Année 2012

Thèse n°2004

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 Décembre 2012

Par Karine PINEL

Née le 27 avril 1984 à Vichy

Imagerie *in vivo* du contrôle de l'inhibition génique et de l'électroporation d'ARN

Membres du Jury

M. Jean-Jacques TOULME, *Directeur de Recherche INSERM, Bordeaux*……..Président
M. Alain LEPAPE, *Directeur de Recherche CNRS, Tours*……Rapporteur
M. Bernard MARI, *Directeur de Recherche CNRS, Nice*……..Rapporteur
M. Jean-Michel FRANCONI, *PU Université Bordeaux Segalen, Bordeaux*…….Invité
M. Franck COUILLAUD, *Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux*……..Directeur de thèse

Remerciements

Ce vendredi 21 décembre 2012, j'ai eu la sensation d'une fin de représentation théâtrale (en 3 actes ou en 3 ans) pendant laquelle on aurait vu le rappel des acteurs sur scène en fin de spectacle afin de les remercier, et ces acteurs c'étaient vous tous…

Permettez-moi tout d'abord d'exprimer toute ma reconnaissance envers les membres du jury de ma soutenance. Je remercie Monsieur Jean-Jacques TOULME d'avoir présidé ce jury, messieurs Alain LEPAPE et Bernard MARI pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et pour leurs conseils précieux et constructifs et Monsieur Jean-Michel FRANCONI pour son regard sur mes travaux. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour le soin que vous avez apporté à l'examen de ce travail et pour la discussion enrichissante que nous avons partagée le jour de ma soutenance.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à Monsieur Franck COUILLAUD, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée dès le début, sa grande disponibilité et son soutien tout au long de ces trois années, notamment dans les moments de doutes. Je le remercie également pour ses qualités humaines, sa patience et la grande liberté qu'il m'a octroyée.

Je suis profondément reconnaissante envers Christelle DEBEISSAT, initiatrice de ce projet. Merci Christelle de m'avoir donné toutes les clefs en mains avant ton départ pour que je puisse mener à bien la suite du projet. Ces quelques mois d'apprentissage m'ont beaucoup apporté et en particulier lors des études sur les souris. Difficile de commencer un projet de 3 ans sur l'animal quand on n'a eu aucun contact au préalable ! Mais tout est devenu vite facile et plaisant.

C'est à Coralie GENEVOIS que je souhaite ensuite adresser un grand merci. Ma Coco, merci pour ton aide précieuse au quotidien durant ces 3 années et en particulier pour les manips de la fin de thèse… Merci pour ta rigueur scientifique et pour l'intérêt que tu as porté à mon projet. Enfin, Coco, merci pour ta sympathie, nos discussions et ton soutien (oulala oui merci !!!).

Je n'oublie pas Pierre-Yves FORTIN pour son aide efficace face aux soucis techniques. Par exemple avec notre très chère caméra qui tombe en panne quelques fois, on ne sait pourquoi… Tu vois Pierre-Yves cette fois-ci tu as droit à des mercis, mais toujours pas pour le surnom pourri (c'est peu de le dire… !) qui m'a suivi tout au long de ma thèse mais qui somme toute reste taquin et gentil, hein Piedpied …! Merci aussi pour ton humour, nos fous rires, tes eh pense… et tes fameux petits bruits qui probablement me feront trouver tous les bureaux du monde bien calmes…

Donc merci à toute l'équipe, Franck, Coralie et Pierre-Yves pour votre bonne humeur, pour nos pauses café animées de grandes discussions. Malgré notre isolement au 3B 3ème étage, je ne pouvais venir qu'avec le sourire tous les matins !

Je tiens également à remercier l'ensemble des stagiaires qui ont fait partie de notre équipe. Merci donc à Dimitri ROOSE, Marion GRITON, Mathilde CHAPOLARD et Xavier HOARAU pour leur gaité et leur gentillesse. Avec une pensée toute particulière pour Hélène DUCHEMIN, ma petite protégée, pour son assiduité et son envie d'apprendre. Merci Hélène, ce fut un plaisir et un enrichissement de travailler avec toi.

J'ai débuté cette thèse dans le laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle dirigé par Monsieur Chrit MOONEN. J'adresse ici tous mes sincères remerciements à toutes les personnes qui constituaient ce laboratoire, et en particulier à Anna, Bruno, Cyril, Delphine, Marc, Marie-France, Mathilde, Matthieu, Pierre, Seb, Silke et Yasmina. J'ai apprécié tous les bons moments passés avec chacun d'entre vous quand je venais « en bas » pour faire mes images. Je garderai en tête les points de vue très enrichissants de physicien de Matthieu lors de nos réunions de biologistes. Et je ne peux pas oublier tous les bons souvenirs lors de nos sorties, à la Dune du Pyla, au laser quest, au bowling… L'organisation « PYFROU » c'est du costaud !

J'ai poursuivi ensuite ma thèse au centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques dirigé par Jean-Michel FRANCONI. Merci à tous les membres du laboratoire pour leur accueil et leur gentillesse. A very special thanks to Jan-Pieter KONSMAN, pour son aide pour l'histologie mais aussi et surtout pour ses conseils et ses entrainements pour perfectionner « my english » ! Merci également à Damien MONCELET, pour sa disponibilité lors de mes manips de cytométrie.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés grâce à des collaborations précieuses. Je pense notamment à Muriel GOLZIO et son équipe qui nous ont beaucoup apportés pour l'élaboration de l'électroration *in vivo*, et avec qui nous avons partagés de bons moments lors des congrès et de notre venue à Toulouse. Je remercie également Michel VENTURA pour ses idées et aides précieuses dans notre étude *in vivo* de l'électroporation d'ARN.

Ce travail, mené *in vivo*, chez la souris, n'aurait pas été possible sans les services des animaleries de Bordeaux 2 et au personnel des animaleries Conventionnelle et Transgénique. J'exprime toute ma gratitude à Pierre COSTET pour sa grande disponibilité et son efficacité.

Et puis la thèse c'est la continuité d'un enseignement et d'un apprentissage scientifique. C'est pourquoi je suis profondément reconnaissante envers mes enseignants de lycée et de fac en Auvergne, qui chacun à leur manière m'ont aidé et apporté quelques clefs utiles dans mon parcours. Je pense notamment à Mme. DUBOST qui m'a donné le goût de l'étude de la génétique. Je voudrai également exprimer toute ma gratitude envers deux personnes qui m'ont enseigné l'aspect pratique de la recherche avant mon entrée en thèse. C'est tout d'abord à Frédéric CHIBON que j'adresse un grand merci, pour m'avoir enseigné la rigueur lors de mon stage de master 1 et pour m'avoir aidé à organiser mes idées dans une démarche scientifique. Merci ensuite à Michel VENTURA, mon maître de stage de master 2, pour m'avoir fait partager son imagination débordante et l'amour de la science. Merci pour son soutien et sa gentillesse à toute épreuve ! Merci aussi à Thérèse de l'équipe VHC mais aussi à Juliette qui a été pour moi une véritable grande sœur.

J’ai eu l’occasion de pouvoir vivre l’expérience de l’enseignement à mon tour. C’est dans le cadre du monitorat que j’ai pu apprendre à enseigner la génétique à des étudiants de Licence. Ce fut une expérience plaisante et enrichissante dans laquelle je me suis épanouie ces 3 ans. Merci pour le soutien et les nombreux conseils que j’ai reçus de la part de l’équipe pédagogique notamment Anne, Benoît, Colette, Corinne, Didier, Francis, François, Frédérique et Marc.

Je terminerai par remercier toutes les personnes qui font partie de ma vie et qui ont été toujours pleines d’encouragements à mon égard. Je pense en particulier à ma famille, la famille de Florian, mais aussi à mes amis, de Vichy et ses alentours, de Lussat et de Bordeaux.

Ma reconnaissance va évidement envers mes parents et ma sœur qui m’ont été d’un immense soutien. Les mots me manquent pour leur exprimer toute ma gratitude. Dévoiler le fruit de son travail devant les personnes que l’on aime ne s’est pas fait sans une certaine émotion. Peut-être est-ce parce que mes parents ont toujours eu de la bienveillance envers mes choix et mes projets et qu’ils m’ont donné l’opportunité de les accomplir. Je nourris l’espoir d’avoir été à la hauteur de leur confiance inconditionnelle. Je les remercie pour tout ce qu’ils m’ont transmis. Papa, maman, Fanny, merci pour l’affection et les encouragements que vous m’avez témoignés, ils m’ont sans nul doute permis de vivre cette expérience qu’est la thèse de la meilleure manière qui soit !

Mes derniers remerciements et non les moindres, s’adressent à Florian. Merci chéri d’avoir été l’épaule dont j’avais besoin tout en gardant ton regard critique et constructif sur mes travaux, j’ai eu beaucoup de chance d’avoir un biochimiste tel que toi à la maison ! Mon parcours aurait surement été bien différent si je ne t’avais pas rencontré. Ces années de thèse ont été un régal à partager avec toi, se comprendre en tant que thésards et partager la joie de la manip qui marche enfin !!! Je ne me lasserai jamais de t’entendre me dire : « trop beau mon blot ! »… Merci aussi pour ta foi en moi. Aujourd’hui, même si notre thèse n’est que le début d’un long parcours, j’aperçois la route d’un bel avenir à tes côtés…

Préambule

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été financés par une allocation du Ministère de la Recherche et de la Technologie (sujet prioritaire, appel d'offre national 2009).

Le travail a débuté en octobre 2009 dans le laboratoire IMF (Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle, UMR 5231 – CNRS, Université Bordeaux Segalen ; directeur : M. Chrit Moonen) et a été poursuivi en janvier 2011 au sein du laboratoire RMSB (Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536 – CNRS, Université Bordeaux Segalen ; directeur : M. Jean-Michel Franconi) sous la direction de M. Franck Couillaud.

Sommaire

1. INTRODUCTION 14

1.1. LA THERAPIE GENIQUE 14

1.1.1. Généralités 14

1.1.2. Les verrous techniques 16

1.2. UNE STRATEGIE ANTISENS OU CIBLAGE DE L'ARNM 19

1.2.1. L'ARNm : structures et fonctions 19

1.2.2. Une stratégie antisens (ou ciblage de l'ARNm) 20

1.2.3. Les microARN : acteurs pour une thérapie génique 24

1.2.3.1. Caractéristiques et fonctions 24

1.2.3.2. Mode d'action 24

1.2.3.3. Potentiel thérapeutique 30

1.3. CONTROLE DE L'EXPRESSION D'UN TRANSGENE 32

1.3.1. Utilisation de promoteurs inductibles 32

1.3.2. Un système thermo-inductible 33

1.3.2.1. La réponse au choc thermique 33

1.3.2.2. Le promoteur Hsp70B 36

1.3.2.2.1. Description 36

1.3.2.2.2. Activation contrôlée dans le temps et dans l'espace 36

1.4. L'ELECTROPORATION : UNE METHODE D'ADRESSAGE EFFICACE *IN VIVO* 38

1.4.1. Généralités 38

1.4.2. Principe de l'électroporation 39

1.4.3. Applications 42

1.5. SUIVI DE L'EXPRESSION D'UN TRANSGENE PAR IMAGERIE OPTIQUE *IN VIVO* 44

1.5.1. L'imagerie moléculaire 44

1.5.2. L'imagerie optique des gènes rapporteurs 48

1.5.2.1. Définition 48

1.5.2.2. Fluorescence 48

1.5.2.2.1. Principe 48

1.5.2.2.2. Les protéines fluorescentes 51

1.5.2.3. Bioluminescence 52

1.5.2.3.1. Principe 52

1.5.2.3.2. Les luciférases 53

1.5.2.4. Applications 56

2. OBJECTIFS DU PROJET DE THESE 57

3. MATERIELS ET METHODES 58

3.1. MATERIEL BIOLOGIQUE 58

3.1.1. Plasmides 58

3.1.2. Bactéries 59

3.1.3. Cellules eucaryotes 59

3.1.3.1. Lignée U87 MG 59

3.1.3.2. Lignée U87 FRT-7 59

3.1.3.3. Lignées U87 FRT-7 modifiées 61

3.1.4. Animaux 62

3.1.4.1. Souris C57BL/6 62

3.1.4.2. Souris NOG 62

3.1.4.3. Souris NLF1 62

3.2. METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET BIOCHIMIE 63

3.2.1. Bactériologie *63*
3.2.1.1. Milieux 63
3.2.1.2. Culture bactérienne 63
3.2.1.3. Transformation bactérienne 63
3.2.1.3.1. Transformation par électroporation 63
3.2.1.3.2. Transformation par choc thermique 64
3.2.2. Culture de cellules eucaryotes *65*
3.2.2.1. Tampons, milieux et réactifs 65
3.2.2.2. Entretien des lignées 65
3.2.2.3. Dénombrement 66
3.2.2.4. Transfection transitoire 66
3.2.2.5. Transfection stable 66
3.2.2.5.1. Transfection stable par recombinaison au site FRT 66
3.2.2.5.2. Transfection stable aléatoire 67
3.2.2.6. Chauffage des cellules en culture 67
3.2.2.7. Dosage *in vitro* de l'activité des luciférases 67
3.2.2.8. Microscopie à fluorescence 68
3.2.2.9. Cytométrie de flux 68
3.3. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 69
3.3.1. Tampons et milieux *69*
3.3.2. Extraction d'ADN plasmidique *69*
3.3.3. Dosage des acides nucléiques par spectrofluorimétrie *70*
3.3.4. Précipitation et purification d'ADN *70*
3.3.5. Extraction des ARN totaux *70*
3.3.6. Traitement des ARN à la DNase I *71*
3.3.7. Réverse-transcription *71*
3.3.8. Amplification d'ADN par PCR *71*
3.3.9. PCR quantitative *72*
3.3.10. Electrophorèse sur gel d'agarose *73*
3.3.11. Synthèse d'ARN *74*
3.3.11.1. Les ARN 5UTR-LucF-3UTR 74
3.3.11.1.1. Obtention des produits PCR, vérification et purification 74
3.3.11.1.2. Précipitation des ADN 74
3.3.11.1.3. Transcription *in vitro* 75
3.3.11.1.4. Précipitation des ARN 75
3.3.11.2. Les ARN 5UTR-LucF-polyA et cap-LucF-polyA 75
3.3.11.3. Analyse de la pureté des ARN 75
3.3.12. Clonage *76*
3.3.12.1. Restriction enzymatique 76
3.3.12.2. Déphosphorylation 76
3.3.12.3. Purification d'ADN à partir d'un milieu de réaction de PCR ou d'un gel d'agarose 76
3.3.12.4. Quantification de l'ADN sur gel d'agarose 77
3.3.12.5. Ligation 77
3.3.12.6. Séquençage 77
3.4. METHODES D'EXPERIMENTATION ANIMALE 78
3.4.1. Animaleries *78*
3.4.2. Anesthésie *78*
3.4.3. Rasage *78*
3.4.4. Xénogreffes sous-cutanées *78*
3.4.5. Mesure du volume tumoral au pied à coulisse *79*
3.4.6. Chauffage par immersion au bain-marie *79*
3.4.7. Electroporation in vivo *80*
3.4.7.1. Appareillage 80
3.4.7.2. Protocole des différents types d'électroporation 81
3.4.8. Imagerie *82*
3.4.8.1. Appareillage 82

3.4.8.2. Imagerie de bioluminescence (BLI) 83
3.4.8.2.1. BLI de la Luciférase Firefly 83
3.4.8.2.2. BLI de la Luciférase *Renilla* 83
3.4.8.3. Imagerie de fluorescence par réflexion (FRI) 83
3.4.9. Euthanasie 84

4. RESULTATS 85

4.1. ETUDE DE L'INHIBITION D'UN MIARN SYNTHETIQUE SUR L'EXPRESSION DU GENE CIBLE *IN VITRO* 85
4.1.1. Choix des miARN et de la stratégie 85
4.1.2. Effet du miRLuc sur l'activité de la LucR in vitro 88
4.1.3. Action inhibitrice du miRLuc in vitro en fonction du niveau d'expression de la cible 89
4.1.4. Activités des promoteurs CMV et EFIα in vivo. 91
4.1.5. Action inhibitrice du miRLuc dans une lignée stable 93
4.1.6. Effet du miRLuc après électroporation intra-tumorale in vivo 95
4.2. INDUCTION DE L'INHIBITION DE L'EXPRESSION D'UN GENE D'IMAGERIE PAR ACTIVATION D'UN PROMOTEUR THERMO-INDUCTIBLE 98
4.2.1. Caractérisation du promoteur Hsp70B 98
4.2.2. Obtention de lignées U87 exprimant le miRLuc sous le contrôle du promoteur Hsp70B 99
4.2.3. Visualisation de l'expression constitutive de la LucR in vivo 101
4.2.4. Expression de la LucR après activation d'Hsp70B 103
4.2.5. Caractérisation in vitro de l'inhibition par le miRLuc sous le contrôle du promoteur Hsp70B 105
4.2.6. Inhibition de l'expression d'un gène d'imagerie in vivo 106
4.3. OPTIMISATION DU SYSTEME D'INDUCTION DE L'INHIBITION GENIQUE 114
4.3.1. Effet de l'ajout d'une cible du miRLuc supplémentaire en 3'UTR de l'ARNm cible 114
4.3.1.1. Insertion d'une cible du miRLuc supplémentaire dans le 3'UTR de l'ARNm de la LucF 114
4.3.1.2. Effet du nombre de cibles sur l'efficacité d'inhibition par le miRLuc placé sous le contrôle du promoteur CMV 116
4.3.1.3. Effet du nombre de cibles sur l'efficacité d'inhibition par le miRLuc placé sous le contrôle du promoteur Hsp70B 118
4.3.2. Modification de la durée d'activation du promoteur Hsp70B 120
4.3.2.1. Stress cellulaire visualisé par l'activation de la voie endogène des protéines chaperons HSP70 121
4.3.2.2. Cinétique d'expression de la LucR sous le contrôle du promoteur Hsp70B 123
4.3.2.3. Expression de l'EmGFP 124
4.3.2.3.1. Mesure en cytométrie de flux 124
4.3.2.3.2. Visualisation par microscopie de fluorescence 128
4.3.2.4. Visualisation de l'inhibition induite par le miRLuc après modulation de l'activation du promoteur thermo-inductible 129
4.3.2.5. Suivi de l'ARNm cible de la LucF 130
4.4. ETUDE DE FAISABILITE D'UTILISATION DE L'ELECTROPORATION *IN VIVO* COMME METHODE DE TRANSFERT 132
4.4.1. L'électroporation et le promoteur Hsp70B sont-ils compatibles ? 132
4.4.2. Suivi de l'électroporation par imagerie de fluorescence par réflexion 133
4.4.3. Etude d'une application en position orthotopique 135
4.5. IMAGERIE DE L'ELECTROPORATION D'ARN *IN VIVO* 137

5. CONCLUSIONS ET DISCUSSION 145

Liste des figures

Figure 1 *: Cibles cliniques de la thérapie génique* 15
Figure 2 *: Les étapes de la traduction* 19
Figure 3 *: Stratégies antisens* 21
Figure 4 *: L'ARNi, un processus multi-étapes* 23
Figure 5 *: Biogénèse des miARN* 26
Figure 6 *: Principales interactions entre un miARN et son ARNm cible* 27
Figure 7 *: Complexes miRISC et mécanismes d'action* 28
Figure 8 *: Mécanismes possibles de la répression traductionnelle par le complexe miRISC (ou miRNP)* 28
Figure 9 *: Régulation de la réponse au choc thermique* 35
Figure 10 *: L'électroporation d'ADN : un processus multi-étapes* 40
Figure 11 *: Effet de l'application d'un champ électrique sur cellule vivante* 41
Figure 12 *: Intégrité de la membrane d'une cellule vivante après l'application d'un champ électrique et asymétrie de la variation du potentiel transmembranaire* 41
Figure 13 *: Diagramme de Jablonski* 49
Figure 14 *: Principe de la FRI in vivo* 50
Figure 15 *: Principe de la BLI in vivo* 52
Figure 16 *: Réaction enzymatique de la luciférase Firefly (LucF)* 55
Figure 17 *: Réaction enzymatique de la Luciférase Renilla (LucR)* 55
Figure 18 *: Système Flp-In (Invitrogen) permettant la recombinaison homologue* 60
Figure 19 *: Spectre d'excitation et d'émission de l'EmGFP et caractéristiques des filtres utilisés* 68
Figure 20 *: Dispositif expérimental pour le chauffage au bain-marie des pattes de souris* ... 79
Figure 21 *: Représentation schématique de la forme d'onde des impulsions délivrées par l'électroporateur Electro Cell S20 (BETA tech)* 80
Figure 22 *: Electroporation in vivo* 81
Figure 23 *: Système pour l'imagerie optique NightOWL II LB 983 (Berthold Technologies)* 83
Figure 24 *: Schématisation du système BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector* ... 86
Figure 25 *: Début de la séquence codante pour la LucF et site d'hybridation du miRLuc mature* 87
Figure 26 *: Effet du miRLuc sur l'activité de la LucR* 88
Figure 27 *: Schématisation du protocole d'évaluation de l'effet inhibiteur du miRLuc sur l'activité de la LucF par triple transfection* 90
Figure 28 *: Inhibition de l'activité de la LucF par le miRLuc par triples transfections transitoires* 90
Figure 29 *: Cinétique de l'activité de la LucF après administration du substrat luciférine in vivo* 92
Figure 30 *: Expression de la LucF après électroporation en intra-dermique in vivo* 93
Figure 31 *: Représentation schématique de l'inhibition par transfection transitoire du plasmide pCMV-miRLuc dans la cellule U87 qui exprime de façon constitutive la LucF* 94
Figure 32 *: Efficacité de l'inhibition par le miRLuc dans la lignée U87 CMV-LucF/CMV-LucR* 95
Figure 33 *: Suivi par BLI de l'effet de l'EP du miRLuc dans des tumeurs U87 exprimant la LucF* 96
Figure 34 *: Suivi du volume des tumeurs des pattes droites des souris 1 et 2 avant et après EP* 97
Figure 35 *: Activation du promoteur Hsp70B à différentes températures* 99
Figure 36 *: Cinétique de l'activité de la LucF* 101
Figure 37 *: Cinétique de détection de l'activité de la LucR par BLI après injection du ViviRen* 102

Figure 38 *: Activité de la LucR après activation thermique (8 min ; 45°C)* 103
Figure 39 *: Détection de l'activité de la LucR après activation du promoteur Hsp70B*..... 104
Figure 40 *: Cinétique d'inhibition de l'activité de la LucF par le miRLuc*..... 105
Figure 41 *: Cinétique d'expression de la LucF présentant une inhibition par le miRLuc 24h après hyperthermie (souris 2011-001)*..... 109
Figure 42 *: Cinétique d'expression de la LucF présentant une inhibition par le miRLuc 46h après hyperthermie (souris 2010-177)*..... 110
Figure 43 *: Cinétique d'expression de la LucF présentant une inhibition par le miRLuc 72h après hyperthermie (souris 2011-003)*..... 111
Figure 44 *: Détermination du volume tumoral au pied à coulisse de tumeurs U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc*..... 113
Figure 45 *: Effet de l'ajout d'une cible sur l'activité de la LucF*..... 115
Figure 46 *: Schématisation de la triple transfection réalisée dans des cellules U87 MG avec les plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S, pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR et pCMV-miRLuc*..... 116
Figure 47 *: Inhibition de l'activité de la LucF par le miRLuc après ajout d'une cible supplémentaire en 3'UTR de l'ARNm de la LucF*..... 117
Figure 48 *: Schématisation de la co-transfection des plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S et pHsp-miRLuc dans les cellules U87 MG*..... 118
Figure 49 *: Inhibition de l'activité de la LucF « double cibles » lorsque le miRLuc est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur Hsp70B*..... 119
Figure 50 *: Niveau d'expression relative de l'ARNm Hsp70 endogène par RT-PCRq après une activation thermique de 45°C pendant 8 ou 20 min*..... 122
Figure 51 *: Activité de la LucR après différents temps d'activation thermique*..... 123
Figure 52 *: Profils de fluorescence obtenus pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc après activation thermique*..... 125
Figure 53 *: Pourcentage de cellules fluorescentes après choc thermique*..... 126
Figure 54 *: Mesure de l'intensité de fluorescence des cellules après choc thermique* 127
Figure 55 *: Microscopie de fluorescence des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg*..... 128
Figure 56 *: Cinétique d'inhibition de l'activité de la LucF* 129
Figure 57 *: Variation du niveau d'expression relative de l'ARNm de la LucF après thermo-induction de la biogénèse du miRLuc* 131
Figure 58 *: Suivi par BLI de l'activation du promoteur Hsp* 133
Figure 59 *: EP intra-dermique des gènes rapporteurs de la LucF et de la mPlum* 134
Figure 60 *: BLI de la LucF après EP intra-crânienne*..... 135
Figure 61 *: Suivi par BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique de l'ARN 5UTR-LucF-3UTR*..... 138
Figure 62 *: Suivi par BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique d'ARN 5UTR-LucF-polyA*..... 139
Figure 63 *: Suivi par BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique d'ARN* 140
Figure 64 *: Visualisation par BLI de l'activité de la LucF 20h après EP in vivo pour 3 types d'ARN différents*..... 141
Figure 65 *: BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique d'ARN*..... 142
Figure 66 *: BLI de la LucF après injection de 14 x 10^{12} molécules d'ARN sans EP*..... 143
Figure 67 *: Hyperthermie réalisée aux ultrasons focalisés guidés par IRM de température* 149

Liste des tableaux

Tableau 1 *: Dérégulation de l'expression des miARN et cancer* 31
Tableau 2 *: Les gènes de la famille HSP70 chez l'Homme* 34
Tableau 3 *: Limites et avantages des méthodes physiques d'adressage in vivo de matériel génétique* 38
Tableau 4 *: Caractéristiques des techniques d'imagerie moléculaire* 45
Tableau 5 *: Gènes rapporteurs utilisables pour l'imagerie moléculaire génique* 46
Tableau 6 *: Structure des chromophores des protéines fluorescentes et caractéristiques spectrales* 51
Tableau 7 *: Applications de l'utilisation des LucF et LucR en BLI* 54
Tableau 8 *: Plasmides utilisés et caractéristiques* 59
Tableau 9 *: Lignées U87 FRT-7 modifiées utilisées et caractéristiques* 61
Tableau 10 *: Milieux utilisés et composition* 63
Tableau 11 *: Tampons, milieux et réactifs utilisés et composition* 65
Tableau 12 *: Tampons et milieux utilisés et composition* 69
Tableau 13 *: Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR* 72
Tableau 14 *: Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCRq* 73
Tableau 15 *: Conditions de courant et protocoles d'électroporation* 82
Tableau 16 *: Plasmides utilisés contenant 4 copies des miARN* 87
Tableau 17 *: Plasmides contenant 4 copies du miARN sous le contrôle du promoteur Hsp70B* 100
Tableau 18 *: Cinétique et quantification des signaux BLI obtenus* 107

Liste des abréviations

°C : degré Celsius
AAV : adeno-associated virus
ADA : adénosine désaminase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AGO : argonaute
Amp : ampicilline
APP : amyloid precursor protein
ARN : acide ribonucléique
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messager
ARNt : ARN de transfert
ATP : adénosine triphosphate
b : base
Blast : blasticidine
BLI : imagerie de bioluminescence
BRET : bioluminescence resonance energy transfer
BSA : bovin serum albumine
CAG : cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin
CCD : charge coupled device
CHO : chinese hamster ovary
CIAP : calf intestinal alkaline phosphatase
CMV: cytomégalovirus
Cox-2 : cyclooxygenase-2
CSC : cellules souches cancéreuses
Ct : cycle Threshold ou cycle seuil
CT : computed tomography
D_2R : dopamine 2 receptor
Da : dalton
DGCR8 : DiGeorge syndrome critical region gene 8
DICS-X : déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X
DMSO : diméthylsulfoxyde
dNTP : désoxyribonucléotides
E : champ électrique
ECT : électrochimiothérapie
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EFIα : elongation factor 1 alpha
eGFP : enhance GFP
EGT : électrogène thérapie
eIF : eucaryotic translation initiation factor
EmGFP : Emerald GFP
EP : électroporation
eRF : eucaryotic release factors
f : fréquence
FAK : focal adhesion kinase
FDA : food and drug administration
fDOT : tomographie de fluorescence diffuse
FMT : tomographie moléculaire de fluorescence
FRET : fluorescence resonance energy transfer
FRI : imagerie de fluorescence par réflexion
GFP : green fluorescent protein
h : heures
HSE : heat shock elements
HSF : heat shock factor
HSP : heat shock proteins
HSV1 : herpes simplex virus de type 1
Hygro : hygromycine
Hz : hertz
IC : intra-cérébral
ID : intra-dermique
IFN : interféron
IL : interleukine
IM : intra-musculaire
IP : intra-péritonéal
IRES : internal ribosomal entry site
IRM : imagerie par résonance magnétique
IT : intra-tumorale
IV : intra-veineuse
Kan : kanamycine
L : litres
LB : Luria-Bertani
LMA : leucémie myéloïde aiguë
LRP : lysine-rich protein
LucF : luciférase Firefly
LucR : luciférase *Renilla*
m : mètres
miARN : microARN
MMP: métalloprotéase matricielle
min : minutes
miRISC : miRNA-induced silencing complexe
miRNP : micro-RNP
MRgHIFU : ultrasons focalisés de hautes intensités guidés par résonance magnétique
N : nucléotide
NEAA : acides aminés non essentiels
Néo : néomycine
NIS : sodium / iodide symporter
NK : natural killer
ORF : open reading frame
P : période
PABP1 : polyadenylate-binding protein 1

pb : paires de bases
P-bodies : processing bodies
PBS : phosphate buffer saline
PCR : polymerase chain reaction
PCRq : PCR quantitative
PS1 : presenilin-1
PSA : pénicilline – streptomycine - amphotéricine
PSM : poste de sécurité microbiologique
RISC : RNA-induced silencing complexe
RLU : relative light unit
RMN : résonance magnétique nucléaire
RNP : ribonucléoprotéique
ROI : region of interest
rpm : rotations par minute
RT : réverse transcription
s : secondes
SDS : sodium dodécyl sulfate
shARN : short hairpin RNA
sHSP : small HSP
siARN : small interfering RNA
SIDA : syndrôme d'immunodéficience acquise
SPECT : single photon emission computerized tomography
Spectino : spectinomycine
SVF : sérum de veau foetal
Tau : tubule-associated unit
TBE : Tris borate EDTA
TE : Tris EDTA
TEN : Tris EDTA NaCl
TEP : tomographie par émission de positons
TK : thymidine kinase
TLR : toll-like receptor
TRBP : TAR RNA binding protein
U : unité
u.a : unité arbitraire
UTR : untranslated region
UV : ultra-violets
V : volt
VEGF : vascular endithelial growth factor
VHC : virus de l'hépatite C
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
W : watt
Zéo : zéocine

1. Introduction

1.1. La thérapie génique

1.1.1. Généralités

L'essor de la génétique et de la biologie moléculaire a permis une compréhension plus précise des processus moléculaires qui sont à l'origine de nombreuses maladies et a profondément modifié l'approche thérapeutique. Les nouveaux outils diagnostiques permettent d'identifier, pour chaque patient, les déterminants moléculaires de sa pathologie. Les nouvelles thérapies ambitionnent d'atteindre directement et spécifiquement chacun de ces déterminants. La méthode consiste alors à adapter le traitement à chaque malade dans le cadre d'un traitement personnalisé. Cette stratégie permet aussi de cibler le caractère complexe ou multifactoriel des maladies. Le traitement personnalisé ne permet d'administrer le médicament qu'au patient susceptible de réagir positivement en fonction de la signature moléculaire de sa maladie et de combiner les traitements en fonction des cibles identifiées. L'efficacité est accrue, les traitements inopérants peuvent être prédits et les effets secondaires sont réduits. Dans ce contexte, la thérapie génique offre des perspectives intéressantes d'une part parce qu'elle propose de s'attaquer directement aux causes de la maladie plutôt que de traiter ses conséquences, et d'autre part parce qu'il s'agit d'une thérapie ciblée par définition.

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules somatiques humaines. Cette stratégie permet de pallier à une anomalie génétique telle qu'un défaut de l'expression d'un gène en restaurant une situation correcte ou d'exprimer un gène thérapeutique. Il existe 2 grandes approches de thérapie génique. L'approche dite *ex vivo* consiste à réaliser, dans un organe cible, une greffe de cellules préalablement modifiées génétiquement en laboratoire. L'approche *in vivo*, quant à elle, permet l'introduction directe du matériel génétique dans les cellules soit directement dans l'organe cible soit par le biais de la circulation sanguine. Outre ces 2 approches, les thérapies géniques se différencient par le type d'acide nucléique utilisé. Le choix du transgène constitue un aspect déterminant de la thérapie et il dépend bien évidemment de la maladie ciblée. La thérapie génique vise à exprimer, restaurer, inhiber ou remplacer un gène. De ce fait, l'ADN intégré de façon permanente au génome ou présent de façon épisomique et l'ARN sont des molécules de choix pour cette approche thérapeutique. Il est à noter que les approches utilisant l'ADN non intégré au génome et l'ARN présentent l'avantage d'être réversibles. Ainsi, le transgène sera éliminé au cours des divisions cellulaires. Le choix de la stratégie de thérapie génique va donc dépendre de plusieurs paramètres et prendre en compte des considérations telles que l'effet thérapeutique escompté, le type d'acide nucléique utilisé, la cellule ou l'organe ciblé et la méthode d'adressage envisagée. Enfin, la thérapie génique ouvre de meilleures perspectives pour un traitement de longue durée, moins toxique, mieux localisé et moins coûteux que les thérapies visant à administrer des protéines recombinantes (Chernajovsky et al., 2004).

Le premier essai clinique de thérapie génique chez l'homme a été réalisé aux Etats-Unis en 1989 par S. Rosenberg, F. Anderson et M. Blaese. Cette démonstration de la

faisabilité de la thérapie génique *ex vivo* a été effectuée sur des patients souffrant d'une maladie connue pour provoquer une défaillance immunitaire sévère dû à un déficit en adénosine désaminase (ADA). Le protocole consistait à prélever des lymphocytes chez la patiente et de les transduire par un vecteur rétroviral exprimant le gène codant pour l'ADA. Ainsi, la ré-introduction des cellules modifiées à la patiente permettait de rétablir les fonctions du système immunitaire. A la suite de ce premier essai, la thérapie génique a connu un essor considérable et les essais précliniques et cliniques se sont multipliés. Le premier véritable succès de thérapie génique a été réalisé en France par l'équipe de A. Fischer (Cavazzana-Calvo et al., 2000). L'objectif était de traiter des enfants souffrant du déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (DICS-X) qui provoque une absence du système immunitaire. Ces patients doivent rester confinés dans un environnement stérile, d'où leur nom d'« enfants bulle ». Les cellules de la moelle osseuse des malades ont été transformées génétiquement *ex vivo* grâce à un rétrovirus puis la ré-administration des cellules modifiées a permis de restaurer les fonctions immunitaires de ces patients.
En 2012, soit plus de 20 ans après la première tentative, plus de 1700 essais de thérapie génique ont été référencés dans le monde, montrant le réel engouement pour cette nouvelle stratégie de traitement. Les essais de thérapie génique concernent majoritairement les cancers qui représentent la majorité des études (Edelstein et al., 2004, 2007) (***Figure 1***).

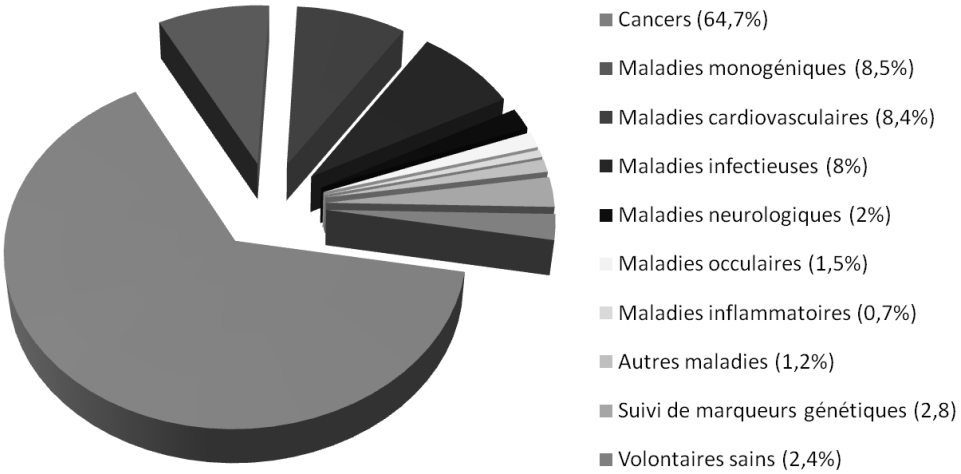


Figure 1 : Cibles cliniques de la thérapie génique
(www.wiley.co.uk/genmed//clinical)

Dans le cas des cancers, le traitement actuel repose essentiellement sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les résultats sont encourageants et en constante progression, notamment quant au risque de rechute. Néanmoins, ces résultats restent perfectibles et des formes de résistance à ces thérapies peuvent se développer. Il existe donc une demande et un réel besoin de concevoir de nouvelles approches thérapeutiques. Les progrès dans le domaine du diagnostic permettent d'établir la signature moléculaire des cancers, l'enjeu étant de trouver des cibles suffisamment spécifiques à chaque signature et ainsi développer des outils thérapeutiques pour les cibler. Dans ce contexte, les thérapies

géniques pourraient jouer un rôle de premier plan en constituant soit des traitements adjuvants aux thérapies actuelles soit des traitements alternatifs.

Pour le traitement des cancers, il convient également de prendre en compte l'hétérogénéité des cellules tumorales. Les cellules souches cancéreuses (CSC) en particulier, constituent une population de cellules au sein de la tumeur qui attirent aujourd'hui l'intérêt des chercheurs (Duarte et al., 2012). Elles ont été identifiées pour la première fois dans un type de leucémie myéloïde aiguë (LMA) (Lapidot et al., 1994). C'est grâce à leur particularité d'exprimer des marqueurs de surface différents des autres cellules de la tumeur qu'elles ont pu être triées par cytométrie de flux. L'admistration de ces cellules à des souris immunodéficientes a démontré la capacité des CSC de générer des tumeurs. Ces cellules ont ensuite été isolées dans de nombreux types de tumeurs solides comme le glioblastome (Singh et al., 2004), le carcinome du sein (Al-Hajj, 2003) ou du pancréas (Li et al., 2007). Les traitements anti-cancéreux traditionnels ciblent spécifiquement les cellules à division rapide, en ciblant la mitose ou la réplication de l'ADN. Les CSC alimentent la croissance tumorale et ont une vitesse de division lente, ce qui les conduit à l'échappement à ces traitements. Ces CSC pourraient donc être à l'origine des phénomènes de résistances aux traitements, de rechutes et de métastases. Dans cette optique, l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les CSC et basées sur la thérapie génique pourraient s'avérer efficaces.

Il est cependant important de souligner que la thérapie génique, malgré son fort potentiel thérapeutique, ne fait actuellement pas partie des outils habituellement utilisés en clinique. Les risques associés à de telles thérapies sont au cœur des débats. Ils ont été notamment mis en lumière lorsque, parmi les patients traités pour le DICS-X par l'équipe de A. Fischer, un enfant décéda suite à une leucémie induite par l'insertion aléatoire du transgène dans un proto-oncogène. Les protocoles de thérapie génique doivent satisfaire aux mêmes exigences que les autres traitements, aussi bien du point de vue éthique que sanitaire. L'innocuité et l'efficacité d'un traitement sont rigoureusement évaluées au cours des différentes phases d'essais cliniques. En 2012, plus de 95 % des essais de thérapie génique sont en phase I, I/II ou II alors qu'à peine 5 % sont en phase II/III et III (The Journal Of Gene Medicine, www.wiley.co.uk/genmed/clinical). Ce constat illustre bien les difficultés rencontrées par la thérapie génique. Il montre que des progrès sont encore nécessaires et que des stratégies nouvelles doivent être imaginées pour lever différentes limitations techniques et permettre l'entrée de la thérapie génique en clinique. Des aspects tels que le choix du transgène, le contrôle de l'intensité et de la durée de l'expression transgénique ou l'efficacité de la méthode d'adressage aux cellules cibles, sont autant de points clés pour lesquels des améliorations sont requises. Ils seront détaillés dans la suite de cette introduction.

1.1.2. Les verrous techniques

Pour assurer un effet thérapeutique satisfaisant, les stratégies doivent répondre à des critères précis, notamment :

- Le ciblage des cellules dans lesquelles l'introduction du matériel génétique est souhaitée doit être spécifique.
- L'adressage du transgène à ces cellules doit être efficace.
- L'intensité de l'expression du transgène doit être adaptable à la thérapie envisagée.

- La durée de l'expression du transgène au niveau de la cible doit être contrôlable.

A l'heure actuelle, des limitations techniques liées à ces différents critères empêchent l'essor des thérapies géniques en clinique. Ils sont en relation avec la grande diversité des pathologies concernées et la variété des cibles envisagées. Il est donc illusoire de concevoir une solution unique et universelle de thérapie génique mais il convient au contraire de proposer une grande variété d'outils ponctuels. Ces outils pourront être combinés entre eux ou avec des protocoles d'ores et déjà utilisés en clinique (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) afin d'élaborer *in fine* des stratégies capables de répondre à une situation pathologique particulière.

Au cours de cette thèse, nous avons souhaité contribuer à cette démarche en proposant des solutions ponctuelles à certains de ces verrous. Au travers d'une démarche expérimentale *in vivo* chez la souris, notre projet consiste à tester la faisabilité de nos propositions qui ambitionnent de répondre, de façon originale, à 4 questions qui se posent vis-à-vis des thérapies géniques.

- **Quel transgène utiliser ?**

Il est primordial d'orienter le choix du transgène à l'effet thérapeutique désiré. Plusieurs stratégies ont été envisagées parmi lesquelles l'obtention de mutations de correction, le déclenchement ou la stimulation de la réponse immunitaire, l'inhibition d'un gène surexprimé, l'inhibition de processus physiologiques ou encore l'élimination des cellules cancéreuses (thérapie suicide).
Les stratégies basées sur l'inhibition de l'expression génique ont particulièrement retenu notre attention. La découverte des ARN interférents et leur rôle ont profondément éclairés la compréhension de la régulation génique. Ces petits ARN non codants apparaissent comme des éléments clés du mécanisme de l'ARN interférence (ARNi) à l'origine de la dégradation des ARN messagers (ARNm) ou de leur blocage au niveau traductionnel. Les microARN (miARN) sont les acteurs naturels de l'interférence ARN et la possibilité de synthétiser des miARN artificiels permet de cibler, *a priori*, tout le transcriptome. Notre travail propose d'étudier la faisabilité d'une stratégie de thérapie génique basée sur l'utilisation des miARN. La biogénèse et le mode d'action de ces petits ARN non codants seront décrits dans le paragraphe 1.2.3. de cette introduction.

- **Comment adresser le transgène aux cellules cibles ?**

Le succès d'un protocole de thérapie génique réside dans l'efficacité et la spécificité de la délivrance du gène thérapeutique au tissu ciblé. Plusieurs méthodes d'adressage sont, à ce jour, utilisables. Elles diffèrent quant à leur efficacité, leur spécificité et leur innocuité. Elles seront abordées plus en détail dans la suite du manuscrit (Cf. 1.4.).

- **Comment contrôler l'expression du transgène ?**

La thérapie génique nécessite une expression transgénique adaptée au type cellulaire ou au tissu choisi, à un moment opportun et en quantité ajustée au besoin. En effet, suivant

l'effet escompté, l'expression du transgène doit être plus ou moins durable, spécifique et régulée. De plus, la réussite d'un protocole de thérapie génique passe bien entendu par la nécessité de ne pas générer d'effets secondaires (réponse immunitaire, cytotoxicité, inflammation, …). Les méthodes d'adressage seules ne permettent pas toujours de contrôler efficacement et précisément tous les paramètres de l'expression génique. Notre étude propose de contrôler l'expression d'un transgène dans le temps et dans l'espace en utilisant un promoteur thermo-inductible dont les caractéristiques seront détaillées par la suite (Cf. 1.3.2.2.).

- **Comment évaluer l'efficacité d'une thérapie dans le temps ?**

Le suivi de la thérapie génique est essentiel afin de contrôler l'effet et la distribution spatiale et temporelle effective du transgène (Waerzeggers et al., 2009). Il peut être réalisé *in vivo* par des méthodes d'imagerie moléculaire en suivant l'expression de gènes rapporteurs. Plusieurs méthodes d'imagerie peuvent être mises en œuvre chez l'animal dans le cas d'un protocole de thérapie génique et seront décrites dans la suite de l'introduction (Cf. 1.5.).

1.2. Une stratégie antisens ou ciblage de l'ARNm

1.2.1. L'ARNm : structures et fonctions

L'objectif principal de cette partie est d'introduire les différents termes qui seront nécessaires à la compréhension de la suite de ce manuscrit.
L'ARNm est transcrit à partir d'un gène puis est traduit en protéine. Nous commencerons par aborder les caractéristiques propres aux ARNm puis nous détaillerons le mécanisme de traduction.

L'ARNm est composé de plusieurs éléments qui sont :
- la coiffe (ou cap), qui est une structure en 5' de l'ARNm, de forme générique m^7GpppN (où m^7G est une guanosine méthylée en position 7, ppp est une liaison triphosphate et N est le premier nucléotide du transcrit).
- une région non-traduite en 5', nommée 5'UTR (untranslated region).
- un cadre ouvert de lecture contenant la séquence codante de la protéine.
- une région non traduite en 3', nommée 3'UTR.
- une queue polyA en 3', qui est une succession de nombreuses adénosines.

La traduction des ARNm se fait selon deux modes : (1) la traduction dépendante de la coiffe et (2) la traduction indépendante de la coiffe impliquant les sites internes d'entrée des ribosomes (Internal Ribosomal Entry Site = IRES) aussi appelée traduction IRES-dépendante. Nous allons nous intéresser ici à la traduction dépendante de la coiffe d'un ARNm (***Figure 2***) qui concerne la majorité des transcrits (Haar et al., 2004).

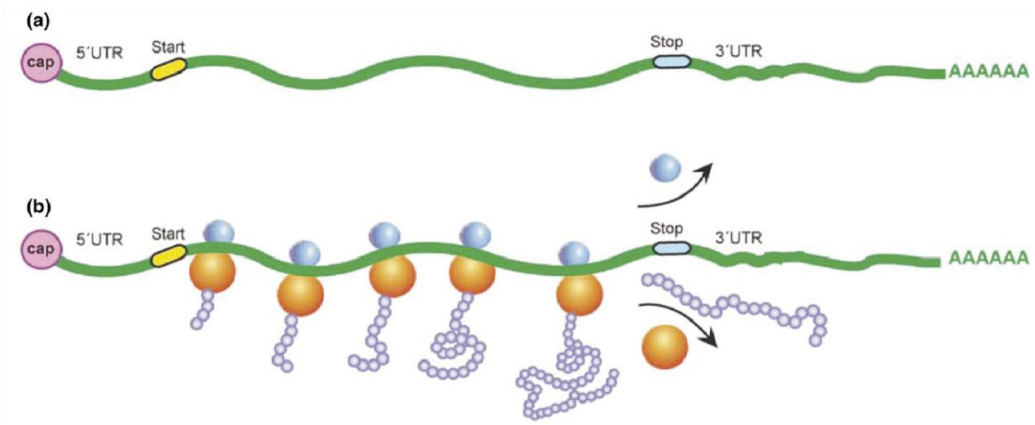


Figure 2 : Les étapes de la traduction
(Nilsen, 2007)
(a) L'ARNm eucaryote possède un codon d'initiation (start) et un codon de terminaison (stop) de la traduction. L'ARNm présente une coiffe en 5' et une queue polyA en 3', il comprend en plus de la partie codante les régions non traduites 5'UTR et 3'UTR. (b) Traduction de l'ARNm en protéine par les ribosomes.

La traduction dépendante de la coiffe comprend 3 étapes :

- L'initiation qui a lieu grâce à la reconnaissance de la coiffe par des facteurs d'initiation de la traduction eIF (eucaryotic translation Initiation Factor). Un acteur principal est le complexe eIF4F, composé de 12 facteurs protéiques, qui permet la reconnaissance de la coiffe. La sous-unité 40S du ribosome est recrutée et lit la région 5' de l'ARNm à la recherche du codon initiateur de la traduction. La grande sous-unité 60S du ribosome vient alors se fixer pour poursuivre la traduction dans l'étape d'élongation.
Il est à noter que eIF4G, faisant parti du complexe eIF4F, interagit avec la protéine PABP1 (polyadenylate-binding protein 1) qui est elle-même associée à la queue polyA de l'ARNm. Cette interaction permet le rapprochement des 2 extrémités de l'ARNm et cette « circularisation » facilite l'initiation de la traduction et le recyclage des ribosomes.

- L'élongation consiste en la synthèse d'une chaîne peptidique. Chaque codon de l'ARNm est reconnu par l'anticodon correspondant d'un ARNt. Ces derniers sont spécifiquement liés à un acide aminé qui s'ajoute à la chaîne peptidique en cours d'élongation.

- La terminaison a lieu lorsque le ribosome arrive au codon terminateur. Cette étape, catalysée par les eRF (eucaryotic Release Factors) consiste en un relargage des acteurs de la traduction.

1.2.2. Une stratégie antisens (ou ciblage de l'ARNm)

Certaines thérapies géniques visent à moduler l'expression de gènes préalablement mis en évidence comme étant responsables de la pathologie. Les stratégies de la thérapie génique consistent soit à apporter un vecteur d'expression capable de conduire à la synthèse d'une protéine d'intérêt pour le défaut génétique, soit de cibler directement la protéine défectueuse ou surexprimée, soit de moduler la synthèse d'une protéine au niveau de la transcription ou de la traduction de son ARNm.

Ce paragraphe est consacré aux approches qui consistent à cibler l'ARNm au niveau post-transcriptionnel pour induire une inhibition de la traduction afin d'abaisser le niveau d'expression d'un gène responsable d'une maladie. A cet effet, différents moyens ont été proposés (***Figure 3***) et nous évoquerons successivement l'utilisation d'oligonucléotides antisens, de ribozymes et d'ARN interférents.

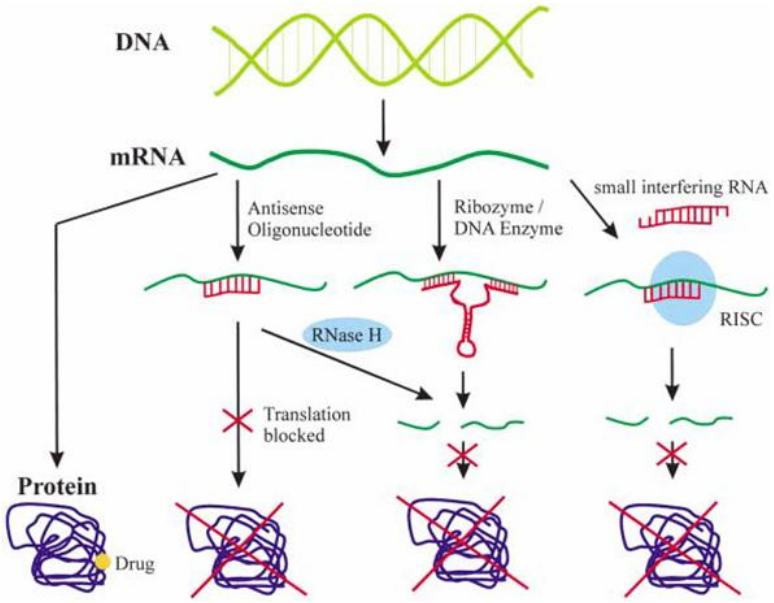


Figure 3 : Stratégies antisens
(Kurreck, 2003)
Les stratégies ciblant l'ARNm utilisent des oligonucléotides antisens, des ribozymes ou des ARN interférents pour bloquer l'ARNm au niveau post-transcriptionnel. Ces stratégies sont différentes de l'utilisation de composés permettant l'inactivation de protéines qui sont des stratégies post-traductionnelles (représentées sur la gauche du schéma).

Les oligonucléotides antisens

En 1978, Zamecnik et Stephenson (Stephenson and Zamecnik, 1978; Zamecnik and Stephenson, 1978) ont mis en évidence le potentiel des oligonucléotides antisens. Ces molécules d'ADN ou d'ARN se fixent spécifiquement par complémentarité de bases sur une séquence cible de l'ARNm. La création de ce duplex permet l'arrêt de la traduction de l'ARNm cible par blocage stérique ou sa dégradation par recrutement de la RNase H. Les oligonucléotides antisens peuvent être modifiés chimiquement afin d'en améliorer leurs performances. Ils ont été mis en oeuvre dans plusieurs études cliniques. L'une d'entre elles a conduit à la mise sur le marché d'un médicament nommé Vitravene (Formivirsen sodium ; Isis Pharmaceuticals, USA) indiqué en traitement local de la rétinite à cytomégalovirus chez les patients atteints du syndrôme d'immunodéficience acquise (SIDA).

Les ribozymes

Dans les années 1980, Cech et Altman (Waldrop, 1989) démontrèrent le potentiel catalytique des ribozymes. Leur découverte fut récompensée par le prix Nobel de Chimie en 1989. Les ribozymes sont des molécules d'ARN (naturels ou synthétiques) capables de cliver de manière spécifique la liaison phosphodiester des ARNm grâce à une réaction de trans-estérification ou d'hydrolyse (Doherty and Doudna, 2001). Cette découverte du potentiel catalytique de ces molécules d'ARN a bouleversé les fondements de la biologie. Suite à cette découverte, de nouvelles perspectives dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques furent envisagées. Dans des études de cancérologie, plusieurs gènes ont été ciblés par des ribozymes

(Kijima et al., 1995) comme le proto-oncogène Ras (Wang et al., 2002) jouant un rôle dans la prolifération cellulaire, le facteur de transcription c-fos (Scanlon et al., 1991, 1994), le gène mdr-1 codant pour une phosphoglyco-protéine membranaire à l'origine de la résistance aux traitements anti-cancéreux (Nagata et al., 2002), la métalloprotéase MMP-9 impliquée dans les processus métastatiques (Hua and Muschel, 1996) et le gène VEGFR-1 codant pour un récepteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Pavco et al., 2000). Ce dernier ribozyme, nommé Angiozyme® (RPI.4610), a été testé dans des cas de cancers du rein mais, face à son manque d'efficacité, les essais cliniques ont été abandonnés. Actuellement, aucun ribozyme n'a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) comme médicament.

Les ARN interférents

L'ARNi est un phénomène naturel mettant en jeu des petites molécules d'ARN nommés ARN interférents. Il a été constaté pour la première fois par R. Jorgensen au début des années 1990. L'introduction d'un transgène visant à augmenter la pigmentation violette des pétunias avait conduit à l'effet inverse de l'effet escompté : les pétunias obtenus étaient devenus blancs ou anormalement pâles dans la plupart des cas. L'expression du gène endogène avait été inhibée par l'introduction du transgène. En 1998, Fire et Mello (Fire et al., 1998) constataient que la présence d'ARN double brin d'un gène entraînait la dégradation spécifique, rapide et efficace de l'ARNm correspondant. Leur étude chez le ver *Caenorabditis elegans* leur valut le Prix Nobel de Médecine en 2006. Ce phénomène d'ARNi, conservé au cours de l'évolution, a été par la suite mis en évidence chez les mammifères.

L'ARNi, mécanisme naturel de la cellule, permet la répression post-transcriptionnelle de l'expression génique. Le procédé est à ce jour bien connu et les ARN interférents sont désormais utilisables en recherche pour réprimer l'expression d'un gène en agissant sur l'ARNm. Les ARN interférents sont de petites séquences d'ARN non codantes de 20 à 30 nucléotides. Il existe différents ARN régulateurs comme les miARN (microARN) endogènes ou synthétiques, les siARN (small-interfering RNA) et les shARN (short hairpin RNA). Les ARN interférents synthétiques peuvent être apportés par l'expérimentateur afin de réguler l'expression des gènes. Leur biogénèse est un processus multi-étapes (***Figure 4***).

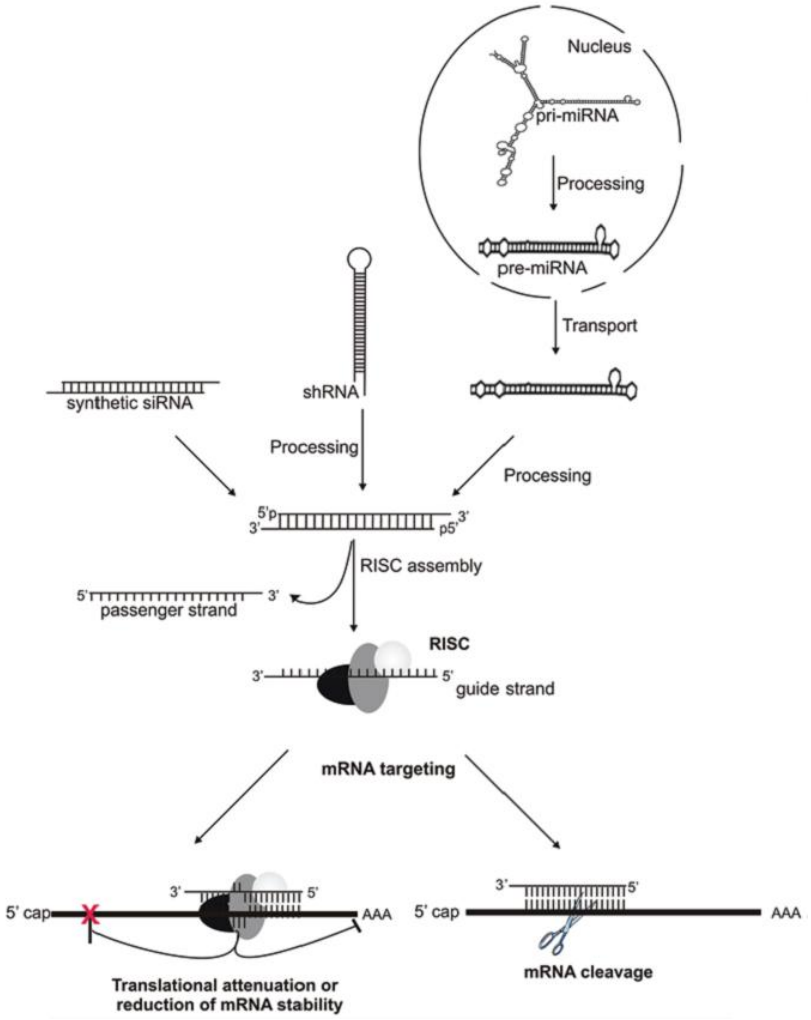


Figure 4 : L'ARNi, un processus multi-étapes

(Scherr and Eder, 2007)

La biogénèse des ARN régulateurs interférents siARN, shARN et miARN est un processus multi-étapes. Une fois dans la cellule (ou présent de façon endogène pour les miARN), ces ARN double brins sont pris en charge par différentes protéines pour former un duplex ARN / ARN. Un brin de ce duplex (brin guide ou brin mature) est prit en charge par le complexe protéique nommé RISC (RNA-induced silencing complexe). Une reconnaissance puis une hybridation spécifique de l'ARN interférent sur l'ARNm cible a lieu. Cette reconnaissance entraîne une inhibition de l'expression du gène ciblé soit par clivage de l'ARNm, soit par inhibition de sa traduction.

