent pendant un temps relativement long. Elles sont telles que leur effet sur l'endocytose se manifeste même si l'ASF se trouve dans un milieu extracellulaire normal.

En ce qui concerne l'effet de l'injection hydrodynamique sur le trafic intracellulaire de l'asialofétuine, nous rappellerons d'abord brièvement quelles sont les principales structures impliquées dans ce trafic et comment elles se comportent en centrifugation.

Comme le schématise la figure 1, la protéine se fixe d'abord à la membrane plasmique au niveau de ses récepteurs. Elle se retrouve ensuite dans des vésicules (vésicules d'endocytose) résultant de l'invagination de cette membrane, ces vésicules étant entourées de clathrine. Elle est ensuite transférée dans les endosomes primaires puis chemine par les endosomes secondaires et tertiaires (corps multivésiculaires) pour aboutir aux lysosomes où elle est dégradée par les protéases de ces organites (Courtoy 1993).

Après centrifugation différentielle suivant le schéma que nous avons utilisé, on retrouve les vésicules d'endocytose essentiellement dans la fraction microsomale P, où la protéine est présente dans les premières minutes qui suivent l'injection. Le transfert dans les endosomes primaires et secondaires se caractérisera par un déplacement de la distribution de la protéine vers la fraction L. En fait, ces structures ont des coefficients de sédimentation dans le saccharose isotonique intermédiaires entre ceux des vésicules d'endocytose et les lysosomes. Ceux-ci sont retrouvés en majorité dans les fractions M et L, surtout M. Après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose, la protéine est rapidement, après l'injection, localisée dans des structures légères (densité 1,13 g/cm^3) correspondant aux endosomes primaires, elle est ensuite transférée dans des organites encore plus légers (densité 1,11 g/cm^3), les endosomes secondaires. Plus tard, on la retrouve dans des structures nettement plus denses (densité 1,18-1,20 g/cm^3), les endosomes tertiaires et les lysosomes (Courtoy 1993). Une telle évolution dans les distributions de la radioactivité après centrifugation différentielle et centrifugation isopycnique est celle que nous observons après une injection conventionnelle d'ASF marqué. Après injection hydrodynamique, les distributions de la radioactivité après centrifugation tant différentielle que isopycnique sont affectées jusqu'à au moins 10 minutes après l'injection. Tout se passe comme si l'internalisation de l'ASF était bloquée pendant cette période. Particulièrement caractéristique est le fait que les modifications de distribution que l'on observe après centrifugation isopycnique de la fraction L+P en fonction du temps qui suit l'injection et qui correspondent au cheminement intracellulaire initial de la protéine endocytée dans le système endosomal ne sont pas apparentes si l'ASF est administré par injection hydrodynamique. La protéine dans ce cas se comporte comme si elle restait associée à la membrane plasmique, sa distribution est d'ailleurs semblable à celle de la phosphodiestérase alcaline un marqueur de la membrane plasmique. Qu'une telle situation se présente est fortement supporté par le fait

que, pendant ce temps, la protéine reste en grande partie accessible à la protéinase K, alors qu'elle ne l'est pas après injection conventionnelle. Toutefois, comme nous l'avons signalé, on ne peut exclure que l'accessibilité à la protéinase K de l'asialofétuine associée à des vésicules provenant de la membrane plasmique, résulte au moins en partie, d'une perméabilité plus grande de la membrane plasmique (persistance de pores) après une injection hydrodynamique.

Un problème se pose quand on compare les distributions de la radioactivité et celle de la phosphodiestérase alcaline, dans les premiers temps après l'injection. Lorsque l'injection est conventionnelle, on observe une beaucoup plus grande proportion de radioactivité que de phosphodiestérase alcaline dans P. Cette différence provient vraisemblablement du fait que, comme nous l'avons déja signalé, l'asialofétuine est endocytée par l'intermédiaire de récepteurs localisés au pôle sinusoïdal de l'hépatocyte. Les vésicules résultant de la fragmentation de cette partie de la membrane plasmique et les petites vésicules de pinocytose, sédimentent principalement dans la fraction P. Il est donc normal que la radioactivité soit principalement associée à la fraction P dans les minutes qui suivent l'injection conventionnelle. La différence de distribution avec celle de la phosphodiestérase alcaline provient probablement du fait que celle-ci est un marqueur de l'ensemble de la membrane plasmique alors que celle de la radioactivité ne concerne qu'une partie de cette membrane, celle où se trouvent les récepteurs de l'asialofétuine. Il serait évidemment intéressant de comparer la distribution de la radioactivité avec des marqueurs spécifiques de la membrane basolatérale.

Dans les temps courts qui suivent l'injection hydrodynamique, on trouve, après centrifugation différentielle, une quantité importante de radioactivité dans la fraction N. La centrifugation isopycnique de la fraction N dans un gradient de saccharose montre une distribution hétérogène mais qui se superpose à la

distribution de la phosphodiestérase alcaline. Il est donc vraisemblable que, comme dans la fraction P, la radioactivité est associée à des fragments de membrane plasmique dans la fraction N.

Les résultats obtenus avec l'^{125}I-TC-ASF permettent de suivre le sort de l'ASF aux temps plus longs après l'injection. Dès la vingtième minute après une injection hydrodynamique, la distribution de la protéine TC évolue jusqu'à atteindre à la soixantième minute un profil témoignant d'un aboutissement dans le système endosome-lysosome.

La raison pour laquelle l'endocytose est perturbée par une injection hydrodynamique n'est pas connue. Comme suggéré précédemment (Lecocq, et al. 2003), la pression hydrodynamique pourrait rendre perméable les jonctions intercellulaires entre les hépatocytes, permettant aux macromolécules, les protéines en particulier, d'avoir accès au pôle biliaire de ces cellules. Il a été démontré qu'un transfert de macromolécules en sens inverse, des canalicules biliaires vers les sinusoïdes se produisait si ces molécules étaient injectées sous pression dans le compartiment biliaire (Rahner, et al. 2000). L'endocytose de protéines injectées par la méthode hydrodynamique pourrait se réaliser au niveau du pôle apical des hépatocytes, comme on le constate, si l'on injecte des protéines dans le canal biliaire (Courtoy 1993; Rahner, et al. 2000). Toutefois, il est vraisemblable que s'il en est ainsi, elle soit moins efficace pour une protéine comme l'asialofétuine dont les récepteurs se trouvent au pôle sinusoïdal des hépatocytes. Cette perméation des jonctions intercellulaires pourrait persister pendant un temps relativement long comme le suggèrent les expériences où l'injection hydrodynamique de NaCl isotonique précède l'injection conventionnelle d'asialofétuine.

4.2. INVERTASE

Nos résultats, quoique limités, indiquent que l'injection hydrodynamique perturbe l'endocytose de l'invertase comme elle le fait pour l'endocytose de l'asialofétuine. L'inhibition de la capture d'invertase est nettement plus marquée que celle de l'asialofétuine. Cela pourrait résulter du fait que les cellules sinusoïdales responsables de l'endocytose de l'invertase, risquent d'être plus sensibles à la pression hydrodynamique vu leur localisation. Elles bordent l'endothélium des sinusoïdes et sont en contact immédiat avec le sang, elles subissent donc plus directement l'effet de cette pression lors de l'injection, avec peut-être comme conséquence des lésions plus importantes de leur membrane plasmique. Les données de la centrifugation différentielle suggèrent qu'ici aussi, l'injection hydrodynamique contrecarre le cheminement intracellulaire de la protéine, d'une façon d'ailleurs plus marquée que pour l'asialofétuine. L'hypothèse d'une capture de la protéine dans une autre zone de la membrane plasmique après injection hydrodynamique est susceptible également d'être envisagée. L'endocytose, qui dans les conditions normales, est avant tout assurée au niveau de la face sinusoïdale de la cellule endothéliale pourrait, après injection hydrodynamique, se réaliser mais d'une façon moins efficace au niveau de la partie de la membrane plasmique dirigée vers l'espace de Disse. Toutefois, comme nous l'avons signalé, l'interprétation des résultats après injection hydrodynamique d'invertase pose un problème car un tel type d'injection modifie sensiblement la distribution intercellulaire de la protéine associée au foie. Il est à noter que cette dernière particularité pourrait avoir un côté intéressant, elle montre qu'il est possible, après injection hydrodynamique, de faire capter par les hépatocytes une protéine qui, normalement est destinée aux cellules endothéliales.

