

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

Sciences de la Vie et de la Terre

**MÉMOIRE**

Présenté par

**LEGAZ Sophie**

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**VISUALISATION PAR LE SYSTEME GAL4/UAS DU  
TRANSPORT DES NANOPARTICULES DE  
POLY(ACIDE LACTIQUE) CHEZ LA DROSOPHILE**

soutenu le 22 septembre 2011

devant le jury suivant :

<b>Professeur Jean-Marie EXBRAYAT</b>	– Président
<b>Docteur Bernard VERRIER</b>	– Tuteur scientifique
<b>Docteur Agnès BOREL</b>	– Tuteur scientifique
<b>Professeur Christophe TERZIAN</b>	– Tuteur pédagogique
<b>Docteur Mireille ROSSEL</b>	– Rapporteur
<b>Professeur Dominique LE GUELLEC</b>	– Examineur

Mémoire préparé sous la direction :

du **Docteur Bernard VERRIER** et du **Docteur Agnès BOREL**

([b.verrier@ibcp.fr](mailto:b.verrier@ibcp.fr)) ([a.borel@ibcp.fr](mailto:a.borel@ibcp.fr))

Laboratoire de : l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), Nanovecteurs  
biodégradables et ingénierie tissulaire, FRE 3310 CNRS - Université Lyon 1

7 passage du Vercors 69007 Lyon France

Directeur : **Docteur Bernard VERRIER**

et du

**Professeur Christophe TERZIAN**

Laboratoire de : Rétrovirus et Pathologie Comparée, UMR 754 INRA-ENVL-UCBL-EPHE  
(Sciences de la Vie et de la Terre)

Directeur : Jean François MORNEX

<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>1</b>
<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b>	<b>5</b>
<b><u>LISTE DES FIGURES / TABLEAUX / PHOTOGRAPHIES / GRAPHIQUES</u></b>	<b>7</b>
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>10</b>
<b><u>OBJECTIFS/PERSPECTIVES</u></b>	<b>11</b>

## **BIBLIOGRAPHIE**

<b><u>1. Les muqueuses comme voie de vaccination</u></b>	<b>12</b>
1.1. <u>La réponse immunitaire</u>	12
1.2. <u>Le système de protection non spécifique associé aux muqueuses</u>	13
1.3. <u>Le système immunitaire associé aux muqueuses (SIAM)</u>	14
A) <u>Le lymphoépithélium et les cellules M : rôle dans l'induction d'une réponse immune</u>	14
B) <u>Site inducteur d'une réponse immune des SIAM: exemple des PPS dans l'intestin</u>	15
1.4. <u>La vaccination par voie muqueuse</u>	16
<b><u>2. Les nanoparticules synthétiques comme adjuvant pour le développement de vaccins</u></b>	<b>17</b>
2.1. <u>Les adjuvants particuliers</u>	17
2.2. <u>Les polymères biodégradables</u>	18
2.3. <u>L'élaboration des nanoparticules de PLA par nanopréciipitation</u>	18
2.4. <u>La caractérisation des nanoparticules</u>	19
A) <u>Les nanosphères et les nanocapsules</u>	19
B) <u>L'Influence du diamètre des nanoparticules</u>	20
2.5. <u>Les nanoparticules comme adjuvant pour la vaccination</u>	21
<b><u>3. Les connaissances actuelles sur la bio-distribution des NPs</u></b>	<b>23</b>
3.1. <u>Les nanoparticules dans les cellules dendritiques SRDC</u>	23
3.2. <u>Les nanoparticules chez la souris</u>	24
<b><u>4. La protéine Gal4 et le système GAL4/UAS</u></b>	<b>25</b>

<a href="#">4.1. Les caractéristiques structurales de Gal4</a>	25
<a href="#">4.2. La séquence Gal4 minimale</a>	27
<a href="#">4.3. Le développement du système GAL4/UAS</a>	27

**[5. la lignée transgénique UAS/GFP de drosophile melanogaster](#) 29**

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide Désoxyribonucléotide

**AMPc** : Adénosine Monophosphate  
cyclique

**AmpR** : Résistance à l'ampicilline

**APS** : Ammonium Persulfate

**ARN** : Acide Ribonucléique (t pour de  
transfert et m pour messenger)

**BALT**: Bronchus-Associated Lymphoid  
Tissue

**BET**: Bromure d'Ethidium

**BSA**: Sérum d'Albumine Bovin

**CALT**: Conjunctiva-Associated Lymphoid  
Tissue

**CNRS**: Centre National de la recherche  
scientifique

**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène

**CRP** : C-Reactive protein

**DALT**: salivary Duct-associated Lymphoid  
Tissue

**DAPI**: 4',6'-diamidino-2-phénylindole

**DC** : Cellule dendritique

**dNTP** : Désoxyribonucléotide Tri-  
Phosphate

**DO** : Densité optique

**DPI** : Indice de Polydispersion

**DTT** : Dithiothreitol

**EAF** : Epithélium Associé aux Follicules

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine  
Tétracétique

**EGFP**: Enhanced Green Fluorescence  
Protein

**ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent  
Assay

**FITC:** Fluorescein Isothiocyanate  
**FR :** Fédération de recherche

**GALT :** Gut Associated Lymphoid Tissue  
**GentR :** Résistance à la gentamicine  
**GFP:** Green Fluorescent Protein  
**GST:** glutathione-S-transferase

**HIV :** Virus de l'Immunodéficience  
Humaine ou VIH

**IFR:** Institut Fédératif de Recherche  
**IL :** Interleukine  
**IP :** Indice de Polydispersion

**IPTG:** Isopropyl- $\beta$ -D-1-  
Thiogalactopyranoside

**ISCs:** Intestinal Stem Cells

**J (J0, J1....):** jour x de la manipulation

**LALT:** Larynx-Associated Lymphoid  
Tissue

**LB (milieu):** milieu Lysogeny broth  
**LB:** Lymphocyte B

**LDAT:** Lacrima Duct-Associated Lymphoid  
Tissue

**LT:** Lymphocyte T (reg pour régulateur, h  
pour helper)

**MAE:** Methyl-Amino-Ethanol

**MALT:** Mucosa Associated Lymphoid  
Tissue

**MBP:** Maltose Binding Protein

**NALT:** Nasopharynx-Associated Lymphoid  
Tissue

**Nf :** Quantité de protéine fixée  
**Ni-NTA:** nickel- nitriloacetic acid  
**NLS:** Nuclear Localization Signal

**NPs:** Nanoparticules

**NR:** Non retenu

**OCT:** Optical Coherence Tomography

**ORF:** Open Reading Fram

**PA :** Protective Antigen (Anthrax)

**PAMPs :** Pathogen-Associated Molecular  
Patterns

**PAP:** Production et Analyse de Protéine

**PBS:** phosphate buffered saline

**PCR:** polymerase chain reaction

**PFA:** paraformaldéhyde

**PLA:** Poly(Lactic Acid)

**PLGA:** Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)

**PP:** Plaque de Peyers

**PRR:** Pattern Recognition Receptor

**QSP :** Quantité suffisante pour

**RNA:** ribonucleic acid

**RT:** Room temperature

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate  
Polyacrylamide Gel  
Electrophoresis