La maturation des ARN interférents permet l'obtention d'un duplex ARN / ARN avec des extrémités 3' sortantes. Ce duplex est pris en charge par un complexe ribonucléoprotéique nommé RISC (RNA-induced silencing complexe) dont la composition diffère selon l'ARN interférent mis en jeu. Le brin mature (ou brin guide) du duplex s'hybride par complémentarité de séquence plus ou moins parfaitement, selon le cas, sur l'ARNm cible. Cette fixation aboutit à l'inhibition de l'expression du gène soit grâce à la répression de la traduction soit grâce au clivage de l'ARNm ciblé. Il est à noter qu'en présence de siARN la complémentarité de séquence entre l'ARN interférent et l'ARNm est parfaite alors qu'il existe éventuellement des zones non-appariées lorsque l'ARNi est exercée par un miARN naturel.

Le mécanisme d'action des miARN sera abordé plus en détail dans la suite de cette introduction.

1.2.3. Les microARN : acteurs pour une thérapie génique

1.2.3.1. Caractéristiques et fonctions

Les miARN sont des séquences simple brin d'environ 22 nucléotides et font partie de la classe des petits ARN non codants. Leur découverte est récente puisque c'est en 1993 que le premier miARN fut identifié chez *Caenorabditis elegans* (Lee et al., 1993). Il s'agit d'un petit ARN naturel de 22 bases, nommé lin-4, qui réprime la traduction de la protéine LIN-14 en interagissant par complémentarité de séquence avec une région dans le 3'UTR de son ARNm. L'inhibition de lin-14 par lin-4 est une étape essentielle au développement larvaire chez cet organisme. Depuis cette découverte, l'existence de miARN a été mise en évidence chez d'autres organismes, y compris chez les mammifères, les plantes et les eucaryotes unicellulaires.

Les miARN ciblent spécifiquement, par complémentarité de bases, les ARNm. Leur action est de déclencher la dégradation d'un ARNm cible ou d'en bloquer la traduction. Les miARN sont donc des régulateurs de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel.

En 2012, plus de 18 000 miARN sont référencés sous la forme précurseur (Cf 1.2.3.2.) dans la base de données miRBase (Release 18) dans plus de 160 espèces. Pour l'Homme, plus de 1 500 séquences précurseurs sont référencées. Les miARN ont été identifiés comme régulant 30% des ARNm de la cellule (Lewis et al., 2005; Filipowicz et al., 2008). La plupart d'entre eux sont tissus spécifique (Davis-Dusenbery and Hata, 2010), ils contribuent ainsi au profil d'expression des gènes spécifique à chaque cellule (Krol et al., 2010). De plus, un même miARN peut cibler jusqu'à une centaine d'ARNm (Krol et al., 2010) et un ARNm peut être la cible de plusieurs miARN différents. Les miARN ont des fonctions biologiques diverses et sont impliqués, entre autres, dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et le développement (Alvarez-Garcia and Miska, 2005). Les miARN forment ainsi une grande famille de molécules qui joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression du génome.

1.2.3.2. Mode d'action

La synthèse des miARN est issue d'un mécanisme bien conservé dans le monde vivant mais dans cette partie nous décrirons plus particulièrement la biogénèse des miARN chez les mammifères.

Une séquence primaire appelée pri-miARN est transcrite grâce à l'ARN polymérase II dans le noyau (Lee et al., 2004) à partir d'un gène miARN ou d'une portion intronique d'un gène codant pour une protéine (Krol et al., 2010). Le pri-miARN est ensuite coiffé et polyadénylé dans le noyau. La séquence pri-miARN comprend une région en tige-boucle

imparfaitement appariée. Cette structure va être prise en charge à 2 niveaux par des RNases III de type endonucléases nommées Drosha et Dicer. Chacune de ces 2 enzymes est complexée à des protéines contenant des domaines de liaisons aux ARN doubles brins. La première étape de maturation a lieu dans le noyau et fait intervenir Drosha complexée à la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) (Han, 2004). Ce complexe induit le clivage nécessaire à la formation du pré-miARN qui est une séquence précurseur en épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides. Le pré-miARN ainsi formé va être exporté dans le cytoplasme par l'intermédiaire de l'exportine 5. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par le complexe Dicer / TRBP (TAR RNA binding protein) pour former un miARN duplex nommé miARN / miARN*. Il est composé d'une vingtaine de nucléotides avec des extrémités 3' sortantes. L'un des 2 brins de ce duplex sera impliqué dans l'hybridation avec l'ARNm cible et sera appelé miARN mature, l'autre brin (miARN*) dit passager sera dégradé. Cependant, le brin miARN* a également été décrit comme pouvant jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes (Okamura et al., 2008; Guo and Lu, 2010). Après maturation, le miARN va être assemblé dans un complexe ribonucléoprotéique (RNP) afin de former le micro-RNP (miRNP) ou miRNA-induced silencing complexe (miRISC) (***Figure 5***).

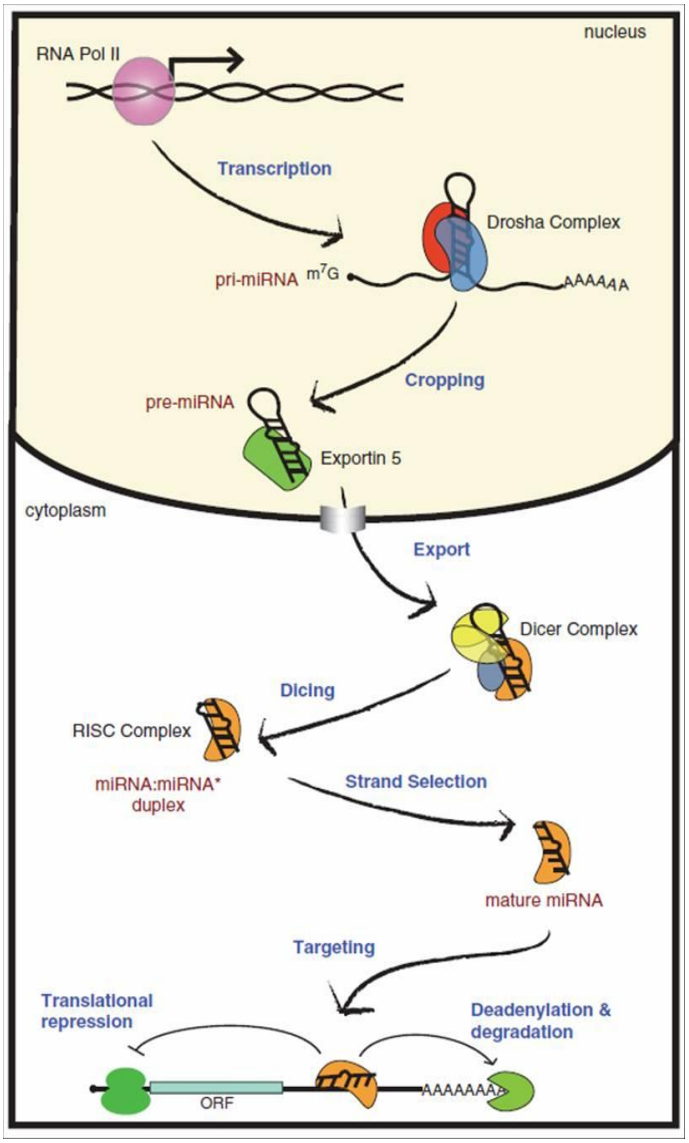


Figure 5 : Biogénèse des miARN
(Davis-Dusenbery and Hata, 2010)
La transcription par l'ARN polymérase II dans le noyau permet la synthèse du pri-miARN qui est pris en charge par Drosha complexée à DGCR8. Une fois excisé, le pré-miARN est exporté dans le cytoplasme où il est reconnu par Dicer complexée à TRBP. Après la formation du complexe miRISC (ici noté complexe RISC) et l'obtention du miARN mature, l'hybridation sur l'ARNm cible permet l'inhibition.

Le miARN mature vient s'hybrider, dans la plupart des cas de façon imparfaite et le plus souvent dans les régions 3'UTR des ARNm cibles. Toutefois, il n'est pas exclu que les miARN ciblent des régions codantes de l'ARNm (Forman et al., 2008). L'efficacité de la répression peut être augmentée dans le cas où plusieurs miARN s'apparient sur le 3'UTR d'un même ARNm (Fang and Rajewsky, 2011). La complémentarité de séquence intervient entre l'ARNm et une région restreinte du miARN appelée région « graine » ou « seed ». Cette région, comprise entre les nucléotides 2 à 8 (***Figure 6***) permet l'hybridation spécifique sur l'ARNm cible.

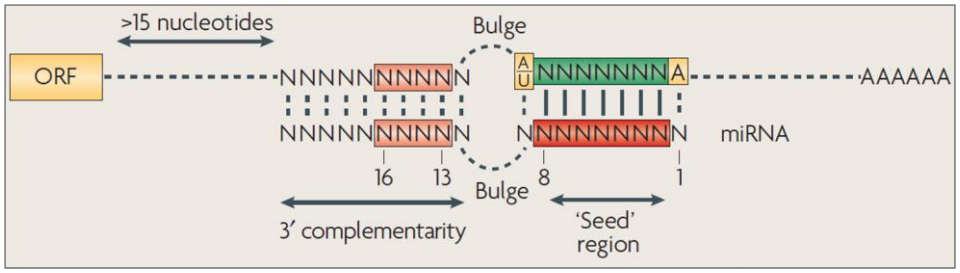


Figure 6 : Principales interactions entre un miARN et son ARNm cible
(Filipowicz et al., 2008)
Appariement de bases entre un miARN et l'ARNm grâce à la région « seed » du miARN (nucléotides 2 à 8) sur la partie 3'UTR de l'ARNm (cas le plus souvent observé). La région centrale de l'hétéroduplex est constituée d'une région non appariée puis une zone plus ou moins bien appariée (discordances fréquentes) est observable en 3' du miARN.

L'hybridation du miARN mature sur l'ARNm cible a pour conséquence de réguler l'expression du gène considéré au niveau post-transcriptionnel. Cette régulation est le résultat de deux mécanismes différents qui sont le clivage de l'ARNm cible ou la répression de la traduction. Ces deux mécanismes font intervenir des protéines différentes et sont détaillés ci-après.

Les protéines de la famille Argonaute (AGO) sont des composants clés du miRISC. Chez les mammifères il existe 4 protéines AGO (AGO1 à AGO4). Suivant la protéine AGO présente dans le complexe miRISC et le niveau d'hybridation entre le miARN et sa cible, la fonction d'inhibition de l'expression génique ne sera pas exercée de la même façon (***Figure 7***). Bien que plus rare chez les animaux que chez les plantes (Krol et al., 2010), une hybridation parfaite entre l'ARNm et les 22 nucléotides du miARN peut avoir lieu. Dans ce cas, la protéine AGO2 est recrutée (Juvvuna et al., 2012) et la fonction réalisée par cette protéine sera un clivage endonucléolytique de l'ARNm cible (Liu et al., 2004). Les protéines AGO1, 3 ou 4, sont incapables de réaliser le clivage. Dans le cas d'une hybridation imparfaite, le clivage n'est pas effectué et la fonction réalisée sera alors une répression de la traduction ou une dé-adénylation. Ces mécanismes mis alors en place seront détaillés dans la suite de ce paragraphe. Ainsi, quelque soit le complexe miRISC formé, une inhibition spécifique de la traduction de l'ARNm a lieu.

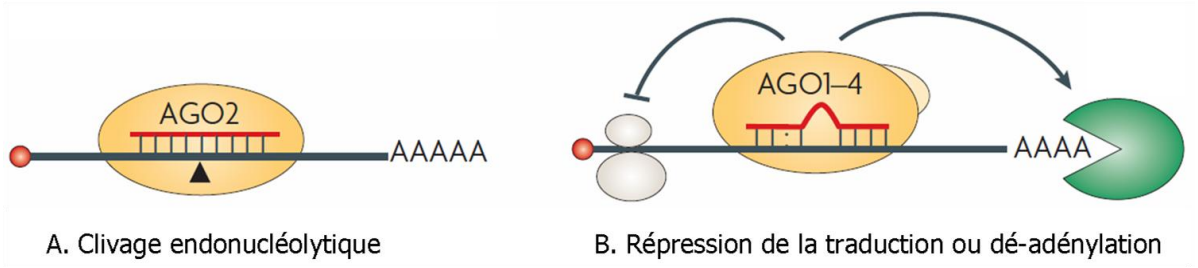


Figure 7 : Complexes miRISC et mécanismes d'action
(Filipowicz et al., 2008)
Lors d'un appariement miARN-ARNm parfait, la protéine AGO2 est recrutée dans le complexe miRISC et l'ARNm cible subira un clivage (A). Dans le cas d'un mésappariement dans le complexe miARN-ARNm, les protéines AGO1 à 4 sont recrutées et déclenchent une répression de la traduction (B).

A ce jour, les études ont clairement défini les différentes étapes de la biogénèse des miARN. Des débats persistent néanmoins quant à leur mode d'action pour la répression de l'expression des gènes dans le cas d'une hybridation imparfaite du miARN sur sa cible. Ainsi différents modèles concernant ce mode d'action des miARN, controversés, émergent de la littérature (Valencia-Sanchez et al., 2006; Nilsen, 2007; Eulalio et al., 2008; Filipowicz et al., 2008; Chekulaeva and Filipowicz, 2009) (***Figure 8***).

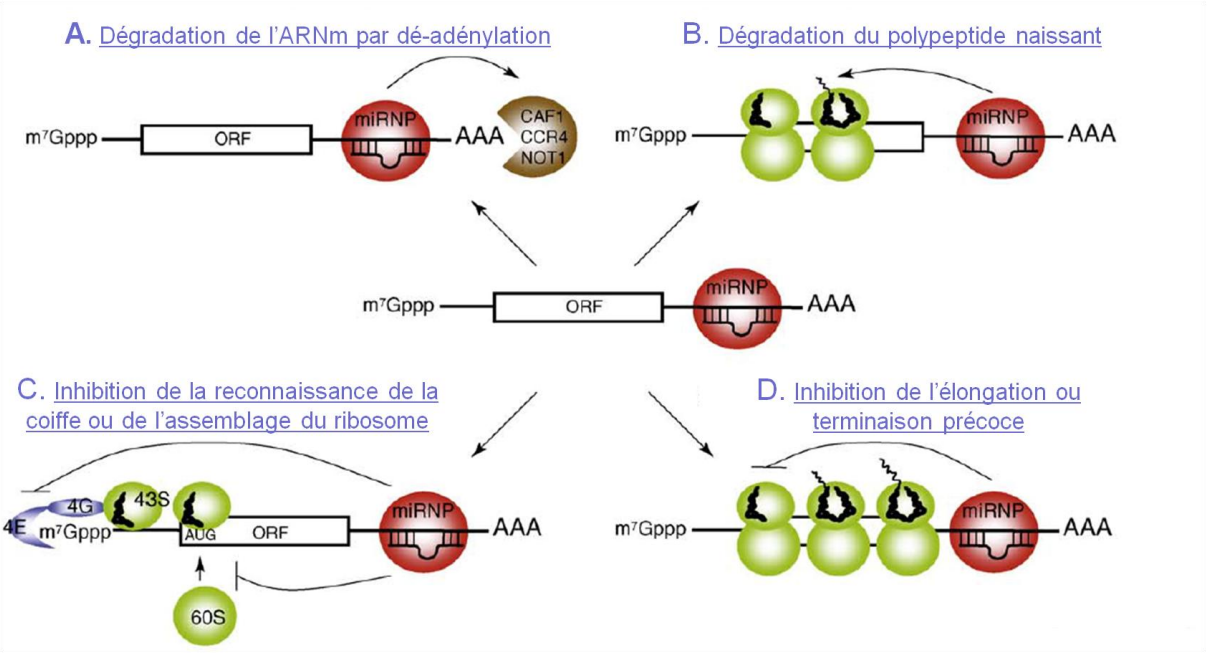


Figure 8 : Mécanismes possibles de la répression traductionnelle par le complexe miRISC (ou miRNP)
(d'après (Chekulaeva and Filipowicz, 2009))
La répression traductionnelle peut être le résultat de 4 mécanismes d'action (A, B, C et D) faisant suite à l'hybridation spécifique d'un miARN sur l'ARNm cible.
CAF1, CCR4 et NOT1 sont des dé-adénylases.

Ces différents modes d'action concernent :

- La dé-adénylation et la dégradation de l'ARNm cible :

Ce mécanisme suggère que les miARN provoqueraient une dégradation de leur ARNm cible. Pour étayer cette théorie, des études montrent que la présence du miARN spécifique diminue la quantité d'ARNm cible dans la cellule (Lim et al., 2005). Une hypothèse propose que la déstabilisation de l'ARNm soit une conséquence de la dé-adénylation de celui-ci par des complexes de dé-adénylases (***Figure 8 A***).

- L'inhibition de la traduction :

Des études suggèrent une inhibition par les miARN au niveau de l'initiation de la traduction, soit au niveau de l'assemblage des ribosomes, soit au niveau de la reconnaissance de la coiffe. Les miARN joueraient un rôle inhibiteur pour le recrutement des eIF et pour la circularisation de l'ARNm requis pour l'initiation de la traduction (Humphreys, 2005) (***Figure 8 C***). Dans la seconde hypothèse, l'inhibition de la traduction par les miARN serait un mécanisme coiffe-dépendent.

A l'inverse, d'autres études chez *Caenorabditis elegans* montrent que la régulation des ARNm par les miARN a lieu en présence de polysomes, et dans ce cas, l'effet aurait lieu après l'étape d'initiation de la traduction (Seggerson et al., 2002). Des études suggèrent même que l'action des miARN serait de réprimer la traduction après l'étape d'élongation de la traduction et avant la terminaison (Petersen et al., 2006) (***Figure 8 D***).

Une troisième hypothèse concernant l'inhibition de la traduction propose la dégradation du polypeptide en formation (***Figure 8 B***) sans pour autant avoir mis en évidence une protéase responsable de cette dégradation.

- La séquestration de l'ARNm cible :

D'autres approches mettent en avant le rôle des P-bodies (Processing bodies) dans la répression exercée par les miARN. Les P-bodies sont des agrégats impliqués dans la machinerie de dégradation des ARNm (Parker and Sheth, 2007) importante pour la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Des enzymes permettant la dégradation de la coiffe (Cougot, 2004), des dé-adénylases et des exonucléases (Parker and Sheth, 2007) ont été co-localisées avec les P-bodies. De plus, il est intéressant de constater que les protéines AGO impliquées dans l'ARNi sont également retrouvées dans ces corps cytoplasmiques (Valencia-Sanchez et al., 2006). Il semblerait donc que, selon ce modèle, les miARN seraient impliqués dans le déclenchement de la dégradation de l'ARNm grâce aux enzymes présentes dans les P-bodies.

Bien que l'existence de ces différents mécanismes ne soit pas remise en cause, les données les plus récentes montrent que la dé-adénylation apparaît comme le processus prédominant dans l'inhibition de l'expression génique. De façon plus détaillée, la protéine GW182 jouerait un rôle central. Cette protéine fait partie du complexe miRISC et possède des domaines de liaison (riches en glycine et tryptophane) aux protéines AGO (Lian et al., 2009; Takimoto et al., 2009). Le rôle mécanistique de GW182 semble relativement bien concervé dans l'évolution (Chekulaeva et al., 2011). Chez les mammifères, la dé-adénylation fait intervenir différents complexes comme le complexe CCR4-CAF1-NOT. La protéine GW182 interagit avec les protéines PABP (polyadenylate-binding protein) (Jinek et al., 2010;

Huntzinger et al., 2012), elles-mêmes associées à la queue polyA de l'ARNm. L'association entre les PABP et la queue polyA entraîne le rapprochement des extrémités de l'ARNm (Cf. 1.2.1.). Ainsi, GW182 pourrait interférer avec cette « circularisation » et déclencher la dé-adénylation de l'ARNm cible (Chekulaeva et al., 2011). En effet, GW182 interagit également avec des dé-adénylases, notament celles présentes dans le complexe CCR4-CAF1-NOT. De plus, ce complexe est recruté indépendamment de l'interaction de GW182 avec les protéines PABP (Fabian et al., 2011). Il semblerait donc que GW182 joue un rôle central dans la dé-adénylation de l'ARNm cible ayant pour effet direct la régulation de l'expression des gènes (Braun et al., 2011).

1.2.3.3. Potentiel thérapeutique

Depuis la découverte des ARN interférents et de leur potentiel inhibiteur, l'ARNi apparaît comme une stratégie révolutionnaire pour réguler l'expression de gènes spécifiques d'organismes eucaryotes. Utiliser les ARN interférents semble donc être une voie intéressante pour inhiber l'expression génique expérimentalement.

La première technologie d'ARNi destinée aux cellules de mammifères a reposé sur l'utilisation de siARN synthétiques (Elbashir et al., 2001) et la première démonstration *in vivo* a été réalisée par injection hydrodynamique chez la souris (McCaffrey et al., 2002). Les siARN présentent cependant certaines limitations pour leur utilisation *in vivo*, comme leur sensibilité aux nucléases plasmatiques et leur courte demi-vie (Wang et al., 2011). Il est donc nécessaire d'optimiser ces techniques, comme par exemple en réalisant des modifications chimiques visant à augmenter la stabilité des siARN *in vivo*. En parallèle, l'utilisation des shARN apparaît aussitôt comme une stratégie alternative aux siARN pour prolonger dans le temps l'inhibition génique (Esau and Monia, 2007). Le shARN a une structure en épingle à cheveux (ou tige-boucle). Sa transcription a lieu dans le noyau à partir d'un vecteur d'expression. Les propriétés du promoteur utilisé déterminent activement l'efficacité du shARN. Initialement, les promoteurs utilisés pour la synthèse des shARN étaient dépendants de l'ARN polymérase III (U6 et H1 par exemple) mais à cause de leur manque de spécificité spatiale (expression ubiquitaire), l'utilisation de promoteurs dépendants de l'ARN polymérase II est désormais privilégiée. De nombreuses études montrent l'utilisation possible des siARN et shARN comme agents thérapeutiques dans le traitement de tumeurs et de métastases en ciblant par exemple des oncogènes ou la voie angiogénique. Cependant, malgré la grande spécificité des shARN, des phénomènes de saturation de la voie endogène de l'ARNi peuvent intervenir et remettre en cause l'efficacité et l'innocuité de cette méthode (Grimm et al., 2006).

L'engouement concernant l'utilisation des miARN comme outils thérapeutiques est né dès la mise en évidence du rôle fondamental de ces molécules dans la régulation de l'expression du génome. En effet, l'expression aberrante des miARN est à l'origine de nombreuses maladies, y compris les cancers (Shi et al., 2008; Deiters, 2010) (***Tableau 1***).

Cancer	miRNA	Selected targets	Presumed target function
Brain	miR-21↑	TPM1, PDCD4	Tumor suppressors
	miR-221↑	$p27^{kip1}$	Tumor suppressor, cell cycle inhibitor
	miR-378↑	Sufu, Fus-1	Tumor suppressors
Thyroid	miR-138↓	hTERT	Oncogenic activity
	miR-221/222↑	$p27^{kip1}$	Tumor suppressor, cell cycle inhibitor
Breast	miR-10b↑	HOXD10	Inhibition of breast cancer metastasis
	miR-21↑	TPM1, PDCD4	Tumor suppressors
	miR-27a↑	ZBTB10, Myt1	Tumor suppressors
	miR-125a/b↓	HER2, HER3	Oncogenes, EGF receptor family members
	miR-206↓	ERα	Promoter of cell proliferation
Lung	let-7/miR-98↓	HMGA2, RAS, c-Myc	Oncogene, related to metastasis, promoter of carcinogenesis
	miR-29↓	DNMT3A/B	Oncogenic activity, DNA methyltransferase
	miR-34↑	Bcl2	Anti-apoptotic factor, promoter of proliferation
	miR-221/222↑	$p27^{kip1}$	Cell cycle inhibitor, cell growth inhibitor
Liver	miR-21↑	PTEN	Tumor suppressor, negative regulation of PI3k
	miR-122↓	Cyclin G, Bcl-w	Anti-apoptotic factor
Biliary	miR-21↑	PTEN	Tumor suppressor, negative regulation of PI3k
	miR-29↓	Mcl-1	Oncogene, anti-apoptotic factor
Pancreas	miR-155↑	TP53INP1	Induction of growth arrest, apoptosis
Colon/rectum	miR-143↓	ERK5	Promoter of cell growth and proliferation
	miR-145↓	IRS1	Oncogene, strong mitogenic activity
Prostate	miR-20a↓	E2F1, E2F3, E2F3	Pro-apoptotic factors, regulation of cell cycle
	miR-125b↓	Bak1	Pro-apoptotic factors, induction of apoptosis
	miR-126↓	SLC45A3	Oncogene
	miR-221/222↑	$p27^{Kip1}$	Tumor suppressor, cell cycle inhibitor
Bladder	miR-127↓	BCL6	Proto-oncogene, suppression of p53
Testis	miR-372/373↑	LATS2	Tumor suppressor
Ovarian	let-7/miR-98↓	HMGA2, RAS, c-Myc	Oncogene, related to metastasis, promoter of carcinogenesis
	miR-210↓	E2F3	Pro-apoptotic factor, regulation of cell cycle
	miR-214↑	PTEN	Tumor suppressor, negative regulation of PI3k
Cervix	miR-218↓	LAMB3	Promoter of cell migration and tumorigenicity
Lymphoma	miR-143↓	ERK5	Promoter of cell proliferation and cell growth
Leukemia	miR-15/16↓	Bcl2	Anti-apoptotic factor, promoter of cell growth
	miR-29/181↓	Tcl1	Oncogene, co-activator of the Akt oncoprotein
	miR-221/222↑	Kit	Proto-oncogene, tyrosine-protein kinase

Tableau 1 : Dérégulation de l'expression des miARN et cancer
(Deiters, 2010)
Dans ce tableau figurent quelques exemples de miARN surexprimés (symbolisé par ↑) ou sous-exprimés (symbolisé par ↓) dans différents cancers par comparaison aux tissus sains.

Contrairement aux siARN, les stratégies proposées s'orientent davantage vers la régulation des miARN eux-mêmes que vers l'utilisation des miARN pour réguler leurs gènes cibles. Ainsi, ces stratégies proposent une restauration de l'expression défectueuse d'un miARN ayant des caractéristiques de suppresseur de tumeur ou l'inhibition de l'expression d'un miARN surexprimé dans un cancer (appelé oncomiR) grâce à des stratégies antisens ou agissant directement sur sa biogénèse. Néanmoins, la stratégie visant à inhiber un gène surexprimé, en utilisant un miARN plutôt qu'un siARN ou un shARN, peut également être envisagée. Une cassette artificielle d'un miARN peut être placée sous la dépendance transcriptionnelle d'un promoteur dépendant de la polymérase II. Cette stratégie offre un grand choix de promoteurs et permet d'envisager des expressions tissus-spécifiques ou inductibles.

1.3. Contrôle de l'expression d'un transgène

1.3.1. Utilisation de promoteurs inductibles

Le promoteur est une courte séquence d'ADN qui est généralement situé en amont du gène dont il contrôle l'expression, notamment en régulant sa transcription. L'activité du promoteur est elle-même régulée, soit en *cis* c'est-à-dire qu'elle tient compte de la séquence même du promoteur, soit en *trans* et dans ce cas on parle de régulation par des facteurs de transcription (protéine nécessaire à l'initiation de la transcription). Un promoteur est défini comme étant inductible si son activation est contrôlable par un composé défini, nommé activateur, ou par une condition environnementale particulière. L'utilisation de tels promoteurs dans la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques permet d'obtenir l'expression d'un transgène à un endroit précis et / ou à un moment voulu. Dans des conditions optimales, un promoteur inductible présente l'avantage de contrôler à la fois spatialement et temporellement l'expression d'un transgène. Les promoteurs inductibles constituent donc des outils intéressants pour les thérapies géniques qui requièrent de maîtriser la localisation, la durée et le niveau d'expression d'un transgène.

Dans le cas d'une méthode de transfert de gènes efficace (Cf. 1.4.) c'est-à-dire qu'elle cible spécifiquement et efficacement l'adressage d'un transgène à des cellules d'intérêt, l'utilisation de promoteurs ubiquitaires (comme CMV, CAG et EFIα) peut être envisagée. Dans le cas contraire, beaucoup de systèmes de régulation de l'expression des gènes basés sur l'utilisation de promoteurs inductibles ont été développés. Ils peuvent être naturels ou synthétiques. Le système le plus utilisé dans la littérature aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, est le système dépendant de l'antibiotique tétracycline (ou de son dérivé : la doxycycline) avec des applications possibles en thérapie génique et dans l'élaboration d'animaux transgéniques (Shockett et al., 1995). Ce système utilise le facteur de transcription tTA qui permet d'induire l'expression du transgène placé sous le contrôle du promoteur P_{tet} en l'absence de tétracycline. Lorsque l'antibiotique est ajouté, le facteur de transcription pert sa capacité de liaison à la séquence promotrice ce qui conduit à une répression de l'expression du transgène. Ce système nommé Tet-Off existe également sous sa variante Tet-On pour laquelle le facteur de transcription a été muté (nommé rtTA) pour excercer son rôle de facteur de transcription seulement en présence de tétracycline. Ce système comporte l'avantage d'être efficace et réversible, cependant l'activation du transgène *in vivo* ne peut se faire de façon localisée.
Le contrôle de la transcription d'un transgène peut être réalisé en utilisant des promoteurs tissus-spécifiques, stade développemental-spécifiques ou encore régulés par le cycle cellulaire. D'autres promoteurs peuvent également être activés par différents signaux environnementaux comme l'hypoxie, les radiations, la chimiothérapie, une infection virale ou un choc thermique (Guo et al., 2008), notament le promoteur Hsp70B dont les caractéristiques seront détaillées ci-dessous.

1.3.2. Un système thermo-inductible

1.3.2.1. La réponse au choc thermique

L'adaptation des cellules aux conditions environnementales est nécessaire à leur survie. Ainsi, les cellules disposent de divers mécanismes afin de détecter et répondre efficacement à une condition de stress donnée. Dans la suite de ce manuscrit, nous focaliserons notre attention sur une réponse cellulaire induite face à un choc thermique en présentant les protéines dites de choc thermique nommées HSP (Heat Shock Proteins). Cette réponse peut être induite par divers facteurs de stress environnementaux (choc thermique, métaux lourds, oxydants…), de stress d'origine pathologique (infection, inflammation, ischémie…) et en condition normale (développement, différenciation, cycle cellulaire…) (Morimoto, 1998).

Chez les eucaryotes, le stress cellulaire dû à une température excessive engendre la synthèse de protéines HSP. Cette réponse au stress fut initialement décrite en 1962 par Ritossa chez la drosophile (Ritossa, 1996). Elle a été conservée au cours de l'évolution (Brocchieri et al., 2008). Le choc thermique, comme d'autres causes de stress, provoque une altération de la structure des protéines qui conduit à leur agrégation. Les protéines HSP, grâce à leur rôle de chaperon, permettent d'inhiber l'agrégation des protéines mal conformées. Elles sont localisées dans différents compartiments cellulaires tels que le cytoplasme, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le noyau (Kregel, 2002).

Il existe 6 catégories de protéines HSP nommées en fonction de leur poids moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites HSP (ou sHSP pour small HSP) (Morimoto and Santoro, 1998). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons essentiellement aux HSP70 regroupées selon 11 gènes chez l'Homme (Tavaria et al., 1996) (***Tableau 2***). La classification des protéines HSP est complexe au vu du grand nombre de noms différents donnés successivement à la même protéine ou à un même gène dans la littérature.

Locus symbol	Site	Alternative names
HSPA1A	6p21.3	Hsp70,Hsx70,HSP72, Hsp70i, Hsp70–1
HSPA1B	6p21.3	Hsp70–2
HSPA1L	6p21.3	Hsp70-Hom, Hsp70t
HSPA2A	14q22	Hsp70–3
HSPA2B	14q24.1	Hsp70–3
HSPA3	21(?)	-
HSPA4	5q31.1	Hsp70RY
HSPA5	9q34	BiP, GRP78
HSPA6	1q	Hsp70–6, Hsp70B'
HSPA7	1q	Hsp70–7, Hsp70B
HSPA8	11q24	HSC70, HSP73
HSPA9	?	GRP75, PBP74, mtHSP75

Tableau 2 : Les gènes de la famille HSP70 chez l'Homme
(adapté de (Tavaria et al., 1996))
Le symbole du locus de chaque gène hsp70 est indiqué par la nomenclature HSPAx où A désigne le membre et x le locus.

Un choc thermique peut altérer la structure tri-dimensionnelle d'une protéine et, par conséquent, affecter ses fonctions cellulaires. Pour maintenir l'intégrité structurale des protéines, la cellule dispose notamment des protéines HSP70. Ces protéines sont dépendantes de l'ATP et sont des chaperons moléculaires essentiels assurant le repliement des protéines mal conformées, évitant ainsi leur agrégation dans la cellule. Si, malgré l'intervention des protéines HSP, le bon repliement des protéines n'a pu être réalisé, elles seront alors éliminées par les systèmes de dégradation cellulaire. Ces contrôles qualité sont stimulés en condition de stress mais possèdent aussi une activité constitutive basale permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire.

La réponse au choc thermique est déclenchée par l'activation de facteurs de transcription nommés heat shock factor (HSF). Ces derniers activent la transcription des gènes hsp en reconnaissant des motifs particuliers, nommés HSE (heat shock elements), présents au niveau du promoteur des gènes hsp. L'activation transcriptionnelle par les HSF se fait grâce à leur capacité de liaison à l'ADN. Le facteur HSF1 est le principal acteur de la réponse au stress chez les vertébrés (Shamovsky and Nudler, 2008). A l'état basal, la quasi-totalité des HSF1 font parti de complexes protéiques constitués de chaperons et co-chaperons comme HSP70. A la suite d'un stress, la mobilisation de HSP70 pour intervenir auprès des protéines endommagées déstabilise le complexe et libère HSF1 qui se trimérise (conformation active) et migre pour s'accumuler rapidement dans le noyau. HSF1 trimérique phosphorylé reconnaît les HSE. Il s'en suit une activation de la transcription des gènes hsp, ce qui augmente la traduction des protéines HSP70. La néosynthèse d'HSP70 permet, à terme, grâce à son interaction avec HSF1 trimérisé, d'abolir sa propre activation transcriptionnelle (***Figure 9***).

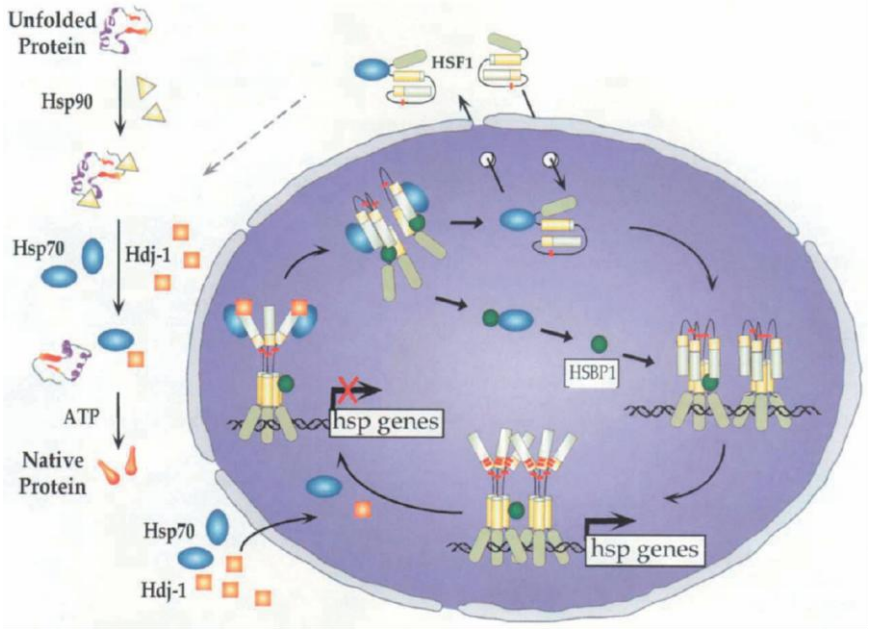


Figure 9 : Régulation de la réponse au choc thermique
(Morimoto and Santoro, 1998)
Un stress cellulaire entraîne la mobilisation de protéines chaperons HSP90, Hdj-1 et HSP70 pour conserver l'intégrité des protéines de la cellule. Cette mobilisation des protéines HSP engendre la libération des HSF dont HSF1 est l'acteur principal (inhibition de l'interaction entre HSP70 et HSF1). Le facteur de transcription HSF1, une fois trimérisé et phosphorylé, devient actif et migre au noyau. Ainsi, HSF1 reconnait les HSE et permet l'activation de la transcription des gènes hsp. Cette néosynthèse de protéines HSP, dont HSP70, permet le piégeage des HSF1 et ainsi l'arrêt de la transcription des gènes hsp.

Cette boucle de régulation des protéines HSP70 en réponse au stress est également modulable en fonction de l'intensité du stimulus.

Les protéines HSP70 sont les membres de la famille les plus sensibles au choc thermique. Ce sont les caractéristiques de dose-réponse et d'activation inductible qui font des protéines HSP70 un outil intéressant, utilisable comme biomarqueur de la cytotoxicité (Kregel, 2002).

La réponse au stress par les protéines HSP70 peut être augmentée dans le cas de la thermo-tolérance. Ce phénomène est défini comme étant la capacité d'une cellule ou d'un organisme à devenir résistant face à un choc thermique après une première exposition au stress (Mizzen and Welch, 1988; Kregel, 2002). Ce phénomène est dépendant de la sévérité du premier stress reçu. En effet, plus l'intensité du choc thermique est forte, plus les phénomènes de thermo-tolérance seront intenses et durables. L'accumulation des protéines HSP après le stress cellulaire est le résultat de la réponse au choc thermique, et l'activité protectrice de ces protéines chaperons expliquerait seulement en partie ce phénomène de thermo-tolérance encore mal connu (Moseley, 1997; Nollen et al., 1999). La thermo-tolérance est un processus différent du phénomène d'acclimatation à la température qui permet à l'organisme de s'adapter à l'augmentation de la température environnante. Cette capacité d'acclimatation a été montrée comme influençant la réponse au choc thermique. En effet, une

étude réalisée sur des cellules de fibroblastes humains provenant de 2 populations de sujets vivants dans des climats environnementaux très différents a montré une différence de réponse de ces cellules face au choc thermique (Lyashko et al., 1994).

1.3.2.2. Le promoteur Hsp70B

1.3.2.2.1. Description

Le stress à l'origine de l'activation de la réponse médiée par les protéines HSP70 peut être une augmentation de la température (hyperthermie), l'hypoxie, l'ischémie, la présence de radicaux libres, … (Kregel, 2002). Ce stress déclenche la mobilisation des protéines HSP70 et permet l'action des HSF1. Ces facteurs de transcription reconnaissent des motifs HSE se trouvant dans les séquences promotrices des gènes hsp70. La reconnaissance de ces motifs et la présence d'une boîte TATA, élément *cis*-régulateur permettant la reconnaissance avec l'ARN polymérase, déclenchent l'activation de la transcription de l'ARNm Hsp70 (Kregel, 2002).

Le promoteur Hsp70B est un membre de la famille des promoteurs des gènes hsp70. C'est le promoteur du gène hsp70B localisé sur le bras long du chromosome 1 chez l'Homme au locus nommé HSPA7 (Tavaria et al., 1996). Il possède 3 motifs HSE. Le promoteur Hsp70B est activable par une hyperthermie, il est donc considéré comme un promoteur thermo-inductible. De par son caractère inductible, ce promoteur peut être utilisé pour contrôler l'activation transcriptionnelle d'un transgène ou d'un gène rapporteur.

Ce promoteur est interchangeable, c'est-à-dire qu'il est utilisable dans l'espèce eucaryote dont il provient mais également dans d'autres espèces eucaryotes. De plus, son activation n'est pas dépendante de l'espèce à partir de laquelle il a été isolé mais de l'environnement dans lequel il se trouve (Rome et al., 2005).

Le promoteur Hsp70B offre l'avantage d'avoir un faible niveau basal et une forte activité après activation (Smith et al., 2002; Eker et al., 2011; Deckers et al., 2012). En effet, des études ont montré une activité 1 000 fois supérieure au niveau basal après l'activation du promoteur Hsp70B contrôlant l'expression d'un gène rapporteur codant pour la GFP (Huang et al., 2000; Li and Dewhirst, 2002).

1.3.2.2.2. Activation contrôlée dans le temps et dans l'espace

L'activation du promoteur Hsp70B est réalisable par une élévation thermique. Si l'hyperthermie est localisée, l'expression du gène sous la dépendance d'Hsp70B est contrôlée spatialement.

Plusieurs méthodes physiques permettent des élévations de température et l'activation du promoteur Hsp70B. Les radiofréquences et les lasers (Ramos et al., 2006) sont des techniques utilisables pour activer le promoteur. Ces méthodes employées en clinique sont cependant invasives.

Les ultrasons focalisés sont non invasifs et ont également été utilisés afin d'activer localement le promoteur Hsp70B *in vivo*. De plus, l'utilisation des ultrasons permet d'accéder aux tissus profonds. L'énergie mécanique déposée par les ultrasons se propage dans le tissu.

La focalisation des ultrasons est réalisable grâce à l'utilisation de transducteurs permettant de faire converger le faisceau ultrasonore en un point focal. En clinique, les ultrasons focalisés sont utilisés pour la thermo-ablation. L'absorption des ultrasons par les tissus permet la conversion de cette énergie en chaleur par un phénomène de friction. Afin de contrôler précisément la température au point focal, le laboratoire IMF (Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle, Bordeaux) dans lequel nous avons initié ce travail, a développé une technologie de monitorage en temps réel de la température par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). La cartographie thermique du tissu chauffé est mesurée en temps réel et l'ajustement de la puissance ultrasonore est asservi par rétro-contrôle automatique. Cette technique permet une précision de chauffage de l'ordre de 1°C dans des volumes de 1 x 1 x 3 mm, de sorte que le dépôt de chaleur reste restreint aux cellules ciblées (Guilhon et al., 2003; Deckers et al., 2009; Eker et al., 2011) sans affecter les cellules voisines (Rome et al., 2005).

Pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo* chez la souris, il est possible d'activer le promoteur Hsp70B avec de l'eau chaude. Pour une activation chez l'animal, son corps ou ses membres sont immergés dans un bain-marie. Cette technique ne permet pas d'obtenir un contrôle spatial mais elle est simple à mettre en œuvre et reproductible.

L'activation du promoteur Hsp70B est dépendante du dépôt de chaleur, elle varie en fonction de l'élévation de température et de la durée du chauffage qui déterminent la dose thermique. Chez les mammifères (homéothermes), l'expression génique contrôlée par le promoteur Hsp70B peut être décrite par la relation d'Arrhénius aussi bien *in vitro* (Hundt et al., 2007) qu'*in vivo* (Deckers et al., 2012) pour des températures comprises entre 43 et 46°C. Cette loi tient compte du fait que certaines réactions sont plus rapides lorsque la température s'élève. Donc dans le cas du promoteur thermo-inductible, la température à laquelle est activé le promoteur et la durée du chauffage sont liées. Plus la température d'induction est basse, plus il sera nécessaire de chauffer longtemps et inversement. Ainsi, le niveau d'expression devient prévisible et modulable par l'expérimentateur (Rome et al., 2005; Deckers et al., 2012). Cette caractéristique représente un véritable atout pour la perspective de protocoles de thérapie génique car, en plus d'être activable de façon contrôlée dans le temps et dans l'espace, le promoteur permet de doser l'expression du gène thérapeutique. Le promoteur Hsp70B apparaît donc comme un outil de choix dans le contrôle spatial et temporel de l'activation de l'expression d'un gène.

1.4. L'électroporation : une méthode d'adressage efficace *in vivo*

L'introduction du matériel génétique à visée thérapeutique peut être réalisée par différentes méthodes : chimiques, physiques ou virales. Ces méthodes doivent répondre à des critères précis tels que la spécificité du ciblage des cellules ou l'efficacité de l'adressage du transgène. Après avoir décrit les caractéristiques de ces méthodes, le principe de l'électroporation *in vivo* et ses applications seront détaillés.

1.4.1. Généralités

Il existe plusieurs méthodes d'adressage permettant l'entrée de la molécule thérapeutique dans les cellules cibles. Elles sont classées en fonction du procédé qu'elles font intervenir. Il existe des méthodes virales, chimiques ou physiques.

Les méthodes virales reposent sur l'utilisation de rétrovirus, d'adénovirus, de virus associés aux adénovirus (AAV) ou de lentivirus pour permettre l'entrée par endocytose du transgène dans la cellule hôte. Ces vecteurs assurent une expression du transgène de longue durée si ce dernier s'est inséré correctement dans le génome de la cellule hôte. Cependant, ces méthodes souffrent de quelques limitations telles que la taille de l'ADN transféré (< 10 Kb). De plus, des risques sont également associés à cette technique, tels que, la possibilité de recombinaison du virus administré avec un virus sauvage, des réactions immunitaires induites par les protéines de l'enveloppe virale ou l'insertion aléatoire dans le génome.

Les méthodes chimiques reposent sur l'utilisation de lipides cationiques, de polymères cationiques ou de systèmes hybrides de polymères lipidiques, entre autres, pour « complexer » et faciliter la pénétration intracellulaire des acides nucléiques.

Les méthodes physiques font, quant à elles, appel à divers procédés tels que l'injection d'ADN nu, le gène gun (ou bombardement de microparticules), l'électroporation, les ultrasons ou l'injection hydrodynamique. Le ***Tableau 3*** liste les principales méthodes physiques disponibles et résume leurs limites et avantages respectifs.

Method	Route of Gene Delivery	Advantages	Limitations
Needle injection	Intratissue	Simplicity and safety	Low efficiency
Gene gun	Topical	Good efficiency	Tissue damage in some applications
Electroporation	Topical Intratissue	High efficiency	Limited working range; need for surgical procedure for nontopical applications
Hydrodynamic delivery	Systemic Intravascular	High efficiency, simplicity, effectiveness for liver gene delivery	Extremely effective in small animals; surgical procedure may be needed for localized gene delivery
Ultrasound	Topical Systemic	Good potential for site-specific gene delivery	Low efficiency in vivo

Tableau 3 : Limites et avantages des méthodes physiques d'adressage in vivo de matériel génétique
(adapté de (Gao et al., 2007))

L'électroporation, outre sa simplicité de mise en œuvre, est une méthode d'adressage d'un transgène efficace aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Le principe et les applications de cette technique sont présentés dans les paragraphes suivants.

1.4.2. Principe de l'électroporation

L'électroporation (EP), consiste à perméabiliser transitoirement la membrane cellulaire à l'aide d'un courant électrique afin d'assurer l'entrée de molécules dans les cellules perméabilisées. Cette perméabilisation permet aux acides nucléiques et à d'autres molécules de franchir la barrière sélective que constitue la membrane plasmique. L'EP, aussi appelée électroperméabilisation ou électrotransfert, est une méthode physique efficace, utilisable en clinique, pour l'adressage d'un transgène à une cellule ou à un tissu. Elle est de fait compatible aux stratégies de la thérapie génique.

Le transfert de gènes par EP a été réalisé pour la première fois dans des cellules de mammifères (Neumann et al., 1982) puis largement appliqué à différentes cellules procaryotes et eucaryotes. A l'heure actuelle, l'électroporation est couramment utilisée, entre autres, pour la transformation bactérienne dans les laboratoires.

L'efficacité de l'EP *in vivo* a été démontrée par l'électrotransfert de gènes dans la peau chez la souris (Titomirov et al., 1991). De nombreux travaux relatent par la suite de l'efficacité de cette méthode sur différents tissus (Murakami and Sunada, 2011) comme sur la peau (Heller et al., 2001; Maruyama et al., 2001), sur le muscle squelettique (Mir et al., 1999; Bureau et al., 2000; Vicat et al., 2000; Fattori et al., 2002), dans des tumeurs solides chez la souris (Bettan et al., 2000; Cemazar et al., 2002, 2009), dans des zones cérébrales de jeunes rats (Akaneya et al., 2005) ou dans le foie chez le rat (Heller et al., 1996).

Les mécanismes intervenant dans l'EP *in vivo* d'acides nucléiques ne sont, à ce jour, pas complètement résolus (Chen et al., 2006; Murakami and Sunada, 2011). En effet, plusieurs modèles sont décrits pour le passage de l'ADN au travers de la membrane plasmique impliquant ou non des structures nommées « électropores » (Mir, 2001). C'est face à la difficulté d'expliquer le caractère transitoire de ces pores membranaires que résident des divergences d'opinions (Mir et al., 2005). Cependant, il est toutefois bien admis que l'électroporation consiste en une succession d'étapes déterminantes pour l'introduction du matériel génétique dans la cellule. A la suite de l'induction d'un champ électrique sur une zone définie, la membrane plasmique des cellules, déstabilisée, devient donc perméable temporairement et de façon réversible. L'ADN, préalablement injecté au niveau de cette zone, va suivre une migration électrophorétique qui lui permettra d'être acheminé au voisinage de la membrane plasmique puis de pénétrer dans le cytoplasme. Il subira par la suite une migration intra-cellulaire qui lui permettra d'être transloqué au noyau. C'est grâce à cette suite d'évènements que l'ADN pourra être exprimé dans la cellule (***Figure 10***).

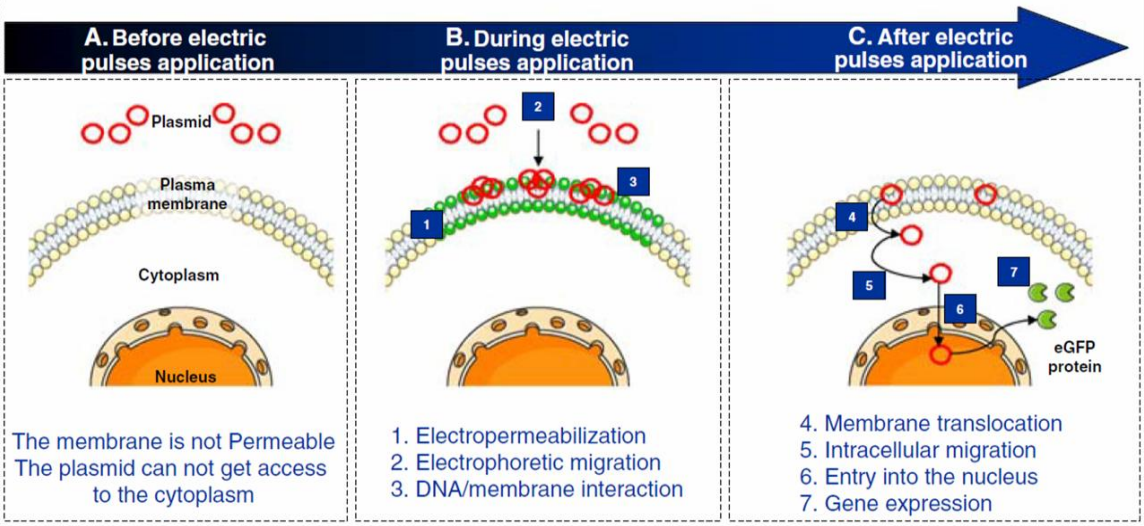


Figure 10 : L'électroporation d'ADN : un processus multi-étapes
(Escoffre et al., 2009)
***A**. Avant l'application d'un courant électrique, la membrane plasmique est une barrière imperméable aux plasmides présents dans le milieu extra-cellulaire.*
***B**. Le courant électrique appliqué permet une électro-perméabilisation de la membrane (en vert) et une migration électrophorétique des plasmides qui interagissent avec la membrane.*
***C**. Après l'électroporation, l'ADN migre dans le cytoplasme de la cellule puis est transloqué jusqu'au noyau où il pourra être exprimé par la machinerie cellulaire (production de la protéine eGFP sur le schéma).*

Au repos, la distribution des différentes charges positives ou négatives de la membrane plasmique ainsi que la distribution des ions entraînent une différence de potentiel membranaire. L'application d'un champ électrique sur une cellule provoque un changement de ce potentiel transmembranaire (André and Mir, 2004) nommé ΔV. Celui-ci dépend de plusieurs paramètres comme la forme de la cellule (f), son rayon (r), le facteur lié aux conductivités de la cellule et du milieu ($g(\lambda)$), le champ électrique (E) et l'angle entre la direction du champ et la normale au point considéré sur la membrane (θ), suivant la formule : $\Delta V = f\, g(\lambda)\, r\, E \cos\theta$ (Golzio et al., 2004; Mir et al., 2005) (***Figure 11***).

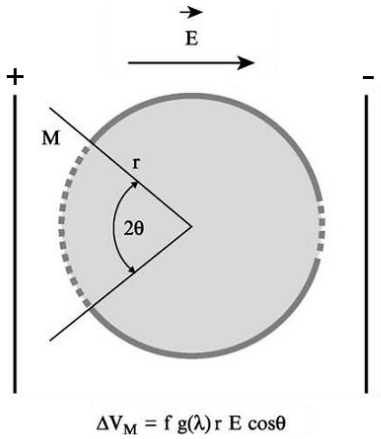


Figure 11 : Effet de l'application d'un champ électrique sur cellule vivante
(Mir et al., 2005)
En pointillés sont représentées les parties de la membrane plasmique perméabilisées grâce au champ électrique (E) qui induit une variation du potentiel transmembranaire ΔV_M au point M à la surface de la cellule. L'anode et la cathode sont représentées par les symboles + et – respectivement.

Cette variation du potentiel transmembranaire n'est pas uniforme à la surface de la cellule. Le potentiel transmembranaire induit atteint son maximum aux points de la cellule face aux électrodes (***Figure 12***). De plus, la différence de potentiel induite est directement proportionnelle à la taille de la cellule et à l'intensité du champ électrique appliqué.

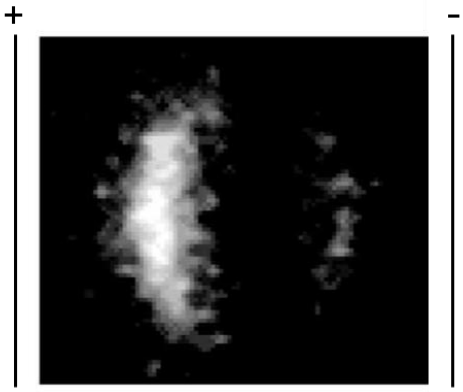


Figure 12 : Intégrité de la membrane d'une cellule vivante après l'application d'un champ électrique et asymétrie de la variation du potentiel transmembranaire
(Gabriel and Teissié, 1997; Mir et al., 2005)
Image 40 ms après l'application d'un courant électrique (1 impulsion de 20 ms à 1 kV / cm) sur une cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) en suspension dans un milieu contenant de l'iodure de propidium. L'anode et la cathode sont représentées par les symboles + et – respectivement. Une hyperpolarisation de la membrane est constatée du côté anode.

Les procédures de stimulation électrique : nombre, durée, voltage / intensité et fréquence des impulsions électriques ont été largement étudiés suivant les types cellulaires ou organes ciblés (Mir et al., 2005; Gothelf and Gehl, 2010). D'après des études d'EP intra-

musculaires et intra-dermiques, des impulsions répétées (8 à 10) à la fréquence de 1 ou 2 Hz, de longue durée (4 - 50 ms / impulsion) et peu intenses (100 - 500 V / cm) permettent d'atteindre des niveaux d'expression satisfaisants du gène électroporé sous forme plasmidique *in vivo*. Concernant l'électrotransfert de gènes dans les tumeurs, les paramètres retrouvés dans la littérature sont relativement variables. Cette constatation résulterait de l'hétérogénéité des tumeurs qui serait responsable des variations de l'efficacité et de la reproductibilité de l'électrotransfert constatées lors de ces études.

L'innocuité de l'EP dépend d'une notion de seuil. Une variation du potentiel transmembranaire bien supérieure à ce seuil remet en question la réversibilité du phénomène (Gehl et al., 1999). En effet, une perméabilisation irréversible peut conduire à la mort des cellules électroporées (Gabriel and Teissié, 1995; Davalos et al., 2005). L'efficacité de l'EP réside donc en une balance entre l'optimisation des paramètres électriques et le maintien de la viabilité cellulaire.

L'efficacité de l'électroporation dépend de la stimulation électrique exercée mais elle est également modulée par la nature du générateur d'impulsions électriques et le choix des électrodes. Il existe une grande variété d'appareillage pour l'électroporation *in vivo*. Le choix de l'électrode dépend de la taille de la zone à électroporer. *In vivo*, les électrodes couramment utilisées sont des électrodes aiguilles pouvant pénétrer dans le tissu à électroporer ou des électrodes plaques qui se positionnent de part et d'autre du tissu.

L'utilisation des impulsions électriques pour le transfert de gènes augmente d'un facteur 100 l'efficacité par rapport à l'injection seule d'un ADN nu dans le tissu (Zhang et al., 2002; Cappelletti et al., 2003) et permet une expression durable dans le muscle squelettique (Mir et al., 1998a, 1999). La limite majeure de l'EP réside dans l'accessibilité du tissu à traiter et la possibilité de placer les électrodes. Comme nous l'avons vu précédemment, l'EP est utilisable pour une grande variété de tissus, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes.

1.4.3. Applications

L'EP est une méthode efficace et facile à mettre en œuvre et est employée pour des applications vétérinaires et cliniques.