4.3. ADN PLASMIDIQUE

Nos résultats montrent que le processus permettant l'entrée dans les hépatocytes des molécules d'ADN plasmidique responsables de l'expression, après une injection hydrodynamique, est presque concommitant à l'injection. Ce processus cesse très rapidement après l'injection et dure, par conséquent, très peu. Par contre, ils indiquent que les modifications du foie qui retardent la dégradation de l'ADN et provoquent sa rétention à la membrane plasmique sont encore présentes un long temps après l'injection. Par conséquent, l'internalisation des molécules d'ADN responsables de l'expression après une injection hydrodynamique semble indépendante du processus, permettant au foie de retarder la dégradation de l'ADN et de le garder à la membrane plasmique pendant un temps prolongé. De plus il a été demontré (Lecocq, et al. 2003), que la majeure partie de l'ADN plasmidique localisée préférentiellement à la membrane plasmique n'est pas responsable de l'expression puisqu'aussi bien son élimination par la désoxyribonucléase ne modifie en rien l'expression.

Ces résultats sont en faveur d'une entrée des molécules d'ADN responsables de l'expression par des discontinuités (pores) introduites par la pression hydrodynamique dans la membrane plasmique. En effet, un tel mécanisme explique pourquoi l'internalisation des molécules d'ADN doit se produire très rapidement et dure très peu de temps. En effet, si la pression hydrodynamique génère des pores dans la membrane plasmique par lesquels l'ADN pénètre, ces pores doivent apparaître, pour la plupart, durant les quelques secondes que dure l'injection hydrodynamique, quand la pression hydrodynamique est maximale. De plus, ces pores doivent disparaître rapidement car la membrane doit être resoudée dans la minute qui suit l'injection pour permettre la survie des cellules (McNeil 2002; McNeil and Ito 1990; McNeil and Steinhardt 1997; Togo, et al. 1999). Par conséquent, si l'ADN entre dans les hépatocytes par des pores induits dans la membrane plasmique, cela doit se produire pendant ou juste après

l'injection. Les publications récentes de Kobayashi et al. (Kobayashi, et al. 2004) ; (Zhang, et al. 2004b) supportent totalement l'hypothèse que les molécules d'ADN plasmidique responsables de l'expression après injection hydrodynamique pénètrent dans le cytosol des hépatocytes par des pores de la membrane plasmique générés par la pression hydrodynamique.

D'après Zhang et al., le mécanisme sous jacent est non spécifique puisqu'aussi bien après injection hydrodynamique les profils de distribution dans le foie du produit d'expression du plasmide pCMV luc et ceux du ^{125}I-ADN, du bleu Evans et de la protéine β galactosidase sont similaires et ces différentes molécules se trouvent dans les hépatocytes,par contre les contrôles par injection conventionnelle sont tous négatifs (Zhang, et al. 2004b). Les résultats de Kobayashi et al. vont dans le même sens. Ces auteurs ont injecté des microsphères de 50, 200, et 500 nm de diamètre, de polystyrène marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine. Ils constatent qu'une injection hydrodynamique projette les microsphères de 50 nm dans le cytoplasme des hépatocytes tandis que les microsphères de diamètres supérieurs restent localisées à la surface des hépatocytes ou dans le compartiment extracellulaire (Kobayashi, et al. 2004). Rappelons que la taille d'un plasmide est de l'ordre de 200-400 nm et d'une protéine d'environ 5-10 nm.

Zhang et al. (Zhang, et al. 2004b) ont en outre effectué une double injection d'un grand volume de NaCl suivie à des temps variables, soit de bleu Evans soit de pCMVLuc. Dans les deux cas ils constatent que si l'intervalle entre les deux injections est de dix minutes le nombre de cellules positives diminue drastiquement tant pour le bleu Evans que pour l'expression de la luciférase. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux que nous avons obtenus mais ne délimitent pas avec précision l'intervalle pendant lequel les pores ou les défauts de la membrane persistent. Il est à noter que cet article a été soumis pour

publication 10 jours après celui que nous avons soumis nous-mêmes (Andrianaivo 2004)

Comment peut-on expliquer que même si l'ADN est injecté un long temps après l'injection hydrodynamique, il garde une distribution après centrifugation différentielle, semblable à celle qu'il a après une injection hydrodynamique directe. En fait, nous observons un phénomène comparable à celui que nous avons décrit pour l'asialofétuine en ce qui concerne la distribution de cette molécule après centrifugation différentielle. Cela suggère fortement que ce sont les mêmes modifications du foie créées par l'injection hydrodynamique qui sont responsables des distributions anormales de la protéine et de l'ADN. Dans le cas de l'asialofétuine, nous avons proposé comme hypothèse que les changements de distribution résultaient d'un accès de la protéine au pôle biliaire de l'hépatocyte, suite à une perméation des jonctions intercellulaires sous l'influence de la pression hydrodynamique, perméation qui persisterait pendant tout un temps après l'injection hydrodynamique. Cela pourrait concerner également l'ADN, avec la différence qu'il resterait nettement plus longtemps fixé à la membrane plasmique car les hépatocytes n'endocytent que très lentement l'ADN (Lecocq 2003). Une conséquence importante des observations que nous venons de décrire est que cet ADN qui reste lié à la membrane plasmique, non dégradé pendant un temps relativement long n'aurait aucun rôle dans la transfection hydrodynamique, seules compteraient les quelques molécules qui entrent par les pores de la membrane plasmique pendant et immédiatement après l'injection. Il est toutefois à remarquer que l'augmentation de la proportion d'ADN dans la fraction S n'est pas observée alors que ce phénomène est apparent jusqu'à 1 heure après injection hydrodynamique d'ASF. Deux facteurs pourraient jouer pour expliquer cette différence, résultant de la différence de taille du plasmide et de l'ASF. Le plasmide a un poids moléculaire cent fois supérieur à celui de l'asialofétuine. Cela peut limiter considérablement

son entrée dans le cytosol, celle-ci serait suffisante pour permettre une expression mais ne conduirait pas à une augmentation décelable de la proportion de cette molécule retrouvée dans S. D'autre part, les pores de la membrane plasmique créés par la pression hydrodynamique et permettant l'entrée d'ASF dans le cytosol pourraient être plus petits que ceux qui permettent l'entrée du plasmide et persisteraient plus longtemps après l'injection et ceci, sans préjudice pour l'hépatocyte. En conséquence, on observerait une proportion d'ASF significativement augmentée dans S, même si l'injection conventionnelle de cette molécule est administrée de nombreuses minutes après une injection hydrodynamique de NaCl.

4. CONCLUSIONS GENERALES

CHAPITRE 5. CONCLUSIONS GENERALES

Les résultats que nous avons présentés nous apportent des informations sur l'influence de l'injection hydrodynamique sur l'endocytose par le foie. Rappelons que notre travail avait deux buts principaux : contribuer à l'élucidation du mécanisme de la transfection hydrodynamique et rechercher si l'injection hydrodynamique pouvait présenter des avantages pour introduire des protéines dans les cellules hépatiques.

5.1. TRANSFECTION HYDRODYNAMIQUE

Il est admis que l'efficience de la transfection hydrodynamique résulte d'un mode d'entrée de l'ADN plasmidique dans les hépatocytes permettant un accès facilité de cette molécule au noyau. Rappelons que deux hypothèses proposées sont soit qu'une telle injection affecte l'endocytose de l'ADN pour permettre une telle facilitation, soit que cette injection provoque l'entrée directe de l'ADN dans le cytosol, par des pores dans la membrane plasmique créés par la pression hydrodynamique (Lecocq, et al. 2003). Nos résultats montrent que l'endocytose d'une protéine spécifiquement endocytée par les hépatocytes est inhibée pendant les minutes qui suivent l'injection hydrodynamique. Il est vraisemblable que cela se passe également pour d'autres macromolécules tel l'ADN, mais dans le cas de l'ADN, il est difficile de dissocier l'endocytose par les hépatocytes et l'endocytose par les cellules sinusoïdales. Or, comme nous l'avons montré, l'entrée dans les hépatocytes des molécules d'ADN plasmidique qui seront responsables de l'expression se fait très rapidement après l'injection hydrodynamique, c'est-à-dire, dans la période de temps où, d'après nos résultats, l'endocytose par ces cellules est fortement perturbée. Nos observations sont donc en faveur d'une entrée de ces molécules d'ADN dans la cellule, lors de la transfection hydrodynamique par un mécanisme autre que l'endocytose. De plus, comme nous l'avons discuté, la présence d'une proportion anormalement

élevée d'ASF dans la fraction non sédimentable de l'homogénat de foie après injection hydrodynamique suggère qu'effectivement, certaines molécules d'ASF atteignent directement le cytosol en traversant la membrane plasmique.