**SIAM :** Système Immunitaire Associé aux  
Muqueuses

**SIDA :** syndrome de l'immunodéficience  
acquise

**SN :** Surnageant

**SRDCs :** Cellules Dendritiques Spléniques  
de souris

**SVF :** Sérum de Veau Fœtal

**TA % :** Taux d'Adsorption

**TAE:** Tris, Acétate, EDTA

**TAP:** Tandem Affinity Purification

**TE:** Tris, EDTA

**TGF\_:** Transforming Growth Factor beta

**Th1:** réponse immunitaire cellulaire

**Th2:** réponse immunitaire humorale

**TLR:** Toll Like Receptor

**TM:** Melting Temperature

**Tris:** trishydroxyméthylaminométhane

**TS:** Taux solide

**UAS:** Upstream Activating Sequence

**UEA:** Ulex europaeus agglutinin

**WGA:** Wheat Germ Agglutinin (lecti

## INTRODUCTION

Les nanoparticules de PLA (acide poly-lactique) sont des adjuvants nanosphériques permettant le transport vers des cellules cibles de faibles quantités de molécules encapsulées et/ou adsorbées (ADN, protéines, fluorophores...). Ces biopolymères représentent un axe majeur de la médecine du futur. Par exemple, leur utilisation en cancérologie pourrait révolutionner la chimiothérapie dont les effets secondaires sont actuellement très lourds et difficilement supportables, en permettant de diminuer considérablement les doses des médicaments administrés et en ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses.

Une autre application particulièrement prometteuse concerne l'emploi de ces nanoparticules en vaccination (Jiang, Gupta et al. 2005). Les adjuvants particuliers pourraient ainsi être utilisés pour la délivrance de plusieurs antigènes (multi vaccinal) tout en étant produits et purifiés rapidement et à moindre coût. De plus, ils pourraient également limiter le nombre de rappels par rapport à un vaccin classique. Cette approche est très largement étudiée et des résultats encourageants ont déjà démontré que ces transporteurs d'antigènes pouvaient induire une réponse immunitaire significative (Ataman-Onal, Munier et al. 2006).

Le laboratoire CNRS dirigé par le Dr Bernard Verrier (Nanovecteurs biodégradables et ingénierie tissulaire, FRE 3310 Dysfonctionnement de l'Homéostasie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (DyHTIT)) est spécialisé dans la confection de nanoparticules d'acide poly-lactique (polymère biodégradable), ainsi que l'adsorption de protéines ou d'acides nucléiques sur ces nanovecteurs pour le développement de candidats vaccins.

Notre équipe étudie les propriétés vaccinales des nanoparticules (ci après notées NPs) qu'elle synthétise et sur lesquelles sont adsorbés des antigènes (notamment la protéine p24 (HIV) et le Protective Antigen (Anthrax)). La réponse immunitaire est testée chez la souris. Cependant, on ne connaît que très peu leur biodistribution et les mécanismes impliqués dans la prise en charge des particules.

Afin de comprendre le déroulement de la réponse immunitaire induite par les NPs le laboratoire a développé des NPs ayant incorporé différents fluorophores. Il a été vérifié que ces fluorophores ne modifient en rien le comportement et les propriétés physico-chimiques des nanoparticules ainsi que leur capacité d'adsorption de ligands à leur surface. Les NPS synthétisées pour les études vaccinales, au laboratoire sont caractérisées par un diamètre compris de 150 nm à 200 nm. Cette taille est idéale pour la diffusion à travers les muqueuses et la prise en charge par les cellules ; cependant elle reste un inconvénient pour les études de biodistribution. En effet à cette taille, on ne visualise que des amas nanoparticulaires en microscopie à fluorescence.

Pour suivre les nanoparticules dans un tissu ou un organe, il faudrait une fluorescence plus importante dans la cellule qui est en contact avec des NPs voir idéalement une fluorescence de toute la cellule.

Il existe une lignée transgénique de drosophiles exprimant le gène reporter *Aequorea victoria green fluorescent protein* (GFP) sous contrôle du promoteur *Upstream Activating Sequence* (UAS) (Timmons, Becker et al. 1997). Ce promoteur est activé par la protéine Gal4 synthétisée naturellement par la levure *Saccharomyces Cerevisiae* (Elliott and Brand 2008) induisant la production de GFP dans la cellule.

En partant des observations précédentes, nous avons fait l'hypothèse qu'en adsorbant la protéine Gal4 à la surface de nanoparticules de PLA et après administration de ces



formulations PLA/Gal4 à un modèle animal transgénique UAS/GFP, nous observerons des cellules GFP positives suite à l'internalisation des nanoparticules PLA/Gal4 dans les cellules.

## OBJECTIFS

Le but de cette étude est de développer un système d'analyse de la biodistribution de nanoparticules dans un organisme via le système GAL4/UAS. L'originalité de ce programme réside dans le mode d'administration de Gal4 : on utilisera la protéine comme outil et non la séquence nucléique Gal4.

La protéine Gal4 est une protéine codée par 881 acides aminés soit 2643 pb pour une masse moléculaire de 89 kDa. Sa taille n'est pas en soit un problème pour l'adsorption sur les NPs, puisqu'au laboratoire nous avons déjà adsorbé une protéine de 140 kDa (GP140, protéine de l'enveloppe du VIH) ; mais s'avère être un inconvénient lors de l'expression et la purification de la protéine.

Nous allons dans un premier temps, cloner le gène gal4min codant pour la séquence minimale de Gal4 (acides aminés 1-100/840-881) dans des vecteurs Gateway®. La protéine sera alors surexprimée chez *Escherichia coli* (modèle de clonage) et après purification, elle sera adsorbée sur des nanoparticules de PLA fluorescentes ou non.

Nous avons choisi de travailler sur le modèle biologique *Drosophila melanogaster*, avec une lignée transgénique UAS/GFP. Le modèle drosophile ainsi que les expériences associées seront réalisées en collaboration avec l'équipe du professeur Christophe Terzian (Université Lyon I, France).

Les larves de drosophile seront nourries avec des nanoparticules sur lesquelles sera adsorbée la protéine recombinante gal4min. Nous espérons ainsi suivre leur migration au cours du développement de la larve ainsi qu'au stade adulte, en observant la fluorescence liée à la synthèse de GFP. En effet lorsque les nanoparticules seront prises en charge par des cellules, elles devraient relarguer la protéine gal4min qui ira se fixer sur la séquence UAS, activant ainsi l'expression de la GFP qui fera fluorescer la cellule.

Ce projet met en œuvre diverses techniques de biologie moléculaire, de biochimie, de biologie cellulaire et de biologie animale me permettant ainsi d'accéder à une formation très complète. Ce programme de recherches s'intègre dans un projet ANR qui a démarré en janvier 2009, et qui m'a permis de bénéficier d'un environnement scientifique unique au sein du laboratoire d'accueil.

# Analyse Bibliographique

## 1. Les muqueuses comme voie de vaccination

Les muqueuses tapissent l'ensemble des cavités corporelles, elles représentent une surface de contact d'environ 400 m<sup>2</sup> chez l'homme, qui s'ouvre vers l'extérieur (le tube digestif, le système urinaire, le système génital et le système respiratoire) et sont organisées en couches minces monostratifiées ou pluristratifiées. Elles sont constituées de cellules épithéliales et de tissus conjonctifs sous-jacents tels que le lamina propria et la muscularis mucosa (McDonald, Wu et al. 2003).