Pour le traitement des cancers, l'électroporation est réalisée dans le cadre de l'électrochimiothérapie (ECT). L'ECT a été indépendamment découverte par Okino et Mohri en 1987 et par Mir et ses collaborateurs en 1991 (Davalos et al., 2005) en associant l'effet d'un traitement anti-cancéreux à l'induction d'un courant électrique, rendant le tissu ciblé perméable à ce composé. Les résultats ont démontré un effet synergique de l'EP associée au traitement anti-cancéreux. La preuve de concept selon laquelle l'EP peut être utilisée dans des stratégies thérapeutiques a ainsi été mise en exergue. Parmi les agents anti-cancéreux employés en clinique, la bléomycine et le cisplatine ont été utilisés dans des protocoles d'ECT chez l'animal (Cemazar et al., 2008) et dans des protocoles cliniques chez l'Homme (Mir et al., 1998b; Gothelf et al., 2003). En effet, certaines molécules ne peuvent traverser par simple

diffusion passive la membrane plasmique de par leurs propriétés : hydrophobicité, taille. Le potentiel cytotoxique de ces molécules peut ainsi être exploité grâce à l'EP.

L'électrogène thérapie (EGT) utilise l'EP pour la pénétration de gènes à visée thérapeutique. L'EP d'ADN plasmidique a été démontrée dans divers tissus grâce à la visualisation de l'expression de gènes rapporteurs comme le gène de la GFP, de la luciférase et de la β-galactosidase (Mir et al., 1998a; Vicat et al., 2000). La possibilité d'électroporer plusieurs plasmides a également été démontrée (André and Mir, 2004). Les gènes utilisés dans l'EGT codent pour des protéines thérapeutiques comme l'IL-12 (interleukine 12) électrotransférée dans des sarcomes chez la souris (Pavlin et al., 2009) afin de stimuler la réponse immunitaire ou l'IFNα (interféron α) (Li et al., 2002). Des stratégies suicides ont également été élaborées, impliquant l'utilisation du gène codant pour la thymidine kinase en association avec le ganciclovir (Shibata et al., 2007).

La vaccination est également une application de l'EP *in vivo*. Le principe est basé sur la production *in vivo* d'antigènes après l'EP d'ADN plasmidique (Bloquel et al., 2004). Chez la souris, l'EP de gènes codants pour les antigènes de surface de l'hépatite C ou pour la protéine gag du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) a montré une augmentation de la réponse immunitaire (Widera et al., 2000). De plus, l'ADN plasmidique possède des motifs CpG non méthylés. Ces motifs reconnus *in vivo* par les récepteurs TLR9 (Toll-like receptor 9) déclenchent une réponse immunitaire (Yamamoto et al., 2009; Tavernier et al., 2011). Ces motifs CpG sont donc un atout dans le cas d'une application de vaccination.

L'utilisation de l'EP a également été montrée comme méthode d'adressage d'ARN interférents *in vivo*. La difficulté mentionnée plus haut concernant l'EP de tumeurs réside dans l'hétérogénéité du tissu. Cependant, l'effet inhibiteur d'un siARN a pu être visualisé en intra-tumoral grâce à l'utilisation de la protéine fluorescence GFP dont l'ARNm était la cible du siARN (Golzio et al., 2007). Dans cette étude, l'effet inhibiteur a été suivi de manière non invasive *in vivo* et sur les tissus prélevés. Les résultats montrent une inhibition de l'expression de la GFP pour la moitié des cellules tumorales. Ce résultat met en avant toute la difficulté de réaliser une EP efficace sur l'ensemble du tissu. La faisabilité d'électroporer des siARN *in vivo* a été également montrée dans différentes études menées sur les rongeurs. Ces études ont mis en évidence l'efficacité de l'EP pour délivrer des siARN à divers organes tels que la rétine (Matsuda and Cepko, 2003), le cerveau (Akaneya et al., 2005), le rein (Takabatake et al., 2005) et le muscle (Golzio et al., 2005).

1.5. Suivi de l'expression d'un transgène par imagerie optique *in vivo*

Le suivi de l'expression du transgène peut être un élément essentiel pour la thérapie génique. Ce suivi peut être réalisé à partir de prélèvements sanguins ou par des biopsies. Les prélèvements sanguins permettent le dosage, soit de l'agent thérapeutique, soit de ses conséquences biochimiques sur les cellules sanguines de la thérapie mais ne permettent pas le suivi de la localisation du transgène. Les biopsies permettent d'appréhender la dimension spatiale et de doser l'agent ou l'effet thérapeutique, mais le caractère invasif ne donne qu'une information spatialement limitée à la zone de prélèvement et ne permet pas un suivi dans le temps. L'imagerie *in vivo* permet de pallier à ces limitations car elle offre un suivi non invasif de l'expression du transgène. L'imagerie moléculaire génique permet ce suivi grâce à la visualisation de gènes rapporteurs.

1.5.1. L'imagerie moléculaire

De manière générale, 2 grands types d'imagerie *in vivo* sont à distinguer, à savoir, l'imagerie anatomique, donnant des informations morphologiques, et l'imagerie fonctionnelle, permettant la visualisation de processus chimiques, physiques ou biologiques.

Les techniques d'imagerie anatomiques telles que la radiographie, l'ultrasonographie, la tomographie X (Computed Tomography, CT), l'échographie et l'IRM sont couramment utilisées en clinique et pour l'expérimention animale, du fait de leur excellente résolution spatiale pour donner des renseignements morphologiques de l'organe ou du tissu d'intérêt.

L'imagerie fonctionnelle apporte quelques informations anatomiques mais renseigne également sur certains aspects du fonctionnement du tissu étudié comme par exemple son métabolisme, le débit sanguin, la perfusion... L'imagerie moléculaire est une imagerie fonctionnelle particulière qui fournit des informations sur la nature chimique ou biochimique des processus observés, elle renseigne sur la présence de métabolites, de protéines ou même d'activités enzymatiques. L'imagerie moléculaire permet aussi de visualiser les processus génétiques, elle est appelée imagerie moléculaire génique. Cette approche repose sur la technologie des gènes rapporteurs associée à l'IRM, la médecine nucléaire et à l'optique. Ces méthodes optiques sont massivement mises en œuvre sur des modèles animaux, pour visualiser l'expression génique, suivre la croissance tumorale, tester des médicaments et mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques, y compris des thérapies géniques.

Les techniques d'imagerie qui présentent une résolution spatiale sont souvent peu sensibles et à l'inverse, celles qui sont sensibles sont souvent peu résolutives. Nous assistons donc aujourd'hui à un réel essor de technologies hybrides qui couplent plusieurs modalités d'imagerie pour allier sensibilité et résolution. Ces technologies sont la TEP / CT (Tomographie par Emission de Positons / CT), la SPECT / CT (Single Photon Emission Computerized Tomography / CT), l'optique / CT, la TEP / IRM… Ce couplage associe l'image anatomique ou morphologique avec la visualisation d'un évènement moléculaire. Le choix de la technique d'imagerie dépend largement des objectifs scientifiques ou cliniques. Il prend en compte les caractéristiques et les limitations de chaque modalité en termes de

sensibilité et de résolution spatiale mais aussi des considérations comme la facilité de mise en œuvre du protocole, le coût, le temps d'acquisition ou la disponibilité locale des appareillages (***Tableau 4***).

Technique	Résolution	Profondeur	Temps d'acquisition	Quantitatif	Coût	Utilisation clinique
IRM	10 - 100 µm	pas de limite	min - heures	oui	élevé	oui
TEP	1 - 2 mm	pas de limite	min - heures	oui	élevé	oui
SPECT	1 - 2 mm	pas de limite	min - heures	oui	moyen	oui
FRI	2 - 3 mm	< 1 cm	s - min	non	faible	oui
FMT	1 mm	< 10 cm	min - heures	oui	moyen	en développement
BLI	plusieurs mm	cm	min	non	moyen	non

Tableau 4 : Caractéristiques des techniques d'imagerie moléculaire
(adapté de (Weissleder and Pittet, 2008))

L'imagerie des thérapies géniques repose sur la technologie des gènes rapporteurs. A l'heure actuelle, elle concerne 3 modalités d'imagerie que sont l'IRM, la médecine nucléaire et l'imagerie optique. Les deux premières modalités seront rapidement évoquées pour leurs potentialités en imagerie moléculaire génique, et l'imagerie optique, qui a permis la réalisation de notre projet, sera abordée plus en détail.

L'expression des gènes rapporteurs (***Tableau 5***) utilisés par l'expérimentateur conduit à la production de protéines qui peuvent avoir différentes fonctions. Ces protéines peuvent être utilisées comme agent de contraste (protéines fluorescentes), pour modifier l'agent de contraste (luciférase, thymidine kinase (TK), galactosidase), ou couplées à des transporteurs ou des recepteurs capables d'intéragir avec l'agent de contraste (Kang and Chung, 2008).

Modality	Reporter
Optical reporter genes	Fluorescent protein (red, green)
	Luciferase (firefly, click beetle, renilla, gaussia)
Nuclear medicine reporter genes	HSV1 TK
	Human mitochondrial TK
	D_2R
	NIS
	Norepinephrine transporter
	SSTr
	Estrogen receptor
MRI reporter genes	Transferrin receptor
	β-galactosidase
	Tyrosinase
	Ferritin
	LRP

Tableau 5 : Gènes rapporteurs utilisables pour l'imagerie moléculaire génique
(Kang and Chung, 2008)
NIS (sodium / iodide symporter) ; D_2R (dopamine 2 receptor) ; HSV1 (herpes simplex virus type 1) ; TK (thymidine kinase) ; SSTr (somatostatin receptor) ; LRP (lysine-rich protein)

Imagerie moléculaire génique et IRM

L'IRM est une technique d'imagerie non invasive possédant une haute résolution spatiale qui permet l'identification et la caractérisation en clinique de tissus pathologiques ou de lésions. Cette technique repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et nécessite un champ magnétique puissant et stable produit par un aimant qui crée une magnétisation des protons des molécules d'eau contenues dans les tissus. Le signal obtenu dépend de la concentration locale en protons et de leur cinétique de relaxation. Les processus de relaxation des protons des molécules d'eau dépendent de leur environnement, de leur dynamique et varient donc selon les tissus. L'image IRM obtenue, après reconstruction, détermine la nature des tissus biologiques explorés.

La sensibilité de l'IRM est relativement faible. Elle est améliorée grâce à l'utilisation d'agents de contraste non spécifiques dont le rôle est de diminuer le temps de relaxation afin d'augmenter l'intensité des signaux. En plus d'être une technique d'imagerie anatomique, l'IRM donne également des informations fonctionnelles (température, diffusion, perfusion…). Quelques gènes rapporteurs sont utilisables en imagerie IRM. Des études montrent par exemple l'utilisation du gène codant pour la β-galactosidase, qui permet de libérer localement l'agent de contraste gadolinium préalablement piégé dans du galactose (Louie et al., 2000), des gènes codant pour des protéines interférant avec le métabolisme du fer comme la métalloprotéine tyrosinase (Weissleder et al., 1997), la ferritine (Cohen et al., 2005; Genove et al., 2005), ou le récepteur à la transferrine (Weissleder et al., 2000). Mais à ce jour ces travaux constituent essentiellement des démonstrations de faisabilité et n'ont pas été mis en œuvre dans des protocoles de thérapie génique clinique ou préclinique. L'avantage des gènes

rapporteurs utilisés en IRM est la détection précise au site d'expression compte tenu de la résolution spatiale de la technique.

Imagerie moléculaire génique et imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est basée sur la détection *in vivo* d'éléments radioactifs injectés dans l'organisme. C'est la technique d'imagerie moléculaire la plus sensible (pM) et est largement implantée en clinique. Les deux techniques d'imagerie nucléaire sont la TEP et la SPECT qui utilisent des radio-pharmaceutiques différents. La TEP utilise des radiotraceurs provoquant une émission de positons (ou positrons) suite à leur désintégration. La SPECT utilise quant à elle des émetteurs gamma comme marqueurs.

Plusieurs gènes rapporteurs sont disponibles pour leurs visualisations en imagerie nucléaire. Les récepteurs et les transporteurs sont particulièrement propices aux approches de médecine nucléaire dès lors que l'on synthétise des ligants radioactifs correspondants qui vont s'accumuler dans ou à la périphérie des cellules qui expriment le gène. C'est le cas par exemple du gène codant pour le récepteur 2 à la dopamine (D_2R) et son ligand 18F-fluoroethylspiperone (FESP) (MacLaren et al., 1999), des gènes codant pour des récepteurs oestrogéniques, du transporteur iode et sodium (NIS)… (voir (Kang and Chung, 2008) pour revue). Le gène HSV1-tk (herpes simplex virus type 1 (HSV1) thymidine kinase), a été couramment utilisé. Dans les cellules transfectées, le gène HSV1-tk permet la synthèse de TK qui phosphoryle son substrat 124I-FIAU. Alors que le substrat non phosphorylé peut traverser la membrane cellulaire, la forme phosphorylée est piégée dans la cellule et émet des positrons qui permettent la visualisation en TEP. Le gène HSV1-tk a notamment été utilisé pour un essai de thérapie génique pour le traitement des gliobastomes chez l'Homme. Après transfection virale du gène dans les cellules tumorales, l'expression de TK a été utilisée pour une imagerie TEP 124I-FIAU puis pour une thérapie en utilisant un susbtrat suicide (Ganciclovir) (Jacobs et al., 2001). Outre l'intérêt pour l'imagerie des thérapies géniques, ce travail illustre aussi un avantage supplémentaire des gènes rapporteurs en médecine nucléaire où le substrat d'imagerie peut être ultérieurement substitué par un subtrat suicide notamment en remplacant la molécule radioactive par un radioélément plus énergétique.

Imagerie moléculaire génique optique

Les gènes rapporteurs pour l'imagerie optique sont les plus couramment utilisés pour les modèles précliniques. L'imagerie optique offre une excellente sensibilité, proche de celle de la médecine nucléaire, tout en associant un large choix de gènes rapporteurs et une mise en œuvre facile et peu onéreuse. Il existe 2 grandes catégories de gènes rapporteurs adaptés à l'imagerie optique : les gènes codants pour les luciférases et les protéines fluorescentes (ou sondes fluorescentes). Les luciférases ont une activité enzymatique qui provoque la production de photons détectables par imagerie de bioluminescence (BLI). Les protéines fluorescentes émetent des photons, en réponse à une excitation lumineuse, détectables par imagerie de fluorescence par réflexion (FRI) ou par tomographie de fluorescence (tomographie moléculaire de fluorescence (FMT) ou tomographie de fluorescence diffuse (fDOT)). Les gènes rapporteurs d'imagerie optique et les méthodes d'imagerie associées sont détaillés dans la partie suivante.

Toutes ces techniques utilisent des caméras CCD (charge coupled device) ultrasensibles qui détectent de faibles variations d'émission de photons. La principale limitation résulte de l'absorption et de la diffusion des photons qui interagissent avec les tissus. Ces phénomènes ont un impact direct sur la quantification du signal observé qui est affecté par la profondeur de détection. En pratique, la profondeur à laquelle se situe le foyer d'émission des photons va directement influencer la morphologie du signal : plus les photons sont en profondeur plus le signal observé sera de faible intensité et diffus.

1.5.2. L'imagerie optique des gènes rapporteurs

1.5.2.1. Définition

L'imagerie optique est basée sur l'utilisation de sondes ou de gènes rapporteurs. Elle regroupe les techniques de BLI, de FRI et de FMT ou fDOT. Les caméras CCD ultra-sensibles détectent des signaux lumineux *in vivo* de faible intensité émis par l'organisme. Ces caméras peuvent être refroidies jusqu'à -90°C afin de diminuer le bruit de fond électronique et ainsi améliorer la sensibilité. Elles permettent la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique grâce à une matrice de détecteurs photosensibles qui constituent le capteur CCD. Ces détecteurs, nommés pixels, convertissent le signal photonique reçu en informations électroniques. Lorsque l'acquisition est terminée, la matrice est vidée séquentiellement. Le signal converti est transmis à l'ordinateur qui reconstruit l'image.

Comme pour les autres modalités, le choix des gènes rapporteurs d'imagerie moléculaire optique dépend de critères tels que l'adressage aux cellules cibles, l'absence d'immunogénicité et de toxicité vis-à-vis de l'animal, la spécificité, la facilité de détection et de quantification. L'utilisation de cette technique chez l'homme n'est envisageable que si l'adressage du gène conduisant à la mort des cellules transfectées, comme par exemple pour l'expression de TK dans les glioblastomes (Jacobs et al., 2001), est restreint aux cellules cibles, ou s'il est strictement transitoire et non toxique.

1.5.2.2. Fluorescence

1.5.2.2.1. Principe

La fluorescence est basée sur l'excitation électronique de molécules ou de systèmes moléculaires (appelés fluorophores) par des radiations électromagnétiques non ionisantes (photons). Pour revenir à son état énergétique initial, le fluorophore excité émet des photons de moindre énergie. L'absorption et l'émission de lumière par un fluorophore peuvent être illustrées par le diagramme de Jablonski (***Figure 13***) représentant les différents niveaux d'énergie des électrons d'une molécule. Les électrons au repos dans le niveau vibrationnel V_0 de l'état électronique fondamental S_0 sont portés à un état excité S_1 sous l'effet de l'absorption d'un rayonnement lumineux (λex). Puis, différents types de dissipation de l'énergie en excès se produisent au cours de la relaxation. La fluorescence se caractérise par

une relaxation rayonnante. Ce phénomène rapide est produit par l'émission d'un photon (à λem) dont l'énergie correspond à la transition entre l'état électronique S_1 et l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental S_0.

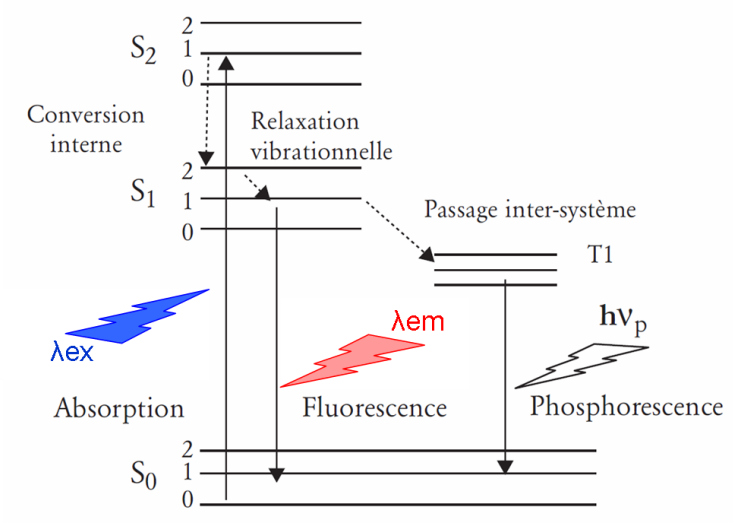


Figure 13 : Diagramme de Jablonski
(modifié d'après (Matthews and Favard, 2007))
Les états électroniques singulets sont notés S_0, S_1, S_2 et l'état triplet T1. Les flèches verticales pleines correspondent aux phénomènes d'absorption ou d'émission de photons. Les flèches en pointillés correspondent à des pertes énergétiques non radiatives. λex et λem correspondent aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement.

Les molécules fluorescentes possèdent deux spectres caractéristiques : un spectre d'excitation et un spectre d'émission.

La fluorescence est beaucoup utilisée en biologie lors d'étude *in vitro*. Elle permet la visualisation et le suivi de processus biologiques au niveau moléculaire comme l'expression de gènes, des réactions enzymatiques ou immunologiques… La fluorescence est également utilisée *in vivo* selon deux modalités d'imagerie.

La fluorescence par réflexion (FRI)

La FRI est une méthode de choix pour la visualisation de sondes fluorescentes *in vivo* (Ntziachristos et al., 2003) et s'applique à l'imagerie des protéines fluorescentes. La FRI consiste à exciter la protéine fluorescente à la longueur d'onde correspondant à son spectre d'absorption et à récupérer le signal émis à une longueur d'onde supérieure. L'excitation est réalisée grâce à une source lumineuse externe placée au dessus de l'animal (laser, diode ou source de lumière blanche filtrée). La caméra CCD également placée au dessus de l'animal capte les photons d'émission filtrés, émis par la protéine. Les temps d'acquisition sont habituellement inférieurs à 1 seconde. L'excitation est continue pendant la mesure et les spectres d'émission et d'excitation sont disjoints (***Figure 14***).

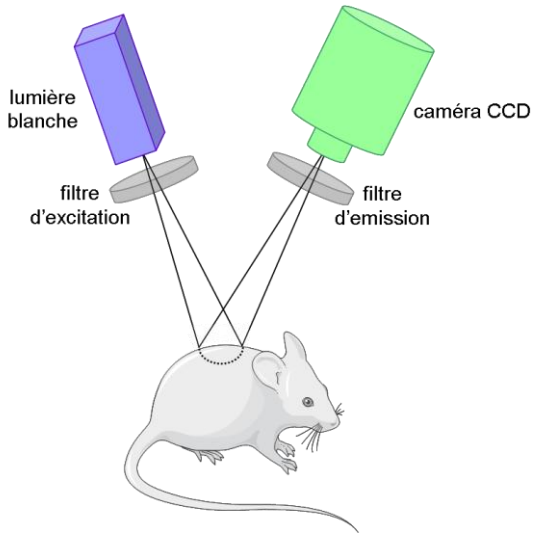


Figure 14 : Principe de la FRI in vivo
(adapté de (Ntziachristos et al., 2003))
La source de lumière traverse un filtre adapté au spectre d'excitation in vivo de la protéine fluorescente puis l'émission de fluorescence est captée par une caméra CCD à travers un filtre adapté au spectre d'émission.

L'imagerie de fluorescence *in vivo* se heurte à 3 problèmes majeurs qui sont l'auto-fluorescence naturelle des tissus, l'absorption des photons par les tissus et la diffusion des photons dans le milieu. Compte tenu des propriétés optiques particulières des tissus vivants, l'auto-fluorescence et l'absorption sont réduites dans le domaine spectral compris entre 650 et 900 nm. Cette fenêtre est appelée la « fenêtre du proche infra-rouge » ou « fenêtre thérapeutique » car elle correspond aux minima d'absorption et d'auto-fluorescence des tissus (Weissleder and Pittet, 2008). La diffusion des photons dans les tissus est responsable d'une perte de résolution spatiale et d'une impression de flou sur les images. En FRI, l'absorption et la diffusion limitent la localisation précise des sources, la quantification du signal et la détection à moins d'un centimètre de la surface de l'animal.

La tomographie de fluorescence

La tomographie moléculaire de fluorescence (FMT) ou la tomographie de fluorescence diffuse (fDOT) associent un ensemble d'images de fluorescence, des mesures de l'absorption et des algorithmes de reconstruction pour permettre une bonne localisation spatiale des sources lumineuses et une quantification du signal de fluorescence. Les sources d'excitation utilisées sont généralement des sources laser mobiles selon les axes x et y, l'excitation est réalisée par transillumination et la détection des signaux est effectuée grâce à une caméra CCD (Ntziachristos et al., 2002). Les acquisitions sont relativement longues puisqu'elles nécessitent l'acquisition d'images de fluorescence et d'absorption pour chaque position du laser d'excitation nécessaires à la reconstruction. Par contre, la tomographie de fluorescence permet de détecter des signaux profonds de plusieurs centimètres et elle permet la quantification.

Les tomographes optiques actuellement disponibles sont optimisés pour la « fenêtre du proche infra-rouge » et au moment où nous avons initié notre projet, aucun gène rapporteur ne

présentait une fluorescence compatible avec l'utilisation de ces systèmes. Les premiers essais réalisés au laboratoire avec la protéine IFP-1.4 (Shu et al., 2009) n'ont permis de détecter la protéine ni *in vitro* ni *in vivo* dans les tumeurs U87 (C. Genevois & F. Couillaud, non publiés), par contre les résulats obtenus avec la protéine IRFP (Filonov et al., 2011) sont très encourageants.

1.5.2.2.2. Les protéines fluorescentes

La plus connue des protéines fluorescentes est la GFP (Green Fluorescent Protein) décrite en 1962. Le prix Nobel de chimie a été attribué en 2008 à RY. Tsien, M. Chalfie et O. Shimomura pour la découverte et le développement de cette protéine fluorescente. La GFP est issue de l'organisme marin *Aequorea victoria*. La forme sauvage de cette protéine comprend 2 pics d'excitation à 395 nm et à 475 nm et un pic d'émission à 508 nm. Aujourd'hui, il existe de nombreux variants de la GFP (***Tableau 6***) mais le mutant le plus utilisé est l'eGFP (enhanced GFP) dont le rendement de fluorescence est supérieur à la GFP. Dans ce travail, nous avons utilisé l'Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP) qui présente un pic d'excitation à 487 nm et un pic d'émission à 509 nm (Tsien, 1998).

La DsRed, qui provient du corail *Discosoma*, est une protéine fluorescente émettant dans le rouge (excitation : 558 nm ; émission : 583 nm). Cette protéine a également fait l'objet de nombreuses mutations pour modifier ses caractéristiques spectrales. Certains mutants comme la protéine mPlum (excitation : 590 nm ; émission : 649 nm) (Wang, 2004) se rapprochent de la « fenêtre du proche infra-rouge » (Shcherbo et al., 2007).

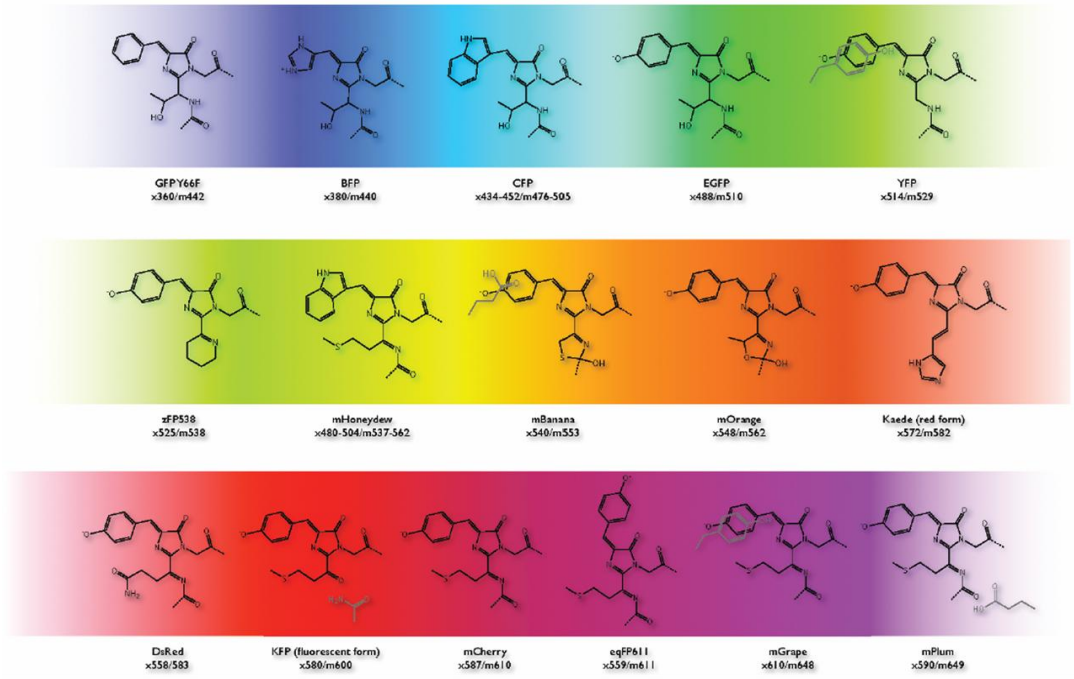


Tableau 6 : Structure des chromophores des protéines fluorescentes et caractéristiques spectrales

(Tsien, 2010)

Les protéines fluorescentes sont classées de la longueur d'onde d'émission la plus courte à la plus longue. Les chaînes latérales des résidus influençant la longueur d'onde de fluorescence apparaissent en gris.

1.5.2.3. Bioluminescence

1.5.2.3.1. Principe

La bioluminescence est l'émission de lumière visible par des organismes vivants. Ce phénomène est retrouvé chez de nombreux organismes comme les bactéries, les champignons, les vers, les mollusques et les insectes. Dans la nature, ce phénomène peut être utilisé pour l'attraction des proies, comme mécanisme de défense ou comme moyen de communication.

La bioluminescence résulte d'une activité enzymatique par des enzymes dénommées luciférases qui génèrent l'émission de photons. Les gènes codant pour les luciférases sont utilisés comme rapporteurs pour des études *in vitro*. Les techniques basées sur la mesure de l'activité enzymatique des luciférases font partie des méthodes les plus simples à mettre œuvre et des plus sensibles à disposition des biochimistes puisqu'elles permettent, par exemple, de doser des concentrations fentomolaires d'ATP (Sigma). *In vivo*, l'émission de photons issue de l'activité des luciférases permet le suivi par imagerie de bioluminescence. Les photons émis *in vivo* sont captés par une caméra CCD, placée dans une boîte noire, au dessus de l'animal (***Figure 15***).

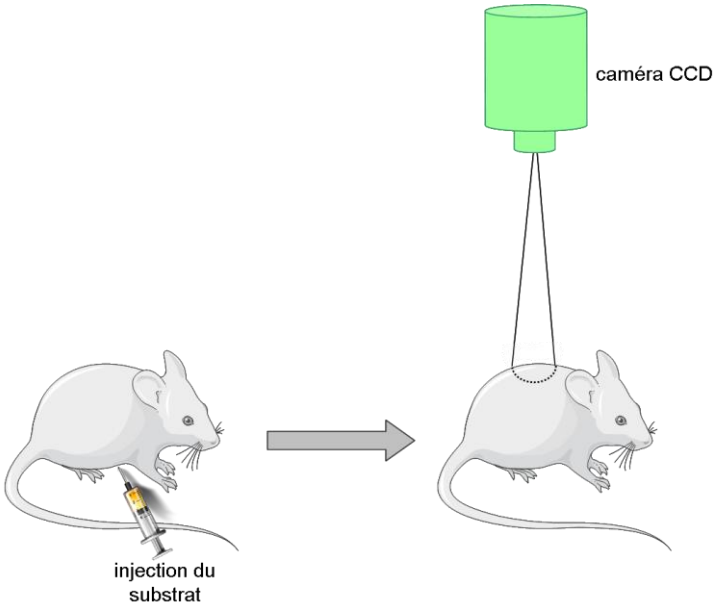


Figure 15 : Principe de la BLI in vivo
Après l'injection du substrat chez la souris, l'émission de photons (bioluminescence) est détectée par une caméra CCD ultrasensible.

Contrairement à la fluorescence, les tissus de mammifères ne présentent pas d'auto-bioluminescence et le bruit de fond est inexistant. Par contre, comme la FRI, la BLI souffre de limitations dues à l'absorption des photons et à la diffusion. En conséquence, la quantification est relative sous réserve que la profondeur des sources lumineuses reste constante. L'administration du substrat de l'enzyme et sa dispertion homogène dans l'organisme est également une étape limitante. Enfin, certaines luciférases sont dépendantes du métabolisme

des cellules et notamment du taux d'oxygène dissout et de la concentration en ATP (nécessaires pour la réaction catalysée par la luciférase Firefly). A l'inverse, ces exigences métaboliques font des luciférases d'excellents marqueurs de la viabilité cellulaire.

1.5.2.3.2. Les luciférases

Les catalyseurs de la bioluminescence sont les luciférases. Ces enzymes catalysent la réaction chimique à l'origine de l'émission de photons et nécessitent un substrat et des co-facteurs (ATP, O_2…). Les luciférases les plus utilisées pour les études d'imagerie optique *in vivo* sont les luciférases Firefly (LucF), *Renilla* (LucR) et bactériennes (Close et al., 2010). L'utilisation des luciférases LucF et LucR est retrouvée dans de multiples applications en recherche (***Tableau 7***). Ces applications concernent l'étude de l'expression de gène, de la migration cellulaire et de la croissance tumorale entre autres. Par ailleurs, de nombreux animaux transgéniques possédant un transgène bioluminescent ont été générés.

Applications	Examples
Cell trafficking (survival, proliferation, migration, and function) in living animals	Stem cells (SCs), such as hematopoietic SCs, embryonic SCs, mesenchymal SCs, bone marrow mononuclear cells, and muscle SCs Immune effector cells such as cytokine-induced killer cells and NK-T cells Transplanted tissues
Noninvasive imaging of tumor development	Tumor growth, metastasis, and response to therapies
In vivo imaging of gene expression (conditional, spatial, and temporal patterns)	*In vivo* control of HIV promoter HIF-1 transcriptional activity in tumor hypoxia Hsp70 expression during heat shock and laser irradiation Cox-2 gene expression Hes1-Luc expression to assess somite segmentation clock P53 expression and screening for antitumor compounds Per2 expression in CNS circadian clock TGF-β transcriptional activity in breast cancer bone metastasis GFAP expression in neurological disease HO-1 expression in hepatic ischemia TLR2 response in brain injury and inflammation MYC oncogene inactivation in liver cancer Smad signaling in injury and neurodegeneration
Evaluation of gene therapy (gene transfer and expression after delivery) in living animals	*In vivo* imaging of hydrodynamically dosed gene transfer *In utero* delivery of adeno-associated viral vectors Plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy siRNA-mediated gene silencing
Real-time, *in vivo* monitoring of inflammation and infection	Viral infection and evaluation of virus vaccines Parasitic and fungal infections Biomaterial-associated infection
Monitoring protein-protein interaction in living animals	CXCR4 and β-arrestin interaction in breast cancer MyoD-Id protein interaction in living mice Rapamycin-modulated dimerization of two proteins Gal4-FLuc transgenic mice as universal reporters for protein-protein interaction (e.g., p53 and large T antigen)
Monitoring protein stability and function *in vivo*	Complementation Luc reporter to detect caspase-3 activity and monitoring of apoptosis Proteasome activity and proteasome inhibitor screening Furin (an endoprotease) activity in breast cancer Complementation Luc assay to detect hepatitis C virus NS3/4A serine protease activity *in vivo* Complementation Luc assay to assess HIF-1α stability and function in tumor hypoxia

Tableau 7 : Applications de l'utilisation des LucF et LucR en BLI
(Close et al., 2010)

La luciférase Firefly

La LucF est la plus connue et la plus utilisée des luciférases. Elle est issue de la mouche luminescente américaine *Photynus pyralis* plus communément appelée luciole. La LucF est une enzyme de 61 kDa qui catalyse l'oxydation de son substrat, la luciférine, en présence d'ATP, d'O_2 et du cation divalent magnésium (Mg^{2+}). Cette réaction aboutie à la production d'oxyluciférine et émet des photons à une longueur d'onde moyenne de 562 nm (***Figure 16***).

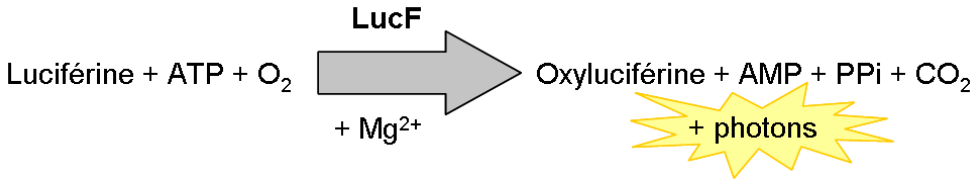


Figure 16 : Réaction enzymatique de la luciférase Firefly (LucF)
L'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, d'O_2 et de Mg^{2+} catalysée par la LucF permet l'émission de photons.

Ce transgène bioluminescent est utilisé pour la BLI chez les rongeurs (Contag et al., 1997; Contag and Bachmann, 2002) et essentiellement la souris. *In vivo*, la production de photons requiert une injection préalable de D-luciférine qui peut être réalisée aisément en intra-péritonéal (IP) et qui diffuse rapidement dans tout l'organisme (8 - 10 min chez la souris). L'injection de luciférine peut également être réalisée en intra-veineuse : l'injection est moins aisée mais la diffusion est très rapide (< 1 min). Moins de 10^{-19} moles de LucF (soit 2,4 x 10^5 molécules) suffisent à produire un signal détectable par la caméra CCD (Close et al., 2010). De plus, comme la réaction nécessite de l'ATP, elle n'intervient que dans les cellules vivantes et permet d'apprécier *in vivo* la viabilité cellulaire.

La luciférase Renilla

La LucR provient de l'organisme *Renilla reniformis* ou pensée de mer (Cnidaire) (Lorenz et al., 1991). La LucR est une enzyme de 36 kDa qui catalyse l'oxydation de la coelenterazine en présence d'oxygène aboutissant à une émission de photons à une longueur d'onde moyenne de 480 nm (***Figure 17***). A la différence de la LucF, l'activité de la LucR ne requiert pas d'ATP. Les spectres d'émission des LucF et LucR sont relativement proches et mal définis en longueur d'onde. Par contre, la réaction enzymatique de la LucR est brève et la production de photons est transitoire. Il est donc possible de mesurer séquentiellement l'activité des deux luciférases *in vivo* en respectant un délai de quelques heures entre les deux mesures.

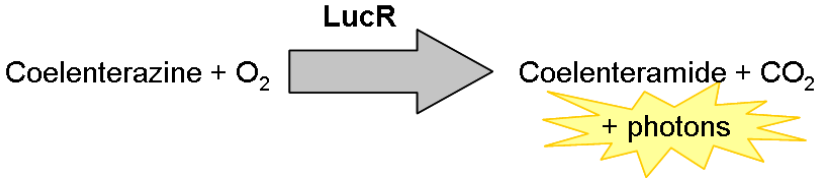


Figure 17 : Réaction enzymatique de la Luciférase Renilla (LucR)
L'oxydation de la coelenterazine en présence d'O_2 catalysée par la LucR permet l'émission de photons.

In vivo, l'administration de la coelenterazine peut se faire en injection IP comme pour la LucF. La commercialisation de nouveaux substrats conjugués et plus stables comme le

ViviRen™ (Promega) permet une meilleure détection du signal *in vivo* (Otto-Duessel et al., 2006).

1.5.2.4. Applications

Les méthodes d'imagerie basées sur la détection de lumière sont largement utilisées en recherche afin de suivre de manière non invasive l'expression d'un transgène, la croissance tumorale ou autres effets biologiques. Les gènes rapporteurs peuvent être utilisés afin de mettre en évidence des interactions protéiques (par FRET (fluorescence resonance energy transfer) ou BRET (bioluminescence resonance energy transfer)) mais également pour la fonction des gènes *in vitro*. De plus, la visualisation, en imagerie optique, de gènes rapporteurs mis sous la dépendance transcriptionnelle de promoteurs spécifiques a permis l'étude fonctionnelle de nombreux gènes *in vivo*.

La BLI est une méthode 2D qui ne permet pas une quantification absolue. Néamoins, la quantification relative est possible et le signal lumineux peut être corrélé au volume tumoral déterminé par IRM (Szentirmai et al., 2006) ou par coupes histologiques (Hashizume et al., 2009). Cette corrélation volume tumoral / signal lumineux est aujourd'hui couramment utilisée pour suivre la croissance tumorale (Jenkins et al., 2003; Close et al., 2010). C'est en utilisant cette caractéristique que de nombreuses études ont démontré l'efficacité thérapeutique d'une molécule. La réponse d'un agent anti-tumoral peut ainsi être suivie en imagerie optique, c'est le cas pour différentes études entre autres sur les glioblastomes (Dinca et al., 2007; Hashizume et al., 2009). La limitation majeure de cette méthode réside dans l'existence de régions hypoxiques fréquentes pour les tumeurs de grande taille. Les cellules présentes dans ces régions hypoxiques acquièrent un métabolisme anaérobie. Le défaut en O_2 a un impact sur la réaction de bioluminescence (Cf. 1.5.2.3.2) entraînant un rapport volume tumoral / BLI non proportionnel (Black et al., 2010).

2. Objectifs du projet de thèse

Au travers d'une démarche expérimentale *in vivo* chez la souris, notre projet consiste à proposer des approches originales susceptibles d'apporter quelques clefs à certains verrous techniques de la thérapie génique. Nos propositions concernent la régulation de l'expression génique par inhibition post-transcriptionnelle, le contrôle thermo-inductible de l'expression et de l'inhibition génique et l'adressage aux cellules cibles. Elles mettent toutes en œuvre des modèles murins et s'appuient sur un suivi *in vivo* par imagerie moléculaire optique.

Notre première contribution propose d'étudier la faisabilité d'une stratégie de thérapie génique basée sur l'utilisation des miARN. Nous avons choisi d'utiliser les miARN comme acteurs de l'ARNi pour notre étude de faisabilité car leur biogénèse peut être couplée avec l'expression d'un gène rapporteur. La biogénèse des miARN est placée sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur thermo-inductible (Hsp70B) dont l'activation peut être maîtrisée dans le temps et dans l'espace. Ainsi, la synthèse du miARN pourra être contrôlée à la demande par une hyperthermie déclenchée par l'expérimentateur. Nous avons choisi de cibler le gène rapporteur de la luciférase firefly (LucF) dont l'expression peut être suivie *in vivo* par imagerie optique de bioluminescence (BLI). Un deuxième promoteur thermo-sensible contrôle le gène rapporteur de la luciférase *Renilla* (LucR) qui permet un suivi *in vivo* par BLI de l'activation du promoteur et le gène rapporteur de l'EmGFP, co-cistronique au miARN, pour un suivi *in vitro*. Le projet sera présenté en 4 grandes parties. La première partie concerne l'efficacité d'inhibition des miARN *in vitro* et *in vivo*. La seconde partie traite de la faisabilité du projet qui a été successivement menée *in vitro* puis *in vivo*. La faisabilité sera étudiée grâce au suivi de l'inhibition de l'expression du gène de la LucF. La troisième partie propose des pistes d'optimisation du protocole avec, pour chacune d'elles, un suivi détaillé de l'ensemble des indicateurs moléculaires. La dernière partie concerne la proposition d'une méthode d'adressage qui pourrait permettre de transposer cette stratégie en clinique.

La cinquième partie des résultats présentés est indépendante et examine la possibilité d'utiliser les molécules d'ARNm comme outils thérapeutiques. L'utilisation de l'ARN comme molécule thérapeutique permet d'obtenir une expression transitoire, indépendante du cycle cellulaire et de prévenir toute insertion du transgène dans le génome des cellules hôtes. Nous examinerons l'efficacité de l'adressage de différents types d'ARN aux cellules cibles par électroporation *in vivo*.

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériel biologique

3.1.1. Plasmides

Nom	Taille	Gènes de sélection	Caractéristiques
pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF	6745 pb	Hygro^R; Amp^R	Le gène de la LucF, avec une cible du miRLuc dans la région codante, est sous le contrôle du promoteur CMV.
pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF	6307 pb	Hygro^R; Amp^R	Le gène de la LucF, avec une cible du miRLuc dans la région codante, est sous le contrôle du promoteur EFIα tronqué.
pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S	6883 pb	Hygro^R; Amp^R	Le gène de la LucF, avec une cible du miRLuc dans la région codante et une cible orientée en sens dans le 3'UTR, est sous le contrôle du promoteur CMV.
pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF-ciblemiR3'UTR-S	6445 pb	Hygro^R; Amp^R	Le gène de la LucF, avec une cible du miRLuc dans la région codante et une cible orientée en sens dans le 3'UTR, est sous le contrôle du promoteur EFIα tronqué.
pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRLuc (nommé pCMV-miRLuc)	6173 pb	Blast^R; Spectino^R	L'expression co-cistronique de l'EmGFP et de 4 copies de la cassette miRLuc est contrôlée par le promoteur CMV.
pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRneg (nommé pCMV-miRneg)	6173 pb	Blast^R; Spectino^R	L'expression co-cistronique de l'EmGFP et de 4 copies de la cassette miRneg est contrôlée par le promoteur CMV.
pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR/Hsp-EmGFP-4*miRLuc (nommé pHsp-miRLuc)	8516 pb	Blast^R; Spectino^R	L'expression co-cistronique de l'EmGFP et de 4 copies de la cassette miRLuc est contrôlée par le promoteur Hsp70B, l'expression de la LucR est contrôlée par un second promoteur Hsp70B.
pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR/Hsp-EmGFP-4*miRneg (nommé pHsp-miRneg)	8516 pb	Blast^R; Spectino^R	L'expression co-cistronique de l'EmGFP et de 4 copies de la cassette miRneg est contrôlée par le promoteur Hsp70B, l'expression de la LucR est contrôlée par un second promoteur Hsp70B.
pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR	7096 pb	Hygro^R; Amp^R	Le gène de la LucR est placé sous le contrôle du promoteur CAG.
pcDNA$_{3.1}$-mPlum	6306 pb	Kan/néo^R; Amp^R	Le gène de la mPlum est placé sous le contrôle du promoteur CMV.

pOG44	5785 pb	Amp^R	Le gène de la recombinase permettant la recombinaison homologue du système Flp-In™ est placé sous le contrôle du promoteur CMV (Invitrogen).
pGEMT/5UTR-LucF-3UTR	5291 pb	LacZ	Le gène de la LucF est encadré par les régions non traduites du VHC.
pCR®2.1-TOPO	3931 pb	Kan^R ; Amp^R	(Invitrogen)

Tableau 8 : Plasmides utilisés et caractéristiques

Hygro : hygromycine (Invitrogen), Amp : ampicilline (Euromedex), Kan : kanamycine (Euromedex), Néo : néomycine, Blast : blasticidine (PAA), Spectino : spectinomycine (Sigma).

3.1.2. Bactéries

Les bactéries utilisées sont de souche *Escherichia coli* (Invitrogen) et sont électrocompétentes (One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*) ou chimiocompétentes (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*). Ces bactéries appartiennent au Groupe 1, classe 1 de risques et ont été manipulées en confinement L1 sous un poste de sécurité microbien (PSM).

3.1.3. Cellules eucaryotes

3.1.3.1. Lignée U87 MG

La lignée native U87 MG est une lignée cellulaire commerciale (ATCC) de cellules gliales dérivées d'un glioblastome humain. Les cellules sont adhérentes en culture et permettent la génération de tumeurs sur des souris immunodéficientes.

3.1.3.2. Lignée U87 FRT-7

La lignée U87 FRT-7 est un clone cellulaire de la lignée U87 MG dont le génome contient un site unique FRT permettant la recombinaison homologue. Ce site FRT a été inséré grâce au système Flp-In™ (Invitrogen) (***Figure 18***). Ces cellules possèdent le gène de résistance à la zéocine et sont maintenues sous pression de sélection à raison de 200 µg / mL.

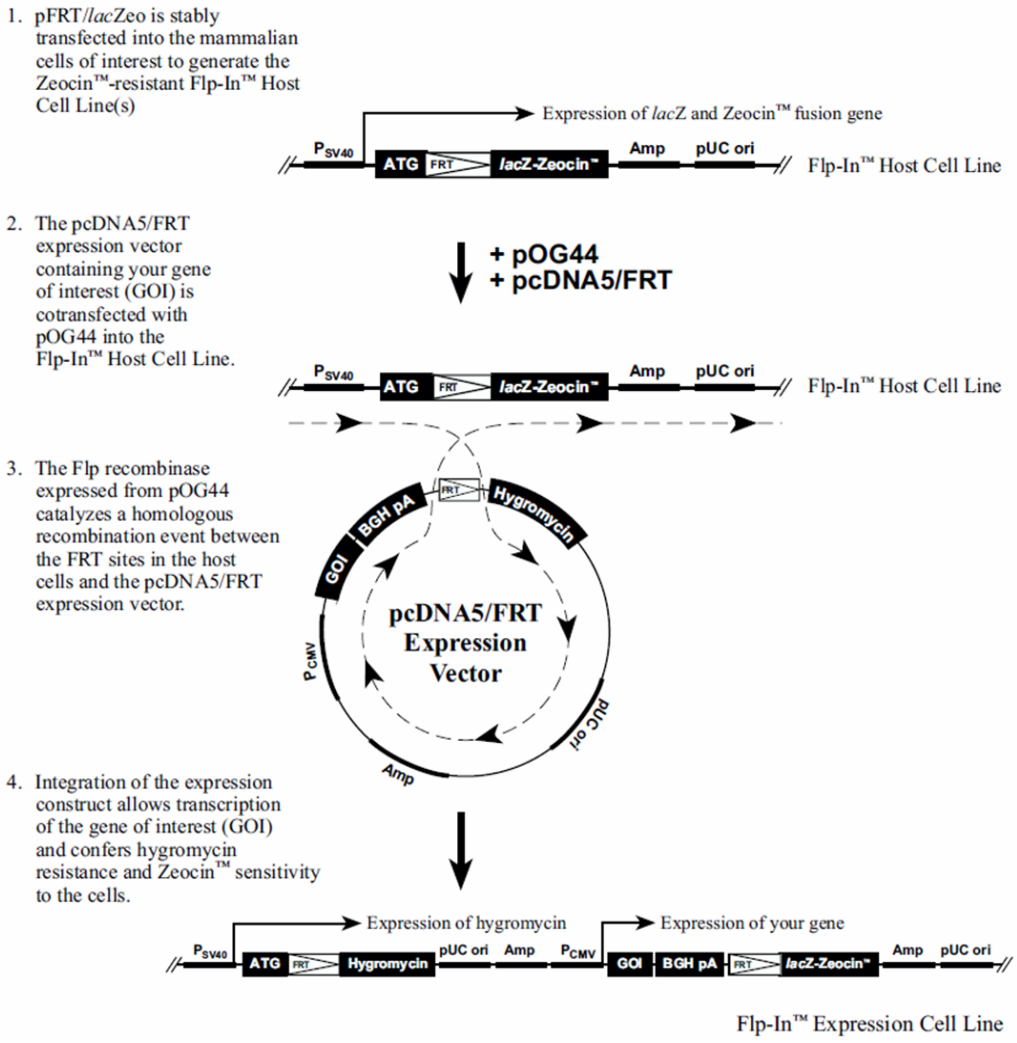


Figure 18 : Système Flp-In (Invitrogen) permettant la recombinaison homologue

La recombinaison homologue utilisant le système Flp-In se fait en 2 étapes. La première étape consiste à intégrer de façon aléatoire, dans le génome des cellules, des sites de recombinaison appelés sites FRT. Les cellules ayant intégré ces sites deviennent résistantes à la zéocine. A partir de cette population polyclonale, les clones cellulaires sont isolés et criblés par Southern Blot afin de déterminer le nombre de sites FRT intégrés à leur génome. Le clone 7 est un clone contenant un site unique de recombinaison. La seconde étape consiste à intégrer par recombinaison au site FRT les constructions d'intérêt. Le vecteur de type pcDNA$_5$-FRT contenant le gène d'intérêt est co-transfecté avec le plasmide pOG44 dans les cellules FRT. Le plasmide pOG44 permet l'expression de la Flp recombinase, necessaire à la recombinaison homologue entre le site FRT présent dans le génome de la cellule et le site FRT apporté par le vecteur d'expression pcDNA$_5$-FRT. Le vecteur pcDNA$_5$-FRT, outre la construction d'intérêt, apporte le gène de résistance à l'hygromycine qui s'intercale entre la zéocine et son promoteur. La recombinaison au site FRT va donc permettre l'expression du gène d'intérêt, conférer une résistance à l'hygromycine et abolir la résistance à la zéocine.

3.1.3.3. Lignées U87 FRT-7 modifiées

Nom	Sélection	Caractéristiques
U87 CMV-LucF	Hygro^R ; 50 µg / mL	Le gène de la LucF, contenant une cible du miRLuc dans la région codante, est sous le contrôle du promoteur CMV (intégration au site FRT).
U87 CMV-LucF/CMV-LucR	Blast^R ; 2 µg / mL	Le gène de la LucF, contenant une cible du miRLuc dans la région codante, est sous le contrôle du promoteur CMV (intégration au site FRT). L'expression de la LucR (intégration aléatoire) est contrôlée par un second promoteur CMV.
U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc	Blast^R ; 2 µg / mL	Le gène de la LucF, contenant une cible du miRLuc dans la région codante, est sous le contrôle du promoteur CMV (intégration au site FRT). Deux promoteurs Hsp70B contrôlent chacun l'expression de la LucR et l'expression co-cistronique de l'EmGFP et des 4 copies du miRLuc (intégration aléatoire).
U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg	Blast^R ; 2 µg / mL	Le gène de la LucF, contenant une cible du miRLuc dans la région codante, est sous le contrôle du promoteur CMV (intégration au site FRT). Deux promoteurs Hsp70B contrôlent chacun et l'expression de la LucR et l'expression co-cistronique de l'EmGFP et des 4 copies du miRneg (intégration aléatoire).
U87 CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S	Hygro^R ; 50 µg / mL	Le gène de la LucF, contenant une cible du miRLuc dans la région codante et une cible orientée en sens dans le 3'UTR, est sous le contrôle du promoteur CMV (intégration au site FRT).
U87 CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc	Blast^R ; 2 µg / mL	Le gène de la LucF, contenant une cible du miRLuc dans la région codante et une cible orientée en sens dans le 3'UTR, est sous le contrôle du promoteur CMV (intégration au site FRT). Deux promoteurs Hsp70B contrôlent chacun l'expression de la LucR et l'expression co-cistronique de l'EmGFP et 4 copies de la cassette miRLuc (intégration aléatoire).
U87 CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg	Blast^R ; 2 µg / mL	Le gène de la LucF, contenant une cible du miRLuc dans la région codante et une cible orientée en sens dans le 3'UTR, est sous le contrôle du promoteur CMV (intégration au site FRT). Deux promoteurs Hsp70B contrôlent chacun l'expression de la LucR et l'expression co-cistronique de l'EmGFP et 4 copies de la cassette miRneg (intégration aléatoire).
U87 Hsp-LucF	Hygro^R ; 50 µg / mL	Le gène de la LucF est sous le contrôle du promoteur Hsp70B (intégration au site FRT).

Tableau 9 : Lignées U87 FRT-7 modifiées utilisées et caractéristiques

Les lignées transformées (***Tableau 9***) sont toutes issues de la lignée clonale U87 FRT-7, isolée à partir d'une lignée polyclonale U87 FRT, elle-même obtenue à partir de la lignée U87 MG.

3.1.4. Animaux

3.1.4.1. Souris C57BL/6

Les souris C57BL/6 sont des souris immunocompétentes au pelage noir. Elles sont achetées à l'âge adulte (6 - 8 semaines) chez Charles River Laboratoires (France) et sont hébergées à l'animalerie conventionnelle A1.

3.1.4.2. Souris NOG

Les souris NOG (NOD/SCID/IL-2Rγ^{null}) sont des souris immunodéficientes au pelage blanc. Elles sont caractérisées par plusieurs anomalies du système immunitaire dont une déficience complète des cellules NK (natural killer), une absence des lymphocytes T et B matures, un disfonctionnement des macrophages et une absence de complément circulant. Cette lignée de souris permet de réaliser des xénogreffes de cellules tumorales humaines. Elles sont achetées à l'âge adulte (6 - 8 semaines) à l'animalerie transgénique de Bordeaux Segalen puis hébergées à l'animalerie conventionnelle A1.

3.1.4.3. Souris NLF1

Les souris NLF1 (Christians et al., 1995) sont des souris immunocompétentes au pelage noir. Ce sont des souris C57BL/6 transgéniques élevées à l'état homozygote à l'animalerie transgénique de Bordeaux Segalen. Elles possèdent le transgène LucF (codant pour la protéine luciférase Firefly) sous le contrôle du promoteur murin Hspa1b, promoteur thermo-sensible des Heat Shock Protein de 70 kDa (HSP). Ce transgène est présent en 3 copies par génome haploïde. Leur génotype est régulièrement contrôlé par PCR.

3.2. Méthodes de biologie cellulaire et biochimie

3.2.1. Bactériologie

3.2.1.1. Milieux

Dénomination	Nom	Composition	Fournisseur
LB-Agar	Lennox-L Agar	pour 1L : 10 g de Peptone 140, 5 g extraits de levure, 5 g NaCl, 12 g d'agar	Invitrogen
LB Broth Base	Lenox-L Broth Base	pour 1L : 10 g de Peptone 140, 5 g extraits de levure, 5 g NaCl	Invitrogen
SOC	SOC	2% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de $MgSO_4$ et 20 mM de glucose	Invitrogen

Tableau 10 : Milieux utilisés et composition

3.2.1.2. Culture bactérienne

Les bactéries sont cultivées sur milieux solides LB-Agar (préalablement stérilisé à l'autoclave 15 min à 121°C) supplémentés en condition liquide par un agent de sélection différent suivant le plasmide à amplifier. Pour les plasmides de type $pcDNA_5$, l'agent de sélection est l'ampicilline à une concentration finale de 100 µg / mL et pour les plasmides de type $pcDNA_{6.2}$, il s'agit de la spectinomycine à 50 µg / mL. Pour la mise en œuvre du crible blanc / bleu, le substrat X-gal (1,6 mg / boîte) est étalé sur les boîtes après solidification du milieu et à l'abri de la lumière. L'étalement des bactéries sur le milieu de culture est réalisé sous PSM de type II puis les boîtes sont incubées à 37°C.

L'amplification d'une colonie bactérienne est réalisée en milieu liquide LB Broth Base stérile supplémenté avec l'antibiotique adéquat (mêmes concentrations finales qu'en milieu solide). Après l'isolement d'une colonie dans du milieu liquide, son amplification est réalisée à 37°C sous agitation (225 rpm).

3.2.1.3. Transformation bactérienne

Les bactéries utilisées pour la transformation bactérienne sont dites compétentes. Elles sont isolées lors de la phase exponentielle de croissance de la culture bactérienne dans laquelle elles présentent des parois fines ainsi favorables à la pénétration de l'ADN.

3.2.1.3.1. Transformation par électroporation

Les bactéries électrocompétentes (en solution dépourvue de sels) conservées à -80°C sont décongelées dans la glace. Pour la transformation, 25 µL de bactéries sont mises en

présence de 0,5 µL de plasmide (soit environ 1 ng) à amplifier. Le mélange est soumis à un choc électrique (1 250 V, 5 ms, 1 pulse, cuve de 1 mm) qui provoque la formation de pores transitoires dans la membrane bactérienne, permettant le passage des acides nucléiques. Pour récupérer du stress de la transformation, les bactéries sont immédiatement incubées à température ambiante dans un milieu enrichi (milieu SOC, 125 µL) puis incubées 1h à 37°C sous agitation (225 rpm). Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu solide en présence de l'antibiotique de sélection adéquat et incubées 12h à 37°C.

3.2.1.3.2. Transformation par choc thermique

La transformation par choc thermique est moins efficace que celle par électroporation, mais elle est cependant utilisée lorsque l'ADN à amplifier est dans une solution trop concentrée en sels. Les bactéries chimiocompétentes conservées à -80°C sont décongelées dans la glace. Pour la transformation, les bactéries (25 µL) sont incubées (30 min) dans la glace en présence du plasmide à amplifier (0,8 µL). Le choc thermique est réalisé en plaçant le mélange ADN / bactéries pendant 30 s à 42°C. Les bactéries sont ensuite immédiatement incubées 2 min dans la glace. Le choc thermique provoque un remaniement lipidique au niveau de la membrane bactérienne nécessaire au passage des acides nucléiques. Le milieu SOC (125 µL) est ajouté à température ambiante. Après une incubation sous agitation (1h ; 37°C ; 225 rpm), les bactéries sont étalées sur un milieu solide en présence de l'antibiotique de sélection adéquat et incubées 12h à 37°C.