5.2. INTRODUCTION DE PROTEINES DANS LA CELLULE

Evidemment, si comme le suggèrent nos résultats, l'injection hydrodynamique permet une entrée directe de l'asialofétuine dans le cytosol, ce procédé devrait être utilisable pour faire pénétrer d'autres protéines dans le cytosol des hépatocytes. Ceci serait, croyons-nous, extrêmement utile car, dans la plupart des cas, une protéine exogène ne peut entrer dans un hépatocyte ou dans tout autre cellule que par endocytose. Or, dans ces conditions, la protéine est quasi condamnée à être dégradée dans le système endosomo-lysosomal et est donc incapable d'exercer une fonction dans la cellule qui l'a captée.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Al-Awqati, Q. 1986 'Proton-translocating ATPases', *Annu Rev Cell Biol* 2: 179-99.

Amabile, P. G., Waugh, J. M., Lewis, T. N., Elkins, C. J., Janas, W. and Dake, M. D. 2001 'High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound', *J Am Coll Cardiol* 37(7): 1975-80.

Amar-Costesec, A., Beaufay, H., Wibo, M., Thines-Sempoux, D., Feytmans, E., Robbi, M. and Berthet, J. 1974a 'Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. II. Preparation and composition of the microsomal fraction', *J Cell Biol* 61(1): 201-12.

Amar-Costesec, A., Wibo, M., Thines-Sempoux, D., Beaufay, H. and Berthet, J. 1974b 'Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. IV. Biochemical, physical, and morphological modifications of microsomal components induced by digitonin, EDTA, and pyrophosphate', *J Cell Biol* 62(3): 717-45.

Anderson, R. G. 1998 'The caveolae membrane system', *Annu Rev Biochem* 67: 199-225.

Anderson, R. G., Kamen, B. A., Rothberg, K. G. and Lacey, S. W. 1992 'Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae', *Science* 255(5043): 410-1.

Andrianaivo, F., Lecocq, M., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R., Jadot, M. 2004 'Hydrodynamics-based transfection of the liver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection', *J Gene Med (sous presse)*.

Ashwell, G. and Harford, J. 1982 'Carbohydrate-specific receptors of the liver', *Annu Rev Biochem* 51: 531-54.

Ashwell, G. and Morell, A. G. 1974 'The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins', *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41(0): 99-128.

Avrameas, A., McIlroy, D., Hosmalin, A., Autran, B., Debre, P., Monsigny, M., Roche, A. C. and Midoux, P. 1996 'Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells', *Eur J Immunol* 26(2): 394-400.

Bachy, M., Boudet, F., Bureau, M., Girerd-Chambaz, Y., Wils, P., Scherman, D. and Meric, C. 2001 'Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse', *Vaccine* 19(13-14): 1688-93.

Bank, A. 2003 'Hematopoietic stem cell gene therapy: selecting only the best', *J Clin Invest* 112(10): 1478-80.

Barbera-Guillem, E. and Vidal-Vanaclocha, F. 1988 'Sinusoidal structure of the liver', *Revis Biol Celular* 16: 1-34, 54-68.

Bartles, J. R., Braiterman, L. T. and Hubbard, A. L. 1985 'Endogenous and exogenous domain markers of the rat hepatocyte plasma membrane', *J Cell Biol* 100(4): 1126-38.

Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J. 1974 'Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. 3. Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradients', *J Cell Biol* 61(1): 213-31.

Beaufay, H., Jacques, P., Baudhuin, P., Sellinger, O. Z., Berthet, J. and De Duve, C. 1964 'Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients', *Biochem J* 92(1): 184-205.

Berg, T., Kindberg, G. M., Ford, T. and Blomhoff, R. 1985 'Intracellular transport of asialoglycoproteins in rat hepatocytes. Evidence for two subpopulations of lysosomes', *Exp Cell Res* 161(2): 285-96.

Bindoff, L. and Gilhus, N. E. 2003 '[The genetic basis of muscle disease]', *Tidsskr Nor Laegeforen* 123(18): 2588-92.

Bischoff, J., Libresco, S., Shia, M. A. and Lodish, H. F. 1988 'The H1 and H2 polypeptides associate to form the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells', *J Cell Biol* 106(4): 1067-74.

Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P. and et al. 1995 'T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years', *Science* 270(5235): 475-80.

Blair-Parks, K., Weston, B. C. and Dean, D. A. 2002 'High-level gene transfer to the cornea using electroporation', *J Gene Med* 4(1): 92-100.

Bogdanovich, S., Perkins, K. J., Krag, T. O. and Khurana, T. S. 2004 'Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions', *J Mol Med* 82(2): 102-15.

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. 1995 'A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine', *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7297-301.

Boussif, O., Zanta, M. A. and Behr, J. P. 1996 'Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold', *Gene Ther* 3(12): 1074-80.

Boyum, A., Berg, T., and Blomhoff,R. 1983 'Fractionation of mammalian cells. In iodinateddensity gradient media: a pratcal approach, Edit Rickwood D., IRL Press, Oxford, Washington, DC.' 147-171.

Braet, F., De Zanger, R., Baekeland, M., Crabbe, E., Van Der Smissen, P. and Wisse, E. 1995 'Structure and dynamics of the fenestrae-associated cytoskeleton of rat liver sinusoidal endothelial cells', *Hepatology* 21(1): 180-9.

Braet, F. and Wisse, E. 2002 'Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review', *Comp Hepatol* 1(1): 1.

Braun, S., Thioudellet, C., Rodriguez, P., Ali-Hadji, D., Perraud, F., Accart, N., Balloul, J. M., Halluard, C., Acres, B., Cavallini, B. and Pavirani, A. 2000 'Immune rejection of human dystrophin following intramuscular injections of naked DNA in mdx mice', *Gene Ther* 7(17): 1447-57.

Brennan, A. L. and Geddes, D. M. 2004 'Bringing new treatments to the bedside in cystic fibrosis', *Pediatr Pulmonol* 37(2): 87-98.

Brown, M. S. and Goldstein, J. L. 1986 'A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis', *Science* 232(4746): 34-47.

Budker, V., Budker, T., Zhang, G., Subbotin, V., Loomis, A. and Wolff, J. A. 2000 'Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process', *J Gene Med* 2(2): 76-88.

Budker, V., Zhang, G., Danko, I., Williams, P. and Wolff, J. 1998 'The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle', *Gene Ther* 5(2): 272-6.

Budker, V., Zhang, G., Knechtle, S. and Wolff, J. A. 1996 'Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes', *Gene Ther* 3(7): 593-8.

Bureau, M. F., Naimi, S., Torero Ibad, R., Seguin, J., Georger, C., Arnould, E., Maton, L., Blanche, F., Delaere, P. and Scherman, D. 2004 'Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation', *Biochim Biophys Acta* 1676(2): 138-48.

Cascallo, M. and Alemany, R. 2004 'Adenovirus-mediated gene transfer to tumor cells', *Methods Mol Biol* 246: 121-38.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. and Fischer, A. 2000a 'Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease', *Science* 288(5466): 669-72.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint-Basile, G., Le Deist, F. and Fischer, A. 2000b '[Gene therapy of severe combined immunodeficiencies]', *Transfus Clin Biol* 7(3): 259-60.

Cereda, S., Cefalo, G., Terenziani, M., Catania, S. and Fossati-Bellani, F. 2004 'Becker muscular dystrophy in a patient with Hodgkin's disease', *J Pediatr Hematol Oncol* 26(1): 72-3.

Chang, W. J., Rothberg, K. G., Kamen, B. A. and Anderson, R. G. 1992 'Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate', *J Cell Biol* 118(1): 63-9.

Chapdelaine, P., Moisset, P. A., Campeau, P., Asselin, I., Vilquin, J. T. and Tremblay, J. P. 2000 'Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development', *Protein Eng* 13(9): 611-5.

Chen, S. D., Widnell, C., Vaerman,J.P., Baudhuin, P., and Courtoy P.J. 1987 'Ultrastructural localization of 5'-nucleotidase in normal rat liver and after bile duct ligation', *J. Cell Biol* 105: 233a.

Chesnoy, S. and Huang, L. 2000 'Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery', *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 27-47.

Connelly, S. and Mech, C. 2004 'Delivery of adenoviral DNA to mouse liver', *Methods Mol Biol* 246: 37-52.

Conran, N., Oresco-Santos, C., Acosta, H. C., Fattori, A., Saad, S. T. and Costa, F. F. 2004 'Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients', *Br J Haematol* 124(4): 547-54.

Courtoy, P. J. 1985 'Receptors, endocytosis and the clinician', *Acta Clin Belg* 40(6): 347-51.

— 1993 'Analytical subcellular fractionation of endosomal compartments in rat hepatocytes', *Subcell Biochem* 19: 29-68.