### 1.1. La réponse immunitaire

Lors de l'entrée d'un agent pathogène dans l'organisme, ce dernier, afin de se protéger met en jeu une réponse immunitaire aboutissant à l'élimination de l'agent infectieux, grâce à un processus complexe reposant sur la discrimination entre « le soi » et « le non-soi ». La réponse immunitaire peut être innée ou adaptative.

#### La réponse immunitaire innée

Cette réponse est mise en place immédiatement face aux signaux de danger (générés par les bactéries, virus et parasites). Il s'agit de la première ligne de défense. Certaines cellules phagocytaires comme les macrophages, capturent et digèrent les bactéries ou autres organismes (phénomène de phagocytose). Pour ce faire la cellule immobilise le pathogène via des récepteurs membranaires puis va l'ingérer dans une vésicule appelée phagosome qui pourra fusionner avec des lysosomes (contenant des enzymes de type lysozyme). Ces enzymes vont alors s'attaquer aux divers constituants de la particule ou du micro-organisme, aboutissant à sa destruction. Les cellules phagocytaires migrent alors à travers le corps ou restent au niveau du site d'infection pour prévenir de nouvelles attaques.

#### La réponse immunitaire adaptative

Les vertébrés disposent également de cellules immunitaires capables d'apprendre et d'améliorer les défenses immunitaires quand ils rencontrent le même pathogène à plusieurs reprises. Cette partie du système immunitaire est appelé « réponse immunitaire adaptative » et fait appel à une «réponse de la mémoire". Cette réponse est mise en place suite à la réponse immunitaire innée via des cellules dites présentatrices d'antigènes (CPA) (Gluckman 2004).

Les cellules dendritiques (DCs) immatures détectent la présence de signaux inflammatoires et de motifs moléculaires microbiens ou « PAMP » (Pathogen Associated Molecular Patterns) via ses récepteurs « PRR » (Pattern Recognition Receptor) comme les « Toll-like receptor ». Cette reconnaissance va induire des signaux de maturation et provoquer une augmentation transitoire de l'activité phagocytaire permettant ainsi d'internaliser par phagocytose ou macropinocytose

le pathogène. Suite à sa destruction certains motifs sont conservés et associés au CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de la cellule dendritique afin d'être présentés aux cellules de l'immunité adaptative tel que les lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB) naïfs. Les différentes sous population de DCs ne portent pas les mêmes récepteurs, ce qui leur permet de réagir à certains types de signaux.

En fonction des signaux perçus, les DCs vont sécréter des cytokines qui orienteront les lymphocytes T vers un profil de différenciation spécifique:

- La réponse Th1 activée par la sécrétion d'IL-12 (interleukine) : les cellules T naïves vont alors se différencier en cellules Th1 productrices d'IFN- $\gamma$  (Gatti, Velleca et al. 2000). Cette maturation est associée à la toxicité et aux réactions inflammatoires locales et joue un rôle primordiale dans la défense contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus, les bactéries et les parasites.
- La réponse Th2 ou réponse à médiation humorale, qui est engagée essentiellement en absence de cytokines de la famille des IL-12. Les lymphocytes Th2 vont alors coopérer avec les lymphocytes B et favoriser leur différenciation en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines (Metzger 2010). Les cellules de types NKT (Natural Killer T, qui sont une sous famille des lymphocytes T) vont également aider à cette différenciation en sécrétant une quantité importante d'IL-4 indispensable à la formation de plasmocytes. Les lymphocytes produisent également, au cours de cette différenciation Th2, de l'IL-13, IL-5, IL-6 et IL-10. Cette réponse repose principalement sur l'activité effectrice des anticorps, sécrétés par des plasmocytes.
- La réponse Treg est activée en présence d'IL-10 et du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor *beta*) (Worthington, Czajkowska et al. 2011). Cette orientation est caractérisée par la maturation des lymphocytes T naïfs en T régulateurs spécifiques d'un antigène qui vont alors développer une activité inhibitrice de la réponse à cet antigène. Cette réponse est essentielle pour le maintien de la tolérance immunitaire périphérique.

La réponse de type Th1 est qualifiée de réponse cellulaire et la réponse de type Th2 de réponse humorale. Il existe également d'autres profils de différenciation des lymphocytes T (Th17, Th9...) initiés par les DC mais qui restent encore à caractériser.

## **1.2. LE Système de protection non spécifique associé aux muqueuses**

Cette exposition directe, et indirecte également, a conduit au développement d'un système immunitaire spécialisé, distinct du système immunitaire systémique (Veazey and Lackner 2003).

Des effecteurs chimiques tel que le glycocalix, mucus, ou le lysozyme, modifient l'intégrité des bactéries et des levures en créant des pores membranaires, ou en inhibant les pathogènes.

A la base des cryptes de l'intestin grêle est localisé un pool de cellules souches protégé par les cellules épithéliales « Paneth cells » qui sécrètent, après interaction des récepteurs de surface PAMPs (pathogen Associated Molecular Patterns)/PRR (Pattern recognition receptor), des peptides et des enzymes antimicrobiens en cas d'infection (Muller, Autenrieth et al. 2005).

Le mucus sécrété en continu constitue une barrière semi-perméable permettant les échanges de nutriments, d'hormones et de gamètes. Il est cependant imperméable aux bactéries et pathogènes qui sont piégés au niveau des fibres de mucine, les rendant ainsi

d'avantage sensibles aux enzymes antibactériens et aux anticorps sécrétés par les cellules sous-épithéliales (Cone 2009).

### **1.3. Le système immunitaire associé aux muqueuses (SIAM)**

Le système immunitaire associé aux muqueuses (SIAM) ou MALT pour Mucosa Associated Lymphoïd Tissue, est localisé le long de la surface des tissus muqueux. Sa fonction principale est de produire et sécréter des immunoglobulines de type A (sIgA sécrétés par les plasmocytes, permettant l'exclusion et l'élimination immunitaire) correspondant à une réponse de type Th2. La réponse Th1 est cependant possible par intermédiaire des cellules T cytotoxiques (Cesta 2006). Le SIAM a été sous-divisé en plusieurs entités :

- \_ GALT (Gut-Associated Lymphoïd Tissue)
- \_ LALT (Larynx-Associated Lymphoïd Tissue)
- \_ DALT (salivary Duct-Associated Lymphoïd Tissue)
- \_ NALT (Nasopharynx-Associated Lymphoïd Tissue)
- \_ BALT (Bronchus-Associated Lymphoïd Tissue)
- \_ CALT (Conjunctiva-Associated Lymphoïd Tissue)
- \_ LDALT (Lacrima Duct-Associated Lymphoïd Tissue)

Ses systèmes immunitaires sont composés d'un site inducteur où la réponse immunitaire est initiée et de sites effecteurs diffus dans la lamina propria (riches en cellules NK-like, macrophages, et lymphocytes B et T) où ont lieu la neutralisation des pathogènes ainsi que la lyse des cellules infectées.