3.2.2. Culture de cellules eucaryotes

3.2.2.1. Tampons, milieux et réactifs

Dénomination	Nom	Composition	Fournisseur
PBS	Phosphate Buffered Saline	155,17 mM NaCl ; 2,97 mM Na_2HPO_4-$7H_2O$; 1,06 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4	Gibco
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	GlutaMAX™ I contenant 4,5 g / L de D-Glucose et 0,11 g / L de pyruvate de sodium	Gibco
SVF décomplémenté	Sérum de veau fœtal décomplémenté	Sérum de veau fœtal décomplémenté par la chaleur (56°C, 30 min) permettant la destruction du complément	Gibco
PSA	Pénicilline-Streptomycine-Amphotéricine	10 000 unités / mL Pénicilline ; 10 000 µg / mL Streptomycine ; 25 µg / mL Amphotéricine B	Gibco
MEM NEAA	Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids	Formulation complète confidentielle	Gibco
Trypsine	0,05 % Trypsin-EDTA	0,5 g / L de trypsine ; 0,2 g / L Na_2-EDTA	Gibco
Opti-MEM	Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™	Formulation complète confidentielle	Gibco
TransFast	TransFast™ Transfection Reagent	Formulation complète confidentielle	Promega

Tableau 11 : Tampons, milieux et réactifs utilisés et composition

3.2.2.2. Entretien des lignées

L'entretien des lignées cellulaires se déroule en conditions stériles dans une salle de culture de niveau 2 de sécurité (L2) et les cellules sont manipulées sous un PSM de type II. La croissance des cellules est suivie au microscope inversé. Les cellules sont cultivées dans du milieu complet composé de DMEM supplémenté avec 10% (v/v) de SVF décomplémenté, 1% (v/v) de PSA et 1% (v/v) de MEM NEAA. Les réactifs nécessaires à l'entretien des lignées (milieu complet, PBS et trypsine) sont pré-chauffés à 37°C. Les cellules sont diluées lorsqu'elles atteignent 80% de confluence lors d'une manipulation appelée « passage ». Les cellules, préalablement rincées avec du PBS, sont incubées en présence de trypsine (0,02 mL / cm^2, 3 min, température ambiante). Cette enzyme permet l'inhibition des zones d'adhérence entre les cellules et d'avec leur support. La réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de milieu complet (10 fois le volume de la solution de trypsine), le SVF permettant l'inhibition

de la trypsine. Après une centrifugation (5 min ; 300 *g* ; température ambiante), les cellules sont diluées et remises en culture dans du milieu complet additionné de l'antibiotique de sélection adéquat (Cf. 3.1.3.). Les lignées sont maintenues en culture à 37°C, en incubateur à 5% de CO_2 et en atmosphère saturée en humidité.

3.2.2.3. Dénombrement

Le dénombrement cellulaire est réalisé grâce à une cellule de Malassez. Pour cela, la suspension cellulaire est mise entre une lame de Malassez et une lamelle. Le comptage des cellules contenues dans le quadrillage de l'hématimètre permet de déterminer la concentration cellulaire.

3.2.2.4. Transfection transitoire

La transfection permet la pénétration d'acides nucléiques dans les cellules eucaryotes. La transfection transitoire permet d'obtenir l'expression transitoire d'un gène d'intérêt. L'agent de transfection utilisé est le réactif TransFast (Promega) qui est un agent de lipotransfection permettant d'envelopper l'ADN (chargé négativement) de lipides (chargés positivement). Le complexe ainsi formé pénètre dans la cellule par endocytose. Deux jours avant la transfection, les cellules sont ensemencées dans une plaque 4 puits à raison de 25 000, 15 000 ou 10 000 cellules / puits de 1,9 cm^2 suivant les besoins de l'expérimentation. Les cellules sont transfectées avec 250 ng d'ADN. L'ADN purifié (Cf. 3.3.4) est repris dans du milieu Opti-MEM (200 µL) et additionné de TransFast (3 µL / µg d'ADN). Le mélange ADN / Opti-MEM / TransFast est incubé (15 min ; température ambiante) pour permettre la formation des complexes cationiques. Après un rinçage au PBS, les cellules à transfecter sont mises en présence du mélange contenant l'ADN (200 µL) et incubées (30 min ; 37°C). Une fois la transfection réalisée, le mélange précédent est remplacé par du milieu complet (500 µL) et les cellules sont replacées dans l'incubateur (37°C ; 5% CO_2).

3.2.2.5. Transfection stable

La transfection stable permet d'intégrer une séquence d'ADN d'intérêt au génome de la cellule. Ainsi, le gène d'intérêt sera conservé au cours des générations.

3.2.2.5.1. Transfection stable par recombinaison au site FRT

Le système Flp-In™ (Cf. ***Figure 18***) permet d'insérer par recombinaison homologue la séquence d'intérêt au site FRT présent dans le génome de la lignée cellulaire U87 FRT-7. La recombinase Flp qui catalyse la réaction est codée par le plasmide pOG44.

Le protocole de transfection est identique à celui de la transfection transitoire, excepté le fait que les plasmides de type $pcDNA_5$ comportant la séquence FRT et pOG44 sont co-transfectés suivant différents ratios molaires et à raison de 250 ng d'ADN total / transfection.

Une fois la réaction réalisée, les cellules sont replacées dans l'incubateur (37°C, 5% CO_2) dans du milieu complet. Après 48h, les cellules transfectées sont sélectionnées en ajoutant de l'hygromycine (50 µg / mL) au milieu de culture. L'antibiotique est renouvelé tous les 2 jours pendant 15 jours. Pour faciliter la croissance des cellules transfectées, le milieu de sélection est composé de 50% (v/v) de milieu complet et de 50% (v/v) de milieu dit conditionné. Le milieu conditionné est un milieu de culture ayant contenu des cellules U87 MG, récupéré lors des différents passages et stérilisé par filtration (Milex, 0,22 µm). Il contient différents signaux de croissance sécrétés par les cellules U87 qui favorisent la croissance des cellules en sélection.

3.2.2.5.2. Transfection stable aléatoire

La transfection aléatoire est réalisée suivant le même protocole que la transfection au site FRT, à la différence que le plasmide codant pour la recombinase n'est pas utilisé. De ce fait, l'insertion de la séquence d'intérêt au génome est aléatoire. Le plasmide transfecté contenant le gène d'intérêt est de type $pcDNA_{6.2}$. La pression de sélection est réalisée comme précédemment, grâce à l'antibiotique blasticidine (2 µg / mL).

3.2.2.6. Chauffage des cellules en culture

Pour permettre l'activation du promoteur Hsp70B contrôlant l'expression des gènes d'intérêt, les cellules mises en plaque sont chauffées au bain-marie. Le milieu de culture est remplacé par du milieu complet pré-chauffé à 45°C et la plaque est immédiatement placée au bain-marie à 45°C durant 8 ou 20 min suivant l'expérimentation. Après le chauffage, les cellules sont replacées dans l'incubateur (37°C ; 5% CO_2).

3.2.2.7. Dosage *in vitro* de l'activité des luciférases

Le dosage de l'activité enzymatique de la LucF est réalisé à partir d'un lysat cellulaire en utilisant le kit « Luciferase Assay System » (Promega). Après un rinçage au PBS, les cellules sont lysées à l'aide d'une solution détergente (Cell Culture Lysis Reagent (Promega) ; 10 min ; température ambiante ; légère agitation). La mesure de l'activité de la LucF est réalisée à partir d'une fraction du lysat (5 µL) additionnée d'un réactif (50 µL, Luciferase Assay Substrate (LAS)) contenant le substrat de l'enzyme (luciférine) et les co-facteurs. La réaction enzymatique génère de la lumière qui est mesurée à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB850, Berthold). L'acquisition (10 s) est réalisée 10 s après l'ajout du réactif LAS. Les mesures sont exprimées en RLU (Relative Light Unit).

Il est également possible de mesurer séquentiellement, sur un même échantillon, l'activité de la LucF et de la LucR grâce au kit « Dual-Luciferase® Reporter Assay System » (Promega). Les cellules, préalablement rincées au PBS, sont lysées par un tampon détergent (Passive Lysis Buffer, Promega). A partir du lysat cellulaire (20 µL), l'activité de la LucF est d'abord mesurée par ajout du substrat et des co-facteurs (100 µL de Luciferase Assay Reagent II (LAR II), (Promega)). La lumière, générée par la réaction, est mesurée au luminomètre (10 s) 5 s après l'ajout du réactif LAR II. L'addition du réactif Stop and Glo® (100 µL) inhibe

l'activité de la LucF et initie l'activité de la LucR simultanément par ajout de son substrat (coelenterazine). Le signal luminescent généré par l'activité de la LucR est à son tour mesuré par le luminomètre (10 s).

3.2.2.8. Microscopie à fluorescence

Le milieu de culture des cellules est remplacé par du PBS avant la visualisation de l'EmGFP. Le microscope inversé de fluorescence ZEISS Axiovert 200 comprend une lampe à mercure FluoArc et est relié à une caméra HAL 100. Deux acquisitions successives sont réalisées avec l'objectif x 40. Une image de fluorescence est effectuée avec les filtres d'émission à 475 +/- 20 nm et d'excitation à 530 +/- 25 nm (***Figure 19***) suivie d'une image de contraste de phase. Le logiciel Axio Vison permet la superposition des 2 images obtenues.

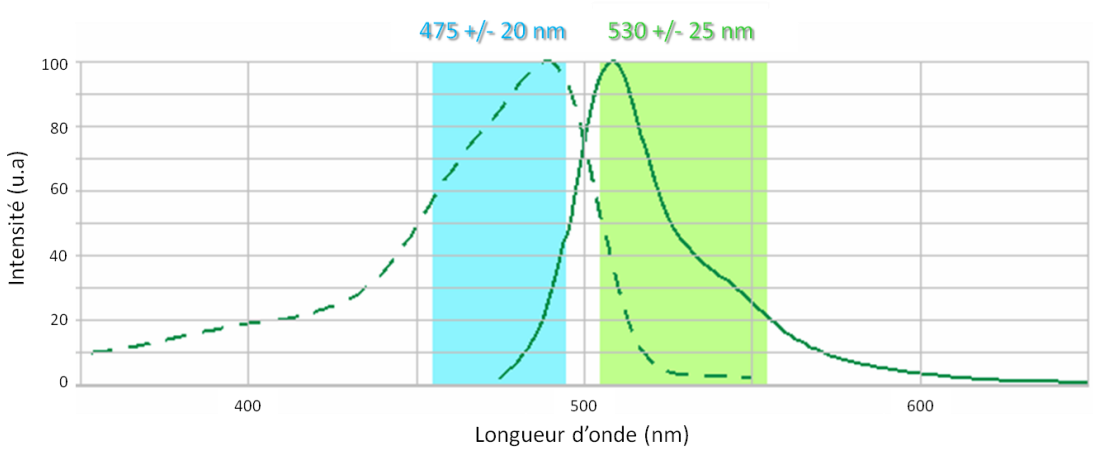


Figure 19 : Spectre d'excitation et d'émission de l'EmGFP et caractéristiques des filtres utilisés

L'EmGFP a un pic d'excitation à 487 nm et d'émission à 509 nm. Les filtres utilisés en microscopie de fluorescence sont des filtres de 475 +/- 20 nm pour l'excitation et 530 +/- 25 nm pour l'émission.

3.2.2.9. Cytométrie de flux

La cytométrie de flux permet de faire passer des cellules devant un faisceau laser pour les compter et les classer notamment en fonction de leur fluorescence. Les cellules U87 en suspension dans du PBS sont placées dans la glace jusqu'au moment de l'injection dans le cytomètre (Guava easycyte^{TM} Flow Cytometer Mini 6-2L ; Millipore). Le laser d'excitation à 488 nm et le filtre d'émission (525 nm +/- 15 nm) permettent de compter les cellules exprimant l'EmGFP et de déterminer le niveau de fluorescence sur les cellules vivantes. L'appareil est piloté par le logiciel Incyte.

3.3. Méthodes de biologie moléculaire

3.3.1. Tampons et milieux

Dénomination	Nom	Composition	Fournisseur
PBS	Phosphate Buffered Saline	155,17 mM NaCl ; 2,97 mM Na_2HPO_4-$7H_2O$; 1,06 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4	Gibco
TBE	Tris Borate EDTA	89 mM Tris borate ; 89 mM acide borique ; 2 mM EDTA ; pH 8,3	Promega
TEN	Tris EDTA NaCl	10 mM deTris ; 0.2 M NaCl ; 1 mM EDTA	Bio-RAD
Tampon de charge	Blue / Orange 6X Loading Dye	0,4% (v/v) orange G ; 0,03% (v/v) bromophenol blue ; 0,03% (v/v) xylene cyanol FF ; 15% Ficoll®400 ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 et 50 mM EDTA pH 8	Promega
TE	Tris EDTA	10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA ; pH 7,5	Molecular Probes

Tableau 12 : Tampons et milieux utilisés et composition

3.3.2. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction des ADN plasmidiques est réalisée à l'aide du kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega). La culture bactérienne (Cf. 3.2.1.2) dans un volume de 150 mL est centrifugée (10 min ; 5 000 *g*). Le culot bactérien est repris dans 6 mL d'une solution de resuspension cellulaire (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 10 mM EDTA, pH 8 ; 100 µg / mL RNase A, Promega) et les bactéries sont lysées par addition de 6 mL d'une solution de lyse (0,2 M NaOH ; 1 % SDS, Promega). Après 3 min d'incubation à température ambiante, la réaction est neutralisée (10 mL ; solution de neutralisation (4,09 M guanidine hydrochloride, pH 4,8 ; 759 mM acétate de potassium ; 2,12 M acide acétique glacial), Promega). Le mélange est incubé 30 min à température ambiante puis centrifugé 10 min à 10 000 *g*. Le surnageant est ensuite déposé sur un système de double colonnes. La première colonne est une colonne de lavage qui va permettre d'éliminer les débris cellulaires. La seconde est une colonne contenant de la silice qui fixe l'ADN. L'application du vide permet d'éliminer le soluté alors que l'ADN reste fixé sur la seconde colonne. L'ADN est alors lavé pour éliminer les endotoxines (5 mL, Promega) puis lavé avec une solution de lavage (20 mL ; 60 mM acétate de potassium ; 8,3 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 0,04 mM EDTA, pH 8 ; 60 % éthanol, Promega). Après avoir séché la colonne, l'ADN plasmidique est élué avec de l'eau Nuclease-Free (600 µL).

3.3.3. Dosage des acides nucléiques par spectrofluorimétrie

La quantification des acides nucléiques est réalisée par spectrofluorimétrie à l'aide d'un spectrofluorimètre (Versafluor® ; Bio-RAD).
Le fluorochrome Hoechst 33258 (Fluorescent DNA Quantitation Kit ; Bio-RAD) est un agent intercalant dont la fluorescence (excitation 360 nm ; émission 460 nm) dépend de sa fixation spécifique à l'ADN. La mesure est réalisée dans une cuve contenant une solution de Hoescht 33258 (0,1 µg / mL ; 2 mL de tampon TEN).
Le fluorophore RiboGreen (RiboGreen™ RNA Quantitation Kit ; Molecular Probes) est fluorescent (excitation 500 nm ; émission 525 nm) lorsqu'il est lié à l'ARN. La mesure est réalisée dans une cuve contenant une solution de RiboGreen (1 / 2 000ème ; 2 mL de tampon TE).

Dans les 2 cas, la fluorescence étant proportionnelle à la quantité d'acides nucléiques, elle permet une quantification à l'aide du spectrofluorimètre étalonné grâce à une solution standard d'ADN ou d'ARN. La sensibilité est de l'ordre de 10 ng / mL pour l'ADN et de 1 ng / mL pour l'ARN.

3.3.4. Précipitation et purification d'ADN

Les ADN sont précipités et purifiés grâce au réactif « SureClean » (Bioline). Le réactif est mélangé volume à volume avec la solution d'ADN. Le mélange est vortexé, incubé 10 min à température ambiante puis centrifugé à 20°C pendant 10 min à 14 000 *g*. Le culot obtenu est lavé avec un volume d'éthanol à 70% (v/v), vortexé puis centrifugé suivant les mêmes conditions que précédemment. Le culot contenant l'ADN est ensuite séché à l'air libre et peut être repris dans le solvant désiré.

3.3.5. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits grâce à la méthode phénol / chloroforme. Les cellules sont reprises dans le réactif TRIZOL® (500 µL ; Invitrogen), contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine. Après une incubation (5 min ; température ambiante), 100 µL de chloroforme sont ajoutés, puis le mélange est vortexé avant d'être incubé 3 min à température ambiante. Une centrifugation (15 min ; 12 000 *g* ; 4°C) est ensuite réalisée afin de séparer les différentes phases. La phase aqueuse, contenant les ARN, est ensuite récupérée et 250 µL d'isopropanol sont ajoutés afin de précipiter les ARN. Après une incubation (10 min ; température ambiante), l'échantillon est centrifugé (10 min ; 12 000 *g* ; 4°C). Une fois le surnageant retiré, le culot d'ARN est lavé avec 500 µL d'éthanol 70% (v/v) puis centrifugé (5 min ; 7 500 *g* ; 4°C). Le culot est séché à l'air libre pendant 10 min puis repris dans de l'eau Nuclease-Free (20 µL). Les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C.

3.3.6. Traitement des ARN à la DNase I

La DNase I est une endonucléase qui dégrade les ADN simple et double brins. Le volume réactionnel final est de 10 µL et comprend 1 µg d'ARN totaux, le tampon réactionnel adéquat fourni par le fabricant (Fermentas) et 1 unité de DNase I (Fermentas). La réaction a lieu à 37°C pendant 30 min. L'activité enzymatique est ensuite inhibée avec l'ajout de 4,5 mM d'EDTA suivie d'une incubation (10 min ; 65°C).

3.3.7. Réverse-transcription

La réverse-transcription est réalisée directement sur l'ARN traité avec la DNaseI. Un mélange d'hexamers (250 ng ; Promega) est ajouté à l'échantillon. L'étape de dénaturation consiste en une première incubation (5 min ; 70°C) suivie d'une deuxième (5 min ; 4°C). Puis 8,4 µL de milieu réactionnel sont ajoutés à l'échantillon. Le milieu réactionnel se compose du tampon fourni par le fabricant (Promega), de 3 mM de $MgCl_2$ (Promega), de 0,5 mM de dNTP (Promega) et de 2 unités d'inhibiteurs de RNase (Promega). Puis 1 µL d'enzyme ImpromII (Promega) est ajouté au milieu réactionnel. L'étape d'hybridation est réalisée à température ambiante pendant 5 min. L'enzyme catalyse ensuite l'élongation lorsque les échantillons sont incubés 1h à 42°C. Enfin, l'enzyme est inactivée grâce à une incubation de 15 min à 70°C. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20°C.

3.3.8. Amplification d'ADN par PCR

La réaction de polymérisation en chaine ou PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN. Cette méthode nécessite l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques (Cf ***Tableau 13***) encadrant le fragment d'intérêt, d'un mélange de désoxyribonucléotides (dNTP) libres et d'une ADN polymérase. La réaction, réalisée au moyen du thermocycleur T-gradient (Biometra), comprend une étape initiale de dénaturation (95°C ; 3 min) suivie de 30 à 40 cycles et se termine par une étape finale d'élongation (72°C ; 5 min). Chaque cycle est constitué d'une phase de dénaturation (95°C ; 30 s), d'une phase d'hybridation des amorces sur la matrice (la température est fonction de la température de ½ dénaturation des amorces (Tm) ; 30 s) et d'une phase d'élongation (72°C ; durée proportionnelle à la taille de l'amplifiât : 1 min / 1 Kb).

L'ADN polymérase thermostable utilisée est la DreamTaq DNA polymerase (Fermentas). Le milieu réactionnel, dont le volume peut être de 25 ou 50 µL final suivant l'amplification effectuée, est composé du tampon fourni par le fabricant (Fermentas), de l'ADN polymérase (1,25 unités), de diméthylsulfoxyde (DMSO ; 1% (v/v)) afin de faciliter la réaction, des dNTP libres (0,2 mM), des 2 amorces oligonucléotidiques monobrins (0,2 µM chacune) ainsi que de la matrice ADN à amplifier (0,4 µL pour un plasmide ou 1,5 µL de culture bactérienne).

Amorce	Séquence 5'→3'	Sens	Commentaires
miR-D	GGATCCGACATCACTTACGC	D	5' de la séquence cible du miRLuc + site BamHI pour le clonage
miR-R	GGATCCCAACACCGGCATAAAG	R	3' de la séquence cible du miRLuc + site BamHI pour le clonage
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	D	Présence de la séquence cible dans le vecteur TOPO®vector (Invitrogen)
T7-R	TAATACGACTCACTATAGGG	R	Présence de la séquence cible dans le vecteur TOPO®vector (Invitrogen)
Hygro-1R	GAGATGCAATAGGTCAGGCT	R	Présence de la séquence cible du miRLuc
LucF-2D	AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAG	D	Présence de la séquence cible du miRLuc et vérification de l'orientation
LucF-10D	GTCCGTTCGGTTGGCAGAAGC	D	Vérification de l'orientation de la séquence cible du miRLuc
T75UTR-Start	TAATACGACTCACTATAGGGGC CAGCCCCCGATTGGGGGCG	D	5' de la région 5UTR du VHC + amorce de la T7 polymérase
3UTR-Stop	ACTTGATCTGCAGAGAGGCCAG	R	3' de la région 3UTR du VHC
T7cap	TAATACGACTCACTATAGGGCC CCGGGAGGTCTCGTAGACC	D	5' de la fin de la région 5UTR du VHC
LucF-Stop	GGCCTGGAGTGTTTAGCTCCC	R	3' du gène de la LucF

Tableau 13 : Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR
D : amorce dans le sens direct soit 5' → 3' ; R : amorce dans le sens réverse soit 3' → 5'
La synthèse des amorces est confiée à un prestataire de service (Eurogentec).

3.3.9. PCR quantitative

La PCR quantitative (PCRq) en temps réel permet de quantifier les produits d'amplification au cours de leur synthèse. La quantification de l'ADN amplifié est réalisée grâce au marqueur fluorescent SYBR Green qui se lie spécifiquement à l'ADN double brin. Sa fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée. La fluorescence est donc récupérée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle. Le thermocycleur utilisé est le MyIQ Real Time (Bio-RAD) piloté par le logiciel MyIQ. Celui-ci permet l'obtention des courbes d'amplification et de dissociation. Cette dernière courbe

permet une vérification de la spécificité de l'amplification. L'efficacité de la PCR est également testée en réalisant des dilutions successives d'un même échantillon et pour chaque couple d'amorce utilisé (Cf. ***Tableau 14***). Le cycle seuil (Ct), défini comme étant le cycle à partir duquel le signal de fluorescence dépasse celui du bruit de fond, peut être déterminé pour chaque échantillon. Le Ct du gène d'intérêt est comparé au Ct de l'ADNc du gène de référence 36B4 codant pour une protéine phosphoribosomal (RPLP0) dont l'expression est supposée constante. La quantification relative de l'échantillon peut être déterminée grâce au calcul du ΔCt (Ct de l'échantillon - Ct gène référence). Chaque Ct a été déterminé en triplicate.
Le mélange réactionnel (25 µL) est constitué de 10 µL d'ADNc dilué au 1 / 100ème, 0,4 µM de chaque amorce et 12,5 µL du milieu Maxima SYBR Green / Fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas) comprenant tous les réactifs nécessaires à l'amplification (Maxima® Hot Start *Taq* DNA polymerase, dNTPs, tampon optimisé, SYBR® Green I, Fluorescein).

Amorce	Séquence 5'→3'	Sens	Commentaires
36B4-S	GCTTCATTGTGGGAGCAGAC	D	5' du gène 36B4
36B4-AS	CATGGTGTTCTTGCCCATCAG	R	3' du gène 36B4
LucF-12D	TCCATTCCATCACGGTTTTGG	D	5' de la LucF
LucF-13R	GCTATGTCTCCAGAATGTAGC	R	3' de la LucF
Hsp70-1D	CGCCTACTTCAACGACTCTCAG	D	5' du gène Hsp70B endogène
Hsp70-4R	GCTTGTTCTGGCTGATGTC	R	3' du gène Hsp70B endogène

Tableau 14 : Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCRq
D : amorce dans le sens direct soit 5' → 3' ; R : amorce dans le sens réverse soit 3' → 5'
La synthèse des amorces est confiée à un prestataire de service (Eurogentec).

3.3.10. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose. La concentration du gel en agarose (0,8 à 2% (w/v)) est choisie suivant la taille des fragments d'ADN à séparer. L'agarose est dissoute dans du tampon TBE. L'agent intercalant GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (1 / 10 000ème ; FluoProbes®, Interchim) dont la fluorescence dépend de sa fixation à l'ADN est ajouté. Les échantillons mélangés au tampon de charge (6 X Load Dye ; Promega) sont déposés dans les puits. La migration est effectuée à température ambiante et à un voltage constant (100 V) dans une cuve horizontale. Les fragments d'ADN sont visualisés par fluorescence sous éclairage UV (302 nm) à l'aide de l'appareil Gel doc 2000 (Bio-RAD), et leur taille est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire (1 Kb Ladder ; Invitrogen). Les gels sont photographiés puis analysés grâce au logiciel Quantity One (Bio-RAD).

Dans le cas où l'ADN ayant migré dans le gel doit être récupéré puis purifié (Cf. 3.3.12.3), la bande d'intérêt est excisée du gel à l'aide d'un scalpel.

3.3.11. Synthèse d'ARN

3.3.11.1. Les ARN 5UTR-LucF-3UTR

Les étapes de synthèse des ARN 5UTR-LucF-3UTR ont été réalisées au laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, UMR 5234, Bordeaux Segalen en collaboration avec Michel Ventura. Ces ARN comportent les régions non traduites (5'UTR et 3'UTR) du virus de l'hépatite C (VHC) encadrant la séquence codante de la LucF. Les étapes de préparation des ARN ont été réalisées avec du matériel et des produits différents du reste des travaux de cette thèse, elles seront donc détaillées toutes ensemble dans ce paragraphe.

3.3.11.1.1. Obtention des produits PCR, vérification et purification

Une amplification par PCR est réalisée afin d'introduire le promoteur de la polymérase du phage T7 en 3' de la séquence devant être transcrite *in vitro*. Les PCR ont été réalisées à partir du plasmide pGEMT/5UTR-LucF-3UTR (Cf. 3.1.1.) avec le couple d'amorces T75UTR-Start / 3UTR-Stop (Cf. 3.3.8). L'amplification de l'ADN est réalisée dans un volume de 50 µL comprenant 10 ng de plasmide en présence de 10 µL de tampon (Phusion Buffer 5 X ; Finnzyme), de $MgCl_2$ (50 mM), de dNTP libres (2,5 mM), de DMSO (0,5% (v/v)), des 2 amorces oligonucléotidiques monobrins (50 pmoles chacune) et de la Taq polymerase Phusion (1 unité ; Finnzyme). La réaction de PCR commence par l'activation de l'enzyme (98°C ; 30 s) suivie par 42 cycles comme décrits précédemment (Cf. 3.3.8.) et elle se termine par une étape finale d'élongation (72°C ; 7 min).

Les produits de PCR obtenus sont vérifiés pour leur taille sur gel d'agarose 1% (Cf. 3.3.10.), puis ils sont purifiés sur colonne MicroSpin™ S400 HR (GE Healthcare – Amersham) permettant ainsi l'élimination des amorces et des dNTP libres. Pour cela, la colonne est préalablement centrifugée (1 min ; 735 *g*). L'échantillon contenant les produits de PCR est placé au centre de cette colonne qui est ensuite de nouveau centrifugée (2 min ; 735 *g*). L'éluât obtenu est ajusté à 200 µL avec de l'eau puis traité par un volume de phénol. Après centrifugation (5 min ; 14 000 rpm), la phase aqueuse contenant l'ADN est prélevée et additionnée à un volume de chloroforme afin d'éliminer le phénol résiduel. Après une centrifugation similaire à la précédente, la phase aqueuse est récupérée.

3.3.11.1.2. Précipitation des ADN

A la phase aqueuse récoltée précédemment, est ajouté du NaCl (4 M ; 10% du volume récolté) ainsi que de l'éthanol (100% ; 3 volumes). Le tube, après avoir été bien agité, est incubé 12h à -20°C. Une centrifugation (25 min à 14 000 rpm) est ensuite réalisée suivie d'un lavage à l'éthanol à 70%. Après une nouvelle centrifugation, le culot est séché puis repris dans de l'eau Nuclease-free (10 µL). La concentration d'ADN est ensuite déterminée par spectrométrie (ND-1000 NanoDrop).

3.3.11.1.3. Transcription *in vitro*

Cette étape est réalisée à l'aide du kit MEGAscript (Ambion) sur les produits de PCR purifiés contenant la séquence du promoteur de la T7 polymérase. Les produits de PCR amplifiés grâce au couple d'amorces T75UTR-Start / 3UTR-Stop, sont utilisés pour générer l'ARN 5UTR-LucF-3UTR. L'ADN (1 µg dans 8 µL) est transcrit (4h ; 37°C) par la T7 polymérase (Ambion) en présence des ribonucléotides et du tampon de transcription (Megascript, Ambion). Les matrices d'ADN sont alors dégradées grâce à l'action de la DNaseI (15 min ; 37°C).

3.3.11.1.4. Précipitation des ARN

Les transcrits synthétisés par transcription *in vitro* sont mis en présence d'acétate d'ammonium (15 µL ; 5 M), d'EDTA (100 mM) et d'eau Nuclease-Free (115 µL) pour arrêter la réaction. Un égal volume de phénol / chloroforme est additionné avant une centrifugation (5 min ; 14000 rpm). La phase aqueuse est récupérée puis précipitée par un volume d'isopropanol. Après incubation (12h ; -20°C), l'ARN est centrifugé (25 min ; 14000 rpm) puis lavé à l'éthanol à 70%. Le culot est séché puis repris dans de l'eau Nuclease-free (50 µL). La concentration d'ARN est ensuite déterminée par spectrométrie (ND-1000 NanoDrop). Pour vérifier l'intégrité des transcrits, 1 µg est déposé sur un gel d'acrylamide à 5%, en présence d'urée (7 M). La migration (45 min ; 25 W) est effectuée dans du TBE puis le gel est coloré au Stains all (Acros Organics, Noisy le Grand, France).

3.3.11.2. Les ARN 5UTR-LucF-polyA et cap-LucF-polyA

Les PCR ont été réalisées à partir du plasmide pGEMT/5UTR-LucF-3UTR (Cf. 3.1.1.) avec le couple d'amorces T75UTR-Start / LucF-Stop pour la synthèse des ARN 5UTR-LucF-polyA et le couple T7cap / LucF-Stop pour celle des ARN cap-LucF-polyA (Cf. 3.3.8.). L'amplification de l'ADN est réalisée puis les produits PCR sont purifiés (Cf. 3.3.11.1.1.). La synthèse des ARN 5UTR-LucF-polyA et cap-LucF-polyA *in vitro* a été réalisée par MitoProd SA à partir des produits PCR obtenus.

3.3.11.3. Analyse de la pureté des ARN

La pureté des ARN transcrits *in vitro* est vérifiée en électrophorèse en circuit microfluidique (Bioanalyzer Agilent 2100). L'appareil permet la mesure en temps réel de l'intensité de fluorescence de l'échantillon (50 ng) qui est déposé en présence du marqueur fluorescent sur la puce (Agilent RNA 6000 Nano). Les résultats sont visualisés sous forme d'électrophorégrammes et le logiciel évalue l'intégrité de chaque préparation d'ARN et attribue un indice de qualité (RNA Integrity Number) à chaque échantillon.

3.3.12. Clonage

3.3.12.1. Restriction enzymatique

La digestion enzymatique est effectuée sur 1 µg d'ADN dans un volume final de 20 µL. Le mélange réactionnel est composé du tampon recommandé par le fournisseur (Promega), de 0,1 mg / mL de BSA acétylée (Bovine Serum Albumine ; Promega) et de 5 unités d'enzyme de restriction (Promega). La réaction a lieu à 37°C pendant 1h.

3.3.12.2. Déphosphorylation

Cette étape permet aux vecteurs linéarisés de ne pas se refermer sur eux-mêmes. L'utilisation d'une alkaline phosphatase (CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), Promega) va hydrolyser les groupements phosphates de l'ADN. L'ADN purifié (Cf. 3.3.4) est repris dans 40 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 8. A l'ADN est ensuite ajouté le tampon fourni par le fabricant (Promega) et l'alkaline phosphatase (Promega). La quantité d'enzyme ajoutée est fonction de la taille et de la quantité d'ADN à déphosphoryler. En effet, 0,01 unité de CIAP déphosphoryle 1 pmole d'extrémité d'ADN. Le mélange réactionnel est incubé (30 min ; 37°C) puis mis en présence d'un nouvel aliquot de CIAP. Une nouvelle incubation (30 min ; 37°C) est réalisée puis l'enzyme est inactivée (10 min ; 75°C).

3.3.12.3. Purification d'ADN à partir d'un milieu de réaction de PCR ou d'un gel d'agarose

Le kit « Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega) permet l'extraction et la purification d'ADN à partir du mélange réactionnel final de PCR ou d'un gel d'agarose.

Dans le cas d'un produit PCR, un volume de solution « Membrane Binding Solution » (4,5 M d'isothiocyanate de guanidine ; 0,5 M d'acétate de potassium ; pH 5, Promega) égal au volume de produit PCR est ajouté. Dans le cas d'un fragment d'ADN contenu dans un gel, 10 µL de « Membrane Binding Solution » sont ajoutés pour 10 mg de gel puis le mélange est incubé à 60°C jusqu'à dissolution complète du gel.

Dans les deux cas, le mélange ADN / « Membrane Binding solution » est déposé sur une colonne et incubé (1 min ; température ambiante). L'éluât est éliminé par centrifugation (1 min ; 14000 *g*) puis la colonne est lavée à deux reprises par une solution alcoolique (10 mM d'acétate de potassium pH 5 ; 80% (v/v) d'éthanol et 16,7 µM EDTA, pH 8, Promega). Une centrifugation (1 min, 14 000 *g*) permet l'élimination de l'éluât. La colonne est séchée (10 min ; 14 000 *g*), puis 50 µL d'eau Nuclease-Free sont ajoutés. Après une incubation finale (1 min ; température ambiante), l'élution de l'ADN est réalisée au moyen d'une centrifugation (1 min ; 14 000 *g*).

3.3.12.4. Quantification de l'ADN sur gel d'agarose

Un ADN ayant été extrait suite à une migration sur gel d'agarose ne peut pas être quantifié par spectrofluorimétrie. Cette incompatibilité est due à la présence de l'intercalant GelRed qui, malgré la purification sur colonne de l'ADN, interfère avec la quantification au Versafluor. Dans ce cas, la quantification de l'ADN est réalisée après une migration sur gel d'agarose. Cette quantification est estimée par comparaison entre l'intensité de la bande de l'échantillon avec celles du marqueur de taille « Low DNA Mass Ladder » (Invitrogen). A chaque bande de ce marqueur est référencée une quantité d'ADN.

3.3.12.5. Ligation

Ligation des ADN purifiés

La ligation entre 2 fragments d'ADN est catalysée par l'enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen). Le milieu réactionnel est composé de 30 fmoles d'extrémités du vecteur receveur et de 90 fmoles d'extrémités de l'insert. La ligation est réalisée dans le tampon fourni par le fabricant auquel est ajouté 0,2 unité de T4 DNA ligase. La réaction s'effectue à 25°C pendant 1h.

Clonage des produits PCR

Le clonage des produits PCR est réalisé à l'aide du kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) qui contient un vecteur linéarisé présentant une base T aux extrémités 3'. Ce plasmide permet d'intégrer directement les produits PCR obtenus après une amplification par une *Taq* polymerase qui ajoute une base A aux extrémités 3' lors de la synthèse. L'insertion du produit PCR interrompt la séquence codant pour le facteur de complémentation alpha et permet le criblage phénotypique (crible blanc / bleu) des colonies bactériennes. La ligation par la T4 DNA ligase (5 min ; 25°C) s'effectue dans un milieu réactionnel de ligation (6 µL) composé du produit PCR (0,5 à 4 µL), de 1 µL de solution salée (1,2 M NaCl, 0,06 M $MgCl_2$) et de 1 µL de TOPO®vector (10 ng de plasmide pCR®2.1-TOPO dans 50% glycérol, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 14 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 100 µg / mL BSA et du rouge de phénol). Une fraction de l'échantillon est directement utilisée pour transformer par choc thermique les bactéries (Cf. 3.2.1.3.2.) qui sont étalées sur un milieu solide en présence du substrat X-gal et de l'antibiotique adéquat (Cf. 3.2.1.2.).

3.3.12.6. Séquençage

Le séquençage est réalisé par un prestataire de service (Beckmann Coulter Genomic) à partir de 3 µg de plasmide.

3.4. Méthodes d'expérimentation animale

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été effectuées conformément aux dispositions légales en vigueur (Agrément d'expérimentation animale F. Couillaud 33-04392 ; Agrément OGM du 18 / 12 / 2009 ; Formation à l'expérimentation animale niveau 1 K. Pinel ; R-45GRETA-F1-10 ; 03 / 2012) et avec l'avis favorable du comité d'éthique d'établissement (saisine N°5012033).

3.4.1. Animaleries

Les animaux ont été hébergés à l'animalerie transgénique (Resp. Dr. Pierre Costet) ou à l'animalerie conventionnelle A1 (Resp. Mme. Laetitia Medan) de l'université Bordeaux Segalen en fonction du statut sanitaire de chaque animal. Les souris sont élevées dans des conditions standardisées de température et de lumière et ont accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum* dans leur hébergement.

3.4.2. Anesthésie

Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Aerane®, Belamont, Nicholas Piramal Limited, London UK) présent à 2% dans un flux d'air. L'isoflurane est un agent halogéné lourd qui permet une induction rapide de l'anesthésie et une récupération prompte de l'animal dès l'arrêt de l'inhalation. L'animal est placé dans une boîte hermétique en plexiglas traversée par le flux anesthésique. Une fois l'animal anesthésié, son museau est placé dans un masque (TEM-SEGA, Bordeaux, France) alimenté par le même flux anesthésique tout au long de l'expérimentation. L'air expiré contenant l'isoflurane est piégé sur des filtres à charbon actif.

3.4.3. Rasage

Pour l'imagerie optique, afin de faciliter le passage des photons et pour éviter les artefacts liés à l'auto-fluorescence du pelage, les zones de l'animal devant être visualisées sont rasées. Les souris sont anesthésiées, rasées grâce à une tondeuse électrique puis épilées à la crème dépilatoire (Veet®, peau sensible). La peau des souris est ensuite abondamment rincée à l'eau tiède.

3.4.4. Xénogreffes sous-cutanées

Les cellules tumorales sont maintenues en culture (Cf. 3.2.2.2.) durant 10 passages puis sont renouvelées afin de limiter toute variabilité susceptible de compromettre les expérimentations. Pour réaliser des xénogreffes sous-cutanées, les cellules sont utilisées

lorsqu'elles atteignent 80% de confluence en culture. Elles sont injectées (2.10^6 cellules ; 100 µL PBS) sur souris vigile à l'aide d'une seringue à insuline (TERUMO®), en sous-cutané, sur les pattes arrière au niveau du muscle tibial crânial des souris. Des tumeurs d'environ 5 mm de diamètre sont obtenues au bout de 4 à 6 semaines.

3.4.5. Mesure du volume tumoral au pied à coulisse

Les tumeurs sous-cutanées sont mesurées au pied à coulisse (Castorama, 10W12, modèle 0 – 150 mm). Les mesures de la longueur et de la largeur sont réalisées chacune 3 fois par le même expérimentateur puis moyennées. Le volume tumoral est ensuite calculé selon la formule de Feldman (Feldman et al., 2009) où : V est le volume, L la longueur, l la largeur et f le facteur tenant compte de l'épaisseur de la tumeur (f = 1,58 pour une souris femelle et 1,69 pour une souris mâle) :

$$V = \frac{\pi}{6} f (L \times l)^{3/2}$$

3.4.6. Chauffage par immersion au bain-marie

Les souris préalablement rasées et anesthésiées sont placées sur une plateforme en plexiglas disposée à la surface de l'eau du bain-marie (***Figure 20***). La plateforme percée est équipée d'un masque d'anesthésie pour maintenir l'animal endormi pendant toute la durée du chauffage. De plus, l'animal est placé sur du polystyrène afin de l'isoler du plexiglas en contact avec l'eau à 45°C. Ce dispositif permet le chauffage simultané des 2 pattes arrière de la souris ou d'une seule suivant l'expérience envisagée. Chaque patte est placée dans l'eau à 45°C pendant 8 min. Le bain-marie utilisé permet de garder une température relativement uniforme tout au long du chauffage (+/- 0,1°C), vérifiée par un thermomètre optique (Luxtron, USA).

Figure 20 : Dispositif expérimental pour le chauffage au bain-marie des pattes de souris
La souris est positionnée sur la plateforme en plexiglas de manière à ce qu'une patte trempe dans l'eau à 45°C. La souris est maintenue anesthésiée durant toute la durée de l'hyperthermie grâce au masque pour petit animal relié au système d'anesthésie.

3.4.7. Electroporation *in vivo*

3.4.7.1. Appareillage

Le générateur d'impulsions haute tension unipolaire Electro Cell S20 (BETA tech) est utilisé *in vivo* pour faire pénétrer les acides nucléiques dans des cellules. L'électroporateur dispose d'un condensateur chargé à une tension programmable entre 0 et 2 000 V. Le nombre d'impulsions est prédéterminé en maitrisant la largeur de l'impulsion et la période. Les paramètres tels que l'amplitude de l'impulsion (U), la largeur de l'impulsion (T), la période de répétition de l'impulsion (P) et le nombre de répétitions de l'impulsion (R) peuvent être configurés en fonction de l'expérimentation (***Figure 21***).

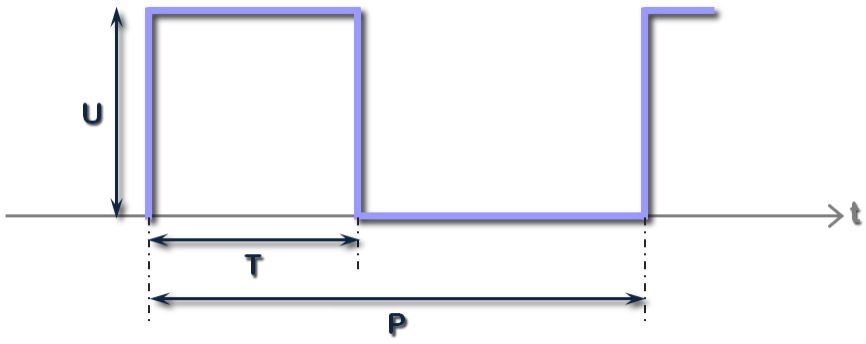


Figure 21 : Représentation schématique de la forme d'onde des impulsions délivrées par l'électroporateur Electro Cell S20 (BETA tech)
U : amplitude d'impulsion (V), T : largeur de l'impulsion (µs), P : période de répétition de l'impulsion (ms), t : temps.

Les impulsions sont délivrées à l'aide d'une pédale externe reliée à l'électroporateur. Les électrodes utilisées sont des électrodes plates en acier inoxydable distantes de 0,5 ou de 1 cm suivant l'expérimentation. Ces plaques sont placées de part et d'autre de la zone à électroporer (***Figure 22***). Cette zone entre les électrodes, d'une distance d (cm), est soumise à un champ électrique homogène d'intensité E (V / cm) tel que E (V / cm) = Tension U (V) / d (cm).

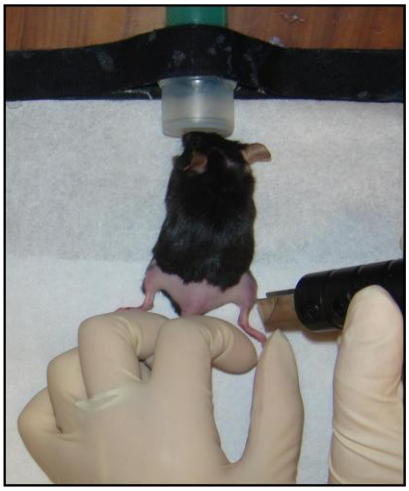


Figure 22 : Electroporation in vivo

Utilisation d'électrodes plates dont les plaques sont distantes de 0,5 cm. L'injection d'acides nucléiques est effectuée sur une peau préalablement épilée. La zone à électroporer est enduite de gel conducteur et, 30 s environ après l'injection, le courant électrique est appliqué sur souris anesthésiée.

3.4.7.2. Protocole des différents types d'électroporation

Avant chaque électroporation (EP), la zone cible a été préalablement rasée (Cf. 3.4.3.).

Les EP en intra-dermique (ID) et en intra-tumorale (IT) sont réalisées sur les pattes arrière des souris. Les acides nucléiques en solution dans du PBS (5, 10 ou 15 µg suivant les expérimentations dans 10 ou 20 µL de PBS) sont injectés grâce à une seringue à insuline (TERUMO®) dans la zone choisie, sur les souris anesthésiées. La zone à électroporer est enduite d'un gel conducteur (Gel échographique Eko Gel, Asept In Med) et les impulsions électriques sont délivrées dans les 30 s suivant l'injection.

Pour les EP en intra-cérébrale (IC), la souris anesthésiée est placée dans un cadre stéréotaxique. Des barres placées dans les conduits auditifs externes permettent le maintien céphalique et facilitent l'injection intra-crânienne des acides nucléiques. Le crâne de l'animal est désinfecté avec de l'alcool à 70% puis une incision cutanée para sagittale de 8 mm est réalisée. Un trou de trépan est ensuite réalisé dans la région pariétale droite à 2,5 mm de la suture sagittale et 1 mm en avant de la suture lambdatique. L'injection d'acides nucléiques (dans 5 µL de PBS) est réalisée à l'aide d'une canule reliée à une seringue d'Hamilton de 50 µL, placée sur le cadre et préalablement remplie avec de l'huile minérale (Promega). L'injection est réalisée à une profondeur de 2,5 mm et à raison de 1 µL / min. Après l'injection, le trou de trépan est rebouché avec de la cire de Horsley. La plaie est ensuite suturée avec du fil non résorbable (Monocryl, 5-0, Ethicon, Johnson-Johnson). L'animal est sorti du cadre stéréotaxique et les électrodes dont les plaques sont distantes de 1 cm sont ensuite positionnées de part et d'autre de la cicatrice recouverte de gel conducteur. A la suite de l'EP, les souris sont soumises à une surveillance accrue (2 fois / jour) afin de surveiller l'apparition d'éventuels comportements inhabituels et d'administrer au besoin des anti-douleurs.

Pour les différentes expérimentations, plusieurs conditions d'EP ont été réalisées (***Tableau 15***).

	Intensité du champ électrique (V / cm)	Durée (ms)	Fréquence (Hz) (f = 1 / P)	Nombre de pulses / cycle	Nombre de cycles*	Distance entre les plaques de l'électrode (cm)
ID	200	20	1	4	2	0,5
IT	600	5	1	5	2	0,5
IC	200	5	1	4	2	1

Tableau 15 : Conditions de courant et protocoles d'électroporation
f : fréquence (Hz), P : période de répétition de l'impulsion (s), ID : intra-dermique, IT : intra-tumoral, IC : intra-cérébrale
** la polarité de l'électrode est inversée entre chaque cycle*

3.4.8. Imagerie

3.4.8.1. Appareillage

L'imagerie optique de fluorescence et de bioluminescence sur petit animal est réalisée grâce au système NightOWL II LB 983 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne) équipé d'une caméra CCD NC100 (Andor Technology, Belfast) refroidie à -70°C par effet Peltier, et dont la résolution est de 1 024 x 1 024 pixels. La caméra se trouve dans une boîte noire étanche à la lumière (***Figure 23***). Un système motorisé permet la mise au point et le déplacement de la caméra selon l'axe z avec une précision de +/- 100 µm. La boîte noire est également équipée d'un système d'anesthésie permettant le maintien de l'anesthésie tout au long de l'acquisition. Le système est piloté par le logiciel IndiGO 2® (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne) permettant l'acquisition et l'analyse des résultats. Ce logiciel permet également la transformation des images de bioluminescence et fluorescence acquises en noir et blanc en images pseudo-couleur pour l'obtention d'une meilleure représentation de la distribution spatiale des photons émis sur l'échantillon.

La caméra CCD est calibrée ce qui permet la comparaison des images obtenues pour toutes les expérimentations quel que soit le champ de vue. Il faut noter que toutes les images réalisées dans ce travail ont un champ de vue identique. Pour l'imagerie de bioluminescence, un standard (Glowell, Biotechnologie LUX, UK) de faible lumière est placé à côté de l'animal à chaque acquisition. Ce standard n'est pas utilisé pour la quantification des mesures de bioluminescence mais sert de contrôle qualité du fonctionnement de la caméra.

Pour l'imagerie de fluorescence, le système NightOWL II dispose d'un dispositif d'excitation comprenant une source de lumière blanche (lampe halogène au tungstène, 100 W), une barrette porte filtres d'excitation (4 emplacements) et un anneau de fluorescence. L'anneau est fixé par une potence dans la boîte noire et permet une illumination homogène de l'animal à la longueur d'onde déterminée par le filtre. La lumière d'émission est captée par la caméra après filtrage. Le filtre d'émission est placé sur une roue porte filtres (3 emplacements) disposée devant l'objectif de la caméra.

La boîte noire est équipée de 4 diodes blanches pour éclairer les souris lors de l'acquisition des photographies en noir et blanc. Elle contient également une plateforme thermostatée (37°C) sur laquelle est placé l'animal durant l'acquisition afin d'éviter une éventuelle hypothermie durant l'examen.

Figure 23 : Système pour l'imagerie optique NightOWL II LB 983 (Berthold Technologies) *La boîte noire renferme la caméra CCD NC100 (Andor Technology, Belfast) et un masque relié au système d'anesthésie.*

3.4.8.2. Imagerie de bioluminescence (BLI)

3.4.8.2.1. BLI de la Luciférase Firefly

Pour l'imagerie de la LucF, le substrat D-Luciférine (sels de sodium, Promega, 3 mg, 100 µL PBS) est injecté en IP sur souris vigile. Les souris sont anesthésiées 7 min après l'injection de la luciférine puis placées sur le lit thermostaté (37°C) sous la caméra. La séquence d'acquisition de bioluminescence est déclenchée 10 min après l'injection de la luciférine. Elle est composée de 2 images (2 x 1 min, binning 4 x 4) moyennées par le logiciel, suivies d'une photographie en niveau de gris (100 ms).

3.4.8.2.2. BLI de la Luciférase *Renilla*

La BLI de la LucR implique l'injection en IP du substrat ViviRen (coelenterazine stabilisée, Promega ; 50,8 µg, 100 µL PBS-BSA (0,1%) (w/v)) sur souris vigile. La souris est anesthésiée 17 min après l'injection puis placée sur le lit thermostaté (37°C) sous la caméra et l'acquisition est déclenchée au bout de 20 min. La séquence d'acquisition comprend 2 images (2 x 1 min, binning 4 x 4) moyennées par le logiciel et une photographie en niveau de gris (100 ms).

3.4.8.3. Imagerie de fluorescence par réflexion (FRI)

L'imagerie de fluorescence de la protéine mPlum est réalisée à l'aide d'un filtre d'excitation à 590 nm +/- 20 nm et d'un filtre d'émission à 680 nm +/- 30 nm. Pour la fluorescence de l'EmGFP, le filtre d'excitation à 470 nm +/- 10 nm et le filtre d'émission à

520 nm +/- 10 nm ont été utilisés. L'acquisition (1 s, intensité de la lampe 100%, binning 1 x 1) est suivie d'une photographie en niveau de gris (100 ms).

3.4.9. Euthanasie

Les souris, préalablement anesthésiées, ont été euthanasiées par dislocation cervicale.

4. Résultats

Les 4 premières parties de ce chapitre concernent le projet principal de la thèse qui ambitionne de contrôler dans le temps et dans l'espace l'inhibition génique en utilisant les miARN. Nous avons souhaité élaborer un système dans lequel la biogénèse d'un miARN synthétique pourrait être déclenchée à la demande en utilisant le promoteur thermo-inductible Hsp70B. Pour mettre en évidence la faisabilité du projet, nous avons choisi de cibler la surexpression d'un gène d'imagerie. Ce gène code pour l'enzyme bioluminescente Luciférase firefly (LucF).

4.1. Etude de l'inhibition d'un miARN synthétique sur l'expression du gène cible *in vitro*

Cette première partie est consacrée au choix et à l'étude de l'efficacité d'un miARN artificiel nommé miRLuc ciblant spécifiquement la LucF et d'un miARN contrôle nommé miRneg. Dans cette première partie les miARN synthétiques seront exprimés de façon constitutive. Leur efficacité sera évaluée successivement *in vitro* par transfection transitoire, puis sur des lignées cellulaires transformées stables et enfin *in vivo* par électroporation intra-tumorale. Nous validerons également le choix d'un gène de normalisation et nous justifierons le choix d'un promoteur pour contrôler l'expression du gène cible.

4.1.1. Choix des miARN et de la stratégie

Afin d'obtenir une inhibition optimale de l'expression de la LucF choisie comme cible, nous souhaitions utiliser un miARN synthétique parfaitement complémentaire d'une séquence cible de l'ARNm de la LucF. En effet, puisque le projet ambitionne d'une part une stratégie *in vivo* et d'autre part une induction transitoire, il était primordial d'utiliser un miARN performant ayant un effet inhibiteur maximal afin de visualiser au mieux l'effet désiré. Dans cette optique, nous avons choisi d'utiliser certains composants du système BLOCK-iT^{TM} Pol II miR RNAi Expression Vector (Invitrogen).

Le système BLOCK-iT^{TM} (***Figure 24***) utilise un plasmide, nommé pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-miR, qui permet une expression co-cistronique de la protéine fluorescente EmGFP et de la séquence du pri-miARN d'intérêt. Ce système utilise la voie endogène de biogénèse des miARN. La transcription du pri-miARN présent dans le transcrit est réalisée par l'ARN polymérase II. La RNase de type III Drosha reconnaît des régions spécifiques en 5' et en 3' du pri-miARN et, après clivage, génère le pré-miARN. Ce précurseur est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5 où il est clivé par Dicer pour former le duplex miARN / miARN*. Le brin de ce duplex impliqué dans l'hybridation avec l'ARNm cible est appelé miARN mature et va être assemblé dans un complexe RNP : le miRISC.

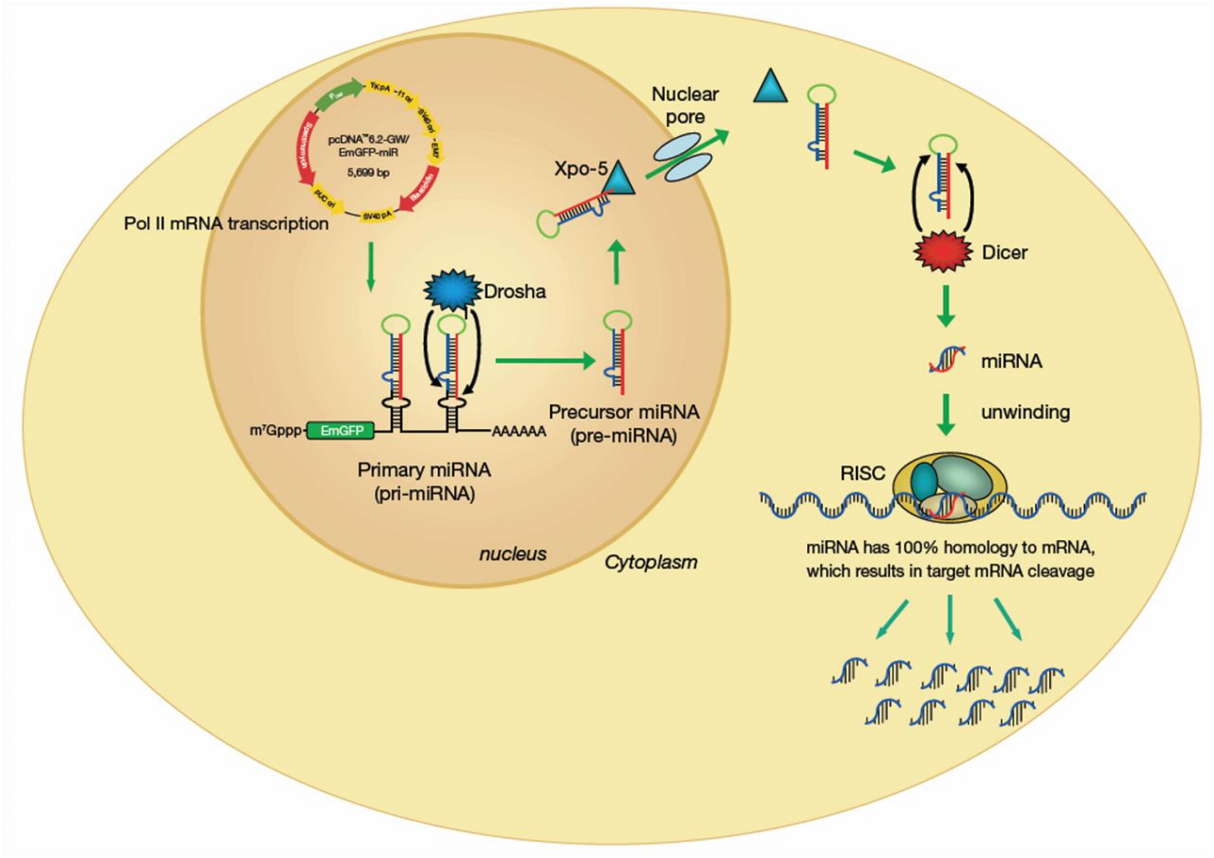


Figure 24 : Schématisation du système BLOCK-iT^{TM} Pol II miR RNAi Expression Vector *(Invitrogen)*

L'ARN polymérase II dans le noyau de la cellule permet la transcription du plasmide pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-miR en un ARNm polycistronique contenant la séquence codante pour l'EmGFP suivie de la (ou des) séquence(s) du pri-miARN. L'étape de clivage par Drosha permet d'obtenir le pré-miARN qui sera exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5 (Xpo-5). Le pré-miARN est ensuite pris en charge par Dicer qui permet l'obtention du duplex double brin. Le miARN mature présent au sein du complexe RISC permet la reconnaissance de l'ARNm cible. Cette étape permet l'inhibition au niveau post-transcriptionnel de l'expression du gène cible.