Courtoy, P. J., Quintart, J. and Baudhuin, P. 1984 'Shift of equilibrium density induced by 3,3'-diaminobenzidine cytochemistry: a new procedure for the analysis and purification of peroxidase-containing organelles', *J Cell Biol* 98(3): 870-6.

Cupers, P., Veithen, A., Kiss, A., Baudhuin, P. and Courtoy, P. J. 1994 'Clathrin polymerization is not required for bulk-phase endocytosis in rat fetal fibroblasts', *J Cell Biol* 127(3): 725-35.

Davidson, J. M., Krieg, T. and Eming, S. A. 2000 'Particle-mediated gene therapy of wounds', *Wound Repair Regen* 8(6): 452-9.

de Duve, C. 1971 'Tissue fractionation. Past and present', *J Cell Biol* 50(1): 20d-55d.

de Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. 1955 'Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue', *Biochem J* 60(4): 604-17.

De Leeuw, A. M., Brouwer, A. and Knook, D. L. 1990 'Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age', *J Electron Microsc Tech* 14(3): 218-36.

Dean, D. A. 2003 'Electroporation of the vasculature and the lung', *DNA Cell Biol* 22(12): 797-806.

Depardon, F., Cisneros, B., Alonso-Vilatela, E. and Montanez, C. 2001 'Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) gene expression in lymphocytes of patients with myotonic dystrophy', *Arch Med Res* 32(2): 123-8.

Dobbs, B. R., Rogers, G. W., Xing, H. Y. and Fraser, R. 1994 'Endotoxin-induced defenestration of the hepatic sinusoidal endothelium: a factor in the pathogenesis of cirrhosis?' *Liver* 14(5): 230-3.

Drabick, J. J., Glasspool-Malone, J., King, A. and Malone, R. W. 2001 'Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electropermeabilization', *Mol Ther* 3(2): 249-55.

Dufour, J. F., Gehr, P. and Reichen, J. 1992 'Hepatic accumulation of lysosomes and defective transcytotic vesicular pathways in cirrhotic rat liver', *Hepatology* 16(4): 997-1006.

Emerich, D. F., Cain, C. K., Greco, C., Saydoff, J. A., Hu, Z. Y., Liu, H. and Lindner, M. D. 1997a 'Cellular delivery of human CNTF prevents motor and cognitive dysfunction in a rodent model of Huntington's disease', *Cell Transplant* 6(3): 249-66.

Emerich, D. F., Winn, S. R., Hantraye, P. M., Peschanski, M., Chen, E. Y., Chu, Y., McDermott, P., Baetge, E. E. and Kordower, J. H. 1997b 'Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease', *Nature* 386(6623): 395-9.

Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D. M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A. and Pieters, J. 1997 'Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells', *Adv Exp Med Biol* 417: 183-7.

Evans, W. H. 1980 'A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte', *Biochim Biophys Acta* 604(1): 27-64.

Evans, W. H. and Flint, N. 1985 'Subfractionation of hepatic endosomes in Nycodenz gradients and by free-flow electrophoresis. Separation of ligand-transporting and receptor-enriched membranes', *Biochem J* 232(1): 25-32.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M. 1987 'Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure', *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7413-7.

Fischer, A. 2000a 'Gene therapy of severe combined immunodeficiency. Interview with Alain Fischer', *J Gene Med* 2(4): 297-300.

— 2000b 'Severe combined immunodeficiencies (SCID)', *Clin Exp Immunol* 122(2): 143-9.

Fischer, A., Hacein-Bey, S., Le Deist, F., de Saint Basile, G., de Villartay, J. P. and Cavazzana-Calvo, M. 2000a '[Gene therapy for immune deficiencies]', *Bull Acad Natl Med* 184(7): 1417-28; discussion 1428-30.

Fischer, A., Hacein-Bey, S., Le Deist, F., Soudais, C., Di Santo, J. P., de Saint Basile, G. and Cavazzana-Calvo, M. 2000b 'Gene therapy of severe combined immunodeficiencies', *Immunol Rev* 178: 13-20.

Forgac, M. 1992 'Structure and properties of the coated vesicle proton pump', *Ann N Y Acad Sci* 671: 273-83.

Fraser, R. and Bowler, L. M. 1975 'Fitration of lipoproteins by the liver.' *New Zealand Medical Journal* 83: 352.

Fraser, R., Bowler, L. M., Day, W. A., Dobbs, B., Johnson, H. D. and Lee, D. 1980 'High perfusion pressure damages the sieving ability of sinusoidal endothelium in rat livers', *Br J Exp Pathol* 61(2): 222-8.

Fraser, R., Dobbs, B. R. and Rogers, G. W. 1995 'Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis', *Hepatology* 21(3): 863-74.

Frenzel, H., Hucker, H. and Kremer, B. 1977 '[The liver sinusoids in rats following fractionated local telecobalt-irradiation. A transmission and scanning electron microscopic study (author's transl)]', *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 375(1): 37-51.

Frokjaer-Jensen, J. 1980 'Three-dimensional organization of plasmalemmal vesicles in endothelial cells. An analysis by serial sectioning of frog mesenteric capillaries', *J Ultrastruct Res* 73(1): 9-20.

Fuchs, R., Male, P. and Mellman, I. 1989a 'Acidification and ion permeabilities of highly purified rat liver endosomes', *J Biol Chem* 264(4): 2212-20.

Fuchs, R., Schmid, S. and Mellman, I. 1989b 'A possible role for Na+,K+-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification', *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2): 539-43.

Gao, X. and Huang, L. 1995 'Cationic liposome-mediated gene transfer', *Gene Ther* 2(10): 710-22.

Garrett, R. H. and Grisham, C. M. 2000 'Biochimie', *Ann Biol Clin (Paris)* 58(6): 1117-1118.

Gautam, A., Densmore, C. L., Xu, B. and Waldrep, J. C. 2000 'Enhanced gene expression in mouse lung after PEI-DNA aerosol delivery', *Mol Ther* 2(1): 63-70.

Geerts, A., Bouwens, L. and Wisse, E. 1990 'Ultrastructure and function of hepatic fat-storing and pit cells', *J Electron Microsc Tech* 14(3): 247-56.

Geuze, H. J., Slot, J. W. and Schwartz, A. L. 1987 'Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution', *J Cell Biol* 104(6): 1715-23.

Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J., Lodish, H. F. and Schwartz, A. L. 1983 'Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis', *Cell* 32(1): 277-87.

Gill, D. R., Davies, L. A., Pringle, I. A. and Hyde, S. C. 2004 'The development of gene therapy for diseases of the lung', *Cell Mol Life Sci* 61(3): 355-68.

Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S. 1963 'The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity', *Biochem J* 89: 114-23.

Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. and Kornfeld, S. 1988 'The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes', *Cell* 52(3): 329-41.

Gustavsson, J., Parpal, S. and Stralfors, P. 1996 'Insulin-stimulated glucose uptake involves the transition of glucose transporters to a caveolae-rich fraction within the plasma membrane: implications for type II diabetes', *Mol Med* 2(3): 367-72.

Hagstrom, J. E. 2003 'Plasmid-based gene delivery to target tissues in vivo: the intravascular approach', *Curr Opin Mol Ther* 5(4): 338-44.

Hansen, S. H., Sandvig, K. and van Deurs, B. 1991 'The preendosomal compartment comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations', *J Cell Biol* 113(4): 731-41.

Harding, C., Levy, M. A. and Stahl, P. 1985 'Morphological analysis of ligand uptake and processing: the role of multivesicular endosomes and CURL in receptor-ligand processing', *Eur J Cell Biol* 36(2): 230-8.

Hayakawa, T., Ng, O. C., Ma, A., Boyer, J. L. and Cheng, O. 1990 'Taurocholate stimulates transcytotic vesicular pathways labeled by horseradish peroxidase in the isolated perfused rat liver', *Gastroenterology* 99(1): 216-28.

Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J. and Nicolau, C. 1996 'In vivo gene electroinjection and expression in rat liver', *FEBS Lett* 389(3): 225-8.

Henis, Y. I., Katzir, Z., Shia, M. A. and Lodish, H. F. 1990 'Oligomeric structure of the human asialoglycoprotein receptor: nature and stoichiometry of mutual complexes containing H1 and H2 polypeptides assessed by fluorescence photobleaching recovery', *J Cell Biol* 111(4): 1409-18.

Herweijer, H. and Wolff, J. A. 2003 'Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy', *Gene Ther* 10(6): 453-8.

Herweijer, H., Zhang, G., Subbotin, V. M., Budker, V., Williams, P. and Wolff, J. A. 2001 'Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver', *J Gene Med* 3(3): 280-91.

Hopkins, C. R., Gibson, A., Shipman, M. and Miller, K. 1990 'Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum', *Nature* 346(6282): 335-9.