#### **A) Le Lymphoépithélium et les cellules M : rôle dans l'induction d'une réponse immune**

Le lymphoépithélium ou épithélium associé aux follicules (EAF) est essentiellement constitué de cellules M (pour microfold M) en monocouches au-dessus du site inducteur des SIAM. Les cellules M ont une surface apicale caractérisée par la présence de microplis (au lieu de microvilllis) denses comme chez les entérocytes.

Ces cellules sont recouvertes d'un glycocalix plus fin que le reste de l'épithélium, ne présentent pas d'enzymes hydrolytiques membranaires et sont quasi-dépourvues de lysozymes, ce qui permet de faciliter les échanges sans altération (Neutra and Kozlowski 2006). Les cellules M n'ont pas de cytosquelette rigide ce qui favorise la formation d'invaginations de la membrane basale dans lesquelles peuvent s'infiltrer les lymphocytes B ou T, voir même des macrophages (Mantis and Wagner 2004) ; réduisant ainsi la barrière épithéliale à leur niveau. Il a été établi que les macromolécules traversent la muqueuse par transcytose en seulement 10 à 15 minutes. Les bactéries quant à elles, traversent la muqueuse par phagocytose ; les virus et petites bactéries par endocytose voir par pinocytose pour les petites molécules solubles.

## **B) Site inducteur d'une réponse immune des SIAM : exemple des plaques de Peyer dans l'intestin**

Les plaques de Peyers (PPs) sont les sites inducteurs de la réponse immune (GALT) au niveau intestinal. Le dôme sous-épithélial des PPs est riche en cellules présentatrices d'antigènes (CPA) tel que les cellules dendritiques (DCs), attirées par des chemo-attractants sécrétés par les cellules de l'épithélium associées aux follicules (EAF). Certaines migrent jusque dans le lymphoépithélium. Lorsqu'un pathogène a traversé la barrière épithéliale via les cellules M, il est alors capturé par les DCs, provoquant leur maturation et leur migration vers les zones intrafolliculaires. Elles vont alors présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs et sécréter des interleukines Il-10 et Il-6, favorisant une réponse immunitaire du type Th2 (Rimoldi, Chieppa et al. 2005).

Les lymphocytes T sont ainsi activés par l'antigène et vont à leur tour migrer via la lymphe efférente dans la lamina propria jusqu'au site d'entrée du pathogène, pour se différencier en cellules effectrices ou en cellules mémoire (Holmgren and Czerkinsky 2005).

L'interaction entre les cellules B, les antigènes piégés par les cellules dendritiques et les cellules T auxiliaires, au niveau de ces sites inducteurs, permet l'élaboration d'une réponse adaptative efficace.

### **1.4. La vaccination par voie muqueuse**

De nombreux pathogènes dont le VIH ou mycobacterium tuberculosis infectent l'hôte via les muqueuses. Les vaccins disponibles à l'heure actuelle sont administrés par injection parentérale (intraveineuse directe ou indirecte, sous-cutanée, intradermique, intramusculaire) et ne confèrent pas de protection aux portes d'entrée du pathogène. Une vaccination directe au niveau des muqueuses permettrait d'empêcher l'entrée du pathogène, la mise en place d'une réponse immunitaire locale et à distance du site d'infection. Peu de vaccins muqueux sont aujourd'hui commercialisés, ceci étant dû à l'absence d'adjuvants efficaces et sans danger. De plus, les muqueuses présentent un environnement particulier qui facilite la dégradation et limite l'adsorption de l'antigène. Les muqueuses se caractérisent également par un état de non-réponse au niveau des tissus muqueux vis-à-vis de nombreux pathogènes (répression de la réaction immune). Cette tolérance est mise en jeu vis-à-vis de la flore commensale et des antigènes alimentaires solubles (Kraus, Brimnes et al. 2005; Mestecky, Russell et al. 2007). Ces mécanismes restent cependant encore méconnus.

La clé d'un vaccin muqueux efficace consisterait à stimuler correctement le système immunitaire tout en répondant à la majorité, voir idéalement à la totalité, des caractéristiques listées par De Magistris (De Magistris 2006).

## **2. Les nanoparticules synthétiques comme adjuvant pour le développement de vaccins**

### **2.1. Les adjuvants particuliers**

Un adjuvant est une substance administrée en combinaison avec un antigène, qui induit une réponse immunitaire plus importante que lors d'une administration de l'antigène seul (Kenney and Edelman 2003). Actuellement seuls les sels d'Aluminium (autorisés aux États-Unis et en Europe) et le MF59 (autorisé seulement en Europe) sont des adjuvants reconnus pour orienter une réponse immune Th2 conduisant à la production d'anticorps (Guy 2007). On distingue deux classes d'adjuvants : ceux qui protègent et présentent l'antigène (immunité innée) tel que les sels minéraux, les liposomes ou les particules synthétiques et d'autre part ceux qui stimulent et modulent la réponse immune (ligands des LT, cytokines).

## **2.2. Les polymères biodégradables**

Le polymère synthétique PLA (Poly(acide lactique))

Ce polymère est dérivé de l'amidon de plusieurs végétaux (maïs, riz, betterave..). Dans un premier temps, le glucose extrait de ces végétaux va être fermenté pour donner de l'acide lactique. Dans un second temps, les monomères d'acide lactique vont être polymérisés par ouverture de cycle, généralement via des catalyseurs à base d'étain, soupçonnés d'induire une certaine toxicité ; ou via des amorceurs tel que le lactate de zinc qui donne des polymères aux caractéristiques mieux contrôlées (Schwach, Coudane et al. 1998).

Ce polymère est à l'heure actuelle employé en chirurgie réparatrice, notamment pour la confection de vis, de broches, de tendon de remplacement...

Le polymère synthétique PLGA

Comme pour le polymère PLA, le PLGA est dérivé de végétaux ; principalement du maïs et de la canne à sucre dont le glucose extrait donne respectivement de l'acide lactique et de l'acide glycolique. Ces deux réactifs, après co-polymérisation des deux monomères par ouverture de cycle, vont alors donner le polymère PLGA.

## **2.3. L'Elaboration des nanoparticules de PLA par nanoprécipitation :**

Cette technique comporte différents temps (Thevenot 2006; Primard, Rochereau et al. 2010). On commence par dissoudre le PLA dans de l'acétone (1%) au quel on ajoute si besoin un fluorochrome hydrophobe tel que le Bodipy ou la Coumarine à 0,1%. Ces fluorochromes présentent un pic d'excitation et d'émission distinct, ce qui garantit ainsi une fluorescence spécifique.

La solution PLA-(fluorochrome+/-)-acétone est ensuite introduite dans une ampoule de coulée (à débit régulier) au-dessus d'un ballon contenant un mélange eau-éthanol 96% en rotation permanente.

L'étape suivante consiste à évaporer les solvants au bain marie.

Enfin, chaque lot de nanoparticules est caractérisé par son taux solide d'une part, son diamètre moyen des nanoparticules et son indice de polydispersité (IP) d'autre part.