Outre le plasmide parfaitement adapté à notre projet, puisqu'il permet l'expression de l'EmGFP et la biogénèse de plusieurs miARN, le système BLOCK-iT^{TM} propose également le plasmide pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-miRLuc. Ce plasmide contient la séquence d'un pri-miARN permettant d'obtenir un miARN mature spécifique de l'ARNm de la LucF. Ce miARN appelé miRLuc est constitué de 21 nucléotides parfaitement complémentaires à une séquence cible située dans la région codante de l'ARNm de la LucF (***Figure 25***). Afin de s'affranchir de l'étape de design du miARN, nous avons choisi le miRLuc du système BLOCK-iT^{TM} pour notre projet. Enfin, ce système contient un plasmide contrôle, qui comporte une séquence dite négative (ou pri-miRneg) car le miRneg mature ne cible ni l'ARNm de la LucF ni aucun gène connu chez les vertébrés.

```
5'   1 ATGGAAGACG CCAAAAACAT AAAGAAAGGC CCGGCGCCAT TCTATCCGCT GGAAGATGGA
    61 ACCGCTGGAG AGCAACTGCA TAAGGCTATG AAGAGATACG CCCTGGTTCC TGGAACAATT
   121 GCTTTTACAG ATGCACATAT CGAGGTGGAC ATCACTTACG CTGAGTACTT CGAAATGTCC
   181 GTTCGGTTGG CAGAAGCTAT GAAACGATAT GGGCTGAATA CAAATCACAG AATCGTCGTA
                            ! !!!!!!!!!! !!!!!!!!!!
                       3'- A CTTTGCTATA CCCGACTTAT -5'
   241 TGCAGTGAAA ACTCTCTTCA ATTCTTTATG CCGGTGTTGG GCGCGTTATT TATCGGAGTT
   301 GCAGTTGCGC CCGCGAACGA CATTTATAAT GAACGTGAAT TGCTCAACAG TATGGGCATT
   361 TCGCAGCCTA CCGTGGTGTT CGTTTCCAAA AAGGGGTTGC ... 3'
```

Figure 25 : Début de la séquence codante pour la LucF et site d'hybridation du miRLuc mature

Le miRLuc (en bleu) de 21 nucléotides s'hybride de façon parfaitement complémentaire sur la séquence cible (en rouge) allant des nucléotides 200 à 220 de la région condante pour la LucF.

Ce système permet d'insérer plusieurs pri-miARN dans le même transcrit afin d'optimiser l'inhibition souhaitée ou d'inhiber plusieurs gènes. A partir du système BLOCK-iT™, nous avons généré le plasmide pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRLuc contenant 4 séquences consécutives du pri-miRLuc et le plasmide pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRneg modifié pour contenir 4 copies du pri-miRneg (T. Bai, stage de master 2). Des tests *in vitro* préalables ne montrent pas de différence d'efficacité entre les plasmides monocopies et multicopies, néanmoins, pour ce projet, nous avons retenu les plasmides contenant 4 copies des cassettes du miRLuc ou du miRneg (***Tableau 16***).

Nom	Construction	Schématisation
pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRLuc ou pCMV-miRLuc	CMV – EmGFP – miRLuc – miRLuc – miRLuc – miRLuc 5'- CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTATTCAGC CCATATCGTTTCAGTTTTGGCCACTGACTGACTGAA ACGATGGGCTGAATACAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGC - 3'	CMV 4*miRLuc
pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRneg ou pCMV-miRneg	CMV – EmGFP – miRneg – miRneg – miRneg – miRneg 5'- CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGAAATGTAC TGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCT CCACGCAGTACATTTCAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGC - 3'	CMV 4*miRneg

Tableau 16 : Plasmides utilisés contenant 4 copies des miARN

*Les plasmides pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRLuc nommé pCMV-miRLuc et pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP-4*miRneg nommé pCMV-miRneg, sont des plasmides multicopies contenant 4 séquences de chaque pri-miARN exprimés de façon co-cistronique avec la protéine fluorescente EmGFP sous le contrôle du promoteur CMV. Les séquences des pré-miARN (68 nucléotides) sont soulignées en noir et les séquences correspondantes aux miARN matures (21 nucléotides) sont indiquées en rouge.*

4.1.2. Effet du miRLuc sur l'activité de la LucR *in vitro*

Le gène codant pour la Luciférase *Renilla* (LucR) est un gène rapporteur bioluminescent qui sera utilisé pour normaliser les résultats dans les expériences de transfections transitoires et pour témoigner de l'efficacité de l'hyperthermie dans les expériences *in vitro* et *in vivo* utilisant le promoteur thermo-inductible Hsp70B. Il est donc primordial de s'assurer que le miRLuc n'a aucun effet sur l'activité de la LucR. Pour cela, des co-transfections transitoires ont été réalisées avec le gène de la LucR en présence du miRLuc ou du miRneg.
Les cellules U87 MG ont été transfectées (10 000 cellules) simultanément avec, en quantité égale, le plasmide pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR qui assure l'expression constitutive de la LucR et avec, soit le plasmide pCMV-miRLuc qui permet la synthèse de 4 miRLuc matures, soit le plasmide pCMV-miRneg qui permet la synthèse de 4 miRneg. L'activité de la LucR est mesurée 48h après la transfection au luminomètre à l'aide du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) (***Figure 26***).

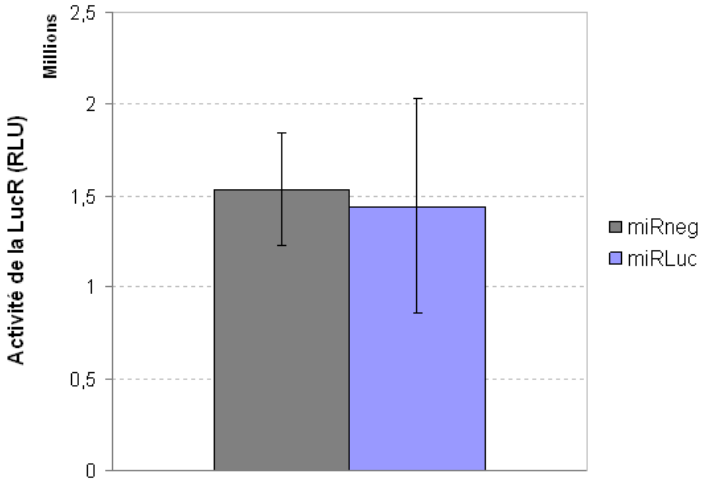


Figure 26 : Effet du miRLuc sur l'activité de la LucR
Les co-transfections transitoires (n = 6) ont été réalisées à raison de 250 ng d'ADN total / puits 48h après l'ensemencement de 10 000 cellules / puits. L'activité de la LucR (RLU) a été déterminée au luminomètre sur 10 000 cellules 48h après les transfections grâce au kit Dual-Luciferase®. En bleu nommé miRLuc, est représentée l'activité de la LucR mesurée après co-transfection de pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR et pCMV-miRLuc dans la lignée U87 MG et en gris nommé miRneg, la co-transfection de pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR et pCMV-miRneg.

L'activité de la LucR résultante ne montre aucune différence entre les 2 conditions expérimentales. Si le miRLuc influence l'activité de la LucR, son effet est identique à celui du miRneg. Le gène rapporteur de la LucR pourra donc être utilisé *in vitro* pour la normalisation des résultats en tant que gène rapportant de l'efficacité de transfection. Ultérieurement, lorsqu'il sera placé sous le contrôle du promoteur Hsp70B, il pourra être utilisé comme témoin de l'activation du promoteur par hyperthermie.

4.1.3. Action inhibitrice du miRLuc *in vitro* en fonction du niveau d'expression de la cible

Afin de déterminer les conditions expérimentales permettant une visualisation optimale de l'inhibition de la LucF *in vivo* par imagerie, nous avons testé l'efficacité d'inhibition par le miRLuc en fonction du niveau d'expression de la cible. Pour cela, nous avons placé la LucF sous le contrôle transcriptionnel de 2 promoteurs constitutifs différents : CMV, un promoteur fort et EFIα tronqué, un promoteur modéré. Nous avons comparé le niveau d'expression et le pourcentage d'inhibition par le miRLuc. Ces expérimentations ont été réalisées grâce à des triples transfections transitoires.

Construction des vecteurs

Le vecteur pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF a été construit à partir du vecteur pcDNA$_5$-FRT qui permet l'intégration par recombinaison homologue au site FRT (Invitrogen) par insertion de l'ADNc de la LucF et de son promoteur CMV issu du vecteur pGL-3 basic (Promega). Le vecteur pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF a été obtenu en remplaçant le promoteur CMV du vecteur pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF par le promoteur EFIα issu du vecteur pTRIPdeltaU3-EFIα-GFP (don du Prof. F. Moreau-Gaudry, Bordeaux). Le vecteur pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR contient la séquence du gène de la LucR sous le contrôle du promoteur constitutif CAG (collection du laboratoire).

Triples transfections transitoires

Les triples transfections transitoires ont été réalisées 48h après l'ensemencement de 25 000 cellules U87 MG / puits. Les 3 plasmides (250 ng d'ADN total / puits), en quantité égale, ont été transfectés avec le transfectant transfast (Promega). Les activités respectives de la LucF et de la LucR (en RLU) ont été déterminées au luminomètre 48h après les transfections grâce au kit Dual-Luciferase®.
Les triples transfections avec les plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF ou pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF, pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR et pCMV-miRLuc (***Figure 27***) ou pCMV-miRneg en égale quantité ont été effectuées.

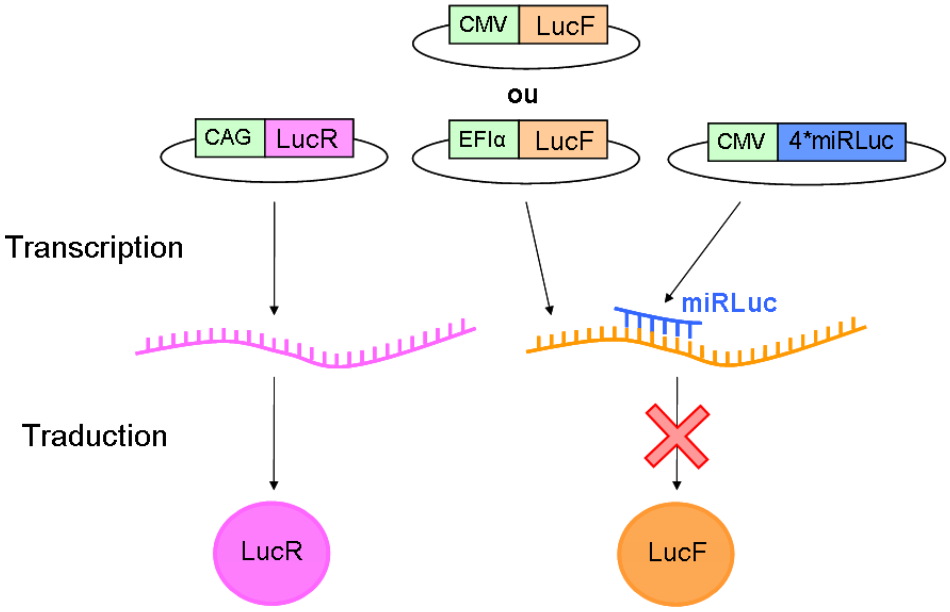


Figure 27 : Schématisation du protocole d'évaluation de l'effet inhibiteur du miRLuc sur l'activité de la LucF par triple transfection

Après transcription des 3 plasmides dans la cellule, le miRLuc mature s'hybride spécifiquement sur l'ARNm de la LucF et provoque ainsi une inhibition de la traduction. La mesure de l'activité de la LucR permet la normalisation des résultats.

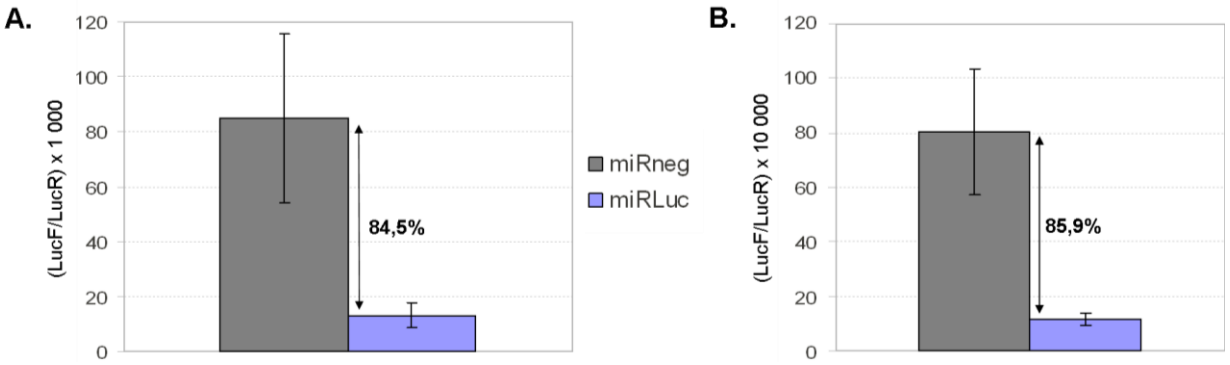


Figure 28 : Inhibition de l'activité de la LucF par le miRLuc par triples transfections transitoires

La LucF est placée soit A. sous le contrôle du promoteur CMV (pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF) soit B. sous le contrôle du promoteur EFIα tronqué (pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF).
Les histogrammes en bleu nommés miRLuc représentent la triple transfection associant le vecteur pCMV-miRLuc et les histogrammes en gris nommés miRneg représentent la triple transfection associant le vecteur pCMV-miRneg. Les résultats sont normalisés par rapport à l'activité de la LucR (pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR) témoignant de l'efficacité de transfection, n = 6, (Student t test, $p<0,01$).

Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à l'activité de la LucR selon les formules suivantes : (activité de la LucF / activité de la LucR) x 1 000 (***Figure 28 A.***) et

(activité de la LucF / activité de la LucR) x 10 000 (***Figure 28 B.***). La ***Figure 28*** permet de visualiser l'expression de la LucF (relatée par l'activité de l'enzyme) en fonction de l'efficacité de transfection.

Les résultats indiquent une différence d'expression de la LucF lors de l'utilisation du promoteur fort CMV ou du promoteur modéré EFIα tronqué. Le promoteur CMV permet une expression de la LucF 10 fois plus importante que lorsque celle-ci est contrôlée par le promoteur EFIα tronqué.

La comparaison des transfections réalisées avec le miRneg ou avec le miRLuc permet de calculer le pourcentage d'inhibition de l'expression de la LucF. Cette inhibition s'avère être de l'ordre de 85% quelque soit le promoteur contrôlant l'expression de la LucF.

En conclusion, le miRLuc choisi permet une inhibition intense de l'activité de la LucF par comparaison avec l'effet du miRneg. Bien que les niveaux d'expression de la LucF diffèrent d'un facteur 10 suivant le promoteur utilisé, l'inhibition est de l'ordre de 85% dans les 2 cas. L'inhibition par le miRLuc est donc identique quelque soit le niveau d'expression de la cible. Cependant, il persiste toujours une activité résiduelle qui échappe à l'inhibition par le miRLuc.

4.1.4. Activités des promoteurs CMV et EFIα *in vivo*.

L'expression de la LucF est déterminée par imagerie de bioluminescence. La réaction catalysée par l'enzyme nécessite l'administration d'un substrat : la luciférine. *In vivo*, il existe plusieurs méthodes d'injection du substrat qui peuvent être réalisées en intra-péritonéale (IP), en sous-cutanée, en intra-tumorale ou en intra-veineuse suivant les expérimentations. Selon la voie d'administration, la cinétique de l'activité de la LucF, après injection du substrat, diffère. La ***Figure 29*** présente cette cinétique obtenue par le laboratoire.

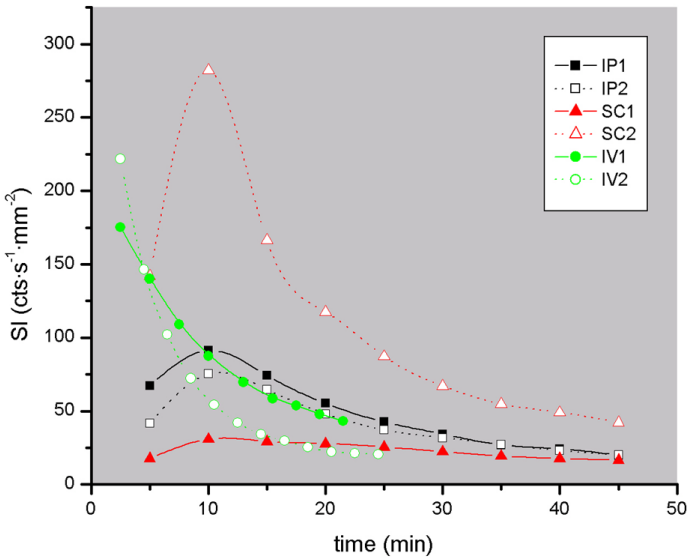


Figure 29 : Cinétique de l'activité de la LucF après administration du substrat luciférine in vivo

(d'après R. Deckers, B. Quesson, C. Rome, F. Couillaud, C.T.W. Moonen)

La cinétique a été déterminée sur des souris transgéniques NLF1 comportant le transgène LucF sous le contrôle du promoteur murin Hspa1b, promoteur thermo-sensible des Heat Shock Protein de 70 kDa (HSP). L'intensité du signal (SI) de l'activité de la LucF a été mesuré à la caméra CCD 6h après activation thermique (45°C ; 8 min) et suivant une cinétique après une injection intra-péritonéale (IP), sous-cutanée (SC) ou intra-veineuse (IV) du substrat D-luciférine (Promega, 3 mg, 100 µL PBS).

La ***Figure 29*** montre que dans les conditions expérimentales du laboratoire, l'activité de la LucF est détectée à son maximum 10 min après l'injection du substrat en IP puis décroît rapidement. Pour l'imagerie de la LucF de toutes les expérimentations présentées dans ce manuscrit, le substrat D-Luciférine (Promega, 3 mg, 100 µL PBS) est injecté en IP sur souris vigile. Les souris sont anesthésiées 7 min après l'injection de la luciférine puis placées sous la caméra. La séquence d'acquisition de bioluminescence est déclenchée à t = 10 min après l'injection du substrat.

Afin de déterminer quel promoteur, entre CMV et EF1α tronqué, est le plus favorable à l'expression de la LucF pour les expérimentations *in vivo*, nous avons testé leur fonctionnalité par éléctroporation (EP) chez la souris. En effet, le choix du promoteur est déterminant pour la visualisation de l'expression du gène rapporteur en imagerie optique de bioluminescence.

Pour cela, les plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF (5 µg / 20 µL PBS) et pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF (5 µg / 20 µL PBS) ont été électroporés en intra-dermique dans les pattes de souris C57BL/6 (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15***).

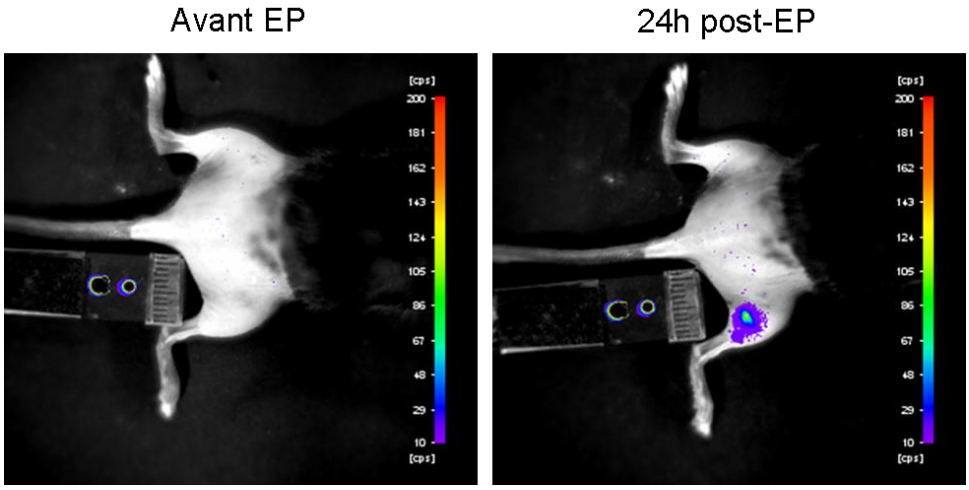


Figure 30 : Expression de la LucF après électroporation en intra-dermique in vivo
L'injection de 5 µg de plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF est réalisée en intra-dermique sur la patte arrière droite d'une souris C57BL/6 préalablement rasée (n = 5). Vingt-quatre heures après l'électroporation (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****), une injection de luciférine en IP permet de visualiser l'expression de la LucF par BLI (vue dorsale). L'échelle de pseudo-couleur indique le nombre de coups/s/pixel.*

Les résultats (***Figure 30***) obtenus après l'EP en intra-dermique du plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF présentent la faisabilité d'électroporer un plasmide codant pour une enzyme bioluminescente. Un signal de BLI est détecté 24h après l'EP.

A l'inverse, aucun signal de BLI n'a été mesuré après l'EP du plasmide pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF suivant les mêmes conditions (résultats non présentés, n = 4).

In vivo, seul le plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF permet la détection par BLI de l'expression de la LucF. Pour la suite des expérimentations, le promoteur CMV sera donc utilisé pour contrôler l'expression du gène rapporteur LucF.

4.1.5. Action inhibitrice du miRLuc dans une lignée stable

Lors des triples transfections transitoires (Cf. 4.1.3.), les plasmides codants pour le gène cible et ceux contenant les séquences des miARN synthétiques sont introduits simultanément dans la cellule. De ce fait, l'expression de la cible LucF et la biogénèse du miRLuc sont probablement simultanées. Cette situation est relativement différente d'une situation physiologique ou pathologique où la plupart du temps le gène cible est déjà exprimé ou surexprimé dans les cellules. Dans l'optique de se rapprocher au mieux d'un contexte physiologique, il est primordial de mesurer l'inhibition par le miRLuc lorsque le gène cible a une expression stable et constitutive dans la cellule. Pour cela, nous avons testé l'inhibition de l'activité LucF par le miRLuc dans une lignée exprimant la LucF de manière constitutive (***Figure 31***).

Génération des lignées

La lignée U87 CMV-LucF a été obtenue par recombinaison homologue au site FRT du plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF dans la lignée monoclonale U87 FRT-7. La transfection stable aléatoire du plasmide pcDNA$_{6.2}$-CMV-LucR (collection du laboratoire) dans la lignée U87 CMV-LucF préalablement générée, a permis l'obtention de la lignée U87 CMV-LucF/CMV-LucR.

Transfection transitoire

Les cellules U87 CMV-LucF/CMV-LucR ont été ensemencées à raison de 25 000 cellules / puits. Les transfections transitoires (***Figure 31***) ont été réalisées 48h après avec le plasmide pCMV-miRLuc ou le pCMV-miRneg (250 ng d'ADN total / puits). L'activité de la LucF a été déterminée au luminomètre 48h après les transfections. L'efficacité de l'inhibition de l'expression de la LucF (***Figure 32***) a été déterminée après lyse des cellules et mesure au luminomètre. Un puits contrôle permet de déterminer l'expression de la LucF dans les cellules U87 CMV-LucF/CMV-LucR en absence de transfection.

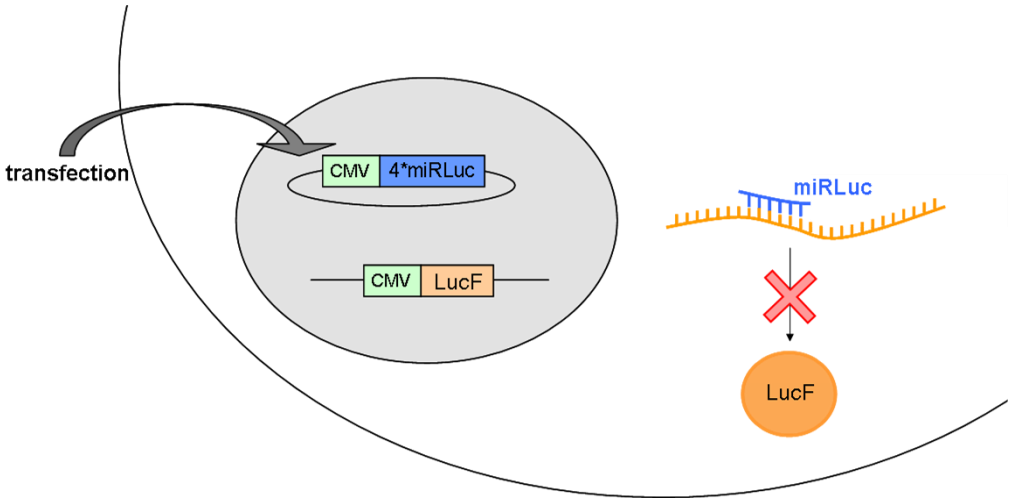


Figure 31 : Représentation schématique de l'inhibition par transfection transitoire du plasmide pCMV-miRLuc dans la cellule U87 qui exprime de façon constitutive la LucF
Les cellules U87 CMV-LucF/CMV-LucR dans lesquelles l'activité de la LucF est constitutive sont transfectées avec le plasmide pCMV-miRLuc. Ainsi, grâce à la voie endogène de biosynthèse des miARN, le miRLuc mature est obtenu dans le cytoplasme. Le phénomène d'ARNi se met donc en place aboutissant à une inhibition de l'expression de la LucF de façon post-transcriptionnelle.

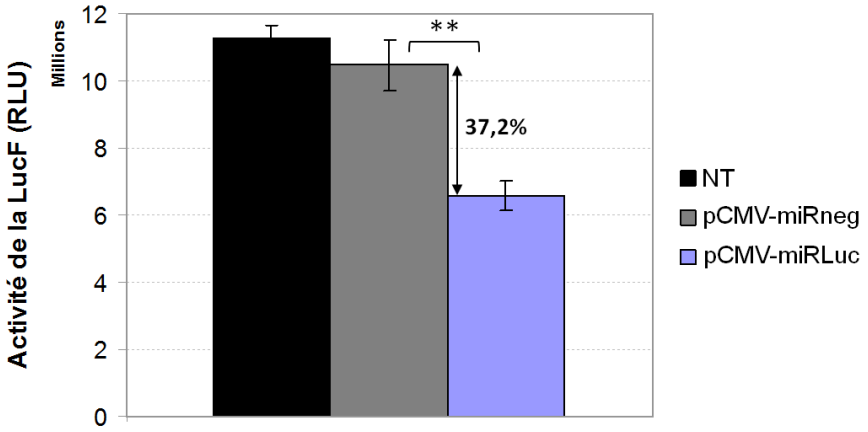


Figure 32 : Efficacité de l'inhibition par le miRLuc dans la lignée U87 CMV-LucF/CMV-LucR

*L'activité de la LucF (RLU) a été déterminée au luminomètre 48h après la transfection grâce au kit Dual-Luciferase®. En bleu est représentée la transfection de pCMV-miRLuc, en gris la transfection de pCMV-miRneg et en noir nommée NT est représentée l'activité de la LucF dans les cellules U87 CMV-LucF/CMV-LucR non transfectées (Student t test, ** : p<0,01).*

La ***Figure 32*** indique que l'activité de la LucF des cellules non transfectées n'est pas différente de celles transfectées avec le pCMV-miRneg. Ce résultat témoigne de l'innocuité du miRneg vis-à-vis de l'ARNm de la LucF.

Dans le cas de la transfection avec le plasmide pCMV-miRLuc, nous observons, comme précédemment, une inhibition de l'expression de la LucF par le miRLuc. Cette inhibition est de 37,2% dans ce contexte, elle est très inférieure aux inhibitions obtenues lors des expériences de co-transfections simultanées. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'une expression stable et constitutive de la LucF est probablement associée à la présence constante d'une quantité importante d'ARNm de la LucF dans la cellule. Ce pool d'ARN constitue autant de cibles pour le miRLuc introduit dans la cellule au moment de la transfection. L'inhibition réduite de 37,2% semble néanmoins compatible avec la poursuite de notre projet d'étude *in vivo*.

4.1.6. Effet du miRLuc après électroporation intra-tumorale *in vivo*

Pour finir, nous avons souhaité tester *in vivo* le potentiel inhibiteur du miRLuc sous le contrôle du promoteur CMV en électroporant le plasmide pCMV-miRLuc dans des tumeurs exprimant la LucF de façon constitutive.

Des cellules U87 CMV-LucF ont été injectées en sous-cutané sur les deux pattes arrière de souris immunodéficientes NOG. Après environ 4 semaines de pousse tumorale, les tumeurs de la patte droite ont été électroporées avec le plasmide pCMV-miRLuc. L'efficacité de l'EP intra-tumorale est réduite (Golzio et al., 2007) d'une part à cause de l'hétérogénéité tumorale, d'autre part à cause de la faible diffusion de l'ADN injecté localement dans la tumeur. Pour pallier à ce problème, nous avons procédé à 4 injections de 5 µg d'ADN / 10 µL PBS à différents endroits de la tumeur. Les injections sont suivies d'impulsions électriques appropriées au tissu (***Tableau 15***).

Comme témoin négatif, la tumeur U87 CMV-LucF de la patte gauche a subi une EP suivant les paramètres identiques à l'EP effectuée sur la patte droite mais sans injection d'ADN. La cinétique d'expression de la LucF est suivie par BLI 24h et 46h après l'EP (***Figure 33***). Parallèlement au suivi par BLI, le volume tumoral a été mesuré au pied à coulisse (***Figure 34***).

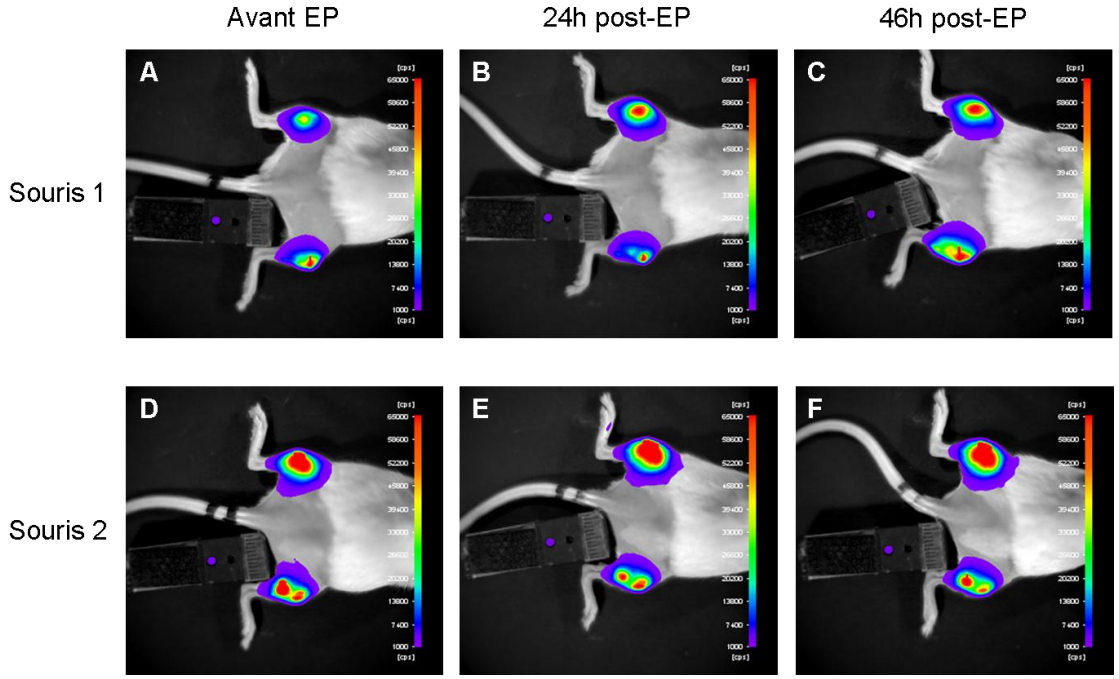


Figure 33 : Suivi par BLI de l'effet de l'EP du miRLuc dans des tumeurs U87 exprimant la LucF

Pour les 2 souris, les injections de 5 µg de plasmide pCMV-miRLuc sont réalisées en intra-tumoral à 4 reprises consécutives et à différents endroits dans les tumeurs U87 CMV-LucF sur la patte droite des souris NOG préalablement rasées. L'EP (600 V / cm ; 5 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****) est effectuée sur les 2 pattes. Après injection de la luciférine en IP, l'expression de la LucF est suivie par BLI (vue dorsale) avant (A et D), 24h (B et E) et 46h (C et F) après l'EP. L'échelle de pseudo-couleur indique le nombre de coups/s/pixel.*

Les résultats (***Figure 33***) présentent le suivi par BLI avant et après l'EP réalisée sur chacune des tumeurs U87 CMV-LucF. Le signal de bioluminescence de la tumeur de la patte gauche augmente graduellement en fonction de la croissance tumorale. A l'inverse, du côté droit, après l'EP du plasmide comprenant la séquence du miRLuc, nous constatons une diminution de la bioluminescence. La diminution du signal intervient 24h après l'EP (***Figure 33 B*** et ***E***) par rapport aux signaux avant l'EP (***Figure 33 A*** et ***D***) pour les deux souris.

Pour la quantification du signal, une ROI (region of interest) automatique par seuillage a été effectuée grâce au logiciel IndiGO 2®. La diminution des signaux est de l'ordre de 20% pour la souris 1 et de 10% pour la souris 2 à 24h après l'EP du miRLuc par rapport aux signaux mesurés avant l'EP.

Une ré-augmentation du signal est détectée à 46h pour la tumeur droite de chacune des deux souris (***Figure 33 C*** et ***F***). Cette ré-augmentation est probablement due à l'élimination du plasmide pCMV-miRLuc au cours du temps et donc à l'arrêt de la biogénèse du miRLuc.

Parallèlement aux images de BLI, l'évolution du volume tumoral des tumeurs des pattes droites a été déterminée au pied à coulisse.

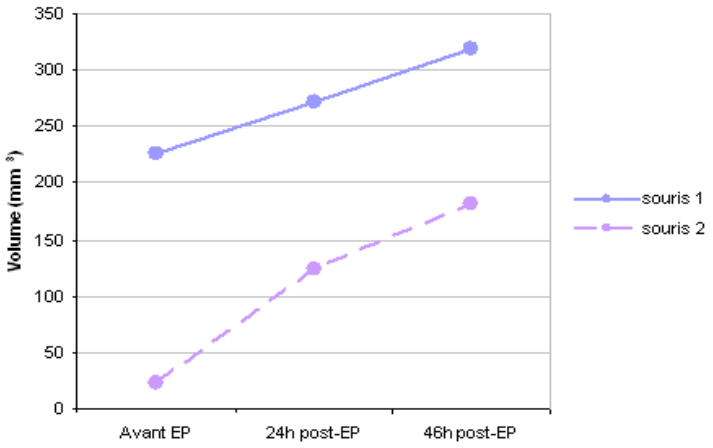


Figure 34 : Suivi du volume des tumeurs des pattes droites des souris 1 et 2 avant et après EP

Le volume tumoral est calculé d'après la formule de Feldman après la mesure, au pied à coulisse, des tumeurs des pattes droites des souris 1 et 2 avant, 24h et 46h après l'EP du plasmide pCMV-miRLuc. Le volume est représenté en mm^3.

La ***Figure 34*** indique qu'après l'EP, la taille des tumeurs augmente de façon croissante. La diminution du signal observée, 24h après l'EP du miRLuc, n'est donc pas due à une diminution du volume tumoral mais bien à une diminution de l'activité de la LucF. De plus, la comparaison avec les signaux détectés pour la tumeur contrôle nous permet de conclure quant à l'action inhibitrice probable du miRLuc sur l'ARNm de la LucF. Il est toutefois envisagé de poursuivre ces expérimentations préliminaires sur un plus grand nombre d'animaux mais également d'injecter et électroporer une suspension contenant le plasmide comprenant la cassette d'expression du miRneg dans la tumeur contrôle.

Nous avions envisagé d'évaluer l'efficacité de l'EP en suivant l'expression de l'EmGFP exprimée de façon co-cistronique à la biogénèse du miRLuc. L'auto-fluorescence des tissus et les caractéristiques spectrales de l'EmGFP, peu favorables à l'imagerie *in vivo*, n'ont pas permis sa détection *in vivo*. Le problème sera abordé dans le chapitre 4.4.2. et résolu en utilisant la protéine fluorescente mPlum facilement visualisable par FRI sur le même imageur optique.

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'expression constitutive du miRLuc à partir du vecteur plasmidique pCMV-miRLuc est efficace pour inhiber l'activité de la LucF *in vitro*. Nous avons également démontré l'innocuité du miRLuc sur l'expression du gène rapporteur de la LucR qui pourra donc être utilisé comme rapporteur de l'activation thermique. Nous avons également établi l'innocuité du miRneg sur les activités des enzymes LucF et LucR. Enfin, nous avons vérifié la fonctionnalité du système *in vivo* sur des tumeurs U87 exprimant la LucF portées par des souris immunodéficientes.

4.2. Induction de l'inhibition de l'expression d'un gène d'imagerie par activation d'un promoteur thermo-inductible

L'objectif de cette deuxième partie est de déterminer la possibilité de déclencher l'inhibition génique en plaçant le miRLuc sous le contrôle d'un promoteur inductible. Nous avons choisi d'utiliser le promoteur thermo-inductible Hsp70B pour ses caractéristiques. Ce promoteur activé possède une forte activité et son activation est transitoire. Il est activable à la demande grâce à divers stimuli et en particulier par un choc thermique. L'étude de ce promoteur a été effectuée au laboratoire, notamment pour des applications précliniques où l'activation thermique a été réalisée au moyen d'ultrasons focalisés guidés par IRM de température. Cette méthode présente l'avantage d'être locale, non invasive, elle permet d'atteindre les organes profonds et offre de réelles perspectives cliniques. Pour le projet de thèse, le choc thermique a été réalisé par de l'eau chauffée, méthode plus adéquate à notre étude de faisabilité. Ce chapitre fait l'état des lieux concernant la caractérisation du promoteur Hsp70B, après une activation réalisée au bain-marie, *in vitro* et *in vivo* et présente une étude *in vitro* de son utilisation pour contrôler la synthèse de miARN.

4.2.1. Caractérisation du promoteur Hsp70B

L'activation du promoteur Hsp70B est fonction de la dose thermique, c'est-à-dire qu'elle dépend de la température et du temps de chauffage. Pour des températures comprises entre 43°C et 46°C, l'activation du promoteur *in vitro* et *in vivo* peut être modélisée et suit la loi d'Arrhénius (Deckers et al., 2012). Les paramètres d'activation varient également en fonction du type cellulaire ou des tissus. Afin d'activer le promoteur Hsp70B dans notre modèle, nous avons vérifié sa réponse à la dose thermique en mesurant l'expression de la LucF placée sous son contrôle transcriptionnel. L'activation du promoteur Hsp70 est transitoire de même que l'expression de la LucF. Le maximum d'expression de la LucF est détecté 6h après le choc thermique (Eker et al., 2011; Deckers et al., 2012).

Afin de déterminer la dose thermique la plus adaptée pour activer le promoteur Hsp70B, la lignée cellulaire U87 Hsp-LucF (collection du laboratoire) a été utilisée. Le choc thermique a été effectué au bain-marie pendant 8 min à différentes températures (43°C, 44°C et 45°C) et l'activité de la LucF, reflétant l'activation du promoteur, a été mesurée au luminomètre après lyse des cellules 6h après l'activation thermique (***Figure 35***).

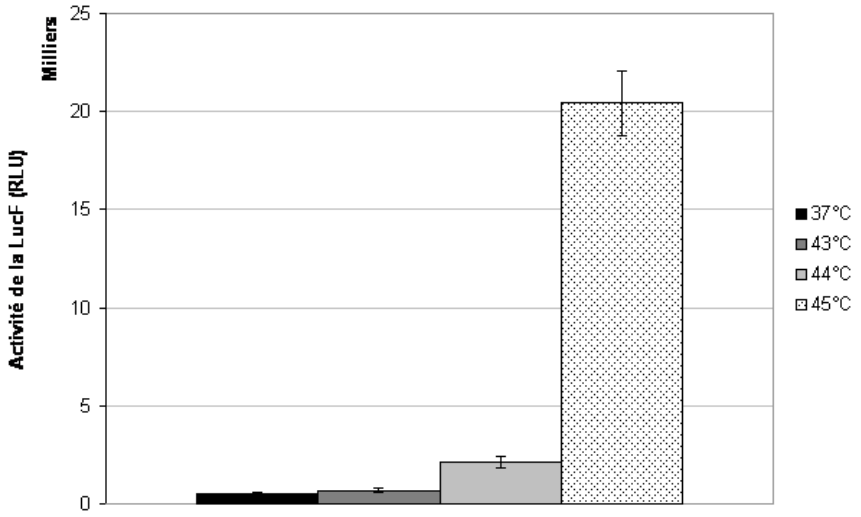


Figure 35 : Activation du promoteur Hsp70B à différentes températures
Mesures de l'activité de la LucF 6h après activation du promoteur Hsp70B dans la lignée U87 Hsp-LucF après différentes températures d'activation thermique. L'hyperthermie est réalisée au bain-marie pendant 8 min et l'activité du gène rapporteur (gène de la LucF) est mesurée au luminomètre après lyse des cellules en utilisant le kit Luciferase Assay System (Promega).

Les résultats de la ***Figure 35*** montrent à 37°C une activité basale très faible, inférieure à 500 RLU. L'activité de la LucF augmente avec la température et elle est maximale à 45°C. Cette condition d'activation (45°C ; 8 min) a été retenue pour la suite de ce travail.

4.2.2. Obtention de lignées U87 exprimant le miRLuc sous le contrôle du promoteur Hsp70B

Construction des vecteurs

Le plasmide pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP 4*miRLuc a été obtenu suivant 3 étapes. Le gène de la LucR a été excisé du vecteur pRL-CMV (Promega) pour être intégré à la place de celui de la LucF dans le vecteur pcDNA$_5$-FRT-Hsp-LucF (collection du laboratoire) pour générer le plasmide pcDNA$_5$-FRT-Hsp-LucR. La cassette Hsp-LucR de ce plasmide a été intégrée en amont du promoteur Hsp70B dans le vecteur pEF$_5$-FRT-Hsp-BMP7 (collection du laboratoire) pour générer le plasmide pEF$_5$-FRT-Hsp-LucR-Hsp-BMP7. Puis, la cassette Hsp-LucR-Hsp a été excisée de ce plasmide pour être intégrée dans le vecteur pcDNA$_{6.2}$-GW EmGFP 4*miRLuc à la place du promoteur CMV. Ainsi, la cassette EmGFP 4*miRLuc se trouve désormais sous le contrôle du promoteur Hsp70B (***Tableau 17***).
Le vecteur pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP 4*miRneg a été construit selon la même stratégie.

Nom	Construction	Schématisation
pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP 4*miRLuc nommé pHsp-miRLuc	Hsp – LucR – Hsp – EmGFP – miRLuc – miRLuc – miRLuc – miRLuc	Hsp LucR – Hsp 4*miRLuc
pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP 4*miRneg nommé pHsp-miRneg	Hsp – LucR – Hsp – EmGFP – miRneg – miRneg – miRneg – miRneg	Hsp LucR – Hsp 4*miRneg

Tableau 17 : Plasmides contenant 4 copies du miARN sous le contrôle du promoteur Hsp70B

*Les plasmides pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP 4*miRLuc, nommé pHsp-miRLuc et pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP-EmGFP 4*miRneg nommé pHsp-miRneg sont des plasmides multicopies contenant 4 séquences de chaque pri-miARN exprimés de façon co-cistronique avec la protéine fluorescente EmGFP sous le contrôle du promoteur Hsp70B.*

Génération des lignées

Les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg ont été générées par transfection stable et aléatoire des plasmides pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP 4*miRLuc et pcDNA$_{6.2}$-Hsp-LucR-Hsp-EmGFP 4*miRneg dans les lignées U87 CMV-LucF.

Caractérisation des lignées

Les lignées ainsi générées comportent le gène de la LucF sous le contrôle du promoteur CMV au site unique de recombinaison homologue FRT. Nous avons donc souhaité vérifier si l'expression de la LucF est similaire pour ces 2 lignées.

La cinétique d'activité de la LucF a été déterminée pour les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg 48h après leur ensemencement.

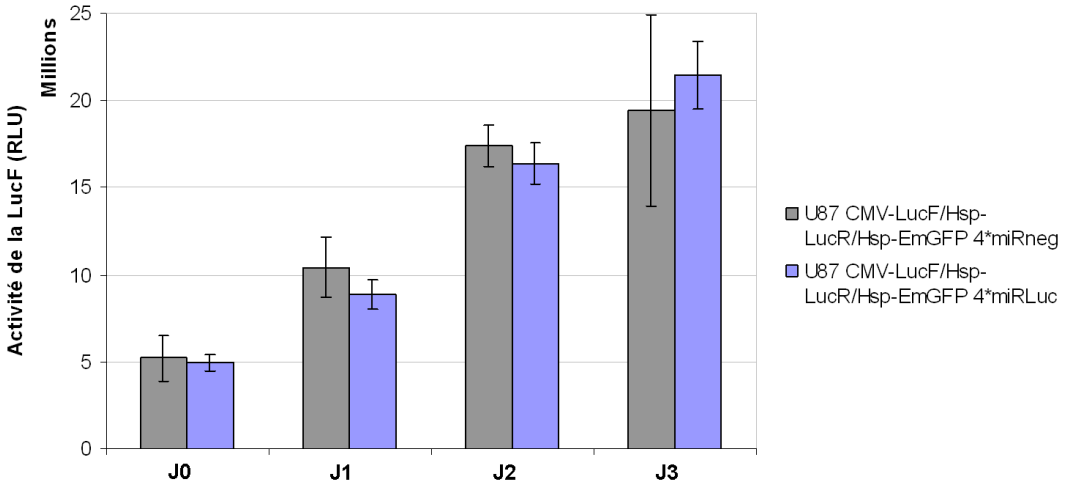


Figure 36 : Cinétique de l'activité de la LucF

*Les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (en bleu) et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (en gris) ont été ensemencées à raison de 15 000 cellules / puits. L'activité de la LucF a été déterminée au luminomètre 48h (J0) après la mise en plaque en utilisant le kit Dual-Luciferase® et suivant une cinétique (en jours), n = 3.*

Les résultats de la ***Figure 36*** révèlent que l'activité de la LucF augmente au cours du temps pour les 2 lignées. Cette augmentation est le reflet des divisions cellulaires successives. Pour les 2 lignées, la cinétique de l'activité de la LucF suit le même profil. Ainsi, elles pourront être utilisées pour déterminer l'inhibition de l'expression de la LucF par le miRLuc. L'inhibition sera déterminée par comparaison du profil de l'activité de la LucF pour les 2 lignées après activation thermique qui permet de déclencher la biogénèse des miARN synthétiques. Cette méthode permet de s'affranchir de l'impact que pourrait avoir l'hyperthermie sur les cellules puisque les 2 lignées comparées seront activées thermiquement suivant les mêmes conditions expérimentales.

4.2.3. Visualisation de l'expression constitutive de la LucR *in vivo*

Dans les lignées cellulaires générées, le gène de la LucR a été choisi comme rapporteur afin de rendre compte de l'activation du promoteur thermo-sensible. La LucR est une enzyme bioluminescente dont le substrat est la coelenterazine. La réaction enzymatique produit des photons qui peuvent être détectés *in vivo* chez la souris par BLI. *In vivo*, la coelenterazine peut être substituée par un conjugué plus stable appelé ViviRen (Promega ; 50,8 µg ; 100 µL PBS-0,1% (w/v) BSA) injecté en IP sur une souris vigile.

Au laboratoire, nous ne disposions d'aucune expérience concernant la détection *in vivo* de cette réaction enzymatique, aussi, dans un premier temps nous avons entrepris d'optimiser sa détection.

Nous avons utilisé une lignée de cellules U87 qui expriment la LucR et la LucF de façon constitutive nommée U87 CMV-LucF/CMV-LucR (Cf. 4.1.5.) pour générer des tumeurs sous-cutanées sur les 2 pattes de souris NOG. Puis, après administration du substrat, des acquisitions de bioluminescence ont été effectuées afin de déterminer la cinétique d'apparition du signal (***Figure 37***).

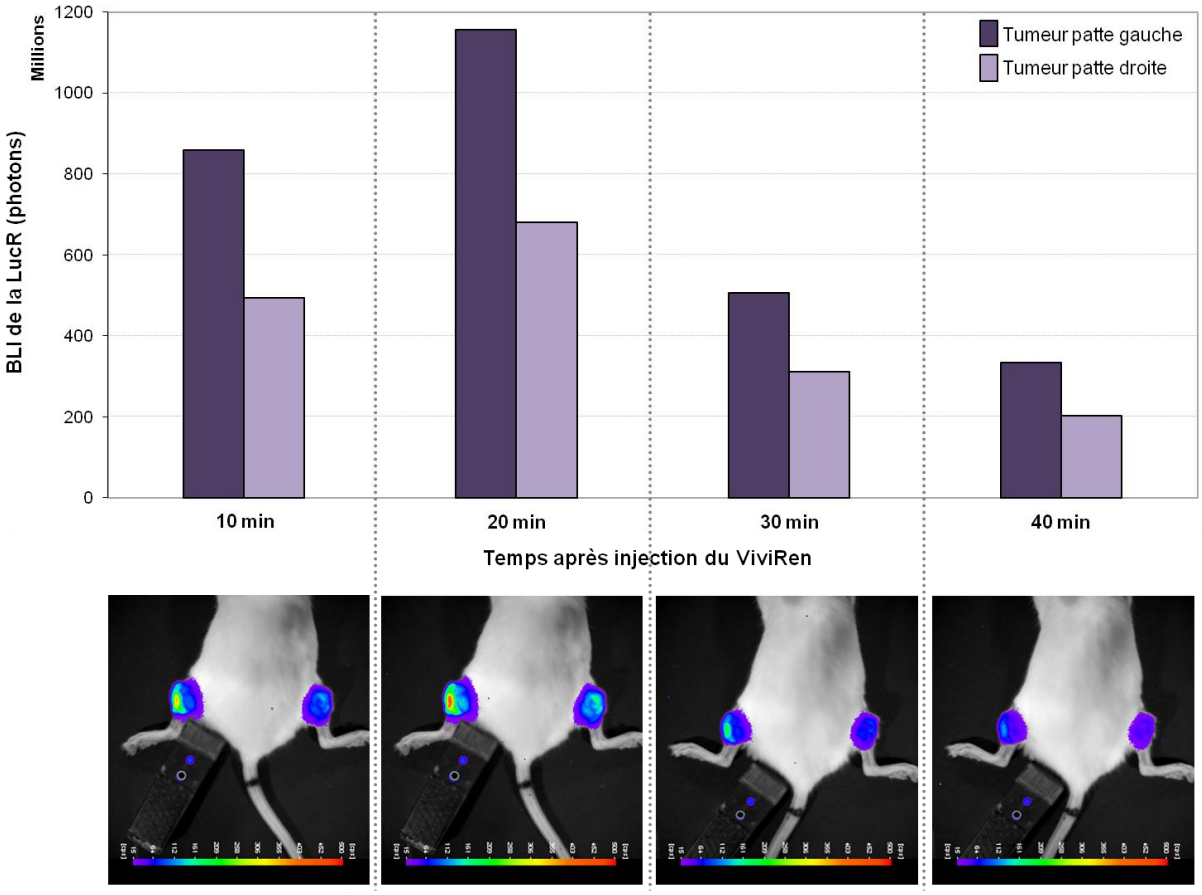


Figure 37 : Cinétique de détection de l'activité de la LucR par BLI après injection du ViviRen

Le ViviRen (50,8 µg, 100 µL PBS-0,1% (w/v) BSA) est injecté en IP sur souris vigile. La visualisation de la bioluminescence de la LucR (vue dorsale) a été effectuée selon une cinétique continue de 10, 20, 30 et 45 min après l'injection du substrat. La quantification du signal est réalisée grâce à un seuillage automatique par le logiciel IndiGO 2®. Le graphique représente la quantification du signal de bioluminescence de la patte gauche (violet foncé) et de la patte droite (violet clair) d'une souris, n = 7.

La ***Figure 37*** indique qu'un signal produit par l'activité de la LucR est détectable *in vivo* par BLI dans des tumeurs sous-cutanées après injection du substrat ViviRen en IP. Ce signal est détecté à 10 min et persiste au moins 45 min après l'injection du substrat. Il atteint son maximum 20 min après l'injection du ViviRen. Il est à noter que le temps d'action du substrat pour l'obtention d'un maximum de bioluminescence est plus long que pour la LucF pour laquelle le signal de bioluminescence est optimal 10 min après l'injection de luciférine.

4.2.4. Expression de la LucR après activation d'Hsp70B

Notre projet consiste à utiliser la LucR comme gène rapporteur de l'activation du promoteur Hsp70B *in vivo*. L'activation de ce promoteur par hyperthermie est transitoire, elle entraîne la transcription transitoire d'un ARNm et la traduction du gène rapporteur. La cinétique d'expression du gène dépend de la vitesse de traduction et de la demi-vie de la protéine. Lorsque la LucF est placée sous contrôle du promoteur Hsp70B, l'expression est maximale 6h après l'activation du promoteur (Deckers et al., 2012). Nous avons donc entrepris de déterminer la cinétique d'expression de la LucR après un choc thermique.

Dans un souci pratique et du fait du coût élevé du substrat ViviRen, la cinétique d'expression de la LucR sous le contrôle du promoteur thermo-inductible a été réalisée *in vitro*. L'activité de la LucR a été mesurée au luminomètre après une activation thermique de 8 min à 45°C des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (Cf 4.2.2) (***Figure 38***).

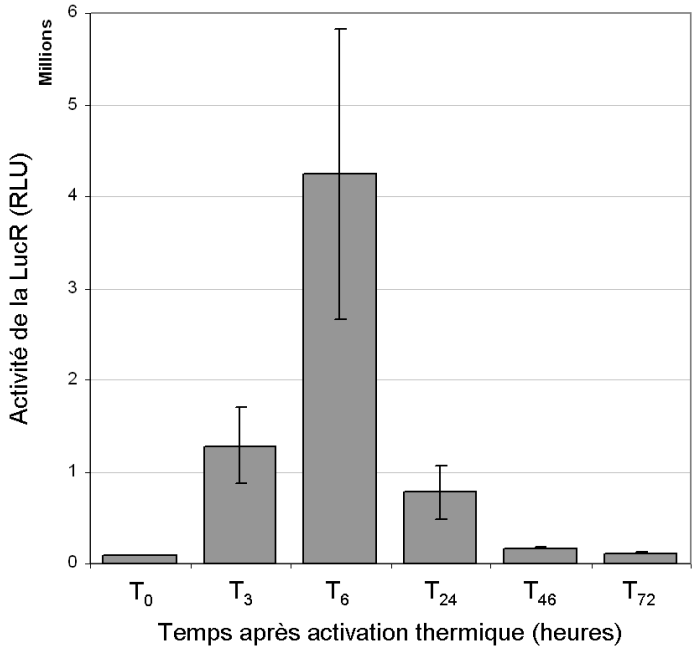


Figure 38 : Activité de la LucR après activation thermique (8 min ; 45°C)
*Les cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg ont été placées 8 min à 45°C au bain-marie 48h après leur ensemencement. L'activité de la LucR (RLU) a été déterminée au luminomètre à différentes heures après l'hyperthermie grâce au kit Dual-Luciferase®.*

La ***Figure 38*** présente le profil d'expression de la LucR *in vitro* après l'activation du promoteur Hsp70B par choc thermique. Nous avons également obtenu un profil similaire pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc. Comme la LucF, l'activité de la LucR est maximale à 6h après une hyperthermie de 8 min à 45°C. Le profil d'expression de la LucR reflète le caractère transitoire de l'activation du promoteur Hsp70B et l'expression du gène rapporteur décroît à 24h pour ensuite revenir à son niveau basal 46h après l'hyperthermie.

Nous avons alors entrepris de vérifier *in vivo* la détection, par BLI, du signal provoqué par la LucR sous le contrôle du promoteur Hsp70B. Pour cela, les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (au même stade d'évolution de la culture ; le nombre de passages entre les 2 lignées peut différer de +/- 1 passage) ont été utilisées pour générer des tumeurs sous-cutanées respectivement sur les pattes arrière gauches et droites des souris NOG. Après l'obtention de tumeurs, un choc thermique a été appliqué sur les pattes des souris en les plongeant pendant 8 min dans une eau chauffée à 45°C. Cette procédure permet d'activer le promoteur Hsp70B (Deckers et al., 2012) et d'activer ainsi l'expression de l'enzyme LucR. Puis, 6h après l'hyperthermie, l'activité de la LucR a été mesurée par BLI, 20 min après l'injection de ViviRen en IP (***Figure 39***).

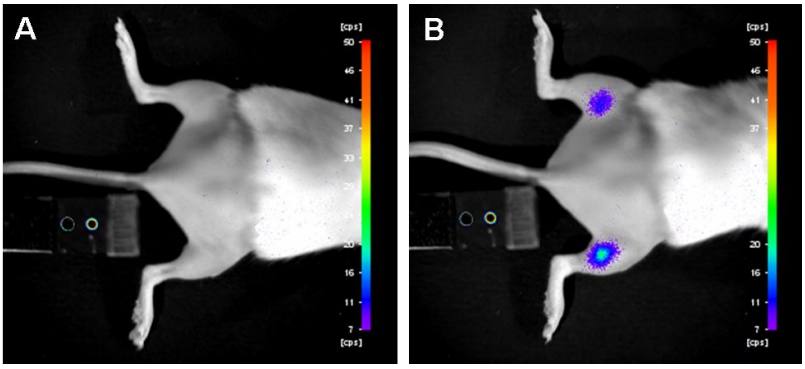


Figure 39 : Détection de l'activité de la LucR après activation du promoteur Hsp70B
*Les souris présentent une tumeur U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc sur la patte gauche et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg sur la droite. L'acquisition (vue dorsale) est réalisée 20 min après l'injection de ViviRen (50,8 µg ; 100 µL PBS-0,1% (w/v) BSA) en IP. Les images A et B correspondent aux acquisitions réalisées (A) avant et (B) 6h après l'activation thermique au bain-marie 8 min à 45°C.*

Les résultats de la BLI indiquent l'absence d'une activité basale de la LucR (avant l'application du choc thermique) 20 min après l'injection du substrat ViviRen (***Figure 39 A***). Par contre, un signal est détecté dans les 2 tumeurs 6h après l'activation du promoteur Hsp70B (45°C ; 8 min) (***Figure 39 B***). De plus, ce signal est transitoire car il n'est plus détecté 24h après l'hyperthermie.