Houk, B. E., Hochhaus, G. and Hughes, J. A. 1999 'Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma', *AAPS PharmSci* 1(3): E9.

Houk, B. E., Martin, R., Hochhaus, G. and Hughes, J. A. 2001 'Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat', *Pharm Res* 18(1): 67-74.

Hysing, J. and Tolleshaug, H. 1986 'Quantitative aspects of the uptake and degradation of lysozyme in the rat kidney in vivo', *Biochim Biophys Acta* 887(1): 42-50.

Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De Coninck, S. and Wattiaux, R. 1984 'Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide', *Biochem J* 219(3): 965-70.

Jadot, M., Misquith, S., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S. and Wattiaux, R. 1986 'Intracellular pathway followed by invertase endocytosed by rat liver', *Eur J Biochem* 161(3): 695-700.

Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H. and Verma, I. M. 1997 'Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors', *Nat Genet* 17(3): 314-7.

Kaplan, J. M., Pennington, S. E., St George, J. A., Woodworth, L. A., Fasbender, A., Marshall, J., Cheng, S. H., Wadsworth, S. C., Gregory, R. J. and Smith, A. E. 1998 'Potentiation of gene transfer to the mouse lung by complexes of adenovirus vector and polycations improves therapeutic potential', *Hum Gene Ther* 9(10): 1469-79.

Kawai, Y., Smedsrod, B., Elvevold, K. and Wake, K. 1998 'Uptake of lithium carmine by sinusoidal endothelial and Kupffer cells of the rat liver: new insights into the classical vital staining and the reticulo-endothelial system', *Cell Tissue Res* 292(2): 395-410.

Kay, M. A., Liu, D. and Hoogerbrugge, P. M. 1997 'Gene therapy', *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12744-6.

Keswani, S. G. and Crombleholme, T. M. 2004 'Gene transfer to the tracheobronchial tree: implications for fetal gene therapy for cystic fibrosis', *Semin Pediatr Surg* 13(1): 44-52.

Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E. and Danos, O. 2001 'Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study', *J Gene Med* 3(2): 135-44.

Kindberg, G. M., Ford, T., Blomhoff, R., Rickwood, D. and Berg, T. 1984 'Separation of endocytic vesicles in Nycodenz gradients', *Anal Biochem* 142(2): 455-62.

Klein, T. M., Arentzen, R., Lewis, P. A. and Fitzpatrick-McElligott, S. 1992 'Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment', *Biotechnology (N Y)* 10(3): 286-91.

Knapp, J. E. and Liu, D. 2004 'Hydrodynamic delivery of DNA', *Methods Mol Biol* 245: 245-50.

Kobayashi, N., Kuramoto, T., Yamaoka, K., Hashida, M. and Takakura, Y. 2001 'Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures', *J Pharmacol Exp Ther* 297(3): 853-60.

Kobayashi, N., Nishikawa, M., Hirata, K., Nishikawa, M. and Takakura, Y. 2004 'Hydrodynamics-based transfection procedure involves transiet hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery', *J Gene Med*.

Kolb-Bachofen, V. 1981 'Hepatic receptor for asialo-glycoproteins. Ultrastructural demonstration of ligand-induced microaggregation of receptors', *Biochim Biophys Acta* 645(2): 293-9.

Kornfeld, S. and Mellman, I. 1989 'The biogenesis of lysosomes', *Annu Rev Cell Biol* 5: 483-525.

Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A. and Lefkowitz, R. J. 1997 'The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification', *J Biol Chem* 272(1): 5-8.

Kurre, P. and Kiem, H. P. 2000 'Progress towards hematopoietic stem cell gene therapy', *Curr Opin Mol Ther* 2(4): 400-11.

Kurzchalia, T. V., Dupree, P. and Monier, S. 1994 'VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae', *FEBS Lett* 346(1): 88-91.

Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S., Mihaylova, E., Leontieva, E., Warnier-Pirotte, M. T., Wattiaux, R. and Jadot, M. 1999 'Uptake by liver and intracellular fate of plasmid DNA complexed with poly-L-Lysine or poly-D-Lysine.' *FEBS Lett*(443): 61-65.

Lecocq, M. 2003 'Uptake and fate of plasmid DNA in relation with hydrodynamic-based transfection of the liver (Thèse)'.

Lecocq, M., Andrianaivo, F., Warnier, M. T., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. and Jadot, M. 2003 'Uptake by mouse liver and intracellular fate of plasmid DNA after a rapid tail vein injection of a small or a large volume', *J Gene Med* 5(2): 142-56.

Lecocq, M., Wattiaux-De Coninck, S., Laurent, N., Wattiaux, R. and Jadot, M. 2000 'Uptake and intracellular fate of polyethylenimine in vivo', *Biochem Biophys Res Commun* 278(2): 414-8.

Lecoq, M. 2003 'Uptake and fate of plasmid DNA in relation with hydrodynamic-based transfection of the liver'.

Lee, R. J. and Huang, L. 1997 'Lipidic vector systems for gene transfer', *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14(2): 173-206.

Lehninger, A. L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 1993 'Principles of biochemistry pg: 72 Worth Publisher'.

Liang, K. W., Nishikawa, M., Liu, F., Sun, B., Ye, Q. and Huang, L. 2004a 'Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA', *Gene Ther*.

— 2004b 'Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA', *Gene Ther* 11(11): 901-8.

Limberis, M., Anson, D. S., Fuller, M. and Parsons, D. W. 2002 'Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dose lentivirus-mediated gene transfer', *Hum Gene Ther* 13(16): 1961-70.

Limet, J. N., Quintart, J., Schneider, Y. J. and Courtoy, P. J. 1985 'Receptor-mediated endocytosis of polymeric IgA and galactosylated serum albumin in rat liver. Evidence for intracellular ligand sorting and identification of distinct endosomal compartments', *Eur J Biochem* 146(3): 539-48.

Lin, M. T., Pulkkinen, L., Uitto, J. and Yoon, K. 2000 'The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy', *Int J Dermatol* 39(3): 161-70.

Liu, D., Chiao, E. F. and Tian, H. 2004 'Chemical methods for DNA delivery: an overview', *Methods Mol Biol* 245: 3-24.

Liu, D. and Knapp, J. E. 2001 'Hydrodynamics-based gene delivery', *Curr Opin Mol Ther* 3(2): 192-7.

Liu, F. and Huang, L. 2002 'Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA', *Gene Ther* 9(16): 1116-9.

Liu, F., Qi, H., Huang, L. and Liu, D. 1997 'Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration', *Gene Ther* 4(6): 517-23.

Liu, F., Song, Y. and Liu, D. 1999 'Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA', *Gene Ther* 6(7): 1258-66.

Liu, M. A. and Ulmer, J. B. 2000 'Gene-based vaccines', *Mol Ther* 1(6): 497-500.

Lollo, C. P., Kwoh, D. Y., Mockler, T. C., Ley, P. M., Guido, M. S., Coffin, C. C., Aleman, R., Bartholomew, R. M. and Carlo, D. J. 1997 'Non-viral gene delivery: vehicle and delivery characterization', *Blood Coagul Fibrinolysis* 8 Suppl 2: S31-8.

Lowe, P. J., Kan, K. S., Barnwell, S. G., Sharma, R. K. and Coleman, R. 1985 'Transcytosis and paracellular movements of horseradish peroxidase across liver parenchymal

tissue from blood to bile. Effects of alpha-naphthylisothiocyanate and colchicine', *Biochem J* 229(2): 529-37.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 'Protein measurement with the Folin phenol reagent', *J Biol Chem* 193(1): 265-75.

Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M. and Piper, R. C. 2000 'Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis', *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1515-24.

Magnusson, S. and Berg, T. 1993 'Endocytosis of ricin by rat liver cells in vivo and in vitro is mainly mediated by mannose receptors on sinusoidal endothelial cells', *Biochem J* 291 (Pt 3): 749-55.

Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K. and Boucher, R. C. 2004a 'Increased airway epithelial Na(+) absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice', *Nat Med*.

— 2004b 'Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice', *Nat Med* 10(5): 487-93.

Marinelli, R. A. and Penalva, G. L. 1992 'Effect of lysosomotropic agents on the taurocholate-stimulated biliary excretion of horseradish peroxidase', *Biochem Pharmacol* 44(8): 1683-6.

Mark, M. 2001 'Endocytosis: Molecules, Membranes, and Movements', *Oxford University Press* 306.

Maruyama, H., Ataka, K., Higuchi, N., Sakamoto, F., Gejyo, F. and Miyazaki, J. 2001 'Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation', *Gene Ther* 8(23): 1808-12.