## **2.4. LA Caractérisation des nanoparticules**

### **A) Les nanosphères et les nanocapsules**

Il existe deux catégories de nanoparticules : les nanosphères et les nanocapsules (Vauthier and Bouchemal 2009). Les nanosphères sont composées d'une matrice parfois poreuse contrairement aux nanocapsules qui ont une enveloppe de polymère et un cœur liquide. Ainsi, la substance d'intérêt à délivrer, est soit au centre des nanocapsules, soit adsorbée à la surface des nanosphères, voire sous forme diffuse dans la matrice des nanosphères.

Par mobilité électrophorétique, on a estimé que les NPs de PLA sont chargées négativement à leur surface ( $\approx -40$  mV).

Fortes de ces propriétés, les nanoparticules sont vite devenues le principal candidat pour le développement de vecteurs de vaccination. Des études chez la souris ont montré que ces nanoparticules étaient un des plus puissants adjuvants pour la vectorisation de vaccination par voie muqueuse (O'Hagan, Singh et al. 2006).

### **B) L'Influence du diamètre des nanoparticules**

Les nanoparticules, de taille proche de celle d'un virus (taille généralement inférieure à 250 nm), peuvent atteindre différents tissus en traversant les muqueuses et les capillaires fins (Lai, Wang et al. 2009). Elles sont également internalisées de manière efficace dans les cellules par endocytose (Davda and Labhasetwar 2002; Panyam, Dali et al. 2003; Panyam, Sahoo et al. 2003). Cette capture est dépendante du temps et de la concentration. L'efficacité de capture diminue à forte dose, indiquant que cette voie est saturable. Suite à leur internalisation, les nanoparticules sont transportées vers les endosomes primaires. Une partie est recyclée vers la membrane cellulaire et par la suite relarguée dans le milieu extracellulaire et l'autre partie atteint les endosomes secondaires qui vont fusionner avec les lysosomes (riche en enzymes) et ainsi être digérée.

Des études sur la lignée cellulaire Caco-2 (lignée cellulaire humaine d'origine intestinale) ont montré que des nanoparticules de 100nm de diamètre étaient capturées 2,5 fois plus efficacement que des particules de  $1\mu\text{m}$  de diamètre et six fois plus efficacement que des particules de  $10\mu\text{m}$  (Desai, Labhasetwar et al. 1997). Il a été également démontré qu'elles sont capables d'atteindre les couches sous-muqueuses alors que les microparticules restent bloquées au niveau des cellules épithéliales (Desai, Labhasetwar et al. 1996).

La taille est la principale caractéristique des nanoparticules, notamment en vaccination où ce paramètre conditionne leur prise en charge par le système immunitaire. Les cellules dendritiques (DCs) par exemple ont la capacité de capturer des nanoparticules de taille comprises entre 100nm et 300nm.

## **2.5. Les nanoparticules comme adjuvant pour la vaccination**

La libération progressive de molécules d'intérêt

Les polymères synthétiques tels que le PLA (acide poly-lactique) ou PLGA (poly(acide lactique-co-glycolique)) présentent de nombreux avantages par rapport aux polymères naturels. Ils permettent notamment une libération prolongée de molécules thérapeutiques adsorbées à leur surface (force électrostatique) ou incorporées dans la nanocapsule. Ce phénomène est induit par la biodégradation lente des nanoparticules, ce qui permet d'envisager de diminuer le nombre d'administrations dans le cadre de la vaccination. Une protéine antigène de *Leptospira interrogans* (responsable de maladies infectieuses d'origine bactérienne) appelée Leptospira

immunoglobulin like protein A (LigAvar) a été encapsulée par Faisal et al, dans des particules de PLGA. La réponse immunitaire a été testée chez le hamster. Les résultats sont comparés avec les complexes LigAvar-liposomes (système de délivrance constitué de lipides non viraux, à caractère amphiphile) ou LigAvar-Alum (adjuvant constitué de sels minéraux dont l'utilisation est autorisée en Europe et aux Etats-Unis chez l'Homme).

L'antigène adjuvanté dans les PLGA a été injecté à la semaine 0 et les deux témoins (LigAvar-liposomes ou LigAvar-Alum aux semaines 0 et 3, afin de prouver qu'une administration unique d'adjuvant nanoparticulaire est aussi efficace que deux injections en présence des adjuvants d'Alum ou liposomiaux.

Pour l'adjuvant PLGA, la cinétique de la réponse humorale est similaire aux deux autres adjuvants testés et est, de plus, supérieure à celle induite par l'Alum. Cette expérience a démontré que l'on pouvait ainsi limiter les injections.

Les auteurs ont dans un second temps mis en évidence la libération progressive de l'antigène in vitro à 37°C sous agitation : après 60 jours d'incubation, seulement 35% de l'antigène initialement introduit ont été retrouvés dans le milieu sous forme libre.

Les nanoparticules de PLA, aux vues de l'ensemble de leurs caractéristiques, sont des adjuvants de qualité pour la vaccination. En effet, elles répondent à de nombreux critères établis par De Magistri: elles sont efficaces quel que soit l'antigène, ne présentent aucune toxicité pour la barrière muqueuse, sont biodégradables, faciles et rapides à produire et purifier, et ce, à moindre cout.

induction d'une réponse cellulaire et humorale

Des études ont montré que l'administration de nanoparticules de PLA associées à la protéine p24 du VIH induit une réponse humorale, avec un titre en anticorps élevé (Ataman-Onal, Munier et al. 2006). D'autre part, les auteurs ont noté que les particules PLA-p24 entraînaient une forte réponse CTL, et une réponse Th1 plus importante qu'en présence de l'adjuvant Freund (huile en émulsion dans l'eau), avec une forte production d'IFN et d'IL2. Les nanoparticules de PLA semblent ainsi être un adjuvant intéressant pour le développement de nouveaux vaccins.

La coadsorption de plusieurs antigenes sur les nanoparticules de PLA

Un autre avantage des nanoparticules de PLA est souligné dans les travaux de Lamalle-Bernard et al (Lamalle-Bernard, Munier et al. 2006). Deux protéines du VIH (p24 et gp120) ont été co-adsorbées sur la même particule de PLA. Une analyse comparative du pouvoir immunogène de particules associées aux deux antigènes, et des deux antigènes adsorbés individuellement, montre que les antigènes conservent leur immunogénicité, avec des taux d'anticorps élevés. Ainsi la possibilité de coadsorber différentes molécules augmente le champ d'action de ces particules qui pourront véhiculer des molécules vers des tissus ou cellules cibles grâce à un ligand spécifique d'un type cellulaire donné (Debbage 2009). Les nanoparticules pourraient ainsi être utilisées pour le traitement de cancers ou maladies chroniques avec le majeur avantage de diminuer les quantités de principe actif administrées et donc de réduire les effets secondaires.

Des polymères biodégradables et non toxiques

La non-toxicité de ces deux polymères (PLA et PLGA) a été démontrée à de nombreuses reprises chez l'animal ce qui en fait des matériaux de sutures ou d'implants privilégiés chez l'homme (Hanafusa, Matsusue et al. 1995; Matsusue, Hanafusa et al. 1995).