Par comparaison avec la ***Figure 37***, le signal BLI est plus faible, d'une part parce que les tumeurs sont plus petites, et d'autre part parce que la LucR est placée sous le contrôle du promoteur Hsp70B dont l'activation est transitoire. Néanmoins, notre projet d'utiliser l'expression de la LucR sous le contrôle du promoteur Hsp70B comme témoin de l'activation du promoteur est pertinent. L'expression de la LucR témoignera ainsi de l'efficacité de l'activation thermique.

4.2.5. Caractérisation *in vitro* de l'inhibition par le miRLuc sous le contrôle du promoteur Hsp70B

Les lignées générées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (Cf. 4.2.2) permettent l'étude de l'inhibition du miRLuc lorsque la biogénèse de celui-ci est contrôlée par le promoteur thermo-inductible. Pour cela, 48h après la mise en plaque des cellules, l'activation du promoteur Hsp70B a été réalisée au bain-marie à 45°C pendant 8 min suivant les conditions d'activation déterminées précédemment. La mesure de l'activité enzymatique de la LucF a été mesurée au luminomètre pour les 2 lignées.

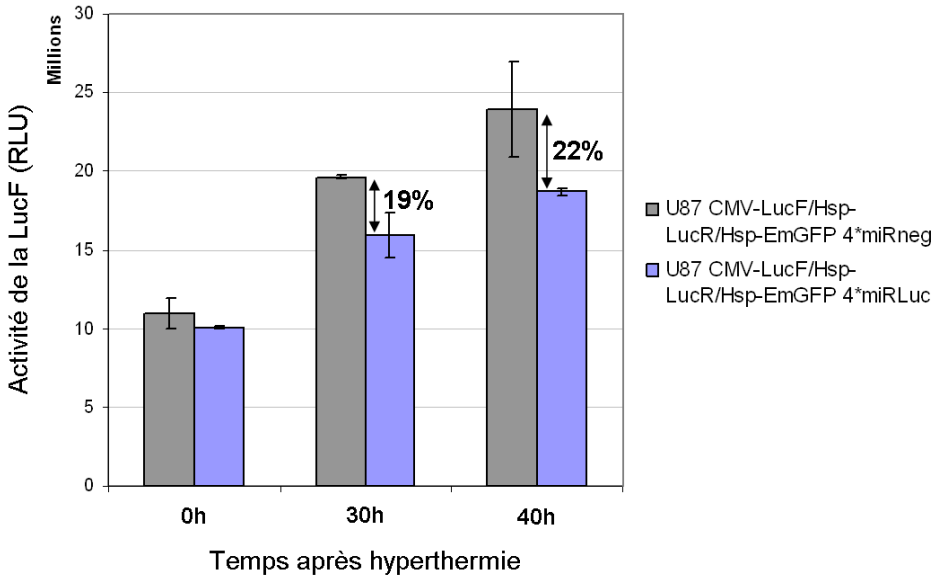


Figure 40 : Cinétique d'inhibition de l'activité de la LucF par le miRLuc
*Les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (en bleu) et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (en gris) ont été ensemmencées à raison de 15 000 cellules / puits. L'activation thermique a été réalisée, 48h après la mise en plaque, au bain-marie à 45°C pendant 8 min. Après lyse des cellules, l'activité de la LucF (RLU) a été déterminée au luminomètre en utilisant le kit Dual-Luciferase® pour chaque lignée et suivant une cinétique, n = 2.*

Etant donné que les expressions de la LucF et de la LucR, contrôlées par le promoteur Hsp70B, sont maximales 6h après le choc thermique, nous avons dans un premier temps réalisé l'étude de l'inhibition sur des temps précoces. Cependant, les résultats obtenus ne montraient pas d'inhibition de l'expression de la LucF. Cette constatation peut être explicable par le fait que la biogénèse des miARN et leur action sont probablement plus longues à ce mettre en place que l'expression des enzymes bioluminescentes. Aussi, des expérimentations similaires ont été renouvellées sur des temps plus longs. La ***Figure 40*** présente la cinétique d'inhibition obtenue de l'activité de la LucF par le miRLuc à 30h et 40h après hyperthermie. Par comparaisons des 2 lignées, nous pouvons constater une inhibition de l'expression de la LucF de 19% et 22% respectivement pour ces deux temps. L'inhibition est relativement faible

ce qui nous a conduit à une phase d'optimisation de notre système afin d'améliorer l'inhibition de la LucF par le miRLuc. Les résultats concernant ces optimisations seront détaillés dans le paragraphe 4.3. En parallèle à ce travail, les expérimentations d'induction de l'inhibition ont été poursuivies *in vivo*.

4.2.6. Inhibition de l'expression d'un gène d'imagerie *in vivo*

L'étape suivante a consisté à étudier l'induction de l'expression des miARN *in vivo*. Les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (au même stade d'évolution de la culture ; le nombre de passages entre les 2 lignées peut différer de +/- 1 passage) ont donc été utilisées pour générer des tumeurs sous-cutanées sur les pattes de souris immunodéficientes (NOG). Pour une meilleure comparaison de la lignée contenant le miRLuc avec la lignée contrôle, ces deux lignées ont été implantées chacune sur une patte de la même souris. Les tumeurs contrôles U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg ont systématiquement été injectées sur les pattes droites des souris et les tumeurs U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc sur les pattes gauches. Une fois les tumeurs obtenues, les 2 pattes des souris ont été plongées dans un bain-marie (45°C ; 8 min) afin d'activer le promoteur Hsp70B contrôlant l'expression des miARN.

Cinétique d'inhibition

Les expérimentations ont été menées sur une cohorte de 37 souris NOG utilisées environ 4 semaines après l'injection des cellules. L'analyse des résultats est effectuée après quantification des signaux obtenus par seuillage automatique et en comparant les signaux BLI détectés avant et après l'hyperthermie. Les résultats obtenus pour lesquels une inhibition a pu être observée (n = 15) sont représentés dans le ***Tableau 18*** et peuvent être classés selon 3 profils. Les images de BLI d'une souris de chacun de ces profils sont présentées et détaillées dans les ***Figure 41***, ***Figure 42*** et ***Figure 43***.

profils	souris	tumeur	Temps après activation thermique (45°C ; 8 min)					
			avant	24 heures	46 heures	72 heures	1 semaine	2 semaines
24h	2011-001	gauche	3 266 265	622 630	8 894 230	9 855 295		
		droite	97 745	179 670	2 449 275	3 120 495		
	2012-005	gauche	8 403 861 415	4 407 400 585	8 372 006 715			
		droite	6 236 514 070	5 913 879 860	8 426 817 930			
	2012-086	gauche	saturation	313 926 251	saturation		saturation	
		droite	17 184 946	59 352 609	66 950 992		87 993 156	
	2012-087	gauche	saturation	282 279 335	saturation		saturation	
		droite	2 009 705	30 083 513	42 446 079		28 639 699	
	2012-090	gauche	219 547 563	168 471 281	saturation		382 927 137	
		droite	2 418 434	9 847 072	36 911 560		24 367 724	
	2012-091	gauche	saturation	282 563 354	saturation		saturation	
		droite	2 294 928	24 431 855	56 842 189		19 273 465	
46h	2010-177	gauche	8 571 664 720	34 177 426 865	27 096 033 265	31 596 019 270		
		droite	12 016 171 965	146 485 668 550	237 942 931 015	301 291 961 020		
	2010-178	gauche	4 223 233 750	26 627 948 280	16 535 566 850			
		droite	3 619 871 380	26 992 423 000	29 140 785 780			
	2010-279	gauche	5 991 825	7 404 325	6 800 905	8 698 740		21 610 685
		droite	354 820	659 355	461 605	436 745		1 475 215
	2010-179	gauche	32 418 684 130	32 886 020 490	9 751 418 620		32 704 005 175	
		droite	32 824 343 395	91 222 221 335	27 057 021 145		61 924 919 820	
	2012-042	gauche	8 430 930	29 431 415	8 570 485		7 321 270	
		droite	13 605 200	24 215 335	14 365 125		27 425 665	
	2012-038	gauche	330 408	5 525 362	263 284		1 176 193	1 861 694
		droite	292 093	5 056 468	930 615		1 455 851	1 197 049
	2012-039	gauche	8 652 143	22 579 262	13 476 693		101 375 755	
		droite	13 624 216	21 296 402	42 100 537		98 099 330	
72h	2011-003	gauche	2 635 160	4 768 600	5 652 825	4 722 270		
		droite	3 113 150	5 334 730	8 013 960	7 960 285		
	2011-005	gauche	3 243 665	23 518 125	25 437 995	20 314 010		
		droite	ND	2 979 810	2 327 235	4 051 615		

Tableau 18 : Cinétique et quantification des signaux BLI obtenus

*Les mesures sont exprimées en photons et obtenues par seuillage automatique. Les souris sont classées arbitrairement selon 3 profils nommés 24h, 46h et 72h qui tiennent compte du temps au bout duquel l'inhibition de l'expression de la LucF sur la tumeur U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc a été obtenue.*

Les résultats présentés dans le ***Tableau 18*** représentent la quantification obtenue par seuillage automatique de chacune des 2 tumeurs sur chaque animal. Bien qu'hétérogènes, les résultats ont été classés arbitrairement selon 3 profils différents en tenant compte du temps post-activation thermique où une inhibition de la BLI a été mesurée.

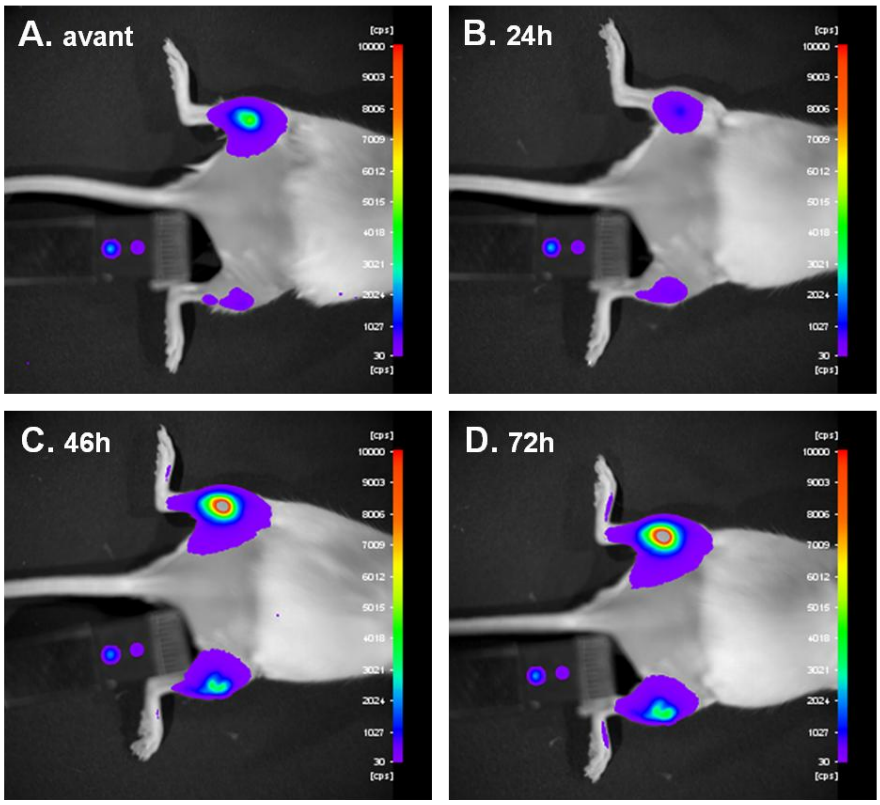
Le profil nommé 24h répertorie 6 souris. Nous constatons pour les tumeurs gauches (contenant la cassette d'expression du miRLuc) une diminution du signal de BLI 24h après l'hyperthermie suivie d'une une ré-augmentation. Concernant les tumeurs contrôles (cassette d'expression du miRneg), le signal BLI croit jusqu'à 46h, y compris 24h après le choc thermique. A noter le comportement atypique de la souris 2012-005, pour laquelle, le signal décroît légèrement dans la tumeur contrôle, 24h après l'activation thermique. Néanmoins, pour cette souris, le signal côté gauche (miRLuc) est plus fortement diminué (presque de moitié). Pour les souris 2012-086, 2012-087, 2012-090 et 2012-091, le signal de bioluminescence sature la caméra et n'a pas pu être quantifié, ils sont notés « saturation ». Ainsi, pour ces souris, l'analyse n'a pu être effectuée que de manière qualitative. En effet, la cinétique d'activité de la LucF après injection du substrat atteint son maximum 10 min après l'injection mais décroît rapidement (***Figure 29***), l'acquisition d'une nouvelle image avec un temps d'acquisition réduit n'a donc pas pu être envisagée. Des diminutions de signaux sur les tumeurs droites des souris 2012-087 et 2012-091 et sur les 2 tumeurs de la souris 2012-090 ont été observées 1 semaine après l'hyperthermie. Ces diminutions sont probablement le

résultat de l'apparition de zones nécrotiques ou hypoxiques au cours du processus de croissance tumorale.

Le profil nommé 46h regroupe 7 souris. Pour ce groupe d'animaux nous constatons une augmentation du signal de BLI pour la tumeur gauche (contenant la cassette d'expression du miRLuc) 24h après l'induction de l'hyperthermie mais une diminution transitoire du signal est observable à 46h. Le signal ré-augmente ensuite du côté gauche à 72h ou à 1 semaine après l'activation thermique pour toutes les souris exceptée la souris 2012-042 pour laquelle le signal continu de décroître une semaine après le dépôt de chaleur. Pour les souris nommées 2010-177, 2010-178 et 2012-039 nous observons une augmentation constante du signal BLI au cours du temps pour la tumeur contrôle. Cette augmentation est le résultat de l'augmentation du volume tumoral au cours de l'expérimentation. Cependant, le signal de la tumeur contrôle de la souris 2010-279 diminue à 46h. Ce résultat a toutefois été inclus dans ce profil étant donné la diminution bien plus conséquente mesurée sur la tumeur gauche que sur la tumeur contrôle. Enfin, les souris 2010-179, 2012-042 et 2012-038 présentent une inhibition de l'expression de la LucF non seulement sur la tumeur gauche mais également sur la tumeur droite lors de la comparaison des valeurs obtenues 24h et 46h après l'hyperthermie. Cependant, pour ces 3 souris un éventuel effet inhibiteur du miRLuc n'est détectable que si l'on compare le signal à 46h avec celui avant chauffage.

Le profil nommé 72h référence les résultats de BLI pour 2 souris. Pour les 2 animaux, le signal de la tumeur gauche (contenant la cassette d'expression du miRLuc) croît jusqu'à 46h puis diminue à 72h. Le signal mesuré pour la tumeur droite augmente ou stagne au cours de la cinétique.

De manière générale, les résultats obtenus concernant les 15 souris sont très hétérogènes et l'interprétation est complexe. Néanmoins, il semble que 3 profils d'inhibition prédominent, ces profils sont nommés 24h, 46h et 72h. Les images de BLI des souris 2011-001, 2010-177 et 2011-003 de chacun de ces profils sont présentées dans les ***Figure 41***, ***Figure 42*** et ***Figure 43***.



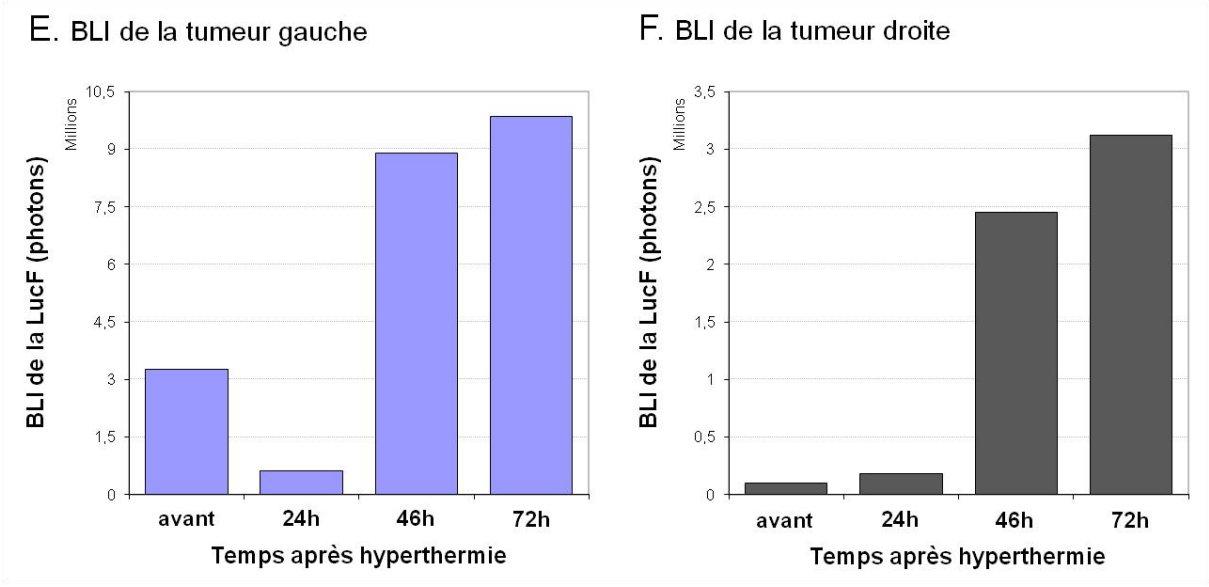
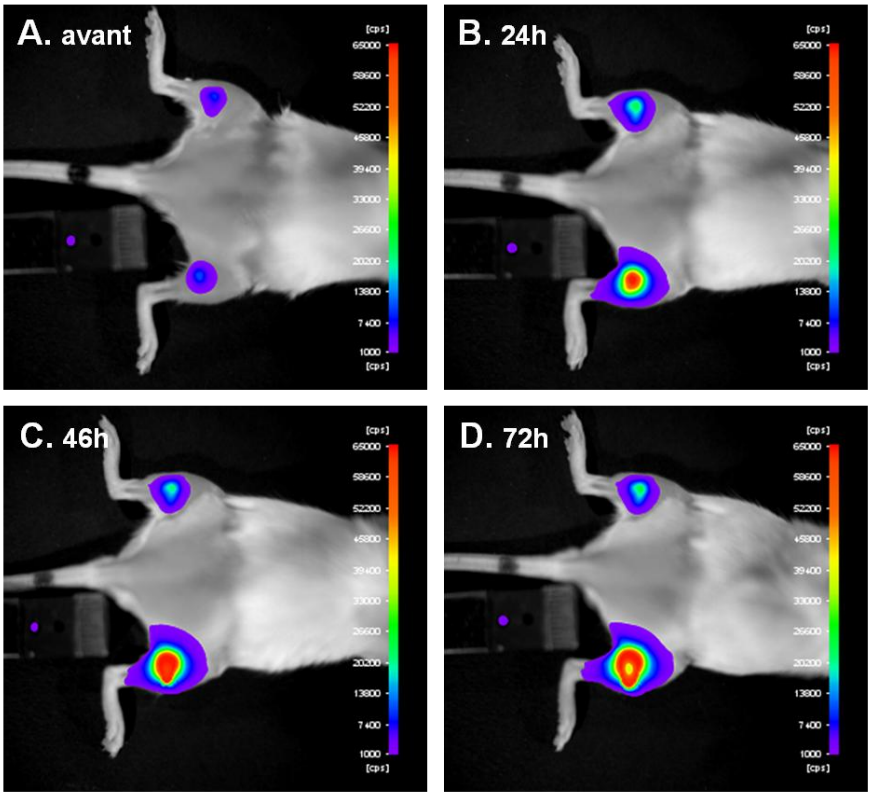


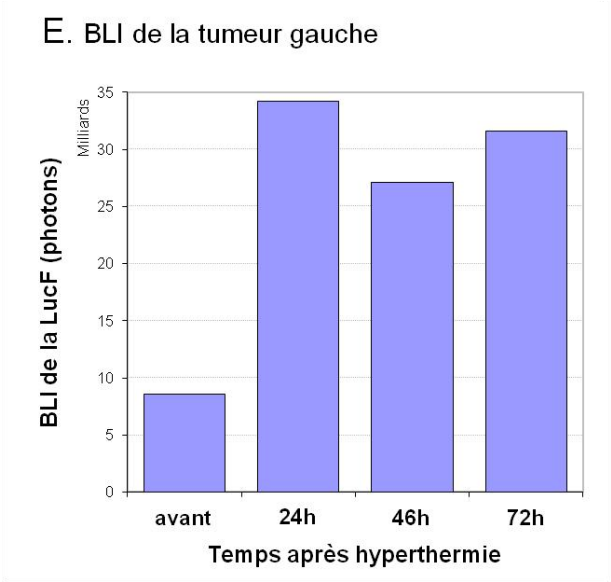
Figure 41 : Cinétique d'expression de la LucF présentant une inhibition par le miRLuc 24h après hyperthermie (souris 2011-001)

(n = 6)

A à D : Suivi de l'activité de la LucF par BLI : les acquisitions ont été réalisées 10 min après l'injection de luciférine en IP. Les images (vue dorsale) A, B, C et D correspondent aux acquisitions obtenues avant l'activation, 24h, 46h et 72h après l'activation thermique respectivement. L'hyperthermie a été effectuée au bain-marie pendant 8 min à 45°C.

E et F : Quantification du signal BLI de la LucF : la quantification, exprimée en photons, a été effectuée par seuillage automatique grâce au logiciel IndiGO 2®. E : tumeur gauche ; F : tumeur droite.





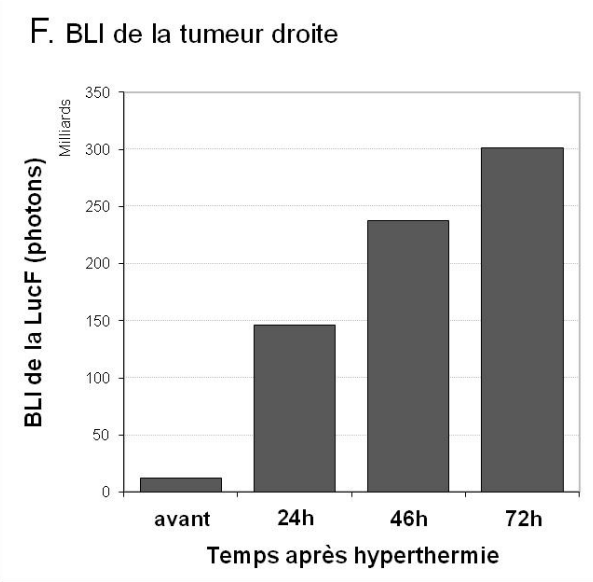
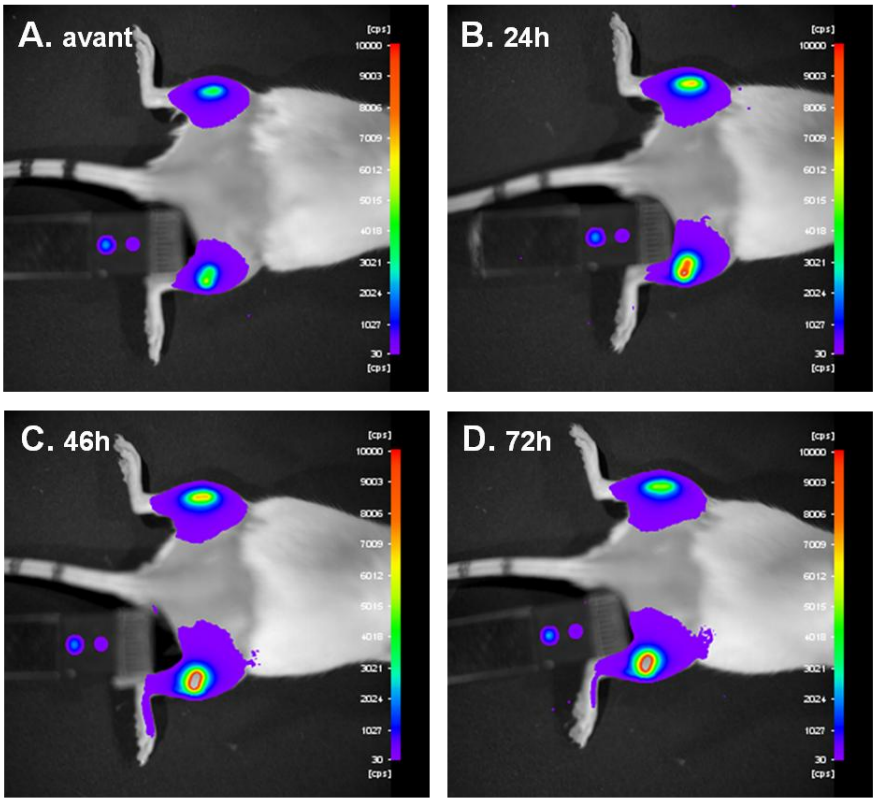


Figure 42 : Cinétique d'expression de la LucF présentant une inhibition par le miRLuc 46h après hyperthermie (souris 2010-177)

(n = 7)

A à D : Suivi de l'activité de la LucF par BLI : les acquisitions ont été réalisées 10 min après l'injection de luciférine en IP. Les images (vue dorsale) A, B, C et D correspondent aux acquisitions obtenues avant l'activation, 24h, 46h et 72h après l'activation thermique respectivement. L'hyperthermie a été effectuée au bain-marie pendant 8 min à 45°C.

E et F : Quantification du signal BLI de la LucF : la quantification, exprimée en photons, a été effectuée par seuillage automatique grâce au logiciel IndiGO 2®. E : tumeur gauche ; F : tumeur droite.



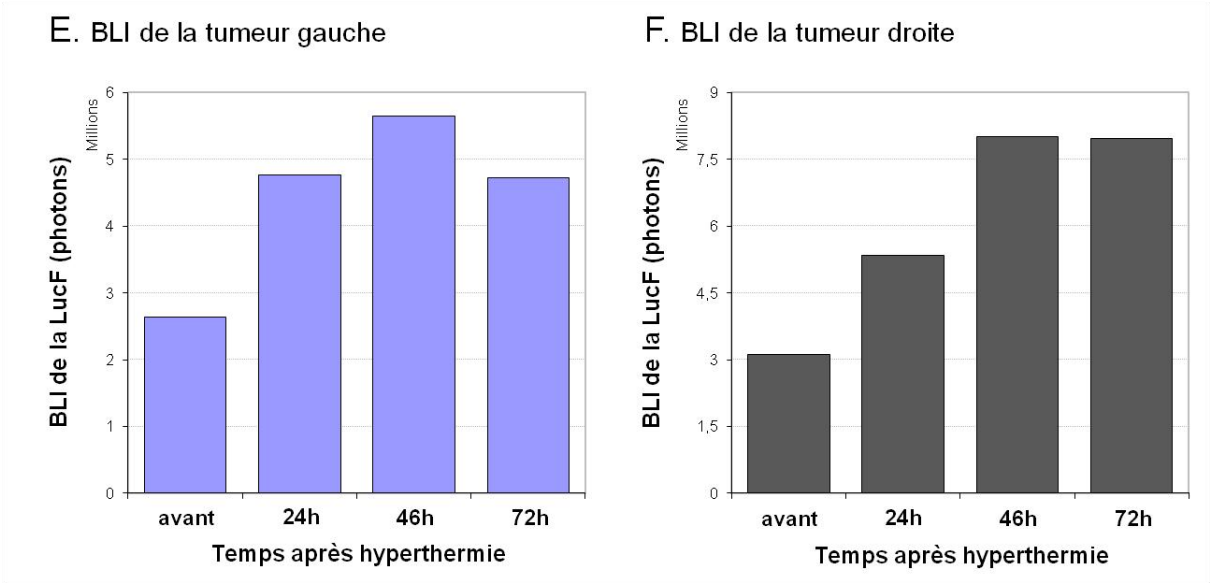


Figure 43 : Cinétique d'expression de la LucF présentant une inhibition par le miRLuc 72h après hyperthermie (souris 2011-003)

(n = 2)

A à D : Suivi de l'activité de la LucF par BLI : les acquisitions ont été réalisées 10 min après l'injection de luciférine en IP. Les images (vue dorsale) A, B, C et D correspondent aux acquisitions obtenues avant l'activation, 24h, 46h et 72h après l'activation thermique respectivement. L'hyperthermie a été effectuée au bain-marie pendant 8 min à 45°C.

E et F : Quantification du signal BLI de la LucF : la quantification, exprimée en photons, a été effectuée par seuillage automatique grâce au logiciel IndiGO 2®. E : tumeur gauche ; F : tumeur droite.

Pour les résultats présentés dans ce paragraphe, toutes les tumeurs gauches et droites expriment la LucR après chauffage, attestant de l'activation du promoteur Hsp70B. L'activation du promoteur Hsp70B contrôlant l'expression de la LucR est un argument fort en faveur de l'activation du promoteur contrôlant l'expression des miARN et de l'EmGFP. Cette hypothèse sera confirmée dans le paragraphe 4.3.

Pour la tumeur contrôle U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg des pattes droites, on constate une augmentation croissante du signal de BLI après chauffage. Cette augmentation est due à l'accroissement de la tumeur constituée de cellules qui expriment la LucF de manière constitutive.

Une inhibition de l'expression de la LucF par le miRLuc contrôlé par le promoteur thermo-inductible a pu être observée dans 40% des cas (n = 15). Trois profils d'inhibition ont pu être identifiés. Ces profils diffèrent en fonction du délai constaté entre l'induction de la biogénèse du miRLuc par hyperthermie et l'inhibition de l'activité de la LucF observée. L'inhibition a été constatée 24h après activation thermique dans 40% des cas (n = 6) (***Figure 41***), 46h après cette activation dans 47% des cas (n = 7) (***Figure 42***) et 72h après l'hyperthermie dans 13% des cas (n = 2) (***Figure 43***).

D'une façon générale, la diminution du signal, détecté par BLI, des tumeurs U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc a été visualisé transitoirement après l'activation thermique. Ceci démontre, comme nos résultats précédents, le caractère transitoire du promoteur Hsp70B. L'inhibition a été détectée pendant une journée mais, pour quelques souris, nous observons de façon surprenante, un effet durant plus longtemps : jusqu'à 2 semaines après l'activation.

Suivi de la croissance tumorale

Puisque la LucF est la cible des miARN, le signal BLI ne peut pas rendre compte de la croissance tumorale. Nos résultats présentés précédemment indiquent que le signal BLI mesuré sur la tumeur contrôle augmente au cours des différentes cinétiques effectuées. Il nous a donc paru important d'ôter des doutes concernant la diminution de signal obtenu sur la tumeur U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc. En effet, la diminution du signal observée est-elle due à l'inhibition de la LucF par le miRLuc ou à une diminution du volume tumoral ? Le fait que les 2 tumeurs soient présentes sur le même animal et qu'elles aient été soumises aux mêmes conditions expérimentales, aussi bien lors de l'implantation que lors de l'hyperthermie, explique difficilement que l'effet observé soit dû à une diminution de la croissance tumorale.

Cependant, afin de lever toute ambiguïté, nous avons suivi la croissance de tumeurs U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc *in vivo* pour voir si les conditions expérimentales auraient un effet sur le volume tumoral. Pour cela, des tumeurs U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc ont été générées sur les pattes de souris NOG. Après l'activation thermique (45°C ; 8 min), le volume tumoral a été déterminé au pied à coulisse.

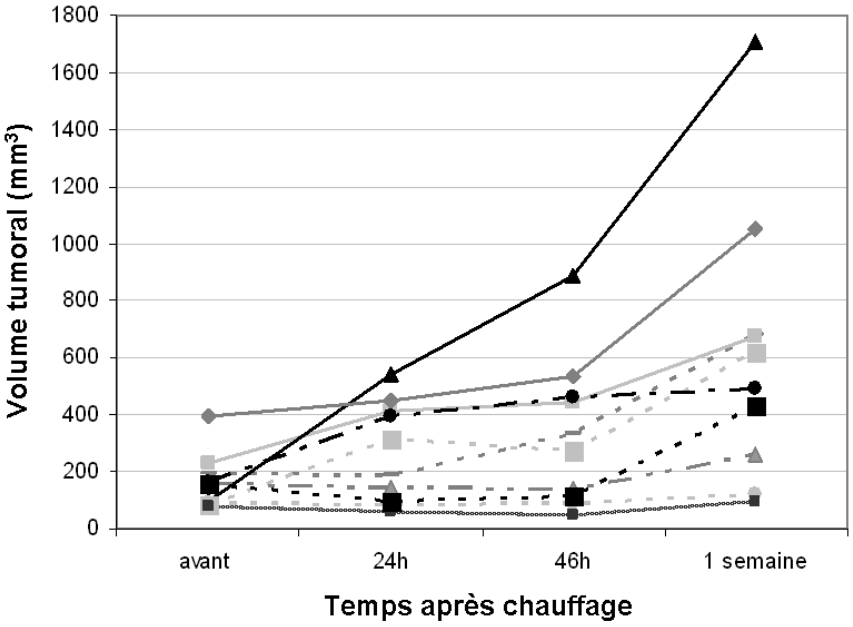


Figure 44 : Détermination du volume tumoral au pied à coulisse de tumeurs U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc

*Les mesures ont été réalisées au pied à coulisse avant, 24h, 46h et 1 semaine après l'activation thermique au bain-marie à 45°C pendant 8 min. Ces mesures ont été réalisées sur 10 pattes de souris NOG comportant une tumeur U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc. Le volume tumoral (exprimé en mm^3) a été calculé d'après la formule de Feldman, n = 10.*

La mesure du volume des tumeurs U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (***Figure 44***) n'indique aucune augmentation notable du volume tumoral à 24h et 46h après l'hyperthermie, sauf pour les tumeurs dont la croissance est plus rapide. Cette absence objective de croissance est probablement liée au manque de précision des mesures au pied à coulisse. En effet, cet outil de mesure ne permet pas de mettre en évidence une variation faible du volume tumoral qui se produirait sur un temps court. Une semaine après l'activation thermique, l'augmentation du volume est détectable.

Pour déterminer le volume tumoral dans nos conditions expérimentales, et dans le souci d'avoir une méthode de suivi plus précise, nous avons entrepris une détermination du volume par IRM de diffusion (Collaboration Dr. Bassem. Hiba, RMSB, Bordeaux).

4.3. Optimisation du système d'induction de l'inhibition génique

Les résultats précédents démontrent la possibilité d'inhiber l'expression génique de la LucF par un miARN placé sous le contrôle d'un promoteur thermo-sensible. Ces résultats sont convaincants à défaut d'être spectaculaires. Dans ce chapitre nous avons envisagé et testé différentes pistes pour optimiser la méthode et augmenter l'effet inhibiteur. Ainsi, nous avons modifié individuellement chacun des 2 acteurs de notre système : d'une part le miARN sous le contrôle du promoteur thermo-inductible et d'autre part sa cible.

4.3.1. Effet de l'ajout d'une cible du miRLuc supplémentaire en 3'UTR de l'ARNm cible

Les miARN naturels s'hybrident le plus souvent dans les régions 3'UTR des ARNm cibles (Cf. 1.2.3.2.). Ces régions, impliquées dans la régulation de la stabilité de l'ARNm, dans sa traduction et dans sa localisation (Hesketh, 2004), sont peu structurées, ce qui les rend plus accessibles aux miARN. De plus, les régions non traduites, notamment le 3'UTR, contiennent des éléments de régulation jouant un rôle important dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique. Par ailleurs, il a également été montré que l'augmentation du nombre de séquences cibles pour un même (ou pour plusieurs) miARN renforce l'efficacité de son d'inhibition (Fang and Rajewsky, 2011; Pasquinelli, 2012).

Dans nos résultats précédents, la séquence du miRLuc utilisée permet la reconnaissance spécifique d'une cible unique de l'ARNm de la LucF située dans la région codante. Afin d'augmenter l'effet inhibiteur du miRLuc, nous avons donc ajouté une cible supplémentaire dans la région 3'UTR de l'ARNm de la LucF. Nous avons successivement étudié l'impact de l'ajout de cette cible sur l'activité de la LucF puis sur l'inhibition par le miRLuc.

4.3.1.1. Insertion d'une cible du miRLuc supplémentaire dans le 3'UTR de l'ARNm de la LucF

Construction des vecteurs

L'ajout d'une cible dans le 3'UTR de l'ARNm de la LucF a été obtenu par insertion de la séquence cible du miRLuc au niveau d'un site de restriction BamHI, situé dans le 3'UTR de l'ARNm de la LucF, clonée dans le vecteur $pcDNA_5$-FRT-CMV-LucF.
Une séquence de 132 pb (allant du 148 au 279ème nucléotide de la séquence codante de la LucF, ***Figure 25***) ne permettant pas la création d'un cadre ouvert de lecture et contenant la séquence cible du miRLuc a été amplifiée par PCR à partir du vecteur $pcDNA_5$-FRT-CMV-LucF, avec des amorces miR-D et miR-R spécifiques de la cible du miRLuc et équipées d'adaptateurs contenant le site de restriction BamHI. Le produit PCR obtenu (132 pb) a été cloné directement dans le vecteur pCR®2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit®). Après

transformation par choc thermique, un clone bactérien a été sélectionné (crible blanc / bleu) et amplifié. La présence de la séquence cible a été vérifiée par PCR avec le couple d'amorce M13Rev / T7-R. Puis, excisé par digestion enzymatique par BamHI, le fragment a été purifié et inséré par ligation dans le vecteur d'intérêt pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF préalablement digéré par BamHI. La présence et l'orientation de la séquence cible ont été vérifiées par PCR grâce aux amorces LucF-2D / LucF-10D. Dans le cas d'une insertion de la cible en anti-sens, l'amorce LucF-10D présente sur la cible devient une amorce reverse et permet ainsi l'amplification d'un fragment de 89 pb. Dans le cas d'une insertion en sens, l'amorce LucF-10D constitue une amorce directe, ce qui conduit à une absence d'amplification. Le plasmide ayant intégré la cible en sens a été amplifié et vérifié par séquençage. Ce plasmide est nommé pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S (nommé plasmide « double cibles »).

Selon une stratégie similaire, un plasmide pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF-ciblemiR3'UTR-S, où l'expression de la LucF est sous le contrôle du promoteur EFIα, a été construit et testé *in vitro*. Les résultats obtenus avec ce plasmide seront simplement mentionnés puisque le promoteur EFIα s'est avéré inefficace *in vivo* dans nos conditions expérimentales et abandonné au profit du promoteur CMV (Cf. 4.1.4).

Activité de la LucF

Nous avons évalué l'impact de l'ajout d'une séquence supplémentaire de 132 pb contenant la cible du miRLuc dans le 3'UTR de l'ARNm de la LucF sur l'activité enzymatique de la protéine résultante. Pour cela, des cellules U87 MG ont été transfectées de façon transitoire avec le plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF qui possède une cible du miRLuc dans la région codante de l'ARNm de la LucF ou avec le plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S qui possède une cible supplémentaire dans la région 3'UTR de l'ARNm de la LucF.

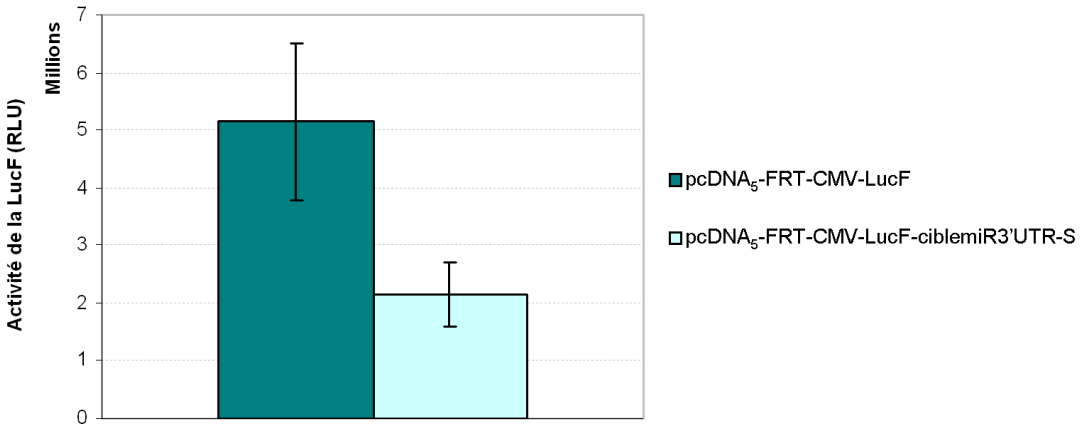


Figure 45 : Effet de l'ajout d'une cible sur l'activité de la LucF

Les transfections transitoires (n = 8) ont été réalisées à raison de 250 ng d'ADN total / puits 48h après l'ensemencement de 25 000 cellules U87 MG / puits. L'activité de la LucF (RLU) a été déterminée au luminomètre 48h après la transfection grâce au kit Luciferase Assay System (Promega). La transfection dans les U87 MG du plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF est représentée en vert foncé et celle de pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S en vert clair (Student t test, $p<0,01$).

Après lyse des cellules transfectées par chacun des 2 plasmides, les résultats de la ***Figure 45*** indiquent une différence d'activité de l'enzyme LucF. L'ajout d'une cible en 3'UTR de l'ARNm de la LucF induit une diminution de l'activité d'environ 60%. A titre indicatif, des résultats similaires ont été obtenus dans les expérimentations réalisées avec le plasmide pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF-ciblemiR3'UTR-S. La différence de taille entre les 2 plasmides (2%) et donc le nombre de copies transfectées ne suffit pas à expliquer la diminution observée. Le 3'UTR est une région impliquée dans la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. L'ajout de la séquence de 132 pb au niveau de cette région régulatrice diminue clairement l'activité de la LucF et donc le niveau d'expression. Néanmoins, cette diminution d'expression n'est pas rédhibitoire pour la suite de notre stratégie d'optimisation de l'inhibition par le miRLuc.

4.3.1.2. Effet du nombre de cibles sur l'efficacité d'inhibition par le miRLuc placé sous le contrôle du promoteur CMV

L'efficacité d'inhibition par le miRLuc, lorsque l'ARNm de la LucF comporte 2 séquences cibles : l'une dans la région codante et l'autre en 3'UTR, a été testée par triple transfection transitoire comme décrit précédemment (Cf. 4.1.3.).

Des triples transfections ont été réalisées dans des U87 MG avec le plasmide pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR comme témoin d'efficacité, le plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S comme cible (double) des miARN et les vecteurs pCMV-miRLuc (***Figure 46***) ou pCMV-miRneg pour permettre l'expression constitutive des miARN.

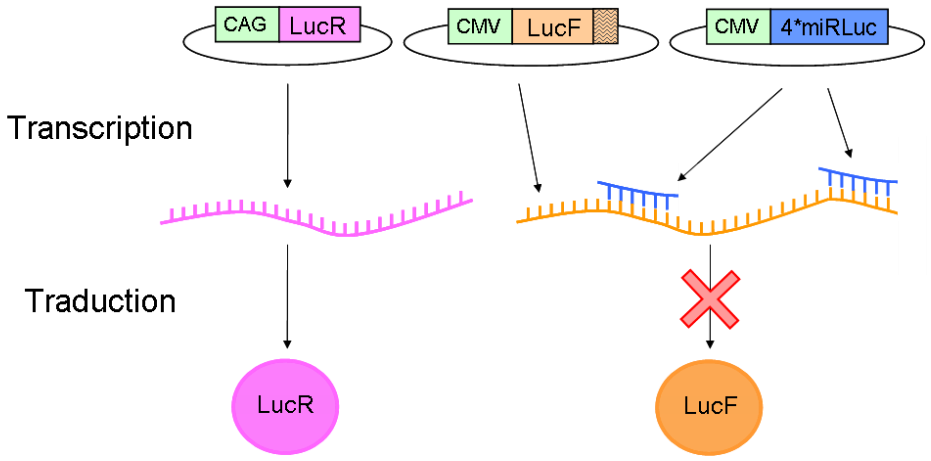


Figure 46 : Schématisation de la triple transfection réalisée dans des cellules U87 MG avec les plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S, pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR et pCMV-miRLuc

La deuxième séquence cible du miRLuc, présente dans le plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S, est représentée par le symbole ▨. Après transcription des plasmides dans la cellule, le miRLuc mature pourra venir s'hybrider spécifiquement sur l'ARNm de la LucF sur chacune des 2 cibles et ainsi provoquer une inhibition de la traduction. La mesure de l'activité de la LucR permet la normalisation des résultats.

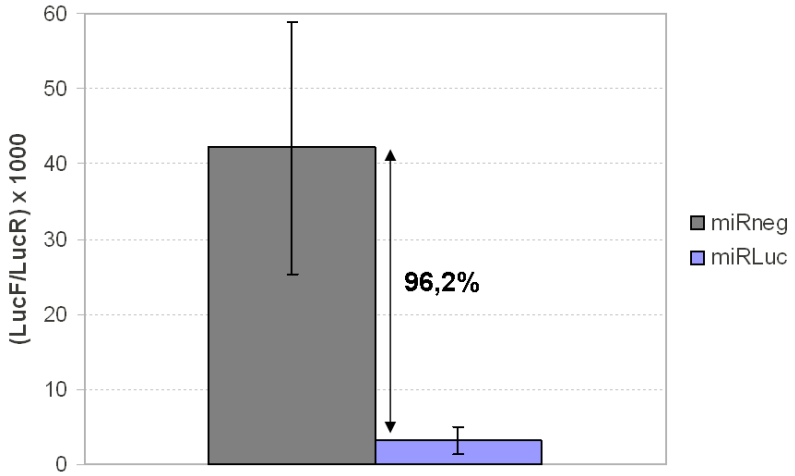


Figure 47 : Inhibition de l'activité de la LucF par le miRLuc après ajout d'une cible supplémentaire en 3'UTR de l'ARNm de la LucF

Les triples transfections transitoires (n = 10) ont été réalisées à raison de 250 ng d'ADN total / puits 48h après l'ensemencement de 25 000 cellules U87 MG / puits. Les activités respectives de la LucF et de la LucR (en RLU) ont été déterminées au luminomètre 48h après les transfections grâce au kit Dual-Luciferase®. En bleu, nommé miRLuc, est représentée la triple transfection de pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S, pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR et pCMV-miRLuc et en gris, nommé miRneg, la triple transfection de pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S, pcDNA$_5$/FRT/CAG/LucR et pCMV-miRneg. Les résultats sont normalisés par rapport à l'activité de la LucR témoignant de l'efficacité de transfection selon la formule (activité de la LucF / activité de la LucR) x 1 000, ($p<0,01$).

La ***Figure 47*** représente l'activité de la LucF après transfection et indique l'inhibition de l'expression de la LucF par le miRLuc normalisée par rapport à l'efficacité de la transfection. Après l'ajout d'une cible supplémentaire du miRLuc au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm de la LucF, l'inhibition atteint 96,2%. Pour mémoire, l'inhibition de l'activité de la LucF « simple cible » était de 84,5% dans les conditions similaires (Cf. ***Figure 28***). Nous constatons donc une amélioration de l'efficacité d'inhibition de plus de 10% par rapport aux expérimentations réalisées avec l'ARNm de la LucF ne comportant qu'une seule cible dans la région codante. L'ajout d'une cible du miRLuc dans la région 3'UTR de l'ARNm de la LucF a donc permis d'optimiser l'inhibition souhaitée.

Le même type d'expérimentation a été réalisé avec le plasmide pcDNA$_5$-FRT-EFIα-LucF-ciblemiR3'UTR-S et aboutit également à une augmentation de l'inhibition obtenue (résultats non présentés).

4.3.1.3. Effet du nombre de cibles sur l'efficacité d'inhibition par le miRLuc placé sous le contrôle du promoteur Hsp70B

L'amélioration de l'inhibition par le miRLuc *in vitro*, lorsque l'ARNm de la LucF possède une deuxième cible en 3'UTR, nous a conduit à envisager de reprendre le projet *de novo* avec de nouvelles lignées stables en remplaçant la LucF « simple cible » par la LucF « double cibles ». Avant de générer ces nouvelles lignées, l'inhibition a été évaluée après hyperthermie lorsque le miRLuc est sous le contrôle du promoteur Hsp70B, en transfections transitoires (***Figure 48***).

Co-transfections transitoires

Pour cela, les plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S et pHsp-miRLuc (ou pHsp-miRneg) ont été co-transfectés dans des cellules U87 MG. L'activation thermique a été effectuée au bain-marie (45°C ; 8 min) 48h après la transfection, puis la mesure de l'activité de la LucF a été déterminée au luminomètre suivant une cinétique.

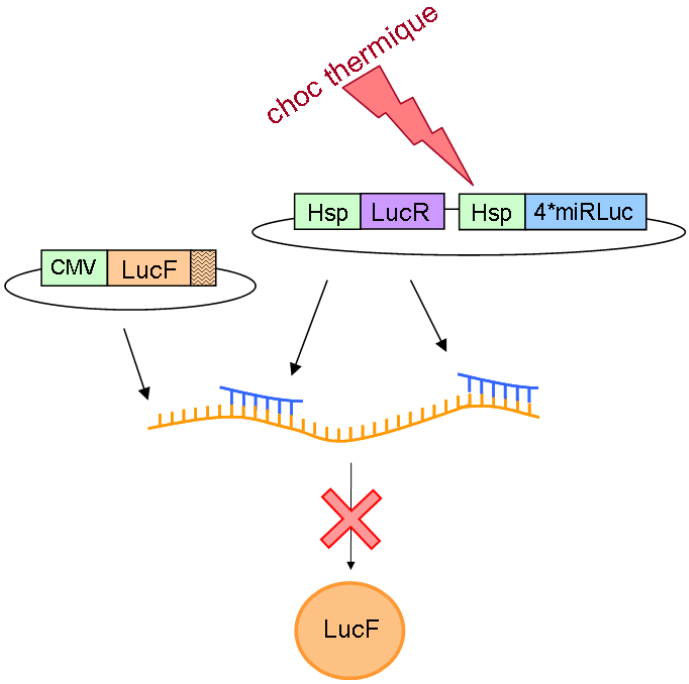


Figure 48 : Schématisation de la co-transfection des plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S et pHsp-miRLuc dans les cellules U87 MG

Le choc thermique des cellules est réalisé au bain-marie, 48h après la transfection. Cette élévation de température permet l'activation des promoteurs Hsp70B (notés Hsp) et permettra la biosynthèse de miRLuc matures. Les miRLuc pourront s'hybrider spécifiquement sur chacune des 2 cibles présentes sur l'ARNm de la LucF. La mesure de l'activité de la LucF reflètera l'inhibition de la traduction par le miRLuc.

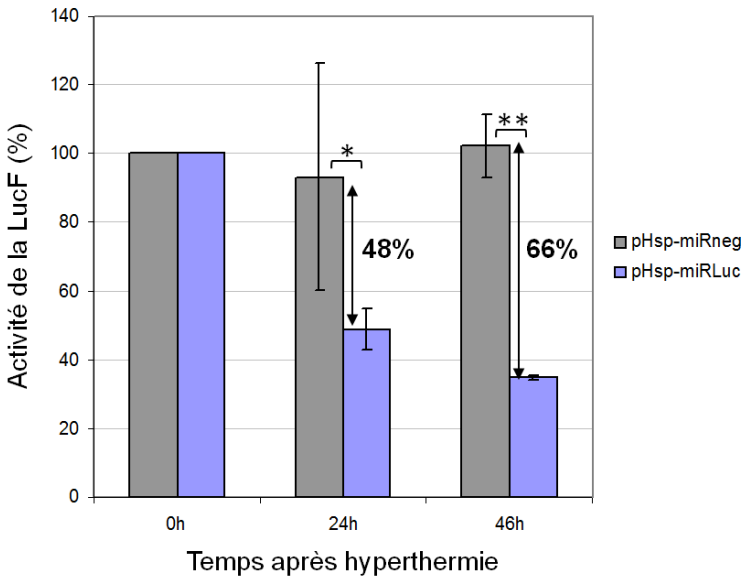


Figure 49 : Inhibition de l'activité de la LucF « double cibles » lorsque le miRLuc est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur Hsp70B

*Les co-transfections transitoires (n = 4) ont été réalisées à raison de 250 ng d'ADN total / puits 48h après l'ensemencement de 10 000 cellules U87 MG / puits. L'activation thermique a été effectuée au bain-marie (45°C ; 8 min). Puis, l'activité de la LucF a été déterminée au luminomètre, après lyse des cellules à différents temps après chauffage, grâce au kit Dual-Luciferase®. La co-transfection du plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S avec pHsp-miRLuc est représentée en bleu et celle avec pHsp-miRneg en gris (Student t test, * : p<0,05 ; ** : p<0,01).*

Les résultats de la ***Figure 49*** présentent une diminution de l'activité de la LucF après activation de la biogénèse du miRLuc par choc thermique. Nous constatons une inhibition de 48% 24h après activation du promoteur Hsp70B. De plus, cette inhibition mesurée à 46h après l'activation thermique atteint 66%. Ces résultats confirment la possibilité d'inhiber l'expression d'un gène *in vitro* en déclenchant la synthèse d'un miARN spécifique.

Ce même type de co-transfections n'ayant pas été obtenues avec la LucF « simple cible » nous ne pouvons conclure qu'en à une éventuelle amélioration de l'effet inhibiteur après activation thermique. L'étude a donc été poursuivie en générant des lignées stables « double cibles ».

Génération des lignées

Des lignées stables U87 « double cibles » de génotype CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc ou CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg, ont été générées selon la même stratégie que celle utilisée précédemment. Elle se déroule en 2 étapes : la transfection par recombinaison homologue au site FRT du plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S puis l'insertion aléatoire des plasmides pHsp-miRLuc ou pHsp-miRneg.

L'insertion de la séquence CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S a été réalisée au site FRT des cellules U87 FRT-7 en utilisant le vecteur pOG44 codant pour la recombinase. La sélection à l'hygromycine a permis l'obtention de la lignée U87 CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-

S. Cette lignée a ensuite été utilisée pour une transfection stable aléatoire pour l'insertion des séquences Hsp-LucR/Hsp-EmGFP-4*miRLuc ou Hsp-LucR/Hsp-EmGFP-4*miRneg (codées par les plasmides pHsp-miRLuc et pHsp-miRneg). La sélection à la blasticidine a permis d'obtenir les lignées U87 CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF-ciblemiR3'UTR-S/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg.

Ces lignées cellulaires ont été obtenues à la fin de la période de thèse et sont en cours de valorisation. L'approche sera mise en œuvre selon un schéma identique à celui exposé dans le chapitre précédent et intégrera l'ensemble des données d'optimisation. Les perspectives nouvelles liées à leur utilisation seront détaillées à la fin de ce manuscrit.

4.3.2. Modification de la durée d'activation du promoteur Hsp70B

Une deuxième piste d'investigation pour (1) augmenter le pourcentage de tumeurs présentant une inhibition, (2) homogénéiser le profil temporel d'inhibition et (3) globalement améliorer l'intensité de l'inhibition, a consisté à optimiser les paramètres du choc thermique.

L'activation de 45°C pendant 8 min du promoteur Hsp70B résulte d'études réalisées *in vitro* et *in vivo* au laboratoire à partir d'une lignée U87 Hsp-LucF. Pour ce projet, qui vise à induire une inhibition de l'expression d'un gène d'imagerie, les conditions d'activation (la dose thermique optimale) pourraient être différentes. Cette différence pourrait être expliquée d'une part parce que la lignée est possiblement différente du fait de la transformation génétique, d'autre part, parce que la réponse au choc thermique est complexe et qu'elle pourrait influencer à la fois la synthèse du miARN et l'ensemble des protéines cellulaires, y compris la LucF ciblée par le miRLuc. Nous avons donc choisi d'augmenter la dose thermique et d'étudier l'impact de cette augmentation sur l'ensemble des protéines et processus physiologiques placés sous le contrôle transcriptionnel de promoteurs thermo-sensibles, qui sont :

- les protéines HSP70 endogènes qui sont sous le contrôle des promoteurs Hsp70 endogènes et qui peuvent, de par leur rôle de chaperon, modifier le devenir des autres protéines cellulaires
- la LucR, utilisée comme témoin de chauffage, dont le gène est placé sous le contrôle d'un promoteur Hsp70B exogène
- l'EmGFP, dont l'expression est co-cistronique à la biogénèse des miRLuc et miRneg, dont le gène est placé sous le contrôle d'un second promoteur Hsp70B
- l'inhibition de l'activité de la LucF par les miRLuc.

D'un point de vue pratique, pour élever la dose thermique, nous avons préféré l'augmentation du temps de chauffage à celle de la température. Ce choix a été motivé par la maîtrise plus aisée de ce paramètre.

4.3.2.1. Stress cellulaire visualisé par l'activation de la voie endogène des protéines chaperons HSP70

Le choc thermique provoque la dénaturation des protéines. La déstabilisation du complexe, formé entre les protéines HSP70 et le facteur de transcription HSF1, provoque la libération de ce dernier. Ainsi, le facteur HSF1 se trimérise et est transloqué au noyau où il se fixe aux éléments HSE des promoteurs Hsp70. Le pool de HSF1 trimérisés active l'ensemble des promoteurs Hsp70, qu'ils soient endogènes ou exogènes. L'activation des promoteurs thermo-inductibles endogènes déclenche la synthèse des protéines HSP70 responsables de la reconformation adéquates des protéines cellulaires altérées par le stress perçu.

Cette partie est consacrée au suivi de la voie endogène de la réponse au choc thermique. La transcription des ARNm des protéines HSP70 a été évaluée par RT-PCR quantitative afin de mesurer la modulation de la réponse au stress en fonction des paramètres du choc thermique.

Pour cela, l'activation thermique a été réalisée à 45°C pendant 8 min ou à un temps d'activation plus long fixé arbitrairement à 20 min. L'hyperthermie a été réalisée au bain-marie sur les cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg. A différents temps après l'activation thermique, les ARN totaux ont été extraits puis traités à la DNase I. Une étape de réverse transcription a permis l'obtention des ADNc totaux puis une PCR quantitative a été effectuée avec le couple d'amorce Hsp70-1D / Hsp70-4R. L'ADNc du gène de référence est amplifié à partir de la même matrice avec le couple d'amorce 36B4-S / 36B4-AS. La quantification relative est effectuée en calculant le ΔCt qui est la différence du Ct obtenu pour les ADNc Hsp70 avec le Ct du gène de référence 36B4. Ce calcul permet d'obtenir la variation relative du nombre de copies de l'ARNm d'intérêt suivant la formule $2^{-\Delta Ct}$.