Matter, A., Orci, L. and Rouiller, C. 1969 'A study on the permeability barriers between Disse's space and the bile canaliculus', *J Ultrastruct Res* 11: 1-71.

Matveev, S., Li, X., Everson, W. and Smart, E. J. 2001 'The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking', *Adv Drug Deliv Rev* 49(3): 237-50.

McNeil, P. L. 2002 'Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue', *J Cell Sci* 115(Pt 5): 873-9.

McNeil, P. L. and Ito, S. 1990 'Molecular traffic through plasma membrane disruptions of cells in vivo', *J Cell Sci* 96 (Pt 3): 549-56.

McNeil, P. L. and Steinhardt, R. A. 1997 'Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity', *J Cell Biol* 137(1): 1-4.

Mellman, I. 1990 'Endocytosis and antigen processing', *Semin Immunol* 2(4): 229-37.

— 1996 'Membranes and sorting', *Curr Opin Cell Biol* 8(4): 497-8.

Mellman, I., Fuchs, R. and Helenius, A. 1986 'Acidification of the endocytic and exocytic pathways', *Annu Rev Biochem* 55: 663-700.

Metchnikoff, E. 1893 'On aqueous humour, microorganisms and immunity', *J. Pathol. Bacteriol* 1: pp. 13-20.

Miao, C. H., Thompson, A. R., Loeb, K. and Ye, X. 2001 'Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo', *Mol Ther* 3(6): 947-57.

Miike, T. and Osawa, M. 2004 '[Therapy for myopathies: from management to genetic treatment: introductory remarks]', *No To Hattatsu* 36(2): 114-6.

Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. and Scherman, D. 1999 'High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses', *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4262-7.

Mir, L. M., Bureau, M. F., Rangara, R., Schwartz, B. and Scherman, D. 1998 'Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle', *C R Acad Sci III* 321(11): 893-9.

Misquith, S., Wattiaux-De Coninck, S. and Wattiaux, R. 1988 'Uptake and intracellular transport in rat liver of formaldehyde-treated bovine serum albumin labelled with 125I-tyramine-cellobiose', *Eur J Biochem* 174(4): 691-7.

Montesano, R., Roth, J., Robert, A. and Orci, L. 1982 'Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins', *Nature* 296(5858): 651-3.

Montier, T., Delepine, P., Marianowski, R., Le Ny, K., Le Bris, M., Gillet, D., Potard, G., Mondine, P., Frachon, I., Yaouanc, J. J., Clement, J. C., Des Abbayes, H. and Ferec, C. 2004 'CFTR Transgene Expression in Primary DeltaF508 Epithelial Cell Cultures From Human Nasal Polyps Following Gene Transfer With Cationic Phosphonolipids', *Mol Biotechnol* 26(3): 193-206.

Morell, A. G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I. H., Hickman, J. and Ashwell, G. 1971 'The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation', *J Biol Chem* 246(5): 1461-7.

Moret, I., Esteban Peris, J., Guillem, V. M., Benet, M., Revert, F., Dasi, F., Crespo, A. and Alino, S. F. 2001 'Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum', *J Control Release* 76(1-2): 169-81.

Mori, T., Okanoue, T., Sawa, Y., Hori, N., Ohta, M. and Kagawa, K. 1993 'Defenestration of the sinusoidal endothelial cell in a rat model of cirrhosis', *Hepatology* 17(5): 891-7.

Muangmoonchai, R., Wong, S. C., Smirlis, D., Phillips, I. R. and Shephardl, E. A. 2002 'Transfection of liver in vivo by biolistic particle delivery: its use in the investigation of cytochrome P450 gene regulation', *Mol Biotechnol* 20(2): 145-51.

Mueller, S. C. and Hubbard, A. L. 1986 'Receptor-mediated endocytosis of asialoglycoproteins by rat hepatocytes: receptor-positive and receptor-negative endosomes', *J Cell Biol* 102(3): 932-42.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R. 1997 'Endocytosis', *Physiol Rev* 77(3): 759-803.

Mulligan, R. C. 1993 'The basic science of gene therapy', *Science* 260(5110): 926-32.

Murakami, T., Nishi, T., Kimura, E., Goto, T., Maeda, Y., Ushio, Y., Uchino, M. and Sunada, Y. 2003 'Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation', *Muscle Nerve* 27(2): 237-41.

Murk, J. L., Humbel, B. M., Ziese, U., Griffith, J. M., Posthuma, G., Slot, J. W., Koster, A. J., Verkleij, A. J., Geuze, H. J. and Kleijmeer, M. J. 2003 'Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion', *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13332-7.

Naito, M. and Wisse, E. 1978 'Filtration effect of endothelial fenestrations on chylomicron transport in neonatal rat liver sinusoids', *Cell Tissue Res* 190(3): 371-82.

Neumann, E. and Rosenheck, K. 1972 'Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes', *J Membr Biol* 10(3): 279-90.

Newman, C. M., Lawrie, A., Brisken, A. F. and Cumberland, D. C. 2001 'Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality', *Echocardiography* 18(4): 339-47.

Niidome, T. and Huang, L. 2002 'Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors', *Gene Ther* 9(24): 1647-52.

Nilsson, M. and Berg, T. 1977 'Uptake and degradation of formaldehyde-treated 125I-labelled human serum albumin in rat liver cells in vivo and in vitro', *Biochim Biophys Acta* 497(1): 171-82.

Nusse, R. 1990 'The int genes in mouse mammary tumorigenesis and in normal development', *Ciba Found Symp* 150: 212-22; discussion 222-6.

Ogawa, K., Minase, T., Enomoto, K. and Onoe, T. 1973 'Ultrastructure of fenestrated cells in the sinusoidal wall of rat liver after perfusion fixation', *Tohoku J Exp Med* 110(1): 89-101.

Olson, L. J., Zhang, J., Dahms, N. M. and Kim, J. J. 2002 'Twists and turns of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Ligand-bound versus ligand-free receptor', *J Biol Chem* 277(12): 10156-61.

Palade, G. E. 1953 'An electron microscope study of the mitochondrial structure', *J Histochem Cytochem* 1(4): 188-211.

Park, E. I., Manzella, S. M. and Baenziger, J. U. 2003 'Rapid clearance of sialylated glycoproteins by the asialoglycoprotein receptor', *J Biol Chem* 278(7): 4597-602.

Parsons, D. W., Hopkins, P. J., Bourne, A. J., Boucher, R. C. and Martin, A. J. 2000 'Airway gene transfer in mouse nasal-airways: importance of identification of epithelial type for assessment of gene transfer', *Gene Ther* 7(21): 1810-5.

Parsons, D. W. and Williams, M. 1996 'Patient-controlled sputum removal during chest physiotherapy in cystic fibrosis: a system for use in closed-circuit assessment of energy expenditure', *Med Biol Eng Comput* 34(6): 494-7.

Pelkmans, L. and Helenius, A. 2002 'Endocytosis via caveolae', *Traffic* 3(5): 311-20.

Persons, D. A. 2003 'Update on gene therapy for hemoglobin disorders', *Curr Opin Mol Ther* 5(5): 508-16.

Pillay, C. S., Elliott, E. and Dennison, C. 2002 'Endolysosomal proteolysis and its regulation', *Biochem J* 363(Pt 3): 417-29.

Pin, I., Pilenko, C. and Gout, J. P. 2003 '[Future prospects in the management of cystic fibrosis]', *Arch Pediatr* 10 Suppl 2: 376s-379s.

Pittman, R. C., Carew, T. E., Glass, C. K., Green, S. R., Taylor, C. A., Jr. and Attie, A. D. 1983 'A radioiodinated, intracellularly trapped ligand for determining the sites of plasma protein degradation in vivo', *Biochem J* 212(3): 791-800.

Polack, F. P., Lee, S. H., Permar, S., Manyara, E., Nousari, H. G., Jeng, Y., Mustafa, F., Valsamakis, A., Adams, R. J., Robinson, H. L. and Griffin, D. E. 2000 'Successful DNA immunization against measles: neutralizing antibody against either the hemagglutinin or fusion glycoprotein protects rhesus macaques without evidence of atypical measles', *Nat Med* 6(7): 776-81.

Pontow, S. E., Kery, V. and Stahl, P. D. 1992 'Mannose receptor', *Int Rev Cytol* 137B: 221-44.

Poussin, D., Malassagne, B., Tran Van Nhieu, J., Trebeden, H., Guery, L., Chereau, C., Soubrane, O., Calmus, Y., Weill, B. and Batteux, F. 2002 'Biliary administration of naked

DNA encoding Fas-Fc protein prevents acute liver failure in mice', *Hum Gene Ther* 13(8): 901-8.