Le PLA et le PLGA utilisés depuis de nombreuses années pour délivrer des médicaments, sont des polyesters qui sont hydrolysés dans le corps en deux produits bio-compatibles et métabolisables, à savoir l'acide lactique et l'acide glycolique (Moghimi, Hunter et al. 2001; O'Hagan, Singh et al. 2006). Leur utilisation reste cependant limitée car elle nécessite l'usage de solvants organiques et des conditions de formulation drastiques qui peuvent dégrader les molécules d'intérêt thérapeutique.

### **3. les Connaissances actuelles sur la bio-distribution des NPs**

#### **3.1. Les nanoparticules dans les cellules dendritiques SRDC**

Des travaux antérieurs menés dans notre laboratoire par Charlotte Primard (ancienne doctorante) ont porté sur l'étude de l'internalisation de NPs fluorescentes par des cellules dendritiques (lignée SRDC). Ces cellules ont été incubées en présence de protéine p24 de la capsid de VIH adsorbée sur des NPs fluorescentes (PLA Bodipy CellTrace, rouge). Après un immuno-marquage de la protéine p24 (fluorophore FITC, vert) une co-localisation (fluorescence jaune) de la protéine p24 avec les NPs fluorescentes rouges a été observée, pour une courte incubation (20 minutes). Cette expérience a mis en évidence une dissociation du complexe protéines/particule au bout d'une heure montrant ainsi qu'une fois internalisées, les particules et les protéines subissent une prise en charge différente.

#### **3.2. Les nanoparticules chez la souris**

Une étude de biodistribution de Nps fluorescentes chez la souris c57BL/6, in vivo (Primard, Rochereau et al. 2010) a montré qu'après injection de nanoparticules fluorescentes, via la technique de ligated loop intestinale, ces dernières pénètrent rapidement au niveau des plaques de Peyers (après 15 minutes d'incubation) et qu'elles restent par contre bloquées dans la lumière intestinale au niveau des aires de villi.

L'implication des cellules M dans le phénomène de transcytose a également été contrôlée, ex vivo, par un procédé de marquage des lectines. Les NPs coumarine-6 fluorescentes (nanoparticules fluorescentes, vertes) sont localisées au niveau des cellules M et non au niveau des entérocytes et des cellules calciformes.

Des immunomarquages ont également été effectués in vivo sur des cryosections d'intestin révélant une co-localisation des nanoparticules fluorescentes avec les cellules dendritiques et les cellules B.

### **4. La protéine Gal4 et le système GAL4/UAS**

Les protéines Gal, issue de *Saccharomyces cerevisiae*, codent pour des gènes structuraux et des gènes régulateurs qui sont conservés entre la levure et les mammifères. Elles interviennent dans le transport du galactose et son métabolisme par la voie de la glycolyse. Environ 300 sites potentiels Gal4-dépendants ont été à ce jour identifiés dans le génome de la levure. En dehors des régions promotrices, les sites peuvent être trouvés également dans les cadres de lecture ouverts (ORF). L'induction des gènes structuraux Gal est dépendante de la protéine Gal4. Cette protéine entre dans la classe des activateurs/répresseurs, des coactivateurs/corépresseurs et des facteurs généraux de transcription.

Au cours des deux dernières décennies, la protéine Gal4 de levure qui code pour des enzymes permettant de convertir le galactose en glucose, a été utilisée comme modèle pour étudier l'activation de la transcription chez les eucaryotes. Certaines propriétés de régulation de la transcription qui ont été dans un premier temps démontrées pour Gal4, ont été depuis réitérées pour d'autres régulateurs transcriptionnels eucaryotes. Les propriétés de Gal4 ont permis la mise au point de la technologie double-hybride et des systèmes Gal4-inductibles pour l'expression des gènes sous contrôle du promoteur UAS (Upstream Activating Sequence), permettant ainsi d'acquérir de nouvelles connaissances dans le domaine de la transcription.

Les travaux de Ptashne (Ptashne 2002) ont apporté de nombreuses informations concernant la nature de la liaison à l'ADN et sur les domaines d'activation de la transcription à l'origine du recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

#### **4.1. Les caractéristiques structurales de Gal4**

La protéine Gal4 est constituée de 881 acides aminés (89kDa) codant pour plusieurs domaines.

Elle est synthétisée sous forme inactive en raison de la fixation de la protéine répressive Gal80. Cette dernière se fixe sur le domaine d'activation de Gal4 inhibant ainsi la transcription par un changement conformationnel. La répression est levée lors de l'induction de la synthèse de galactose qui induit le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

Le domaine de fixation à l'ADN est codé par les acides aminés 1 à 65 qui forment une structure hélice-boucle-hélice due à la présence de six cystéines (CYS11, CYS14, CYS21, CYS28, CYS31 et CYS38) et de deux ions zinc qui forment deux « doigts zinc ». Ce site reconnaît une région UAS (Upstream Activator Sequence) de 17 paires de bases (5'-CGG-N11-GCC-3') dont l'affinité relative pour Gal4 varie entre les gènes *GAL*, ce qui permet l'activation différentielle (Lohr, Venkov et al. 1995). La protéine se fixe sur le site UAS sous forme dimérique (Marmorstein, Carey et al. 1992).

Les études sur les interactions entre le site de liaison de Gal4 et le site UAS ont permis d'établir que le domaine Zn-Cys est une zone de contact avec les séquences CGG tandis que l'éditeur de liens (entre les acides aminés 40 et 49) et les domaines de dimérisation interagissent avec le squelette phosphate de l'ADN.

Le site de dimérisation (structure leucine zipper), situé entre les acides aminés 65 et 94 code pour la structure secondaire.

Les domaines d'activation (ARI et ARII) sont situés au niveau des acides aminés 148 à 196 et 768 à 884, riches en acide glutamique.

Le site de fixation de la protéine Gal80 est situé au niveau d'un des domaines d'activation (acides aminés 851 à 881).

Il existe également une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) codée par la séquence démarrant à l'acide aminé 46 jusqu'au 74<sup>ème</sup> (Chan, Hubner et al. 1998), ce qui permet l'exportation de la protéine du cytoplasme vers le noyau, nécessaire à sa fonction d'activateur de transcription.

#### **4.2. La séquence gal4 minimale**

Les travaux de Jun Ma et Mark Ptashne (Ma and Ptashne 1987; Ma and Ptashne 1987; Ptashne 2002), ont montré qu'une protéine Gal4 tronquée renfermant le domaine de fixation à l'ADN de Gal4 (acides aminés 1 à 74) et le domaine d'activation (acides aminés 768 à 881) est suffisante pour induire la transcription d'un gène de fusion UAS-LacZ chez des cellules de levures déficientes en Gal4.

Les travaux de Marnie E. Halpern (Halpern, Rhee et al. 2008) ont démontré de même qu'avec une protéine Gal4 tronquée, composée des acides aminés 1 à 147 et 840 à 881, il y a également conservation de la fonctionnalité de la protéine Gal4.

#### **4.3. LE Développement du système GAL4/UAS**

Les propriétés de Gal4 ont permis d'établir un système d'étude de l'expression des gènes et de leurs fonctions associées chez la drosophile. Ce système d'étude, appelé système d'expression GAL4/UAS, a été développé en 1993 par Andrea Brand et Norbert Perrimon.