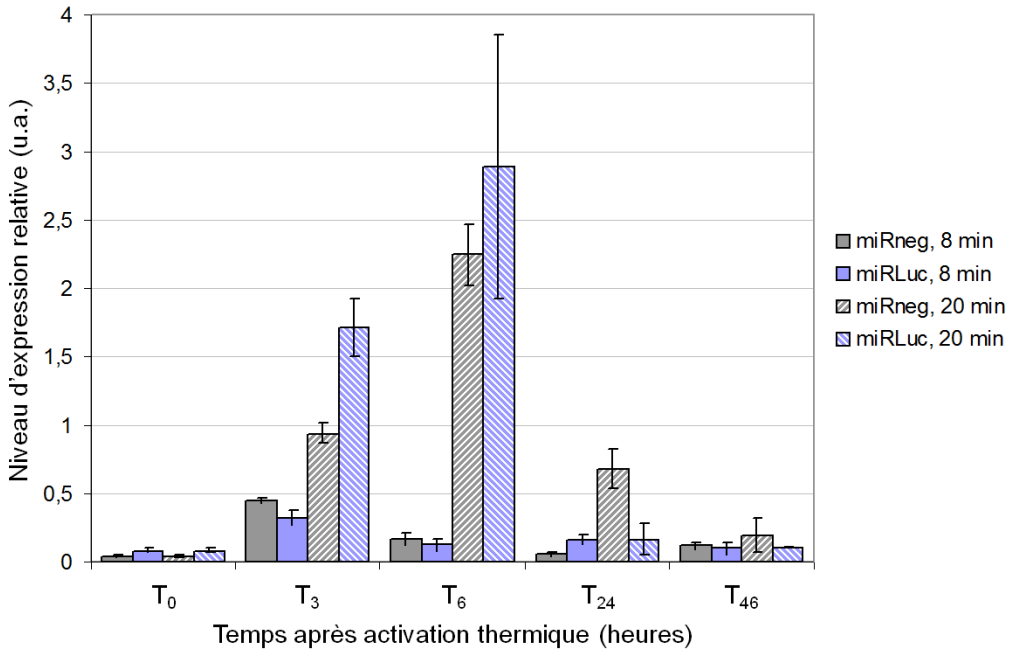


Figure 50 : Niveau d'expression relative de l'ARNm Hsp70 endogène par RT-PCRq après une activation thermique de 45°C pendant 8 ou 20 min

*Les niveaux d'expression relative (en unité arbitraire) des ARNm Hsp70 sont représentés, à différents temps après activation thermique, en bleu pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (nommée miRLuc) et en gris pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (nommée miRneg). L'activation thermique a été réalisée au bain-marie à 45°C pendant 8 min (miRLuc, 8min et miRneg, 8 min) ou 20 min (miRLuc, 20 min et miRneg, 20 min).*

Les variations d'expression relative des ARNm Hsp70 reflètent l'activité des promoteurs après activation thermique. La ***Figure 50*** présente le profil d'expression des ARNm à différents temps en fonction de l'activation thermique de 45°C durant 8 ou 20 min dans les lignées cellulaires U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg. En fonction de la durée de l'hyperthermie, les niveaux d'expression et le profil d'activation diffèrent.

La quantité d'ARNm Hsp70 transcrits est maximale 3h après un choc thermique de 45°C durant 8 min, alors qu'elle est maximale à 6h après une hyperthermie de 20 min. Par ailleurs, le niveau d'expression des ARNm Hsp70 après un choc thermique de 20 min est beaucoup plus important que lors d'une activation de 8 min. L'augmentation du temps d'activation permet d'obtenir des niveaux d'expression jusqu'à 24 fois plus élevés. Le profil de l'expression relative d'ARNm Hsp70 obtenu après le choc thermique est similaire pour les 2 lignées.

Enfin, ces résultats témoignent que, quels que soient les paramètres d'hyperthermie, l'activation du promoteur est transitoire et qu'à partir de 24h après l'activation, le niveau basal d'expression des ARNm HSP70 est retrouvé (présenté à T_0).

En conclusion, ces résultats confirment que l'activation des promoteurs Hsp70 est modulable par la dose thermique. Ils soulignent aussi, grâce au profil d'expression des ARNm

Hsp70 obtenu, que l'activation pourrait être considérablement augmentée en prolongeant le temps de chauffage à 45°C.

4.3.2.2. Cinétique d'expression de la LucR sous le contrôle du promoteur Hsp70B

Dans notre stratégie, le gène rapporteur de la LucR est sous le contrôle d'un promoteur Hsp70B. Nous avons donc évalué l'impact d'une augmentation de la durée de l'hyperthermie sur son expression.

L'activité de la LucR a donc été mesurée dans les cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg après activation thermique au bain-marie à 45°C pendant 8 ou 20 min (***Figure 51***).

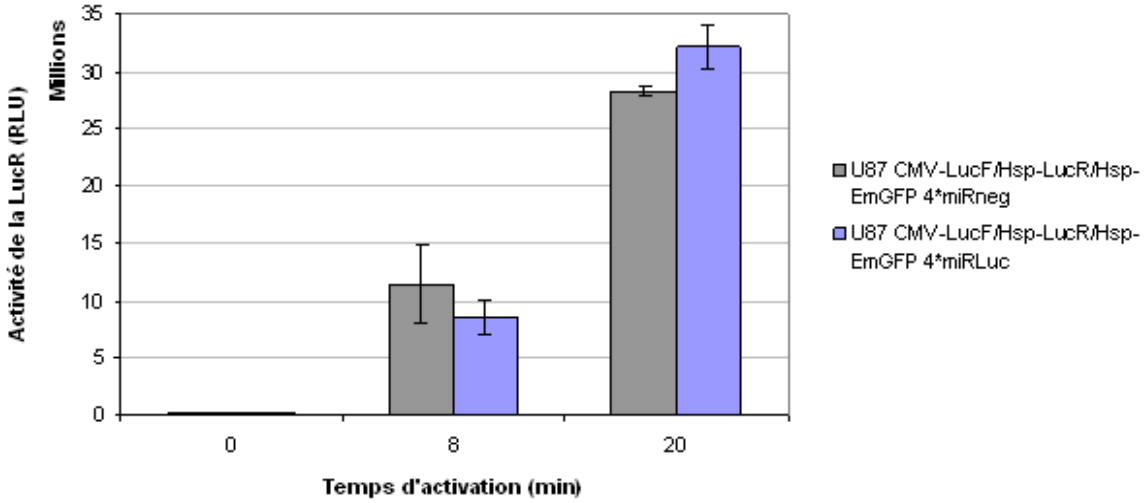


Figure 51 : Activité de la LucR après différents temps d'activation thermique
*Les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (en bleu) et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (en gris) ont été ensemencées à raison de 25 000 cellules / puits, puis 48h après, soit maintenues à 37°C, soit chauffées au bain-marie à 45°C pendant 8 ou 20 min. La mesure de l'activité de la LucR (RLU) a été déterminée au luminomètre sur les lysats cellulaires en utilisant le kit Dual-Luciferase® 6h après l'hyperthermie.*

Les résultats obtenus dans la ***Figure 51*** indiquent l'activité de la LucR en fonction de l'hyperthermie réalisée. L'activation des U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg à 45°C pendant 20 min est 2,5 fois plus efficace qu'une activation pendant 8 min. Pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et pour la même température, une activation thermique de 20 min est 3,7 fois plus efficace qu'une activation de 8 min quant à l'intensité de l'activité de la LucR. Une hyperthermie prolongée à 20 min permet donc un niveau d'expression du gène plus important et confirment l'obtention d'une activation du promoteur Hsp70B plus optimale.

4.3.2.3. Expression de l'EmGFP

Nous avons également étudié l'expression de l'EmGFP co-cistronique aux miARN et placée sous le contrôle transcriptionel du promoteur thermo-sensible.

4.3.2.3.1. Mesure en cytométrie de flux

Nous avons déterminé l'impact de l'augmentation du temps d'activation thermique sur l'expression de l'EmGFP afin de tester directement l'activation du promoteur Hsp70B à l'origine de la biogénèse des miRLuc et miRneg. D'après les données du fournisseur (système BLOCK-iT^{TM}), l'expression de l'EmGFP est parfaitement corrélée à celle des miARN présents dans la construction. Le suivi de l'expression de l'EmGFP a été réalisé par cytométrie de flux.

Les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg ont été utilisées. L'activation thermique a été réalisée 48h après leur mise en plaque. Puis les cellules ont été analysées au cytomètre de flux (***Figure 52***) afin de déterminer le pourcentage de cellules fluorescentes (***Figure 53***) et le niveau de l'intensité de fluorescence de l'EmGFP (***Figure 54***) pour chaque condition.

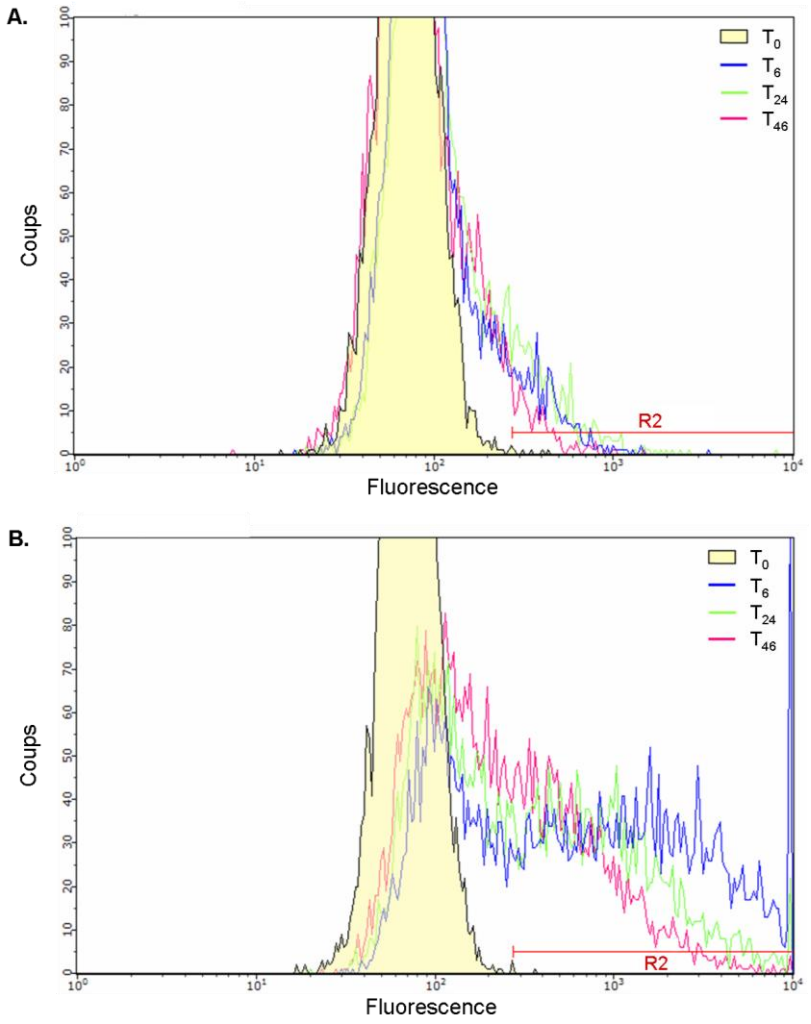


Figure 52 : Profils de fluorescence obtenus pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc après activation thermique

Profils obtenus pour une activation thermique de 8 min (A) ou de 20 min (B).
T_0 correspond au profil avant chauffage, T_6, T_{24} et T_{46} correspondent aux mesures réalisées après 6, 24 et 46 heures respectivement.
Les profils de fluorescence ont été déterminés sur 4 000 cellules au cytomètre de flux. La population R2 concerne la population d'intérêt comprenant les cellules fluorescentes pour l'EmGFP.

Les profils de la ***Figure 52*** représentent le niveau de fluorescence pour chaque évènement détecté (cellule) avant et à différents temps après un choc thermique de 45°C pendant 8 min (***Figure 52 A***) ou 20 min (***Figure 52 B***). Nous constatons que l'hyperthermie provoque un décalage du profil de fluorescence vers la droite quel que soit le temps d'activation. De plus, il est clair que ce décalage est plus important lorsque le temps d'activation thermique est de 20 min (***Figure 52 B***). Ce décalage correspond à la présence d'une population cellulaire (population R2) de cellules fluorescentes pour l'EmGFP. L'effectif de cette population R2 est plus important lorsque le temps d'activation thermique est de 20 min. Il est à noter que nous obtenons des profils similaires avec la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (résultats non représentés). Les données de cytométrie de flux permettent la mesure du pourcentage de cellules fluorescentes, reportées dans la ***Figure 53***, pour les 2 lignées et pour les 2 temps d'activation testés.

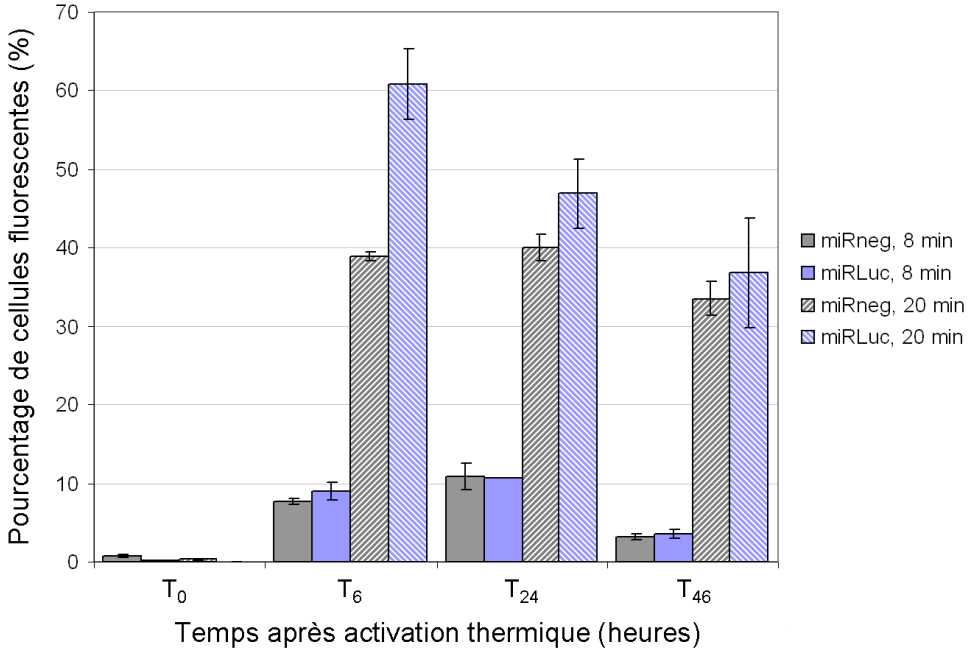


Figure 53 : Pourcentage de cellules fluorescentes après choc thermique
*Après activation thermique des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (nommées miRLuc) et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (nommées miRneg), le pourcentage de cellules fluorescentes a été déterminé au cytomètre de flux sur 4 000 cellules de chaque lignée. Deux temps d'activation à 45°C ont été testés : 8 min (miRLuc, 8 min et miRneg, 8 min) et 20 min (miRLuc, 20 min et miRneg, 20 min), n = 3.*

La ***Figure 53*** indique qu'avant activation thermique, moins de 0,3% des cellules sont fluorescentes, confirmant ainsi l'absence d'activité basale du promoteur Hsp70B. Après le choc thermique, les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg possèdent globalement la même cinétique d'expression de l'EmGFP. En fonction de la durée du choc thermique, les profils de fluorescence sont très différents. Pour une activation à 45°C pendant 8 min, le pourcentage de cellules fluorescentes est faible et atteint un maximum de 11% 24h après l'hyperthermie. Lorsque l'hyperthermie induite est plus longue (20 min), l'expression de l'EmGFP est plus précoce (6h) et le pourcentage de cellules fluorescentes augmente de façon drastique pour atteindre 60%. Le pourcentage décroît ensuite graduellement mais reste à 37% à 46h. Le comportement des 2 lignées est sensiblement identique, excepté 6h après chauffage où le pourcentage de cellules fluorescentes pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc est notablement supérieur à celui de la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg.

Outre le pourcentage de cellules fluorescentes, l'analyse par cytométrie de flux permet également de mesurer l'intensité de fluorescence par cellule. Cette intensité reflète donc le niveau d'expression de la protéine EmGFP au cours du temps après choc thermique pour les 2 lignées.

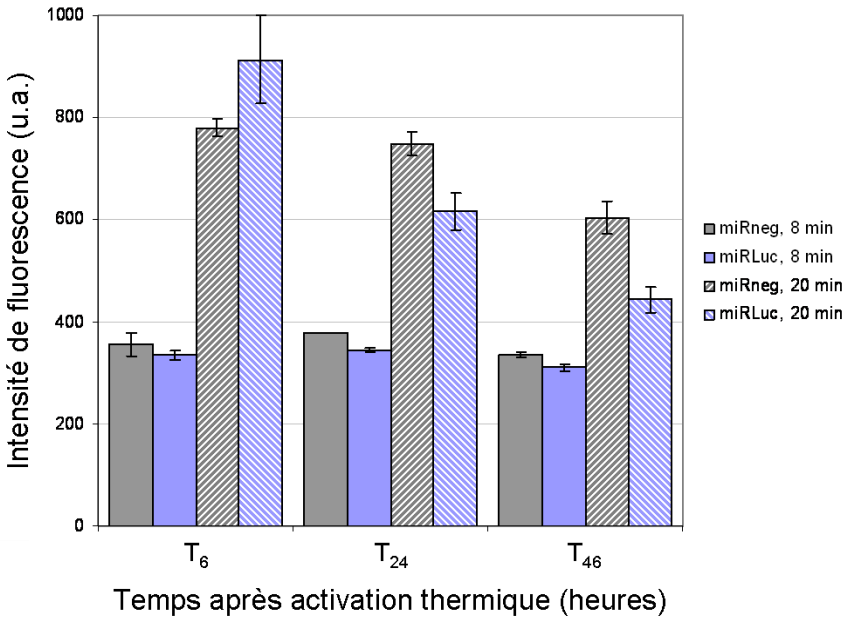


Figure 54 : Mesure de l'intensité de fluorescence des cellules après choc thermique
*Après activation thermique des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (nommées miRLuc) et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (nommées miRneg), l'intensité de fluorescence des cellules exprimant l'EmGFP a été déterminée sur 4 000 cellules au cytomètre de flux. Deux temps d'activation à 45°C ont été testés : 8 min (miRLuc, 8 min et miRneg, 8 min) et 20 min (miRLuc, 20 min et miRneg, 20 min), n = 3.*

La ***Figure 54*** présente l'intensité de fluorescence mesurée dans la population R2 qui correspond aux cellules fluorescentes pour l'EmGFP. Cette mesure n'est pas indiquée pour les cellules non chauffées étant donné le faible nombre de cellules fluorescentes obtenu (0,3%) (***Figure 53***). Pour chaque condition, le bruit de fond a été soustrait, il représente l'intensité de fluorescence des cellules hors R2, ce qui équivaut au signal d'auto-fluorescence des cellules. L'intensité de fluorescence, exprimée en unité arbitraire, suit le même profil que celui obtenu pour le pourcentage de cellules fluorescentes (***Figure 53***). Pour l'activation thermique de 45°C pedant 8 min, nous observons un pic d'intensité à 24h après l'hyperthermie mais, globalement, l'intensité de fluorescence reste relativement faible. Cette intensité est nettement améliorée lorsque l'activation thermique dure 20 min. L'intensité de fluorescence est doublée et le pic est plus précoce (6h après l'hyperthermie) en accord avec les résultats présentés dans la ***Figure 53***.

L'activation thermique des cellules, pour les 2 lignées, à 45°C pendant 20 min permet d'obtenir un pourcentage de cellules fluorescentes et une intensité de fluorescence nettement supérieurs que lors d'une activation de 8 min. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment concernant l'expression des ARNm Hsp70 endogènes (***Figure 50***) et l'activité de la LucR (***Figure 51***).

L'ensemble concordant des résultats montre qu'à 45°C, un choc thermique de 20 min est beaucoup plus efficace qu'un choc de 8 min pour induire l'expression des différentes protéines placées sous le contrôle transcriptionnel des promoteurs Hsp70B. C'est le cas pour les protéines endogènes et pour les protéines rapporteurs. Etant donné que l'ARNm de l'EmGFP contient également les séquences des pri-miRLuc (ou pri-miRneg), nous pouvons

émettre l'hypothèse qu'une augmentation du temps d'hyperthermie devrait permettre une synthèse plus précoce et plus intense du miRLuc (ou du miRneg). Une activation de 45°C, 20 min serait donc plus appropriée afin d'obtenir une meilleure efficacité d'inhibition de la LucF par le miRLuc *in vivo*.

4.3.2.3.2. Visualisation par microscopie de fluorescence

Les résultats de cytométrie de flux révèlent qu'après un choc thermique, dans nos conditions expérimentales, le pourcentage de cellules exprimant l'EmGFP ne dépasse pas 60%. L'expression de l'EmGFP co-cistronique à la biogénèse des miRLuc ou miRneg permet également de visualiser les cellules en microscopie de fluorescence. Nous avons donc entrepris l'observation des cellules au microscope pour vérifier les conclusions de l'analyse cytométrique.

Pour cela, les cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg ont été mises en culture puis activées à 45°C pendant 20 min. Les cellules ont ensuite été observées au microscope de fluorescence 6h après l'hyperthermie.

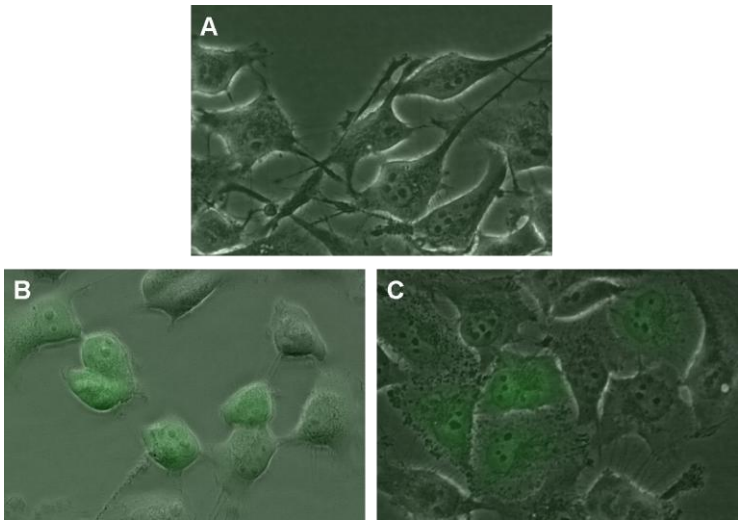


Figure 55 : Microscopie de fluorescence des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg

*La superposition des images de fluorescence (ex : 475 +/- 20 nm ; em : 530 +/- 25 nm) et de contraste de phase (grossissement x 40) des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc avant activation (A), 6h après activation de 45°C, 20 min (B) et des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg 6h après activation de 45°C, 20 min (C).*

La ***Figure 55*** confirme l'absence de fluorescence des cellules avant hyperthermie (***Figure 55 A***) et l'expression de l'EmGFP après activation thermique (***Figure 55 B et C***) pour les 2 lignées.

De plus, les images de fluorescence après hyperthermie confirment la présence de cellules non fluorescentes. Ces cellules n'expriment pas l'EmGFP et sont retrouvées pour les 2 lignées, ce qui confirme l'importante hétérogénéité de la population cellulaire quant à la réponse au choc thermique constatée en cytométrie de flux.

Un tri cellulaire basé sur l'expression de l'EmGFP après activation thermique pourrait être mis en place avant l'injection des cellules pour l'élaboration de tumeurs *in vivo*. Ce tri préalable pourrait permettre de diminuer l'hétérogénéité afin d'améliorer la réponse inhibitrice *in vivo*.

4.3.2.4. Visualisation de l'inhibition induite par le miRLuc après modulation de l'activation du promoteur thermo-inductible

Après avoir montré qu'à 45°C une hyperthermie de 20 min était plus efficace pour la transcription des ARNm Hsp70 et pour l'expression de l'EmGFP et de la LucR, nous avons voulu vérifier une éventuelle amélioration de l'inhibition de l'expression de la LucF par le miRLuc.
Cette analyse a été effectuée *in vitro* en comparant l'activité de la LucF des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et des cellules U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg avant ou après un choc thermique de 45°C, 20 min.

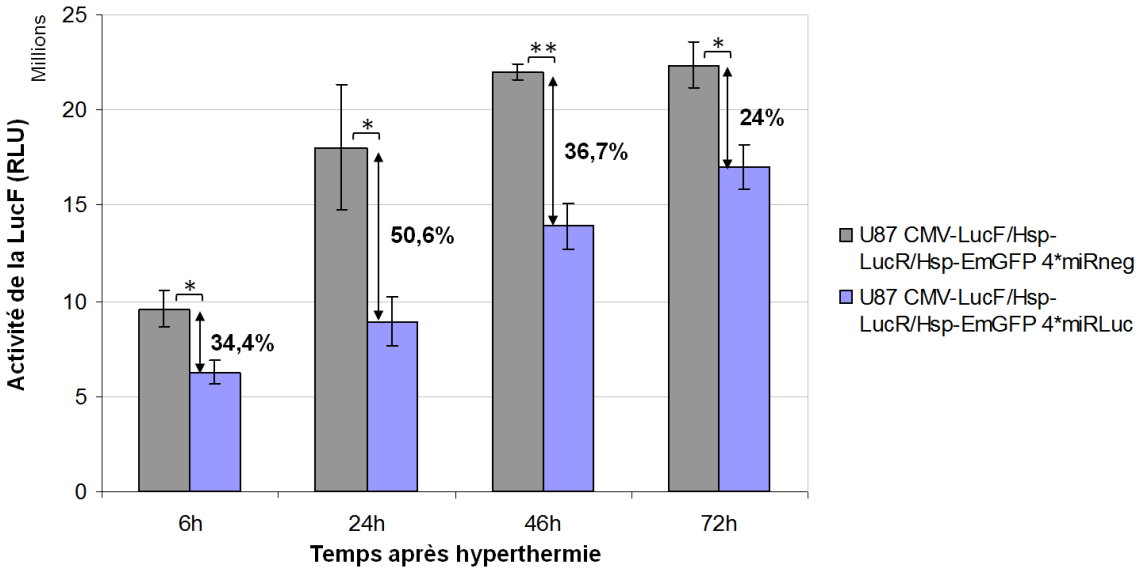


Figure 56 : Cinétique d'inhibition de l'activité de la LucF
*Les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc (en bleu) et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg (en gris) ont été ensemencées à raison de 15 000 cellules / puits. L'activation thermique a été réalisée 48h après la mise en plaque au bain-marie à 45°C pendant 20 min. Après lyse des cellules, l'activité de la LucF (RLU) a été déterminée au luminomètre en utilisant le kit Dual-Luciferase® pour chaque lignée et suivant une cinétique, n = 3, (Student t test, * : p<0,05 ; ** : p<0,01).*

La ***Figure 56*** indique une augmentation de l'activité de la LucF au cours du temps pour les 2 lignées. Cette élévation est le reflet des divisions cellulaires.
Après le choc thermique (45°C ; 20 min), les résultats montrent que l'activité de la LucF est différente pour les 2 lignées. Précédemment, nous avons constaté qu'à 37°C, l'activité de la

LucF suit le même profil pour les 2 lignées au cours du temps (***Figure 36***). La différence d'activité constatée est donc le résultat du choc thermique. La comparaison de l'activité de la LucF pour ces 2 lignées nous permet ainsi de mesurer le pourcentage d'inhibition par le miRLuc.
Six heures après l'hyperthermie, l'inhibition de l'expression de la LucF par le miRLuc est de 34,4%. Cette inhibition augmente jusqu'à 24h pour atteindre 50,6%, puis décroit lentement, tout en restant visualisable, même à 72h où elle est encore de 24%. Les études réalisées précédemment montraient qu'un choc thermique de 20 min était plus efficace pour induire l'expression des gènes rapporteurs du système qu'une hyperthermie de 8 min. Les résultats d'inhibition de l'activité de la LucF confirment ces conclusions par comparaison avec les résultats obtenus dans la ***Figure 40***.

4.3.2.5. Suivi de l'ARNm cible de la LucF

Le mode d'action des miARN (Cf. 1.2.3.2.) dépend de son hybridation sur l'ARNm cible et du recrutement des protéines de la famille Argonaute (AGO). Si l'hybridation est parfaitement complémentaire entre le miARN et sa cible, la protéine AGO2 est recrutée au sein du complexe miRISC permettant le clivage de l'ARNm cible et donc sa dégradation. Le miARN synthétique utilisé dans ce projet est parfaitement complémentaire à la région cible sur l'ARNm de la LucF, et devrait logiquement conduire à la dégradation de cet ARNm. Nous avons donc entrepris de vérifier cette hypothèse en quantifiant l'ARNm de la LucF par PCRq après choc thermique.

Pour cela, les lignées U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg ont été mises en culture, et une hyperthermie de 45°C pendant 20 min a été effectuée. A différents temps après le choc thermique, les ARN totaux ont été extraits, traités à la DNase I et rétro-transcrits. Les ADNc obtenus ont été utilisés comme matrice pour la PCRq. Le gène de la LucF a été amplifié avec le couple d'amorce LucF-12D / LucF-13R, et la quantification a été réalisée par comparaison avec l'expression du gène de référence 36B4 (ΔCt) (amorce 36B4-S / 36B4-AS). Les variations du niveau d'expression relative des ARNm de la LucF ont été exprimées selon la formule $2^{-\Delta Ct}$.

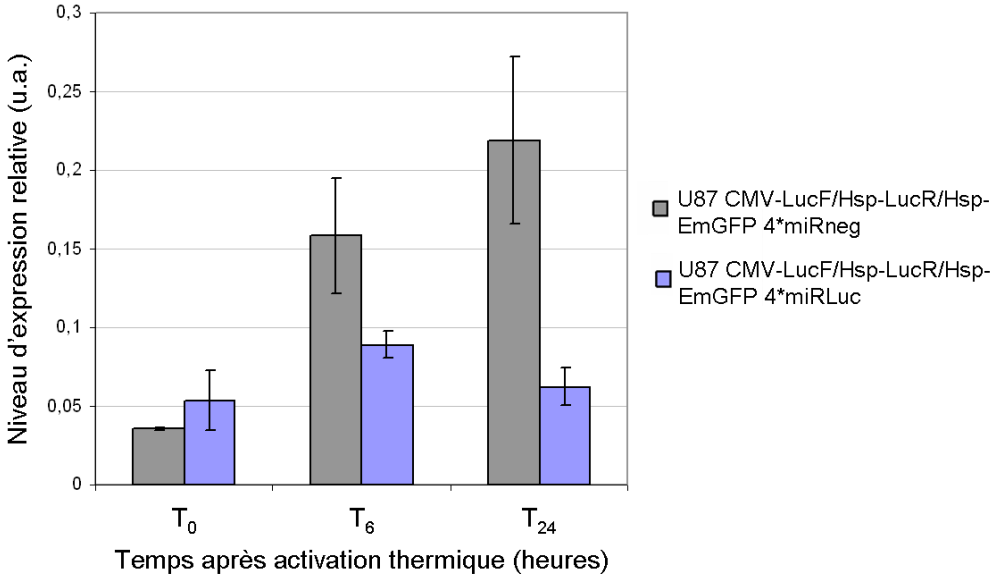


Figure 57 : Variation du niveau d'expression relative de l'ARNm de la LucF après thermo-induction de la biogénèse du miRLuc

*Les niveaux d'expression relative (en unité arbitraire) des ARNm de la LucF sont représentés, à différents temps après activation thermique (45°C ; 20 min), en bleu pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc et en gris pour la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg.*

La ***Figure 57*** indique une augmentation du niveau d'expression relative de l'ARNm de la LucF dans la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRneg au cours du temps après le choc thermique. Nous pouvons observer que l'expression de la LucF pour cette lignée est environ 6 fois plus importante à 24h après l'hyperthermie qu'avant. Dans la lignée U87 CMV-LucF/Hsp-LucR/Hsp-EmGFP 4*miRLuc, 6h après le choc thermique, l'augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de la LucF est extrêmement faible. Puis, le niveau d'expression de la LucF diminue 24h après l'hyperthermie pour retrouver un niveau d'expression similaire à celui mesuré avant l'activation thermique.

Les profils d'expression obtenus pour les 2 lignées sont donc très différents. Ces résultats sont tout à fait en accord avec les mesures de l'activité de la LucF présentés dans la ***Figure 56***. Ainsi, la diminution de l'activité de la LucF après choc thermique coïncide avec une diminution de la quantité relative de son ARNm. Ces résultats semblent valider l'hypothèse selon laquelle l'effet du miRLuc est lié à la dégradation de l'ARNm cible.

4.4. Etude de faisabilité d'utilisation de l'électroporation *in vivo* comme méthode de transfert

Les résultats précédents ont présentés la faisabilité d'un contrôle *in vivo* de l'inhibition génique grâce à des miARN placés sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur thermo-sensible. Dans notre modèle expérimental, la cassette d'expression thermo-inductible du miARN était préalablement insérée dans le génome de la cellule cible, occultant ainsi le problème de l'adressage. Dans ce chapitre, nous avons entrepris de tester la possibilité d'utiliser l'électroporation *in vivo* pour réaliser l'adressage d'une cassette d'expression dépendante des promoteurs thermo-inductibles, y compris dans des tumeurs orthotopiques profondes.

4.4.1. L'électroporation et le promoteur Hsp70B sont-ils compatibles ?

Le projet consiste à utiliser l'EP pour adresser un gène ou un miARN sous contrôle transcriptionnel du promoteur thermo-inductible Hsp70B. Les promoteurs Hsp sont activables par différents types de stress cellulaire (Cf. 1.3.2.). Nous avons donc voulu déterminer si l'EP constituait un stress cellulaire susceptible d'activer le promoteur. Afin de répondre à cette question, nous avons dans un premier temps utilisé une souris transgénique (NLF1) exprimant la LucF sous le contrôle du promoteur Hspa1b homologue murin du promoteur Hsp70B. Nous avons comparé l'activation du promoteur par hyperthermie et par une EP.

Le niveau basal d'expression de la LucF a été déterminé par BLI sur chaque souris. La patte droite des souris a été soumise à un choc thermique au bain-marie à 45°C pendant 8 min, et la patte gauche soumise à un choc électrique correspondant soit aux conditions utilisées pour une EP en intra-dermique (n = 3 ; 200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15***), soit à une EP intra-tumorale (n = 3 ; 600 V / cm ; 5 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15***). L'expression de la LucF a été déterminée par BLI 6h après l'intervention (***Figure 58***).

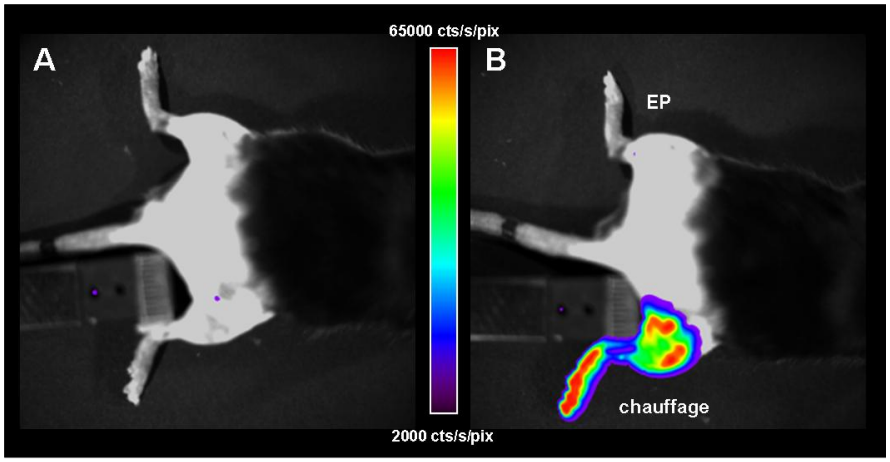


Figure 58 : Suivi par BLI de l'activation du promoteur Hsp

Suivi de l'activité de la LucF par BLI (vue dorsale) chez une souris transgénique Hsp-LucF, (A) avant et (B) 6h après une EP sur la patte gauche et un choc thermique (45°C ; 8 min) sur la patte droite.
Les images sont réalisées 10 min après l'injection IP de la luciférine à la caméra CCD (n = 3 pour chaque condition).

Le choc thermique (45°C ; 8 min) entraîne une expression de la LucF sur les pattes droites des souris 6h après chauffage (n = 6). Aucun signal n'est obtenu sur les pattes gauches quelles que soient les conditions d'EP. Dans nos conditions expérimentales, les chocs électriques n'induisent donc pas d'activation du promoteur Hspa1b contrôlant l'expression de la LucF.

Le même type d'expérience est envisagé sur des tumeurs U87 Hsp-LucF, contenant le promoteur Hsp70B humain, afin de confirmer ces résultats. Ainsi des études, combinant l'adressage d'un gène aux cellules *in vivo* par EP et le contrôle de son expression par le promoteur Hsp70B, pourront être envisagées.

4.4.2. Suivi de l'électroporation par imagerie de fluorescence par réflexion

Dans la perspective de coupler l'EP et le contrôle de l'expression génique à l'aide du promoteur thermo-sensible, des incertitudes persistent quant à l'efficacité de l'électro-transfert. Il a été envisagé d'utiliser un gène rapporteur pour contrôler l'efficacité de l'EP. Les gènes rapporteurs de la LucF et de la LucR étant déjà mobilisés pour notre stratégie, nous avons testé la faisabilité d'électroporer la protéine fluorescente mPlum dont les caractéristiques spectrales (excitation à 590 nm et émission à 649 nm) sont favorables à l'imagerie *in vivo* du petit animal.

L'injection intra-dermique sur les pattes arrière droites de souris C57BL/6 (n = 3) a été réalisée avec 20 µL de PBS contenant 5 µg de $pcDNA_5$-FRT-CMV-LucF et 5 µg de $pcDNA_{3.1}$-mPlum, puis l'EP a été effectuée (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15***). L'utilisation du gène codant pour la LucF nous permet d'avoir un contrôle interne à l'expérimentation. Les images de BLI et de FRI ont ensuite été acquises 24h après l'EP. Il

faut toutefois mentionner que pour ces 2 types d'imagerie, le champ de vue est différent. En effet, la fluorescence nécessite une excitation homogène sur l'animal.

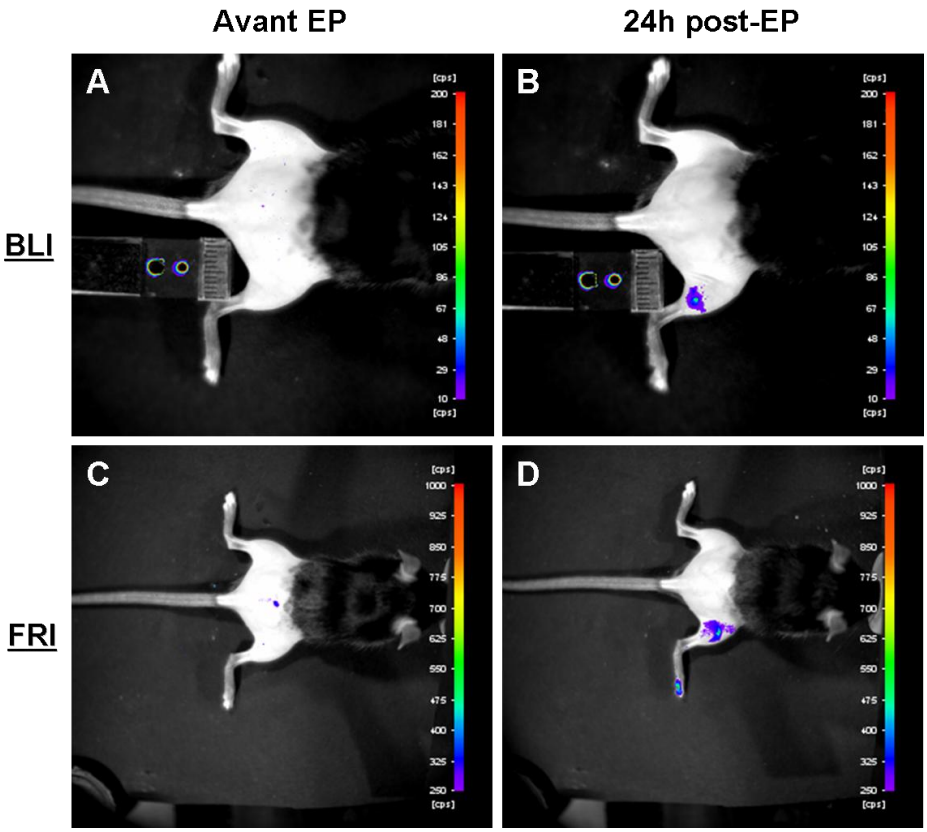


Figure 59 : EP intra-dermique des gènes rapporteurs de la LucF et de la mPlum
Les plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF et pcDNA$_{3.1}$-mPlum ont été co-injectés en intra-dermique sur les pattes droites des souris (n = 3) à raison de 5 µg de chaque plasmide dans 20 µL de PBS, puis électroporés (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****). Les images A et C correspondent aux images BLI et FRI respectivement avant l'EP. Les images B et D correspondent aux images BLI et FRI respectivement 24h après l'EP.*
Les acquisitions (vue dorsale) sont réalisées à la caméra CCD et pour l'image BLI, 10 min après l'injection de luciférine en IP.

Les résultats obtenus dans la ***Figure 59*** présentent les images de BLI et de FRI obtenues 24h après la co-EP des plasmides pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF et pcDNA$_{3.1}$-mPlum en intra-dermique sur les pattes droites des souris. Le signal BLI à 24h après l'EP atteste du bon déroulement de l'expérimentation. Pour mPlum, nous obtenons un signal FRI 24h après l'EP.

Ce résultat démontre la faisabilité d'utiliser la protéine fluorescente mPlum comme rapporteur supplémentaire pour suivre *in vivo*, par imagerie de fluorescence, l'efficacité de l'EP.

4.4.3. Etude d'une application en position orthotopique

Afin de se rapprocher au mieux d'un contexte physio-pathologique, l'étape suivante consiste à compiler l'ensemble de nos résultats pour concevoir un modèle de tumeur orthopopique. Il s'agit d'induire une inhibition génique visualisable en BLI en électroporant le miRLuc dans une tumeur U87 CMV-LucF. Puisque la lignée cellulaire U87 MG provient d'un glioblastome humain, il s'agit de générer des tumeurs intra-cérébrales et donc, d'électroporer l'ADN en intra-crânien. Avant l'élaboration d'un tel modèle, nous avons entrepris de tester la faisabilité de l'EP dans cette zone.

Une première série d'expériences a consisté à placer les électrodes de part et d'autre du crâne de la souris pour administrer le courant électrique, et à tester l'innocuité de la procédure. Des courants croissants ont été appliqués entre les 2 électrodes, et le comportement des animaux a été observé pour détecter d'éventuels signes de désagrément pour les souris. Les conditions de courant (200 V / cm ; 5 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15***) se sont avérées sans répercution sur le comportement des souris.

Ensuite, le plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF (12,5 µg ou 25 µg / 5 µL PBS) a été injecté dans la zone pariétale droite du cerveau des souris maintenues dans un cadre stéréotaxique puis électroporé. L'expression de la LucF a été suivie par BLI à différents temps après l'EP.

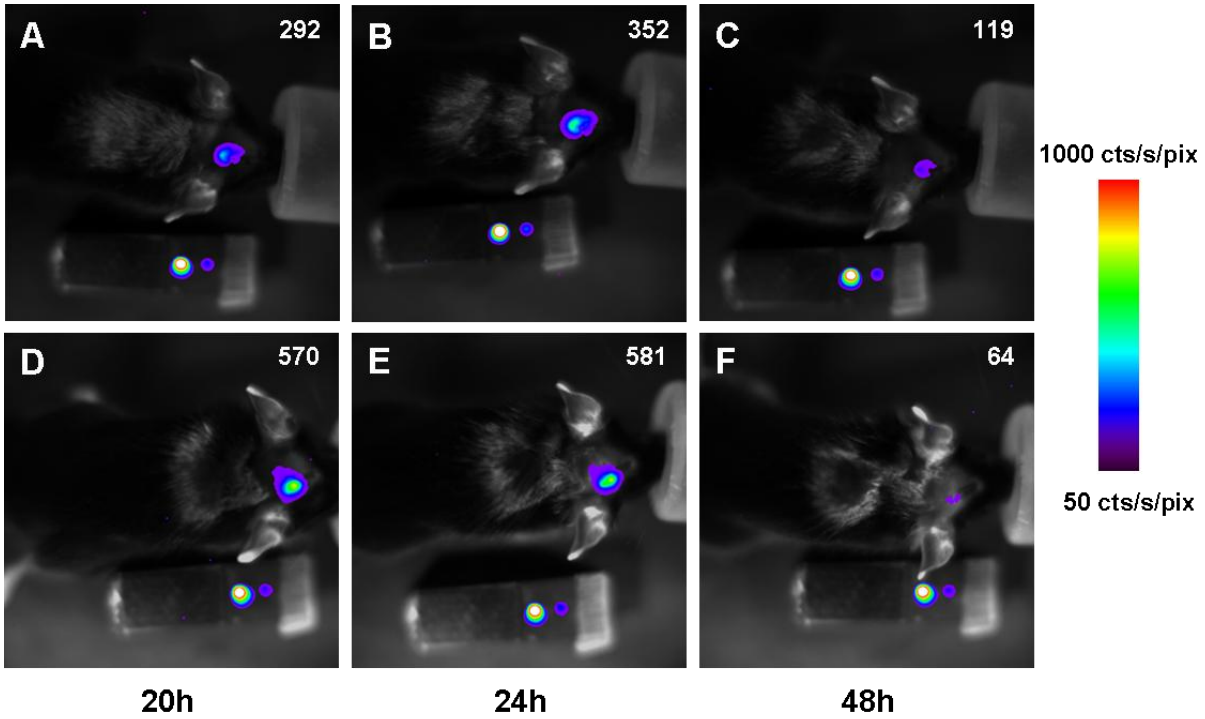


Figure 60 : BLI de la LucF après EP intra-crânienne

Le plasmide pcDNA$_5$-FRT-CMV-LucF injecté en intra-cérébral a été électroporé (200 V / cm ; 5 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****). Les images A, B et C correspondent à l'EP intra-cérébrale de 12,5 µg d'ADN plasmidique (n = 3) et les images D, E et F correspondent à l'EP de 25 µg du même plasmide (n = 3). Les acquisitions (vue dorsale) ont été réalisées 20h (images A et D), 24h (images B et E) et 48h (images C et F) après l'EP. Les acquisitions ont été réalisées à la caméra CCD, 10 min après l'injection de luciférine en IP. Les chiffres indiqués en haut à droite de chaque image représentent le nombre de coups maximal en un pixel.*

La ***Figure 60*** indique la présence d'un signal de BLI au niveau de la tête de la souris. L'émission de photons confirme l'expression de la LucF à partir du plasmide et la diffusion de la luciférine injectée en IP. Une étude cinétique de la BLI après injection de luciférine (cinétique non présentée) révèle que les signaux les plus intenses sont obtenus 10 min après l'injection du substrat, comme c'est habituellement le cas pour les autres tissus. Ceci suggère que la diffusion de la luciférine dans le cerveau n'est pas retardée par le franchissement de la barrière hémato-encéphalique, probablement rompue lors de l'injection intra-cérébrale de l'ADN. Quelle que soit la quantité de plasmide injectée, l'expression de la LucF est maximale 24h après EP puis décroît rapidement pour disparaître après 48h.

Les résultats obtenus, bien que préliminaires, montrent la faisabilité d'électroporer de l'ADN plasmidique en intra-cérébral chez la souris. Ils ouvrent des perspectives intéressantes dans l'élaboration de modèles pour l'étude de stratégie concernant la thérapie des gliomes.

4.5. Imagerie de l'électroporation d'ARN *in vivo*

L'intégration non-contrôlée du transgène dans le génome de la cellule cible constitue une restriction majeure au développement des thérapies géniques. Ce phénomène est le plus souvent responsable de l'absence d'expression du transgène thérapeutique mais, dans les cas les plus dramatiques, il peut initier des processus oncogéniques graves. Ce phénomène est à l'origine de 2 cas de leucémies et du décès d'un patient survenus lors de la mise en œuvre de la thérapie génique des « enfants bulle ». A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode pour éliminer complètement ce risque pour les thérapies utilisant de l'ADN.

Pour contourner ce problème, dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'électroporation *in vivo* d'ARN. Si la faisabilité d'électroporer de petits ARN non codants comme les miARN et les siARN a déjà fait l'objet de différents travaux, l'électrotransfert d'ARNm est peu documenté même s'il est souvent évoqué comme perspective (Van Driessche et al., 2005).

L'ARNm est l'intermédiaire nécessaire à l'obtention d'une protéine d'intérêt. Contrairement aux molécules d'ADN, les ARNm sont exprimés dans le cytoplasme et l'obstacle représenté par la barrière nucléaire n'est plus à franchir. Enfin et surtout, les ARNm ne présentent aucun risque d'intégration non désirée au génome de la cellule hôte, et leur expression n'est pas irréversible puisque qu'elle est strictement transitoire.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Michel Ventura (laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, UMR 5234, Bordeaux Segalen). Il offre une perspective supplémentaire pour la mise en oeuvre d'une stratégie thérapeutique anti-virale développée (Dumas et al., 2007; Bitard et al., 2010) et brevetée par ce laboratoire (FR20060004806 ; 30/05/2006), basée sur l'utilisation d'ARN négatifs et qui sera détaillée dans la discussion.

Pour ce projet, nous avons choisi d'utiliser des ARN codant pour la LucF.

Nous avons transcrits *in vitro* 3 types d'ARN différents afin de tester leur visualisation par BLI après EP *in vivo*.

1. Les ARN nommés 5UTR-LucF-3UTR comportent la séquence codante de la LucF encadrée par les 2 régions 5'UTR et 3'UTR non traduites du virus de l'hépatite C (VHC). Ce type de construction permet l'étude de la réplication virale et aboutit à l'expression de protéines d'intérêt *in vitro*. Ces ARN ont été synthétisés grâce à une étape de transcription *in vitro* réalisée à partir de produits PCR, obtenus à partir du plasmide pGEMT/5UTR-LucF-3UTR avec le couple d'amorces T75UTR-Start / 3UTR-Stop, précipités et purifiés. La pureté des ARN obtenus a ensuite été testée au bioanalyzer (Agilent).

2. Les ARN nommés cap-LucF-polyA comportent également la séquence codante de la LucF obtenue par PCR comme précédemment mais avec le couple d'amorce T7cap / LucF-Stop. Après transcription *in vitro*, une queue polyA est ajoutée en 3' et une coiffe en 5' de l'ARN. La queue polyA et la coiffe ont été ajoutées par les méthodes de production d'ARN par fermentation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par l'entreprise MitoProd SA.

3. Les ARN dénommés 5UTR-LucF-polyA constituent une forme intermédiaire qui contient la séquence non-traduite 5'UTR et une queue polyA encadrant la séquence codante

de la LucF. Les produits PCR ont été obtenus avec le couple d'amorce T75UTR-Start / LucF-Stop.

Ces différents ARN ont été électroporés *in vivo* en intra-dermique sur les pattes de souris C57BL/6 afin de tester leur fonctionnalité. Ces ARN ayant des tailles différentes, nous avons choisi d'électroporer un nombre identique de molécules afin de pouvoir comparer leur expression. Pour chaque ARN, 14 x 10^{12} molécules ont été électroporées puis l'expression de la LucF au cours du temps a été déterminée par BLI. Pour la quantification du signal, exprimé en photons, une ROI automatique par seuillage a été effectuée grâce au logiciel IndiGO 2®.

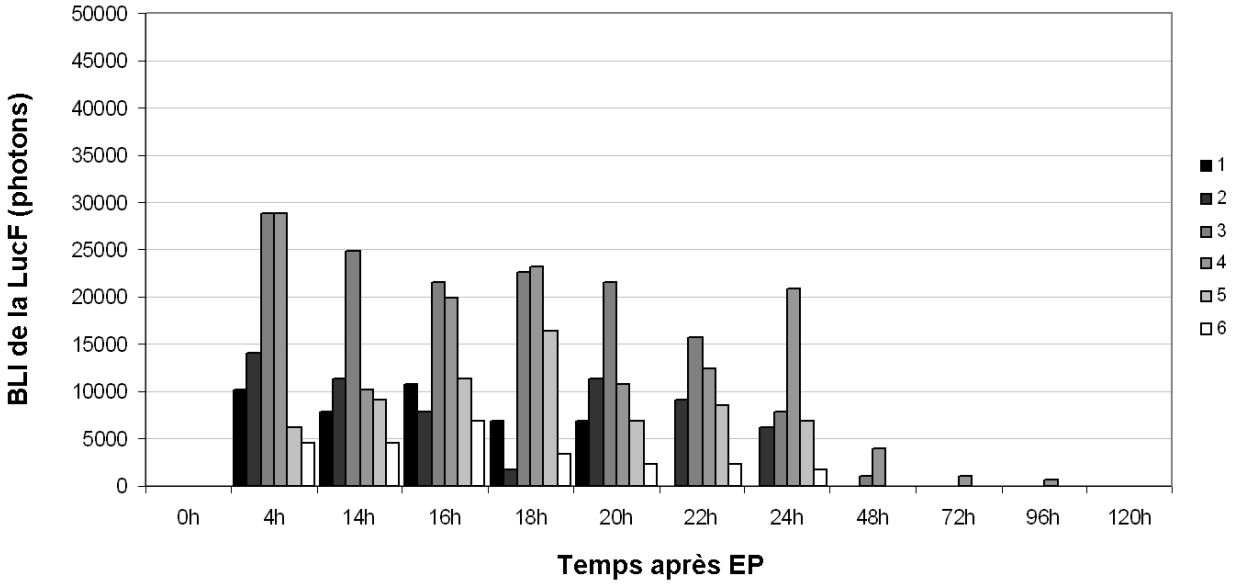


Figure 61 : Suivi par BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique de l'ARN 5UTR-LucF-3UTR

Les molécules d'ARN (14 x 10^{12} molécules dans 10 µL de PBS) ont été électroporées (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****) en intra-dermique sur les pattes gauches de souris C57BL/6 (n = 6, notées de 1 à 6) et l'expression de la LucF est suivie par BLI 10 min après l'injection de luciférine à différents temps après EP.*

La ***Figure 61*** démontre la faisabilité d'électroporer des molécules d'ARN de type 5UTR-LucF-3UTR. Un signal de BLI est en effet détectable pour les 6 souris électroporées. La traduction est précoce puisque, dès 4h après l'EP, nous obtenons un signal de BLI. L'expression dure environ 20h de façon constante puis diminue ou disparaît 48h après l'EP. La traduction *in vivo* des ARN 5UTR-LucF-3UTR électroporés est possible malgé l'absence de coiffe et intervient probablement grâce à l'IRES présent dans la région 5'UTR.

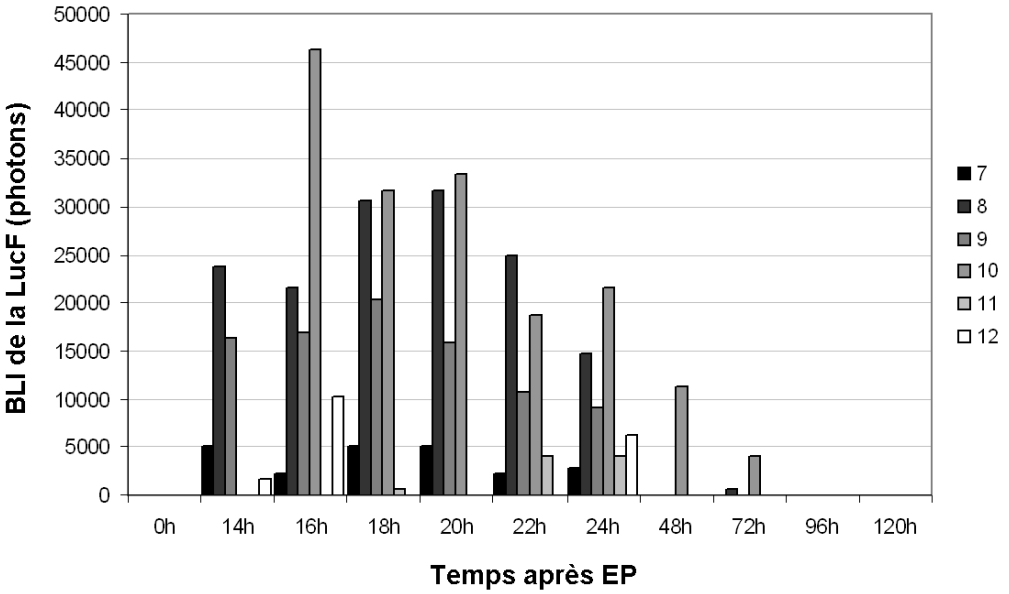


Figure 62 : Suivi par BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique d'ARN 5UTR-LucF-polyA

Les molécules d'ARN (14 x 10^{12} molécules dans 10 µL de PBS) ont été électroporées (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****) en intra-dermique sur les pattes gauches de souris C57BL/6 (n = 6, notées de 7 à 12) et l'expression de la LucF est suivie par BLI 10 min après l'injection de luciférine à différents temps après EP.*

La ***Figure 62*** indique que l'EP des ARN 5UTR-LucF-polyA permet également l'obtention d'un signal BLI après l'EP. La cinétique est comparable à celle des ARN 5UTR-LucF-3UTR. Le signal est détecté jusqu'à 24h après l'EP puis disparaît à 48h à l'exception d'une souris. Le niveau d'expression de la LucF est plus important que celui obtenu avec les ARN 5UTR-LucF-3UTR. En effet, le maximum d'intensité du signal est proche des 45 000 photons, alors que le maximum n'avoisine que les 25 000 photons dans le cas des ARN 5UTR-LucF-3UTR. Ce niveau d'expression de la LucF pour les ARN 5UTR-LucF-polyA pourrait être du à la présence de la queue polyA, qui joue un rôle protecteur contre la dégradation de l'ARN, et qui intervient dans le processus de recrutement des ribosomes essentiels à la traduction de l'ARN en protéine.