Price, P. A. and Lim, J. E. 2003 'The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex', *J Biol Chem* 278(24): 22144-52.

Quintart, J., Courtoy, P. J., Limet, J. N. and Baudhuin, P. 1983 'Galactose-specific endocytosis in rat liver. Biochemical and morphological characterization of a low-density compartment isolated from hepatocytes', *Eur J Biochem* 131(1): 105-12.

Rahner, C., Stieger, B. and Landmann, L. 2000 'Apical endocytosis in rat hepatocytes In situ involves clathrin, traverses a subapical compartment, and leads to lysosomes', *Gastroenterology* 119(6): 1692-707.

Renston, R. H., Maloney, D. G., Jones, A. L., Hradek, G. T., Wong, K. Y. and Goldfine, I. D. 1980 'Bile secretory apparatus: evidence for a vesicular transport mechanism for proteins in the rat, using horseradish peroxidase and [125I]insulin', *Gastroenterology* 78(6): 1373-88.

Rippe, B. and Haraldsson, B. 1994 'Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory', *Physiol Rev* 74(1): 163-219.

Rohrer, J. and Kornfeld, R. 2001 'Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network', *Mol Biol Cell* 12(6): 1623-31.

Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S. and Teissie, J. 1998 'In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma', *Nat Biotechnol* 16(2): 168-71.

Rossmanith, W., Chabicovsky, M., Herkner, K. and Schulte-Hermann, R. 2002 'Cellular gene dose and kinetics of gene expression in mouse livers transfected by high-volume tail-vein injection of naked DNA', *DNA Cell Biol* 21(11): 847-53.

Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G. 1992 'Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats', *Cell* 68(4): 673-82.

Rothberg, K. G., Ying, Y. S., Kamen, B. A. and Anderson, R. G. 1990a 'Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate', *J Cell Biol* 111(6 Pt 2): 2931-8.

Rothberg, K. G., Ying, Y. S., Kolhouse, J. F., Kamen, B. A. and Anderson, R. G. 1990b 'The glycophospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway', *J Cell Biol* 110(3): 637-49.

Rothman, J. E. 1994 'Mechanisms of intracellular protein transport', *Nature* 372(6501): 55-63.

Rudolph, C., Lausier, J., Naundorf, S., Muller, R. H. and Rosenecker, J. 2000 'In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers', *J Gene Med* 2(4): 269-78.

Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M. P. 1993 'Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells', *J Cell Biol* 122(4): 789-807.

Sato, Y., Ajiki, T., Inoue, S., Hakamata, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takahashi, M. and Kobayashi, E. 2003 'A novel gene therapy to the graft organ by a rapid injection of naked DNA I: long-lasting gene expression in a rat model of limb transplantation', *Transplantation* 76(9): 1294-8.

Schenborn, E. T. 2000 'Transfection technologies', *Methods Mol Biol* 130: 91-102.

Schmid, S. L. 1997 'Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process', *Annu Rev Biochem* 66: 511-48.

Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E. and Allard, J. 1994 'Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules', *J Cell Biol* 127(5): 1217-32.

Schultze, H. E. and Heremans, J. F. 1964 'Molecular Biology of human proteins, Elseiver Publishing' 1: 524.

Schwartz, A. L., Bolognesi, A. and Fridovich, S. E. 1984 'Recycling of the asialoglycoprotein receptor and the effect of lysosomotropic amines in hepatoma cells', *J Cell Biol* 98(2): 732-8.

Seaman, M. N. 2004 'Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer', *J Cell Biol* 165(1): 111-22.

Seglen, P. O. 1976 'Preparation of isolated rat liver cells', *Methods Cell Biol* 13: 29-83.

Shia, M. A. and Lodish, H. F. 1989 'The two subunits of the human asialoglycoprotein receptor have different fates when expressed alone in fibroblasts', *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4): 158-62.

Shohet, R. V., Chen, S., Zhou, Y. T., Wang, Z., Meidell, R. S., Unger, R. H. and Grayburn, P. A. 2000 'Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium', *Circulation* 101(22): 2554-6.

Smart, E. J., Mineo, C. and Anderson, R. G. 1996 'Clustered folate receptors deliver 5-methyltetrahydrofolate to cytoplasm of MA104 cells', *J Cell Biol* 134(5): 1169-77.

Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A. and Anderson, R. G. 1994 'Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation', *J Cell Biol* 127(5): 1185-97.

Smedsrod, B., De Bleser, P. J., Braet, F., Lovisetti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E. and Geerts, A. 1994 'Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells', *Gut* 35(11): 1509-16.

Smedsrod, B. and Pertoft, H. 1985 'Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence', *J Leukoc Biol* 38(2): 213-30.

Smedsrod, B., Pertoft, H., Gustafson, S. and Laurent, T. C. 1990 'Scavenger functions of the liver endothelial cell', *Biochem J* 266(2): 313-27.

Smythe, E. 1996 'Subcellular Biochemistry, vol 27: Biology of the Lysosome', *John B. Lloyd, Robert W. Mason, Plenum* 27: 416.

Sobolev, A. S., Rosenkranz, A. A., Smirnova, O. A., Nikitin, V. A., Neugodova, G. L., Naroditsky, B. S., Shilov, I. N., Shatski, I. N. and Ernst, L. K. 1998 'Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo', *J Biol Chem* 273(14): 7928-33.

Somiari, S., Glasspool-Malone, J., Drabick, J. J., Gilbert, R. A., Heller, R., Jaroszeski, M. J. and Malone, R. W. 2000 'Theory and in vivo application of electroporative gene delivery', *Mol Ther* 2(3): 178-87.

Song, J., Chappell, J. C., Qi, M., VanGieson, E. J., Kaul, S. and Price, R. J. 2002 'Influence of injection site, microvascular pressure and ultrasound variables on microbubble-mediated delivery of microspheres to muscle', *J Am Coll Cardiol* 39(4): 726-31.

Sorensen, K. K., Tollersrud, O. K., Evjen, G. and Smedsrod, B. 2001 'Mannose-receptor-mediated clearance of lysosomal alpha-mannosidase in scavenger endothelium of cod endocardium', *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129(2-3): 615-30.

Sorkin, A. and Carpenter, G. 1993 'Interaction of activated EGF receptors with coated pit adaptins', *Science* 261(5121): 612-5.

Sorkin, A. and Waters, C. M. 1993 'Endocytosis of growth factor receptors', *Bioessays* 15(6): 375-82.

Soukharev, S., Berlin, W., Hanover, J. A., Bethke, B. and Sauer, B. 2000 'Organization of the mouse ASGR1 gene encoding the major subunit of the hepatic asialoglycoprotein receptor', *Gene* 241(2): 233-40.

Spiess, M. and Lodish, H. F. 1985 'Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: conservation of two receptor genes during evolution', *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(19): 6465-9.

Stahl, P., Six, H., Rodman, J. S., Schlesinger, P., Tulsiani, D. R. and Touster, O. 1976 'Evidence for specific recognition sites mediating clearance of lysosomal enzymes in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(11): 4045-9.

Stanley, K. K., Edwards, M. R. and Luzio, J. P. 1980 'Subcellular distribution and movement of 5'-nucleotidase in rat cells', *Biochem J* 186(1): 59-69.

Steffan, A. M., Pereira, C. A., Bingen, A., Valle, M., Martin, J. P., Koehren, F., Royer, C., Gendrault, J. L. and Kirn, A. 1995 'Mouse hepatitis virus type 3 infection provokes a decrease in the number of sinusoidal endothelial cell fenestrae both in vivo and in vitro', *Hepatology* 22(2): 395-401.

Suzuki, T., Shin, B. C., Fujikura, K., Matsuzaki, T. and Takata, K. 1998 'Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation', *FEBS Lett* 425(3): 436-40.

Takeda, S. 2004 '[Gene therapy on muscular dystrophy]', *No To Hattatsu* 36(2): 117-23.

Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki, M., Ogihara, T., Yasufumi, K. and Morishita, R. 2002 'Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound', *Circulation* 105(10): 1233-9.

Teissie, J. 2002 'In vivo gene expression: combining hydrodynamics-based transfection and electrotransfer', *Trends Biotechnol* 20(12): 487-8.

Togo, T., Alderton, J. M., Bi, G. Q. and Steinhardt, R. A. 1999 'The mechanism of facilitated cell membrane resealing', *J Cell Sci* 112 (Pt 5): 719-31.

Tolleshaug, H., Berg, T. and Blomhoff, R. 1984 'Uptake of mannose-terminated glycoproteins in isolated rat liver cells. Evidence for receptor-mediated endocytosis in hepatocytes', *Biochem J* 223(1): 151-60.