De nos jours, les généticiens ont créé d'une part des lignées drosophiles GAL4, exprimant de manière localisée la protéine Gal4 (dans les cellules musculaires, au niveau des nerfs...); et d'autre part des lignées, dites reporters, caractérisées par la présence du promoteur UAS en amont d'une séquence codant pour une protéine fluorescente verte tel que la GFP (Green Fluorescent Protein, découverte chez la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*) ou rouge via la RFP (Red Fluorescent Protein).

En application, si on croise une lignée MHC (Myosin Heavy Chain)-Gal4 avec une lignée UAS-GFP, on observera l'expression de la GFP au niveau des muscles de la paroi chez la seconde génération. La myosine est une protéine clé dans les mécanismes de contraction musculaire. Cette lignée MHC-Gal4, UAS-GFP (seconde génération) sert alors de témoin pour l'étude de l'architecture musculaire.

L'implication de la protéine codée par le gène PAX7-FKHR dans la rhabdomyosarcome (tumeur maligne des tissus mous, mis en place à partir de cellules musculaires striées riches en myosine) a été suspectée. Afin de vérifier cette hypothèse, une lignée UAS-GFP, UAS-PAX7-FKHR a été croisée avec la lignée MHC-Gal4. Cette seconde génération permet de cibler le tissu désiré grâce au parent MHC-Gal4 et d'observer les cellules exprimant PAX7-FKHR grâce à la co-expression de la GFP via le système Gal4/UAS. Ainsi, les observations en microscopie à fluorescence ont permis de confirmer que lorsqu'il y a expression du gène PAX7-FKHR dans les cellules musculaires (synthétisant de la myosine) il y a une désorganisation de l'architecture musculaire (Galindo, Allport et al. 2006). Cette expérience a été synthétisée.

Sans les lignées transgéniques, une étude classique aurait nécessité des dissections et/ou cryosections des tissus mous, suivies d'immunomarquages pour identifier les cellules MHC positives, ce qui nécessite plus de temps, de moyens et de matériel. De plus, avec les transgènes UAS-Gal4, l'observation globale est nettement contrastée et peut par la suite être étudiée plus en détail via des cryosections mais sans immun marquage préalable; la localisation se faisant grâce aux cellules GFP positives.

## 5. la lignée transgénique UAS/GFP de drosophile melanogaster

*Drosophila melanogaster* (souvent désignée tout simplement par son genre *Drosophila*) est un insecte diptère (une paire d'aile) de couleur brun jaunâtre, avec des anneaux transversaux noirs au niveau de l'abdomen et aux yeux rouges vifs. Cette espèce présente un dimorphisme sexuel (la femelle mesurant environ 4 mm et le mâle, qui est légèrement plus foncé, environ 3 mm) et l'avantage d'être peu contraignante : elle nécessite principalement du sucre et un environnement humide pour se développer.

La femelle pond en tout environ 500 œufs au cours de sa vie, d'environ 0,5 mm qui donnent au bout de 24h une larve dite de stade 1. Cette larve stade 1 passe en 48h en larve stade 2, puis en larve stade 3 (à 72H). En fin de stade 3, la larve va former une puppe pour subir la dernière métamorphose (5 jours), suite à laquelle l'adulte émerge. La femelle peut s'accoupler dès 8h après son émergence.

Le cycle de vie de cette espèce est d'environ deux semaines à 22°C (comme décrit précédemment) et de vingt jours à 18°C.

La drosophile est le modèle utilisé par excellence pour les expériences génétiques étant donné qu'elle présente 4 paires de chromosomes (3 autosomiques et 1 sexuel) constitués de 165 millions de bases codant pour environ 13 000 gènes. Dès 1987 ont été mis en place des techniques de transformation génétique, comme présenté dans la partie *le développement du système GAL4/UAS*. Son génome a été totalement séquencé entre 1998 et 2000 (Adams, Celniker et al. 2000).

De plus, on sait maintenant que 61% des gènes de maladies humaines connues ont une correspondance avec le génome de la drosophile et que 50% des protéines de cette mouche ont des analogues chez les mammifères (Reiter, Potocki et al. 2001).

La muqueuse intestinale chez la Drosophile

Le système digestif de la drosophile est divisé en sept parties (Apidianakis and Rahme 2011) :

- Une partie faisant office d'œsophage.
- Une seconde partie assimilable chez les mammifères à l'estomac (procédé de digestion).
- L'intestin antérieur où les aliments s'accumulent temporairement (assimilable à l'intestin grêle chez les mammifères).
- L'intestin moyen où se déroule l'adsorption des nutriments.
- A la jonction entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur se trouvent des structures rénales (appelées tube de Malpighi) qui absorbent les solutés, de l'eau ainsi que les déchets de l'hémolymphe environnante pour les recycler en composés solides azotés. Ces déchets sont alors rejetés dans l'intestin postérieur.
- L'intestin postérieur qui va permettre l'échange de molécules d'eau et d'électrolytes.
- Enfin, le rectum et l'anus marquent la fin du système digestif.

L'intestin moyen (site de la réponse immunitaire chez la drosophile) est constitué, tout comme chez les mammifères d'une monocouche de cellules épithéliales : les entérocytes y sont les cellules majoritaires. Contrairement aux mammifères, il n'y a pas de villosités probablement en raison de sa faible taille ; cette caractéristique implique une dispersion homogène des cellules le long de l'intestin.

Au niveau de la muqueuse intestinale, toutes les cellules sont issues de la différenciation de cellules souches intestinales (ISCs). Ces cellules souches se différencient dans un premier

temps en entéroblastes qui vont à leur tour se différencier soit en cellules entero-endocrines (sécrétrices de peptides anti-microbiens) soit en entérocytes (adsorbant les nutriments).

## Références Bibliographiques

- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-95.
- Apidianakis, Y. and L. G. Rahme (2011). "*Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology." Dis Model Mech **4**(1): 21-30.
- Ataman-Onal, Y., S. Munier, et al. (2006). "Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models." J Control Release **112**(2): 175-85.
- Cesta, M. F. (2006). "Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue." Toxicol Pathol **34**(5): 599-608.
- Chan, C. K., S. Hubner, et al. (1998). "Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery." Gene Ther **5**(9): 1204-12.
- Cone, R. A. (2009). "Barrier properties of mucus." Adv Drug Deliv Rev **61**(2): 75-85.
- Davda, J. and V. Labhasetwar (2002). "Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells." Int J Pharm **233**(1-2): 51-9.
- De Magistris, M. T. (2006). "Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics." Adv Drug Deliv Rev **58**(1): 52-67.
- Debbage, P. (2009). "Targeted drugs and nanomedicine: present and future." Curr Pharm Des **15**(2): 153-72.
- Desai, M. P., V. Labhasetwar, et al. (1996). "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size." Pharm Res **13**(12): 1838-45.
- Desai, M. P., V. Labhasetwar, et al. (1997). "The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent." Pharm Res **14**(11): 1568-73.
- Elliott, D. A. and A. H. Brand (2008). "The GAL4 system : a versatile system for the expression of genes." Methods Mol Biol **420**: 79-95.
- Galindo, R. L., J. A. Allport, et al. (2006). "A *Drosophila* model of the rhabdomyosarcoma initiator PAX7-FKHR." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(36): 13439-44.
- Gatti, E., M. A. Velleca, et al. (2000). "Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized CD34+ progenitors." J Immunol **164**(7): 3600-7.
- Gluckman, J. C. (2004). Les cellules présentatrices de l'antigène.
- Guy, B. (2007). "The perfect mix: recent progress in adjuvant research." Nat Rev Microbiol **5**(7): 505-17.
- Halpern, M. E., J. Rhee, et al. (2008). "Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish." Zebrafish **5**(2): 97-110.
- Hanafusa, S., Y. Matsusue, et al. (1995). "Biodegradable plate fixation of rabbit femoral shaft osteotomies. A comparative study." Clin Orthop Relat Res(315): 262-71.
- Holmgren, J. and C. Czerkinsky (2005). "Mucosal immunity and vaccines." Nat Med **11**(4 Suppl): S45-53.
- Jiang, W., R. K. Gupta, et al. (2005). "Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens." Adv Drug Deliv Rev **57**(3): 391-410.
- Kenney, R. T. and R. Edelman (2003). "Survey of human-use adjuvants." Expert Rev Vaccines **2**(2): 167-88.
- Kraus, T. A., J. Brimnes, et al. (2005). "Induction of mucosal tolerance in Peyer's patch-

deficient, ligated small bowel loops." J Clin Invest **115**(8): 2234-43.

Lai, S. K., Y. Y. Wang, et al. (2009). "Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues." Adv Drug Deliv Rev **61**(2): 158-71.

Lamalle-Bernard, D., S. Munier, et al. (2006). "Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity." J Control Release **115**(1): 57-67.

Lohr, D., P. Venkov, et al. (1995). "Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network." Faseb J **9**(9): 777-87.

Ma, J. and M. Ptashne (1987). "The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80." Cell **50**(1): 137-42.

Ma, J. and M. Ptashne (1987). "Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments." Cell **48**(5): 847-53.

Mantis, N. J. and J. Wagner (2004). "Analysis of adhesion molecules involved in leukocyte homing into the basolateral pockets of mouse Peyer's patch M cells." J Drug Target **12**(2): 79-87.

Marmorstein, R., M. Carey, et al. (1992). "DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex." Nature **356**(6368): 408-14.

Matsusue, Y., S. Hanafusa, et al. (1995). "Tissue reaction of bioabsorbable ultra high strength poly (L-lactide) rod. A long-term study in rabbits." Clin Orthop Relat Res(317): 246-53.

McDonald, D., L. Wu, et al. (2003). "Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions." Science **300**(5623): 1295-7.

Mestecky, J., M. W. Russell, et al. (2007). "Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier?" J Immunol **179**(9): 5633-8.

Metzger, D. W. (2010). "Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses." Cytokine **52**(1-2): 102-7.

Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." Pharmacol Rev **53**(2): 283-318.

Muller, C. A., I. B. Autenrieth, et al. (2005). "Innate defenses of the intestinal epithelial barrier." Cell Mol Life Sci **62**(12): 1297-307.

Neutra, M. R. and P. A. Kozlowski (2006). "Mucosal vaccines: the promise and the challenge." Nat Rev Immunol **6**(2): 148-58.

O'Hagan, D. T., M. Singh, et al. (2006). "Microparticle-based technologies for vaccines." Methods **40**(1): 10-9.

Panyam, J., M. M. Dali, et al. (2003). "Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles." J Control Release **92**(1-2): 173-87.

Panyam, J., S. K. Sahoo, et al. (2003). "Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles." Int J Pharm **262**(1-2): 1-11.

Primard, C., N. Rochereau, et al. (2010). "Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells." Biomaterials **31**(23): 6060-8.

Ptashne, M. a. A. G. (2002). "Genes and Signals." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Reiter, L. T., L. Potocki, et al. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster." Genome Res **11**(6): 1114-25.

Rimoldi, M., M. Chieppa, et al. (2005). "Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells." Nat Immunol **6**(5): 507-14.

Schwach, G., J. Coudane, et al. (1998). "Ring opening polymerization of D,L-lactide in the presence of zinc metal and zinc lactate." Polymer international.

Thevenot, J. (2006). Conception de lipoparticules biocompatibles et étude de leurs interactions avec différentes molécules biologiques. Thèse de Doctorat Université Claude Bernard-Lyon 1.

Timmons, L., J. Becker, et al. (1997). "Green fluorescent protein/beta-galactosidase double reporters for visualizing Drosophila gene expression patterns." Dev Genet **20**(4): 338-47.

Vauthier, C. and K. Bouchemal (2009). "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles." Pharm Res **26**(5): 1025-58.

Veazey, R. and A. Lackner (2003). "The mucosal immune system and HIV-1 infection." AIDS Rev **5**(4): 245-52.

Worthington, J. J., B. I. Czajkowska, et al. (2011). "Intestinal Dendritic Cells Activate Transforming Growth Factor-beta and Induce Foxp3+ T Regulatory Cells via Integrin alphavbeta8." Gastroenterology.



# ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

## CONCEPTION ET EVALUATION DE NANOPARTICULES BIODEGRADABLES POUR LE TRANSPORT DE MOLECULES ACTIVES *LEGAZ Sophie*

### RÉSUMÉ

Les nanoparticules biorésorbables sont des candidats prometteurs pour la nanomédecine et en particulier la vaccination, de par leur taille proche de celle d'un virus et leur nature biodégradable. Si on adsorbe à la surface des NPs un antigène, les cellules de l'immunité vont prendre en charge les particules formulées et vont pouvoir initier une réponse immunitaire.

Notre équipe travaille sur l'élaboration de candidats vaccins particuliers, utilisant comme adjuvant des nanoparticules d'acide poly-lactique.

Les premières études de biodistribution ont montré que les cellules M, situées au niveau des plaques de Peyer (chez la souris), permettent le passage des nanoparticules de la lumière intestinale à la muqueuse intestinale. Nous souhaitons élargir cette étude en analysant leur distribution dans le reste de l'organisme afin de mieux comprendre leur prise en charge et tenter de l'améliorer à l'aide de molécules immunostimulatrices appropriées.

Cette étude repose sur les propriétés du système GAL4/UAS qui se traduit par l'expression de la protéine fluorescente GFP lorsque la protéine Gal4 se fixe sur le promoteur UAS. La protéine Gal4 a été réduite au maximum afin d'éliminer toute association et réaction aspécifique. Ainsi la protéine gal4min a été produite chez la bactérie BL21 (De3). Après validation de la construction et de la fonctionnalité de la protéine recombinante, celle-ci a été adsorbée sur des nanoparticules fluorescentes (Fluorophore Bodipy CellTrace). Des larves UAS-GFP, au stade 1 ont été nourries avec ces formulations PLA-gal4min. Au Stade 3, il est possible de visualiser des cellules GFP positives au niveau de la muqueuse intestinale. Ces observations valident ainsi le concept selon lequel les NPs PLA-gal4min pourraient permettre de suivre la biodistribution des NPs chez la Drosophile. Ce concept pouvant par la suite être étendu à d'autres modèles.

**MOTS-CLÉS :** Nanoparticules – protéine Gal4 – Upstream Activating Sequence (UAS) – Biodistribution. Muqueuse intestinale – Drosophile.