Tooze, J. and Hollinshead, M. 1991 'Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells', *J Cell Biol* 115(3): 635-53.

Trams, E. G. and Lauter, C. J. 1974 'On the sidedness of plasma membrane enzymes', *Biochim Biophys Acta* 345(2): 180-97.

Tsujie, M., Isaka, Y., Nakamura, H., Imai, E. and Hori, M. 2001 'Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli', *J Am Soc Nephrol* 12(5): 949-54.

Ueda, H., Ohno, S. and Kobayashi, T. 2000 'Myotonic dystrophy and myotonic dystrophy protein kinase', *Prog Histochem Cytochem* 35(3): 187-251.

Ukkonen, P., Lewis, V., Marsh, M., Helenius, A. and Mellman, I. 1986 'Transport of macrophage Fc receptors and Fc receptor-bound ligands to lysosomes', *J Exp Med* 163(4): 952-71.

Ulmer, J. B., DeWitt, C. M., Chastain, M., Friedman, A., Donnelly, J. J., McClements, W. L., Caulfield, M. J., Bohannon, K. E., Volkin, D. B. and Evans, R. K. 1999 'Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants', *Vaccine* 18(1-2): 18-28.

Van Dyke, R. W., Hornick, C. A., Belcher, J., Scharschmidt, B. F. and Havel, R. J. 1985a 'Identification and characterization of ATP-dependent proton transport by rat liver multivesicular bodies', *J Biol Chem* 260(20): 11021-6.

Van Dyke, R. W., Scharschmidt, B. F. and Steer, C. J. 1985b 'ATP-dependent proton transport by isolated brain clathrin-coated vesicles. Role of clathrin and other determinants of acidification', *Biochim Biophys Acta* 812(2): 423-36.

Van Heeckeren, A. M., Scaria, A., Schluchter, M. D., Ferkol, T. W., Wadsworth, S. and Davis, P. B. 2004 'Delivery of CFTR by adenoviral vector to cystic fibrosis mouse lung in a model of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(4): L717-26.

Vidal-Vanaclocha, F., Alonso-Varona, A., Ayala, R. and Barbera-Guillem, E. 1990 'Functional variations in liver tissue during the implantation process of metastatic tumour cells', *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416(3): 189-95.

Vilquin, J. T., Kennel, P. F., Paturneau-Jouas, M., Chapdelaine, P., Boissel, N., Delaere, P., Tremblay, J. P., Scherman, D., Fiszman, M. Y. and Schwartz, K. 2001 'Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies', *Gene Ther* 8(14): 1097-107.

Wake, K., Kawai, Y. and Smedsrod, B. 2001 'Re-evaluation of the reticulo-endothelial system', *Ital J Anat Embryol* 106(2 Suppl 1): 261-9.

Wall, D. A., Wilson, G. and Hubbard, A. L. 1980 'The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocytes', *Cell* 21(1): 79-93.

Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck, S. 1983 'Separation of cell organelles. Iodinated density gradient media: a practical approach. Edit Rickwood D., IRL Press, Oxford, Washington, DC': 119-137.

Wattiaux, R., Wibo, M. Baudhuin, P. 1963 'Influence of the injection of triton WR-1339 on the properties of rat-liver lysosomes, Ciba symposium on lysosomes, edited by de Reuck and Cameron; London, J. and A. Churchill, Ltd.' 176-200.

Weigel, P. H. 1993 'Endocytosis and function of the hepatic asialoglycoprotein receptor', *Subcell Biochem* 19: 125-61.

— 1994 'Galactosyl and N-acetylgalactosaminyl homeostasis: a function for mammalian asialoglycoprotein receptors', *Bioessays* 16(7): 519-24.

Wells, K. E., Fletcher, S., Mann, C. J., Wilton, S. D. and Wells, D. J. 2003 'Enhanced in vivo delivery of antisense oligonucleotides to restore dystrophin expression in adult mdx mouse muscle', *FEBS Lett* 552(2-3): 145-9.

Widmann, J. J., Cotran, R. S. and Fahimi, H. D. 1972 'Mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells. Identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity', *J Cell Biol* 52(1): 159-70.

Wileman, T., Boshans, R. L., Schlesinger, P. and Stahl, P. 1984 'Monensin inhibits recycling of macrophage mannose-glycoprotein receptors and ligand delivery to lysosomes', *Biochem J* 220(3): 665-75.

Williams, M. T., Parsons, D. W., Frick, R. A., Ellis, E. R., Martin, A. J., Giles, S. E. and Grant, E. R. 2001 'Acute respiratory infection in patients with cystic fibrosis with mild pulmonary impairment: comparison of two physiotherapy regimens', *Aust J Physiother* 47(4): 227-36.

Willingham, M. C. and Pastan, I. 1985 'Ultrastructural immunocytochemical localization of the transferrin receptor using a monoclonal antibody in human KB cells', *J Histochem Cytochem* 33(1): 59-64.

Wilson, J. M., Whitney, J. A. and Neutra, M. R. 1991 'Biogenesis of the apical endosome-lysosome complex during differentiation of absorptive epithelial cells in rat ileum', *J Cell Sci* 100 (Pt 1): 133-43.

Wisse, E. 1970 'An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids', *J Ultrastruct Res* 31(1): 125-50.

Wisse, E., Braet, F., Luo, D., De Zanger, R., Jans, D., Crabbe, E. and Vermoesen, A. 1996 'Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver', *Toxicol Pathol* 24(1): 100-11.

Wisse, E., De Zanger, R. B., Charels, K., Van Der Smissen, P. and McCuskey, R. S. 1985 'The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse', *Hepatology* 5(4): 683-92.

Wisse, E., De Zanger, R. B., Jacobs, R. and McCuskey, R. S. 1983 'Scanning electron microscope observations on the structure of portal veins, sinusoids and central veins in rat liver', *Scan Electron Microsc*(Pt 3): 1441-52.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P. L. 1990 'Direct gene transfer into mouse muscle in vivo', *Science* 247(4949 Pt 1): 1465-8.

Wong, T. K. and Neumann, E. 1982 'Electric field mediated gene transfer', *Biochem Biophys Res Commun* 107(2): 584-7.

Yamada, E. 1955 'The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse', *J Biophys Biochem Cytol* 1(5): 445-58.

Yoshida, H., Swenberg, C. E. and Geacintov, N. E. 1987 'Kinetic flow dichroism study of conformational changes in supercoiled DNA induced by ethidium bromide and noncovalent and covalent binding of benz[a]pyrene diol epoxide', *Biochemistry* 26(5): 1351-8.

Yoshida, S., Kashiwamura, S. I., Hosoya, Y., Luo, E., Matsuoka, H., Ishii, A., Fujimura, A. and Kobayashi, E. 2000 'Direct immunization of malaria DNA vaccine into the liver by gene gun protects against lethal challenge of Plasmodium berghei sporozoite', *Biochem Biophys Res Commun* 271(1): 107-15.

Zhang, G., Budker, V., Williams, P., Subbotin, V. and Wolff, J. A. 2001 'Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates', *Hum Gene Ther* 12(4): 427-38.

Zhang, G., Budker, V. and Wolff, J. A. 1999 'High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA', *Hum Gene Ther* 10(10): 1735-7.

Zhang, G., Budker, V. G., Ludtke, J. J. and Wolff, J. A. 2004a 'Naked DNA gene transfer in mammalian cells', *Methods Mol Biol* 245: 251-64.

Zhang, G., Gao, X., Song, Y. K., Vollmer, R., Stolz, D. B., Gasiorowski, J. Z., Dean, D. A. and Liu, D. 2004b 'Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery', *Gene Ther*.

Zhang, G., Vargo, D., Budker, V., Armstrong, N., Knechtle, S. and Wolff, J. A. 1997 'Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers', *Hum Gene Ther* 8(15): 1763-72.

Zhu, Z. B., Makhija, S. K., Lu, B., Wang, M., Kaliberova, L., Liu, B., Rivera, A. A., Nettelbeck, D. M., Mahasreshti, P. J., Leath, C. A., 3rd, Yamaoto, M., Alvarez, R. D. and Curiel, D. T. 2004 'Transcriptional targeting of adenoviral vector through the CXCR4 tumor-specific promoter', *Gene Ther* 11(7): 645-8.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. and Trono, D. 1997 'Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo', *Nat Biotechnol* 15(9): 871-5.

Signature Not Verified

ANDRIANAIVO Fanjambolatiana

Digitally signed by ANDRIANAIVO Fanjambolatiana
DN: cn=ANDRIANAIVO Fanjambolatiana, o=Chimie Physiologique, ou=FUNDP, c=BE
Date: 2004.07.14 08:05:01 + 01'00'