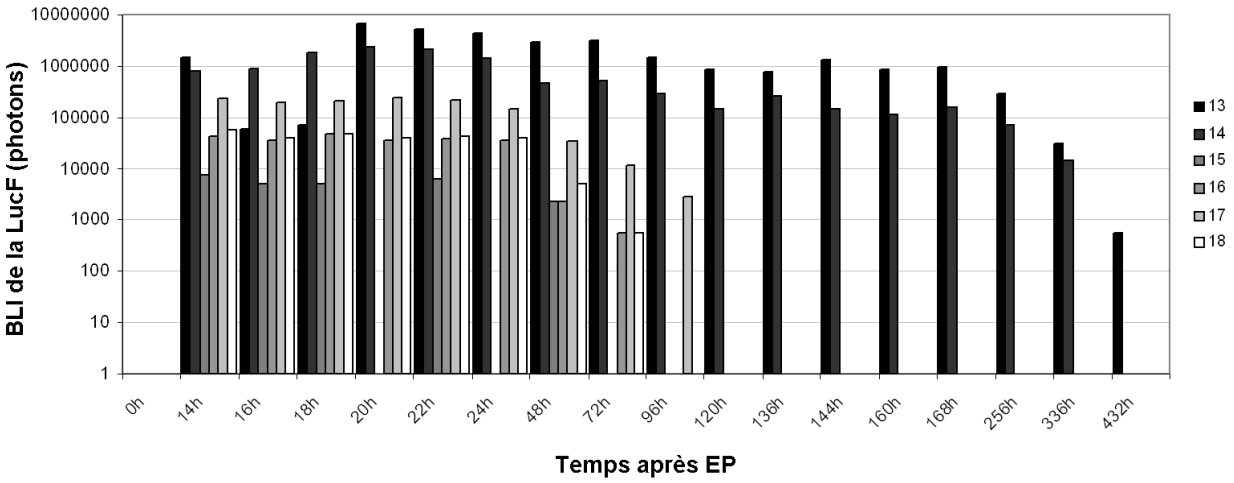


Figure 63 : Suivi par BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique d'ARN cap-LucF-polyA

Les molécules d'ARN (14 x 10^{12} molécules dans 10 µL de PBS) ont été électroporées (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****) en intra-dermique sur les pattes gauches de souris C57BL/6 (n = 6, notées de 13 à 18) et l'expression de la LucF est suivie par BLI 10 min après l'injection de luciférine à différents temps après EP. Les résultats sont représentés selon une échelle logarithmique.*

La ***Figure 63*** indique que la traduction de la LucF a eu lieu après l'EP de l'ARNm *in vivo*. Nous pouvons distinguer 2 types de profils :

- Le premier concerne les 4 souris numérotées de 15 à 18. Ce profil d'expression est similaire à ceux obtenus après EP des ARN 5UTR-LucF-3UTR (***Figure 61***) et 5UTR-LucF-polyA (***Figure 62***). L'expression de la LucF est relativement constante pendant 24h, décroît à 48h puis disparaît 120h après l'EP. Les niveaux d'expression obtenus sont compris entre 5 000 et 240 000 photons.
- Le second profil concerne les souris numérotées 13 et 14 pour lesquelles l'intensité du signal est bien plus importante et atteint plus de 6 500 000 photons 20h après l'EP (souris n°13). Pour ces 2 souris, le signal BLI obtenu perdure jusqu'à 2 semaines après l'EP.

L'EP des ARNm cap-LucF-polyA apparaît donc comme la plus efficace, aussi bien pour le niveau que pour la durée d'expression de la LucF. Ceci peut s'expliquer par la présence de la coiffe en 5' de l'ARN qui permet la mise en œuvre de la traduction dite « dépendante de la coiffe ». Ce mécanisme traductionnel permet, au moyen de complexes protéiques, le rapprochement des 2 extrémités de l'ARNm. Cette « circularisation » de l'ARN facilite l'initiation de la traduction et le recyclage des ribosomes.

La ***Figure 64*** illustre les signaux BLI obtenus pour chaque type d'ARN, 20h après EP.

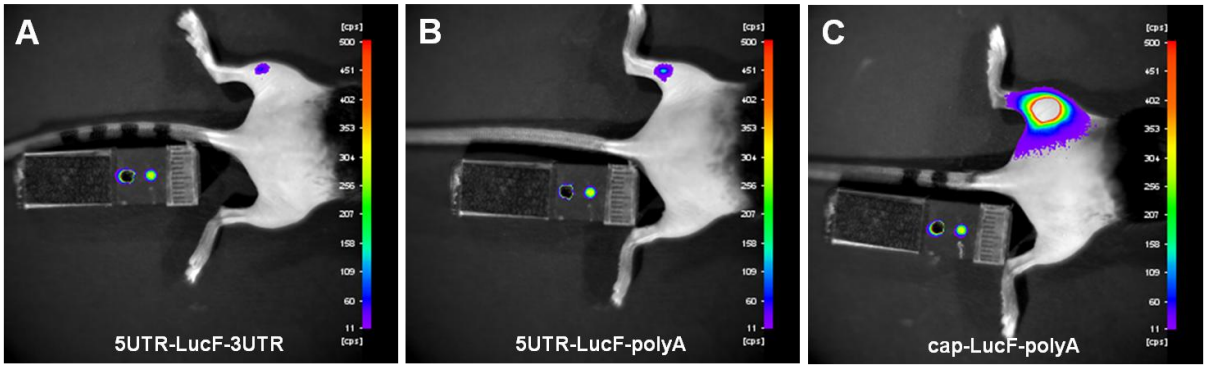


Figure 64 : Visualisation par BLI de l'activité de la LucF 20h après EP in vivo pour 3 types d'ARN différents

Les molécules d'ARN (14 x 10^{12} molécules dans 10 µL de PBS) ont été électroporées en intra-dermique (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****) sur les pattes gauches de souris C57BL/6. Les acquisitions (vue dorsale) sont réalisées 20h après l'EP et 10 min après l'injection de luciférine en IP. L'image A correspond à l'EP de l'ARN 5UTR-LucF-3UTR (souris n°4), l'image B correspond à l'EP de l'ARN 5UTR-LucF-polyA (souris n°9) et l'image C concerne l'EP des molécules de cap-LucF-polyA (souris n°14).*

Après avoir testé la faisabilité d'électroporer des molécules d'ARN *in vivo*, nous avons modulé le nombre de molécules électroporées en comparant 4 x 10^{12}, 14 x 10^{12} et 49 x 10^{12} molécules. Les signaux de BLI témoignant de l'expression de la LucF ont été détectés 20h après l'EP.

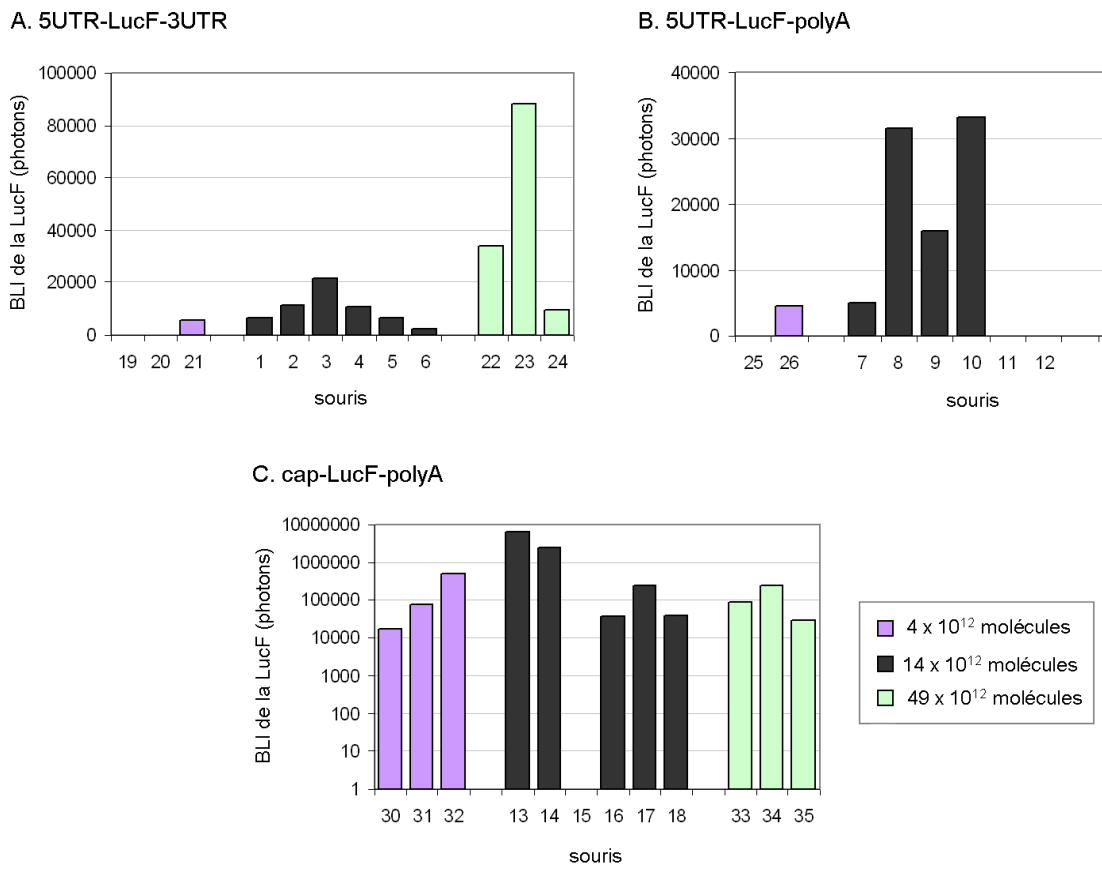


Figure 65 : BLI de l'expression de la LucF après EP intra-dermique d'ARN

Les molécules d'ARN (4 x 10^{12} en rose, 14 x 10^{12} en gris et 49 x 10^{12} molécules en vert ; 10 µL de PBS) ont été électroporées (200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****) en intra-dermique sur les pattes gauches de souris C57BL/6. L'expression de la LucF observée par BLI 20h après EP et 10 min après l'injection de luciférine pour les ARN 5UTR-LucF-3UTR en A, 5UTR-LucF-polyA en B et cap-LucF-polyA en C.*

La ***Figure 65*** représente le suivi de l'expression de la LucF après EP de différentes quantités d'ARN.

La ***Figure 65 A*** indique le profil des signaux de BLI obtenus 20h après l'EP de 3 quantités différentes d'ARN 5UTR-LucF-3UTR. L'EP de 4 x 10^{12} molécules ne permet d'obtenir un signal que pour 1 seule souris sur les 3 électroporées. Lors d'une EP de 49 x 10^{12} molécules, un maximum supérieur à 85 000 photons a été obtenu (souris n°23) contre un maximum d'environ 20 000 photons pour 14 x 10^{12} molécules d'ARN électroporées. L'EP de 49 x 10^{12} molécules permet donc une nette augmentation de l'intensité des signaux obtenus par rapport à l'EP de 14 x 10^{12} molécules. Pour l'EP des ARN 5UTR-LucF-3UTR, le signal est donc fonction du nombre de molécules électroporées.

La ***Figure 65 B*** présente qu'une EP de 4 x 10^{12} molécules d'ARN 5UTR-LucF-polyA est moins efficace, aussi bien pour la possibilité d'observer un signal que pour l'intensité du signal. De manière surprenante, l'EP de 49 x 10^{12} molécules d'ARN ne permet pas d'améliorer l'intensité des signaux et la variabilité inter-souris reste importante.

La ***Figure 65 C*** révèle une expression de la LucF quelle que soit la quantité d'ARNm électroporé (NB : échelle logarithmique des ordonnées). Par rapport aux 2 autres types d'ARN testés, l'EP de 4 x 10^{12} molécules d'ARN cap-LucF-polyA permet d'obtenir un signal BLI pouvant atteindre 500 000 photons (souris n°32). Le fait d'électroporer 49 x 10^{12}

molécules n'améliore pas le niveau d'expression de la LucF puisqu'on obtient un maximum de 230 000 photons (souris n°34). Globalement, la dose de 14 x 10^{12} molécules reste la plus efficace, notamment grâce à quelques animaux présentant des niveaux d'expression notoirement élevés.

Il semble donc que les processus moléculaires responsables de la traduction des ARN 5UTR-LucF-3UTR ne soient pas saturés, et que l'augmentation du nombre de molécules disponibles dans les cellules augmente le niveau de traduction de la protéine LucF. Par contre, pour les ARN présentant une queue polyA, l'EP de 14 x 10^{12} molécules semble être la condition la plus favorable à la traduction. Nous avons également observé cette notion de saturation lors de l'EP d'ADN plasmidique. En effet, l'EP de 50 µg de plasmides s'est avérée globalement moins efficace que 5 µg. Cette constatation pourrait indiquer soit une saturation des processus moléculaires de traduction soit une toxicité des fortes concentrations en acides nucléiques.

Enfin, nous avons suivi l'expression de la LucF par BLI après injection des différents ARN sans appliquer le courant électrique. Les souris ont été injectées avec 14 x 10^{12} molécules de chaque ARN, puis l'expression de la LucF a été suivie par BLI à 20h après l'injection.

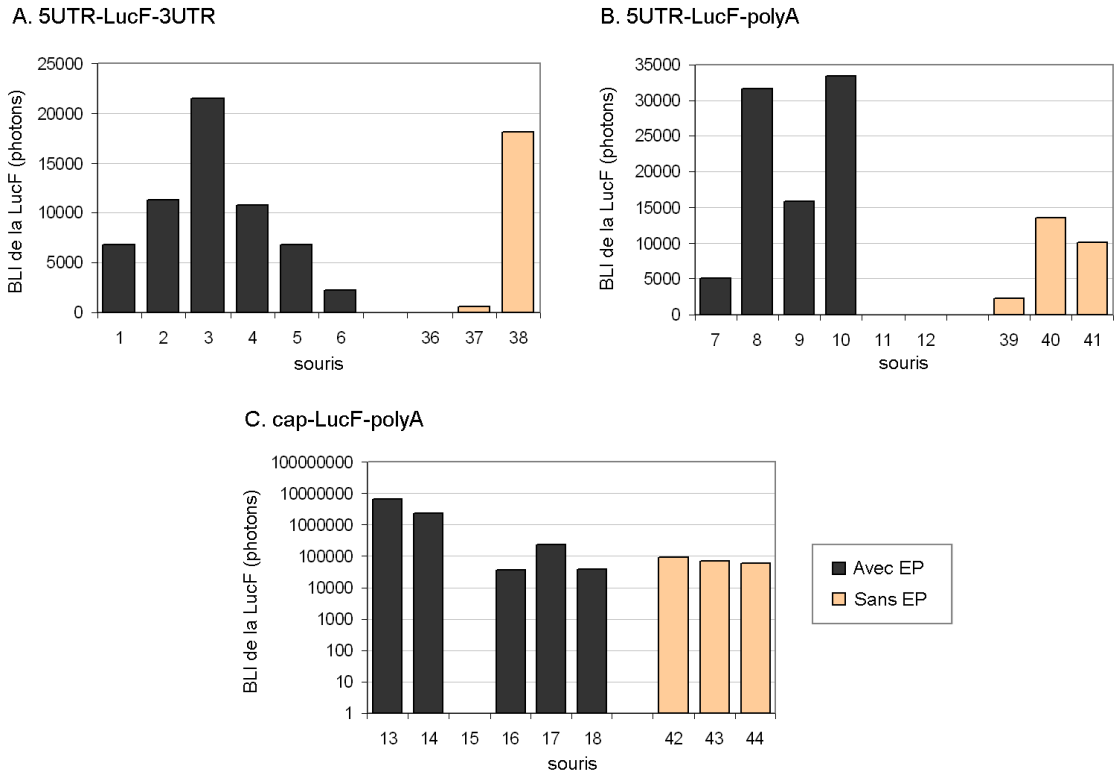


Figure 66 : BLI de la LucF après injection de 14 x 10^{12} molécules d'ARN sans EP
Les molécules d'ARN (14 x 10^{12} molécules dans 10 µL de PBS) ont été injectées en intra-dermique sur les pattes gauches de souris C57BL/6 (histogrammes orange) puis ont été électroporées (histogramme en gris ; 200 V / cm ; 20 ms ; 1 Hz ; ***Tableau 15****). L'expression de la LucF 20h après est suivie par BLI 10 min après l'injection de luciférine pour les ARN 5UTR-LucF-3UTR en A, 5UTR-LucF-polyA en B et cap-LucF-polyA en C.*

La ***Figure 66*** représente les résultats obtenus à 20h après l'injection, temps qui s'avère être le moment d'expression maximal pour tous les ARN. Pour les ARN 5UTR-LucF-3UTR et 5UTR-LucF-polyA, des signaux BLI sont détectables mais ils sont plus faibles que ceux obtenus après une EP. En ce qui concerne les ARN cap-LucF-polyA, nous observons un signal BLI pour toutes les souris testées. Les niveaux sont comparables aux niveaux d'expression les plus faibles observés après EP, mais restent très inférieurs à ceux des animaux présentant des niveaux d'expression particulièrement élevés (souris n°13 et 14).

L'injection seule d'ARN sans EP permet l'expression de la protéine LucF et la détection d'un signal BLI. Ce signal semble plus faible que ceux obtenus dans le meilleur des cas après l'application du champ électrique. Dans un certain nombre de cas, l'EP permet donc d'augmenter le niveau d'expression de la protéine d'intérêt dans les cellules.

Nous avons vu dans le chapitre précédent la mise au point d'une méthode de suivi de l'efficacité de l'EP. Ce suivi pourrait être réalisé par l'EP simultanée du plasmide codant pour la protéine fluorescente mPlum (***Figure 59***) avec les ARN, pour permettre de déterminer l'efficacité de l'EP réalisée sur chaque animal en faisant l'hypothèse que les rendements d'électroporation pour l'ARN et l'ADN soient identiques.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence l'expression transitoire d'ARN *in vivo*. Nous avons montré que le niveau d'expression de la protéine peut être modulé en fonction de la nature des ARN et de la quantité injectée. L'injection d'ARN sans EP s'avère également efficace. Dans leur ensemble, les variations entre individu sont importantes quant à l'efficacité de la traduction suggérant une optimisation des conditions expérimentales. Cependant, l'expression intense et prolongée observée sur 2 animaux après EP d'ARN coiffés et poly-adénylés révèle toute la potentialité de cette approche.

5. Conclusions et discussion

Contrôle de l'inhibition génique in vivo

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de démontrer *in vivo* la faisabilité d'induire et de contrôler une inhibition génique grâce à l'utilisation d'un promoteur thermo-inductible contrôlant la biogénèse de miARN synthétiques.

Nous avons choisi comme gène cible la LucF pour permettre un suivi efficace *in vivo* par imagerie de bioluminescence. L'étude a été effectuée en 3 étapes successives. La première a consisté à évaluer l'efficacité du miRLuc pour inhiber l'expression du gène rapporteur de la LucF *in vitro*. La seconde étape a été de placer le miRLuc sous le contrôle transcriptionnel du promoteur thermo-sensible Hsp70B pour induire l'inhibition *in vitro* puis *in vivo*. Le but de la troisième étape a été de proposer et d'évaluer différentes pistes pour l'optimisation de la stratégie.

Faisabilité du modèle

Notre stratégie d'inhibition de l'expression d'un gène est basée sur l'utilisation du mécanisme de l'ARN interférence faisant intervenir les miARN. L'introduction simultanée dans des cellules tumorales humaines *in vitro* par transfection de la LucF et du miRLuc a permis d'obtenir une inhibition efficace de l'expression de la LucF. Le miRLuc s'est avéré également capable d'inhiber efficacement l'expression de sa cible lorsque cette dernière est surexprimée de façon constitutive dans une lignée cellulaire génétiquement modifiée. Cette inhibition a également pu être visualisée *in vivo* par électroporation intra-tumorale d'un plasmide contenant une cassette d'expression constitutive du miRLuc dans une tumeur exprimant la LucF. Il est cependant envisagé de réitérer ces expérimentations sur un nombre plus important d'animaux. En outre, ces résultats ont démontré que l'inhibition pouvait être visualisée *in vivo* par imagerie de bioluminescence.

Concernant le mode d'action du miRLuc, l'analyse par RT-PCRq a montré une diminution de la quantité d'ARNm de la LucF corrélée à la biogénèse du miRLuc. Ce miARN est parfaitement complémentaire avec la séquence cible présente sur l'ARNm de la LucF. Nos résultats, en accord avec les modèles consensuels actuels, indiquent une dégradation du transcrit ciblé. C'est cette dégradation qui serait responsable dans notre étude de l'inhibition génique observée.

Afin d'induire l'inhibition génique à la demande, nous avons choisi l'utilisation du promoteur thermo-inductible Hsp70B. Une étude réalisée *in vitro* sur des cellules de rongeurs par transfection transitoire avait montré que le miRLuc placé sous le contrôle transcriptionnel du promoteur Hsp70B permettait d'induire l'inhibition de la LucF (Yang and Paschen, 2008). Nos résultats dans ce domaine sont similaires et nous ont incité à générer des lignées stables utilisables *in vitro* et susceptibles de porter le projet *in vivo*.

La réponse au choc thermique est complexe et multi-factorielle. L'élévation de la température active non seulement le promoteur exogène qui contrôle la biogénèse du miRLuc mais aussi les promoteurs endogènes responsables de la synthèse des protéines chaperons HSP70 (Fortin et al., 2012). Le choc thermique entraîne une cascade d'évènements cellulaires, y compris l'arrêt temporaire de la plupart des synthèses protéiques (Carper et al., 1987). Enfin, les protéines HSP70, par leur effet chaperon, agissent sur la stabilité des protéines cellulaires, y compris sur la protéine cible LucF. Dans ce contexte, il a été nécessaire de ne pas induire de biais concernant l'effet de l'hyperthermie pour ne visualiser que l'effet du miRLuc dans nos expérimentations. Pour cela, nous avons généré une lignée cellulaire transformée dont les caractéristiques sont identiques à celles de la lignée expérimentale avec pour seule différence la production d'un miARN neutre (nommé miRneg). De plus, l'insertion du gène cible de la LucF par recombinaison au site FRT a montré des niveaux d'expression comparables pour les deux lignées.

Dans un premier temps, sur la base des travaux du laboratoire (Deckers et al., 2009), l'activation du promoteur a été réalisée par une hyperthermie de 45°C pendant 8 min au bain-marie. Cette activation s'est avérée efficace (à défaut d'être optimale) *in vitro* puis *in vivo* sur des tumeurs sous-cutanées. Nous avons pu mettre en évidence par BLI une inhibition de l'expression de la LucF pour 40% des souris testées. Cette inhibition a été obtenue selon des profils différents, notamment à 24h (40% des cas), à 46h (47% des cas) et même à 72h (13% des cas). Même si l'inhibition n'est ni systématique, ni quantitativement spectaculaire, nos résultats démontrent *in vivo*, dans un environnement complexe, la faisabilité de notre projet et la pertinence de nos choix. Nous avons jugé les résultats très encourageants mais perfectibles, aussi avons nous entrepris d'optimiser le protocole en analysant et modifiant divers points potentiellement critiques.

Les points critiques

Le premier point critique concerne l'activation thermique. Si l'objectif ultime consiste à utiliser un chauffage aux ultrasons focalisés guidés par IRM pour permettre le contrôle spatio-temporel, nous avons jusqu'à présent réalisé le choc thermique en plongeant les tumeurs dans un bain-marie. Outre sa simplicité de mise en œuvre et son faible coût, cette méthode active thermiquement l'ensemble de la tumeur, atout majeur pour notre étude de faisabilité. Cependant, des expérimentations récentes menées au laboratoire ont montré la difficulté de maîtriser la température en profondeur dans les tissus (Deckers et al., 2012). Nous avons pu constater pour des tumeurs de 350 mm^3 une variation de 5°C entre la surface et le centre de la tumeur (n = 3) après un chauffage au bain-marie (45°C ; 8 min). Cette observation est probablement due à la géométrie du chauffage (centripète), à la dispersion de la chaleur dans la tumeur, mais aussi à la vascularisation du tissu tumoral. De plus, nous avons choisi d'implanter la tumeur exprimant le miRLuc et la tumeur contrôle sur la même souris. Ce choix permet une comparaison simultanée des 2 tumeurs par BLI concernant l'expression de la LucF dont l'activité résulte de la même injection de substrat en IP. Cependant, bien que les cellules soient injectées selon les mêmes conditions expérimentales, la croissance tumorale diffère d'une patte à l'autre pour une même souris. Ce choix ne permet donc pas une étude sur un volume tumoral défini. Enfin, il faut prendre en compte la thermo-

régulation mise en œuvre par l'organisme face au stress provoqué par l'hyperthermie. L'homéostasie maintient ou rétablit les constantes physiologiques lors de variations du milieu extérieur et s'oppose à l'hyperthermie expérimentale. Pour toutes ces raisons, le chauffage, point critique de notre modèle, a été examiné. Nous avons pu montrer qu'en augmentant la dose thermique, l'inhibition était plus efficace *in vitro*. Une activation de 45°C pendant 20 min s'avère plus efficace pour déclencher l'ensemble des processus moléculaires dépendant des promoteurs Hsp70 : la transcription des ARNm Hsp70 endogènes est augmentée, de même que l'expression des gènes rapporteurs codant pour la LucR et l'EmGFP. Cependant, les images de fluorescence après hyperthermie montrent l'hétérogénéité du chauffage. Nous constatons en effet la présence de cellules non fluorescentes dans les conditions optimales d'activation. La réponse au choc thermique *in vitro* est donc relativement hétérogène. Pour déterminer s'il s'agit d'une hérérogénéité cellulaire (les lignées sont polyclonales) ou d'une héréogénéité de chauffage au bain-marie, le travail sera poursuivi. Un tri cellulaire en cytométrie de flux basé sur l'expression de l'EmGFP après activation thermique pourrait permettre de réduire l'hétérogénéité cellulaire. Ainsi, les cellules positives pour la fluorescence de l'EmGFP seraient sélectionnées pour générer des tumeurs *in vivo*. La réponse inhibitrice souhaitée pourrait alors être améliorée. L'application de ces nouveaux paramètres d'activation thermique *in vivo* constitue ainsi la première perspective à ce travail.

Le second point critique concerne le nombre et la position des séquences ciblées par les miARN. A partir des données de la littérature, une séquence cible supplémentaire du miRLuc dans le 3'UTR de l'ARNm de la LucF a été introduite pour tenter d'améliorer l'inhibition. Nous avons pu démontrer *in vitro* cette amélioration. Dès lors, nous avons généré de nouvelles lignées stables dites « double cibles ». Ces lignées seront désormais utilisées pour la poursuite de ce travail.

Ainsi, l'étude *in vivo* pourra être menée en associant les optimisations concernant les paramètres d'activation thermique et l'augmentation du nombre de cibles pour tenter d'accroître l'effet inhibiteur par le miRLuc.

Une activation inductible, transitoire et modulable

Nos résultats confirment les données de la littérature concernant l'activité inductible et transitoire du promoteur Hsp70B. Ces caractéristiques constituent un réel avantage face aux phénomènes de toxicité redoutés dans le cas de la mise en place d'une stratégie thérapeutique. En effet, le transgène peut être activé à la demande et son expression est limitée dans le temps. De plus, nos résultats confirment que l'activation du promoteur Hsp70B est modulable en fonction de la dose thermique appliquée *in vitro*. Cette constatation a également été mise en évidence *in vivo* (Deckers et al., 2012). Cette modulation permet d'adapter l'activation du promoteur à l'effet thérapeutique escompté.

Potentialités du modèle

La construction moléculaire que nous avons utilisée permet de combiner simultanément l'expression de miARN synthétiques et une surexpression génique. La surexpression est matérialisée dans notre modèle par l'expression de l'EmGFP co-cistronique aux miARN. Le gène de l'EmGFP est placé sous le contrôle du même promoteur thermo-inductible que les miARN et nous avons pu suivre la réalité de son expression. La surexpression est également possible en utilisant un deuxième promoteur Hsp70B susceptible de contrôler l'expression d'un gène comme nous avons pu le montrer avec la LucR. Dans notre étude, le suivi de la LucR par BLI nous a permis d'obtenir un témoin de l'efficacité d'activation du promoteur après hyperthermie et donc de suivre l'efficacité de la stratégie. Notre modèle permet aussi l'expression simultanée de plusieurs séquences de miARN. Nous avons retenu l'expression de 4 copies identiques mais le vecteur d'expression permet d'inclure plusieurs miARN différents. Ainsi, il est possible d'envisager d'induire simultanément la traduction de plusieurs protéines d'intérêt et d'inhiber l'expression de plusieurs gènes. Cette propriété est particulièrement adaptée à la thérapie génique puisque généralement plusieurs déterminants moléculaires sont à l'origine de la maladie. Ainsi, dans un contexte tumoral, notre technique pourrait permettre de pallier simultanément à la surexpression et à la sous-expression de plusieurs de ces déterminants.

Perspectives d'adressage du système aux cellules cibles

Notre stratégie expérimentale, reposant sur l'utilisation de lignées de cellules tumorales modifiées génétiquement pour contenir l'ensemble des acteurs (cible, miARN et autres gènes rapporteurs), nous a permis de mesurer efficacement l'inhibition de l'expression génique. Notre modèle néglige cependant les problèmes d'adressage du vecteur thérapeutique. Le contrôle de l'expression génique, grâce à l'utilisation d'un promoteur thermo-sensible, est compatible avec les vecteurs viraux (Silcox et al., 2005) ou les vecteurs cellulaires (Eker et al., 2011; Fortin, 2011). Cependant, à l'heure actuelle, la compatibilité de l'expression thermo-inductible avec les méthodes physiques d'adressage comme la sonoporation et l'électroporation n'a jamais été envisagée. C'est dans cette perspective que le laboratoire a fait l'acquisition d'un système d'EP *in vivo* et développe des projets en collaboration avec le Dr. Muriel Golzio (IPBS, Toulouse), en particulier dans le domaine de l'EP en intra-tumorale et le couplage avec l'hyperthermie par ultrasons focalisés. C'est dans ce contexte que nous avons étudié l'effet de l'EP sur la souris Hsp-LucF (NLF1). Nous avons ainsi pu montrer que les courants nécessaires à l'EP n'activaient pas le promoteur Hsp70B murin *in vivo*, et donc que l'activation ultérieure du promoteur pouvait être envisagée (Projet Aquitaine / Midi Pyrénées, 2013-2014). Malgré la faible efficacité de l'EP intra-tumorale, nous avons testé la faisabilité d'électroporer des miARN sous contrôle d'un promoteur constitutif dans une tumeur exprimant la cible. *In vivo*, le miRLuc électroporé s'avère efficace pour inhiber l'expression de la LucF dans les cellules tumorales et cette inhibition a été détectée par BLI. D'autre part, pour mesurer l'efficacité de l'EP, nous avons testé la possibilité d'électroporer le gène codant pour la protéine mPlum qui a permis d'obtenir des résultats très favorables quant à son utilisation. Ainsi, l'EP simultanée du gène de la protéine mPlum pourrait permettre le suivi de l'efficacité de la méthode d'adressage. Notre système, comprenant le miARN

contrôlé par le promoteur thermo-inductible, pourrait ainsi être électroporé dans une tumeur modifiée pour exprimer la LucF de façon constitutive. Le suivi de la bioluminescence après EP puis après activation thermique pourrait permettre d'obtenir et de visualiser l'inhibition génique souhaitée.

Perspectives pour un contrôle de l'inhibition génique dans le temps et dans l'espace

Le promoteur Hsp70B permet le contrôle spatio-temporel de l'expression ou de l'inhibition génique dès lors que la méthode de chauffage est elle-même définie dans le temps et dans l'espace. Les ultrasons focalisés guidés par imagerie de résonance magnétique (MRgHIFU) offrent de telles potentialités. Ils permettent un dépôt de chaleur localisé non invasif, y compris dans les organes profonds, et l'IRM de température offre la possibilité de contrôler en temps réel la température au point focal. Un système d'asservissement automatique en temps réel effectue le contrôle automatique de la puissance des ultrasons focalisés en fonction des données de l'IRM autorisant des élévations de température avec une précision de +/- 1°C. La faisabilité de l'activation du promoteur Hsp70B par MRgHIFU pour permettre le contrôle spatio-temporel de l'expression d'un gène a déjà été démontrée sur des tissus sains (Deckers et al., 2009) ou *via* des vecteurs cellulaires d'adressage (Eker et al., 2011; Fortin, 2011). Dans des tumeurs, une première démonstration de faisabilité a été réalisée mais associée à un suivi destructif de l'expression génique (Guilhon et al., 2003). Dans la perspective de coupler notre projet de contrôle de l'inhibition génique avec le contrôle spatio-temporel par MRgHIFU, des expériences préliminaires ont été réalisées au laboratoire sur des tumeurs U87 modifiées génétiquement pour exprimer la LucF sous le contrôle du promoteur Hsp70B et implantées en sous-cutanée sur des souris immunodéficientes. La ***Figure 67*** présente la faisabilité du protocole.

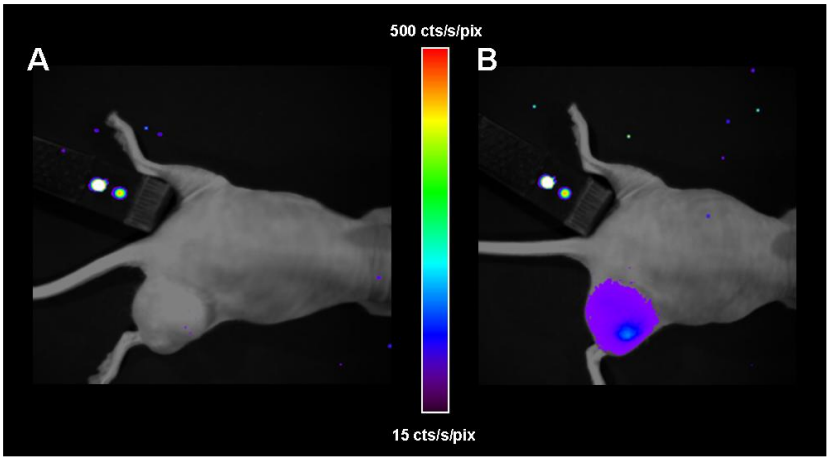


Figure 67 : Hyperthermie réalisée aux ultrasons focalisés guidés par IRM de température
(Courtoisie de C. Genevois, M. Lepetit-Coiffé, P-Y Fortin et F. Couillaud, non publié)
Tumeur U87 Hsp-LucF implantée sur la patte droite d'une souris Nude. (A) Image de bioluminescence avant hyperthermie et (B) après une hyperthermie (45°C ; 8 min) par ultrasons focalisés guidés par IRM de température.

La mise en œuvre du contrôle de l'inhibition de l'expression des miARN activable par MRgHIFU n'a pas été réalisée dans ce travail de thèse pour deux raisons. La première est liée au temps nécessaire à la construction des outils moléculaires et cellulaires et à l'optimisation des conditions expérimentales. La seconde a été dépendante de la réorganisation de la plateforme expérimentale bordelaise et de l'absence d'équipement MRgHIFU qui ont rendues la technologie inaccessible depuis 2011. Les résultats de notre travail montrant la faisabilité de l'approche par les miARN et l'acquisition en cours d'un nouvel équipement MRgHIFU (Région Aquitaine, Equipement d'Avenir, France Life Imaging, Labex TRAIL) permettent d'envisager la réalisation prochaine du couplage.

L'électroporation intra-cérébrale et perspectives

Dans ce manuscrit, nous montrons également la possibilité de mettre en œuvre l'EP en intra-crânien. Les résultats que nous avons obtenus sont encourageants et, bien que préliminaires, montrent la faisabilité d'induire l'expression génique en orthotopique sur une tumeur profonde grâce à l'EP. L'originalité de notre approche repose sur le placement d'électrodes plates de part et d'autre du crâne d'une souris adulte, seule l'injection d'ADN est invasive. Les résultats obtenus sont encourageants et permettent d'envisager de transfecter une tumeur profonde grâce à l'EP. La résolution spatiale du procédé est à l'intersection du champ électrique et de la zone de diffusion de l'acide nucléique après injection. Elle pourrait être affinée ultérieurement par l'utilisation d'électrodes dites « aiguilles » permettant d'appliquer le courant électrique directement sur la zone injectée. L'EP intra-crânienne pourrait également être envisagée en utilisant des ARN (Cf. 4.5) ainsi que les miARN de notre étude (Cf. 4.4.3).

Le potentiel thérapeutique des miARN est considérable et fait l'objet d'une littérature abondante. Ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes à notre travail. Pour ne citer que les glioblastomes, compte tenu du modèle cellulaire que nous avons utilisé, de nombreux miARN sont dérégulés positivement ou négativement (González-Gómez et al., 2011; Chistiakov and Chekhonin, 2012). Ces tumeurs gliales malignes de grade IV constituent la forme la plus fréquente des tumeurs primitives du système nerveux. La survie globale est estimée à 4 mois en l'absence de traitement, et la médiane de survie est de l'ordre de 12 à 15 mois avec un traitement multimodal (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie). En plus de la localisation cérébrale qui rend le traitement par chirurgie délicat, les glioblastomes de haut grade sont des tumeurs très invasives, compliquant ainsi la résection totale de la tumeur. Des études ont montré l'impact de certains acteurs de la régulation post-transcriptionnelle sur la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses. Le rôle des miARN nommés miR-7 (Wu et al., 2011) et miR-137 (Chen et al., 2012) ont été déterminés dans les cellules U87. Dans ces cellules, leur expression permet d'inhiber les phénomènes de migration et d'invasion cellulaires. Les cibles de ces miARN sont des régions situées dans le 3'UTR de l'ARNm de la protéine FAK (focal adhésion kinase) pour miR-7 et de l'ARNm de Cox-2 (cyclooxygenase-2) pour le miR-137. Ces protéines sont en effet impliquées dans la migration et la prolifération cellulaire. Les miARN, de par leurs fonctions de régulation de l'expression des gènes, peuvent donc avoir des actions de suppresseurs de tumeurs. Les outils moléculaires que

nous avons développés combinés à la méthode d'adressage par EP, nous permettraient de tenter de restaurer les fonctions des miARN miR-7 et miR-137 dans le contexte de tumeurs U87 chez la souris. Notre vecteur permet en effet d'induire l'expression simultanée de plusieurs miARN différents. L'action de ces miARN sur l'expression des gènes responsables de la migration et de l'invasion tumorale pourrait être suivie *in vivo* en position ectopique. En utilisant des tumeurs U87 CMV-LucF modifiées de façon à ce que la biogénèse de ces miARN soit contrôlée par le promoteur Hsp70B, nous pourrions envisager d'étudier l'impact de l'activation de la biogénèse des miR-7 et miR-137 à différents stades dans la progression tumorale. En se rapprochant d'un contexte plus physiologique, l'EP de ces miARN dans une tumeur U87 CMV-LucF en position intra-cérébrale pourrait permettre d'étudier la migration et l'invasion des cellules *in vivo* par BLI.

Les potentialités offertes par l'EP intra-crânienne comme stratégie d'adressage ne se limitent pas aux cancers. Par exemple, l'application de cette méthode pourrait être mise en œuvre dans le cadre des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Différents gènes ont été retrouvés comme impliqués dans cette maladie (Koren et al., 2009) qui est caractérisée par la formation d'une agrégation protéique formant des plaques amyloïdes. Des mutations du gène PSEN1 codant pour la protéine à activité gamma-sécrétase PS1 (presenilin-1) sont à l'origine du clivage anormalement élevé de la protéine APP (amyloid precursor protein). Cette protéine joue un rôle dans la plasticité neuronale et, lorsqu'elle est clivée, conduit à la formation des plaques amyloïdes. L'implication de la protéine tau (tubule-associated unit) a également été démontrée. Cette protéine associée aux microtubules intervient dans leur polymérisation et leur stabilité. Des agrégats de cette protéine tau sont à l'origine d'une neurotoxicité provoquant une dégénérescence neurofibrillaire. A ce jour, différentes stratégies ont été mises en place pour réduire la formation des plaques amyloïdes ou inhiber l'agrégation de la protéine tau. Un modèle d'étude intéressant pour cette maladie est la souris 3xTg-AD (Oddo et al., 2003) qui possède des mutations dans les gènes des protéines tau, APP et PS1. Cette souris triple-transgénique a la particularité de développer des plaques amyloïdes ainsi qu'une dégénérescence neurofibrillaire similaires à celles constatées dans la maladie d'Alzheimer chez l'Homme. Ce modèle d'étude fait désormais partie de plusieurs protocoles (Oddo et al., 2004; Filali et al., 2012). Le travail d'EP en intra-cérébral mené pour ces travaux de thèse pourrait s'avérer être une piste intéressante pour l'adressage d'acides nucléiques dans des zones cérébrales de ces souris triples transgéniques. Une méthode d'EP intra-cérébrale de gènes codants pour des protéines tau, APP et PS1 fonctionnelles en association avec des ARN interférents ciblant les ARNm des protéines non fonctionnelles, pourrait être envisagée. Après l'EP, l'étude de la présence de plaques amyloïdes et d'une dégénérescence neurofibrillaire permettrait de mesurer la progression de la maladie chez les souris triples-transgéniques.

Thérapie génique et ARNm

La deuxième partie de ce travail de thèse avait pour objectif de tester *in vivo* l'EP d'ARN et de suivre leur expression par imagerie de bioluminescence.

L'ARNm est une molécule décrite comme fragile et vulnérable aux dégradations enzymatiques par les RNases. Son utilisation est donc rarement envisagée pour des stratégies *in vivo*. Pourtant, contrairement à l'ADN, l'ARNm présente un certain nombre d'avantages. Les ARNm sont exprimés dans le cytoplasme, l'obstacle représenté par la barrière nucléaire n'est donc plus à franchir. De plus, ils ne présentent aucun risque d'intégration non désirée dans le génome de la cellule hôte et leur expression est typiquement transitoire. Enfin, l'ARNm est directement traduit et ne dépend donc pas des mécanismes complexes de transcription et d'export nucléaire. Les doutes quant à l'utilisation des ARNm pour des perspectives thérapeutiques concernent leur efficacité en relation avec leur dégradation supposée très rapide et l'impossibilité de moduler leur expression en l'absence de promoteur.

Cependant, certaines approches thérapeutiques récentes proposent l'utilisation des ARNm. Certaines d'entre elles concernent l'emploi des ARN pour la vaccination en utilisant les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont des actrices du système immunitaire et jouent le rôle de présentatrices d'antigènes. Ainsi, l'EP des cellules dendritiques *in vitro* avec un ARNm codant pour un antigène permet, après leur ré-administration dans l'organisme, une stimulation du système immunitaire (Tavernier et al., 2011). En effet, ces ARNm sont reconnus par les récepteurs TLRs (Toll-like receptors) TLR7 et TLR8 qui permettent d'initier la réponse immunitaire (Yamamoto et al., 2009). Quelques travaux rapportent l'utilisation d'ARN *in vivo* en les couplant avec des lipides cationiques (Anderson et al., 2003) ou par EP intra-dermique (Johansson et al., 2012). Dans cette dernière étude, les ARN utilisés possédaient un fort pouvoir immunogène dans le cadre d'une stratégie d'immunothérapie. Un ARNm codant pour la LucF, utilisé comme témoin, n'induisait pas de réponse immunitaire. L'expression des ARNm codant pour la LucF n'était pas visualisée par imagerie dans cette étude et l'activité enzymatique de la LucF obtenue était faible.

Outre notre intérêt général pour l'utilisation des ARNm *in vivo* dans le cadre des thérapies géniques et de l'imagerie, nous avions également un intérêt particulier pour l'adressage des ARN viraux dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Michel Ventura ((Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, UMR 5234, Bordeaux). Le projet consiste à délivrer aux hépatocytes infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) des ARN artificiels de types viraux non-codants qui permettent la synthèse de protéines anti-virales exclusivement dans les cellules infectées. Ces cellules, contrairement aux cellules saines, expriment les protéines du complexe de réplication capable de synthétiser l'ARN codant (dit « positif ») à partir d'ARN non codant (dit « négatif ») (Bitard et al., 2010). *In vivo*, la démonstration de faisabilité de cette approche passe par la possibilité d'adresser des ARN aux cellules infectées. Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué les performances de l'EP en utilisant un ARN positif codant pour la LucF en réalisant un suivi par BLI. Les ARN comportent la séquence codante de la LucF encadrée par les 2 régions non traduites du VHC. Ce type de construction permet l'étude de la réplication virale

mais peut également, après transfection dans des cellules *in vitro*, aboutir à l'expression de protéines d'intérêt. Il est à noter que dans ce contexte, la traduction des protéines ne dépend pas des facteurs traductionnels cap-dépendants de la cellule puisque la région 5'UTR possède une activité IRES (Honda et al., 1996) assurant la traduction des protéines. De plus, la région 3'UTR (Isken et al., 2007) semble être impliquée dans la régulation traductionnelle du virus (Song et al., 2006) en interagissant avec l'IRES porté par le 5'UTR. La synthèse protéique peut donc intervenir même lorsque la cellule est dans un état de quiescence où son métabolisme protéique est réduit.

L'étude menée dans ce travail nous a permis de comparer l'efficacité de l'EP intra-dermique de plusieurs types de molécules d'ARN. Cette efficacité est très variable et hétérogène, elle pourrait s'expliquer par l'utilisation de conditions d'EP qui mériteraient d'être optimisées. Néanmoins, nous avons pu montrer pour la première fois le suivi par BLI de l'expression de la LucF *in vivo* chez la souris à partir d'ARN. Les ARN coiffés et polyadénylés (cap-LucF-polyA) se révèlent être les plus efficaces pour leur détection *in vivo*. En particulier, nous avons observé des expressions très intenses et persistantes jusqu'à 2 semaines après l'EP. La demi-vie de la LucF est de l'ordre de 3h *in vitro* (Thompson et al., 1991) et *in vivo*, la détection de son activité enzymatique ne dépasse pas 24h (Fortin et al., 2012, soumis). Nos observations impliquent donc une grande stabilité des ARN cap-LucF-polyA *in vivo*. Les ARN de types viraux (5UTR-LucF-3UTR) sont, quant à eux, beaucoup moins efficaces, mais la détection de l'expression de la LucF reste néanmoins possible. Il est important de noter qu'il semble que nous ayons atteint des doses saturantes pour les ARN poly-adénylés (5UTR-LucF-polyA et cap-LucF-polyA) alors que pour les ARN viraux, la détection du signal bioluminescent augmente en fonction du nombre de copies d'ARN électroporées. Cette différence de comportement pourrait résulter de l'utilisation de différentes voies traductionnelles des ARN qui sont cap-dépendantes ou IRES-dépendantes. Par ailleurs, l'injection d'ARN sans EP s'avère également efficace et pourrait aussi offrir des perspectives thérapeutiques.

En conclusion, nous avons montré la possibilité d'électroporer des ARN *in vivo*. L'expression est transitoire et peut être ajustée en modulant le nombre de molécules électroporées.

Bibliographie

Akaneya, Y., Jiang, B., and Tsumoto, T. (2005). RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. J. Neurophysiol *93*, 594–602.

Al-Hajj, M. (2003). From the Cover: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *100*, 3983–3988.

Alvarez-Garcia, I., and Miska, E.A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. Development *132*, 4653–4662.

Anderson, D.M., Hall, L.L., Ayyalapu, A.R., Irion, V.R., Nantz, M.H., and Hecker, J.G. (2003). Stability of mRNA/Cationic Lipid Lipoplexes in Human and Rat Cerebrospinal Fluid: Methods and Evidence for Nonviral mRNA Gene Delivery to the Central Nervous System. Human Gene Therapy *14*, 191–202.

André, F., and Mir, L.M. (2004). DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. Gene Ther *11 Suppl 1*, S33–42.

Bettan, M., Ivanov, M.A., Mir, L.M., Boissière, F., Delaere, P., and Scherman, D. (2000). Efficient DNA electrotransfer into tumors. Bioelectrochemistry *52*, 83–90.

Bitard, J., Chognard, G., Dumas, E., Rumi, J., Masante, C., Mahias, K., Astier-Gin, T., and Ventura, M. (2010). Hijacking hepatitis C viral replication with a non-coding replicative RNA. Antiviral Res *87*, 9–15.

Black, P.C., Shetty, A., Brown, G.A., Esparza-Coss, E., Metwalli, A.R., Agarwal, P.K., McConkey, D.J., Hazle, J.D., and Dinney, C.P.N. (2010). Validating bladder cancer xenograft bioluminescence with magnetic resonance imaging: the significance of hypoxia and necrosis. BJU International *106*, 1799–1804.

Bloquel, C., Fabre, E., Bureau, M.F., and Scherman, D. (2004). Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. J Gene Med *6 Suppl 1*, S11–23.

Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylase Complexes to miRNA Targets. Molecular Cell *44*, 120–133.

Brocchieri, L., Conway de Macario, E., and Macario, A.J. (2008). hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. BMC Evolutionary Biology *8*, 19.

Bureau, M.F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L.M., and Scherman, D. (2000). Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. Biochim. Biophys. Acta *1474*, 353–359.

Cappelletti, M., Zampaglione, I., Rizzuto, G., Ciliberto, G., La Monica, N., and Fattori, E. (2003). Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA. J Gene Med *5*, 324–332.

Carper, S.W., Duffy, J.J., and Gerner, E.W. (1987). Heat Shock Proteins in Thermotolerance and Other Cellular Processes. Cancer Res *47*, 5249–5255.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., Basile, G. de S., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.-L., et al. (2000). Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. Science *288*, 669–672.

Cemazar, M., Golzio, M., Sersa, G., Hojman, P., Kranjc, S., Mesojednik, S., Rols, M.-P., and Teissie, J. (2009). Control by pulse parameters of DNA electrotransfer into solid tumors in mice. Gene Ther *16*, 635–644.

Cemazar, M., Sersa, G., Wilson, J., Tozer, G.M., Hart, S.L., Grosel, A., and Dachs, G.U. (2002). Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. Cancer Gene Ther *9*, 399–406.

Cemazar, M., Tamzali, Y., Sersa, G., Tozon, N., Mir, L. m., Miklavcic, D., Lowe, R., and Teissie, J. (2008). Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. Journal of Veterinary Internal Medicine *22*, 826–831.

Chekulaeva, M., and Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. Current Opinion in Cell Biology *21*, 452–460.

Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4–NOT through conserved W-containing motifs. Nature Structural & Molecular Biology *18*, 1218–1226.

Chen, C., Smye, S.W., Robinson, M.P., and Evans, J.A. (2006). Membrane electroporation theories: a review. Med Biol Eng Comput *44*, 5–14.

Chen, L., Wang, X., Wang, H., Li, Y., Yan, W., Han, L., Zhang, K., Zhang, J., Wang, Y., Feng, Y., et al. (2012). miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2. European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990).

Chernajovsky, Y., Gould, D.J., and Podhajcer, O.L. (2004). Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis? Nature Reviews Immunology *4*, 800–811.

Chistiakov, D.A., and Chekhonin, V.P. (2012). Contribution of microRNAs to radio- and chemoresistance of brain tumors and their therapeutic potential. European Journal of Pharmacology *684*, 8–18.

Christians, E., Campion, E., Thompson, E.M., and Renard, J.P. (1995). Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. Development *121*, 113–122.

Close, D.M., Xu, T., Sayler, G.S., and Ripp, S. (2010). In Vivo Bioluminescent Imaging (BLI): Noninvasive Visualization and Interrogation of Biological Processes in Living Animals. Sensors *11*, 180–206.

Cohen, B., Dafni, H., Meir, G., Harmelin, A., and Neeman, M. (2005). Ferritin as an Endogenous MRI Reporter for Noninvasive Imaging of Gene Expression in C6 Glioma Tumors. Neoplasia (New York, N.Y.) *7*, 109.

Contag, C.H., and Bachmann, M.H. (2002). Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. Annu Rev Biomed Eng *4*, 235–260.

Contag, C.H., Spilman, S.D., Contag, P.R., Oshiro, M., Eames, B., Dennery, P., Stevenson, D.K., and Benaron, D.A. (1997). Visualizing Gene Expression in Living Mammals Using a Bioluminescent Reporter. Photochemistry and Photobiology *66*, 523–531.

Cougot, N. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. The Journal of Cell Biology *165*, 31–40.

Davalos, R., Mir, L., and Rubinsky, B. (2005). Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. Annals of Biomedical Engineering *33*, 223–231.

Davis-Dusenbery, B.N., and Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. J. Biochem *148*, 381–392.

Deckers, R., Debeissat, C., Fortin, P.-Y., Moonen, C.T.W., and Couillaud, F. (2012). Arrhenius analysis of the relationship between hyperthermia and Hsp70 promoter activation: A comparison between ex vivo and in vivo data. International Journal of Hyperthermia *28*, 441–450.

Deckers, R., Quesson, B., Arsaut, J., Eimer, S., Couillaud, F., and Moonen, C.T.W. (2009). Image-guided, noninvasive, spatiotemporal control of gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A *106*, 1175–1180.

Deiters, A. (2010). Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway. AAPS J *12*, 51–60.

Dinca, E.B., Sarkaria, J.N., Schroeder, M.A., Carlson, B.L., Voicu, R., Gupta, N., Berger, M.S., and James, C.D. (2007). Bioluminescence monitoring of intracranial glioblastoma xenograft: response to primary and salvage temozolomide therapy. J. Neurosurg. *107*, 610–616.

Doherty, E.A., and Doudna, J.A. (2001). Ribozyme Structures and Mechanisms. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure *30*, 457–475.

Van Driessche, A., Ponsaerts, P., Van Bockstaele, D.R., Van Tendeloo, V.F.I., and Berneman, Z.N. (2005). Messenger RNA electroporation: an efficient tool in immunotherapy and stem cell research. FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA *43*, 213.

Duarte, S., Carle, G., Faneca, H., Lima, M.C.P. de, and Pierrefite-Carle, V. (2012). Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? Cancer Letters.

Dumas, E., Masante, C., Astier-Gin, T., Lapaillerie, D., and Ventura, M. (2007). The hepatitis C virus minigenome: A new cellular model for studying viral replication. Journal of Virological Methods *142*, 59–66.

Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. J Gene Med *9*, 833–842.

Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., and Edelstein, R.M. (2004). Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. J Gene Med *6*, 597–602.

Eker, O.F., Quesson, B., Rome, C., Arsaut, J., Deminière, C., Moonen, C.T., Grenier, N., and Couillaud, F. (2011). Combination of Cell Delivery and Thermoinducible Transcription for in Vivo Spatiotemporal Control of Gene Expression: A Feasibility Study. Radiology *258*, 496–504.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature *411*, 494–498.

Esau, C.C., and Monia, B.P. (2007). Therapeutic potential for microRNAs. Adv. Drug Deliv. Rev *59*, 101–114.

Escoffre, J.-M., Portet, T., Wasungu, L., Teissié, J., Dean, D., and Rols, M.-P. (2009). What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. Mol. Biotechnol *41*, 286–295.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. Cell *132*, 9–14.

Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4–NOT. Nature Structural & Molecular Biology *18*, 1211–1217.

Fang, Z., and Rajewsky, N. (2011). The Impact of miRNA Target Sites in Coding Sequences and in 3′UTRs. PLoS ONE *6*, e18067.

Fattori, E., La Monica, N., Ciliberto, G., and Toniatti, C. (2002). Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery. Somat. Cell Mol. Genet *27*, 75–83.

Feldman, J.P., Goldwasser, R., Mark, S., Schwartz, J., and Orion, I. (2009). A Mathematical Model for Tumor Volume Evaluation using Two-Dimensions. Journal of Applied Quantitative Methods *4*, 455–462.

Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., and Planel, E. (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). Behavioural Brain Research *234*, 334–342.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nature Reviews Genetics *9*, 102–114.

Filonov, G.S., Piatkevich, K.D., Ting, L.-M., Zhang, J., Kim, K., and Verkhusha, V.V. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. Nature Biotechnology *29*, 757–761.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature *391*, 806–811.

Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Coller, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 14879–14884.

Fortin, P.-Y. (2011). Adressage d'un gène à une tumeur via des cellules sanguines circulantes: contrôle de l'expression par hyperthermie locale et suivi par imagerie. Bordeaux II.

Fortin, P.-Y., Genevois, C., Chapolard, M., Santalucia, T., Planas, A., and Couillaud, F. (2012). Early and late in vivo imaging of transient and inducible promoter activation.

Gabriel, B., and Teissié, J. (1995). Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1266*, 171–178.

Gabriel, B., and Teissié, J. (1997). Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. Biophys. J *73*, 2630–2637.

Gao, X., Kim, K.-S., and Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: What we know and what is next. The AAPS Journal *9*, E92–E104.

Gehl, J., Sørensen, T.H., Nielsen, K., Raskmark, P., Nielsen, S.L., Skovsgaard, T., and Mir, L.M. (1999). In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects *1428*, 233–240.

Genove, G., DeMarco, U., Xu, H., Goins, W.F., and Ahrens, E.T. (2005). A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. Nature Medicine *11*, 450–454.

Golzio, M., Mazzolini, L., Ledoux, A., Paganin, A., Izard, M., Hellaudais, L., Bieth, A., Pillaire, M.J., Cazaux, C., Hoffmann, J.S., et al. (2007). In vivo gene silencing in solid tumors by targeted electrically mediated siRNA delivery. Gene Therapy *14*, 752–759.

Golzio, M., Mazzolini, L., Moller, P., Rols, M.P., and Teissié, J. (2005). Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. Gene Therapy *12*, 246–251.

Golzio, M., Rols, M.P., and Teissié, J. (2004). In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. Methods *33*, 126–135.

González-Gómez, P., Sánchez, P., and Mira, H. (2011). MicroRNAs as Regulators of Neural Stem Cell-Related Pathways in Glioblastoma Multiforme. Molecular Neurobiology *44*, 235–249.

Gothelf, A., and Gehl, J. (2010). Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. Curr Gene Ther *10*, 287–299.

Gothelf, A., Mir, L.M., and Gehl, J. (2003). Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. Cancer Treat. Rev *29*, 371–387.

Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. Nature *441*, 537–541.

Guilhon, E., Voisin, P., De Zwart, J.A., Quesson, B., Salomir, R., Maurange, C., Bouchaud, V., Smirnov, P., De Verneuil, H., Vekris, A., et al. (2003). Spatial and temporal control of transgene expression in vivo using a heat-sensitive promoter and MRI-guided focused ultrasound. J Gene Med *5*, 333–342.

Guo, L., and Lu, Z. (2010). The Fate of miRNA* Strand through Evolutionary Analysis: Implication for Degradation As Merely Carrier Strand or Potential Regulatory Molecule? PLoS ONE *5*, e11387.

Guo, Z.S., Li, Q., Bartlett, D.L., Yang, J.Y., and Fang, B. (2008). Gene transfer: the challenge of regulated gene expression. Trends in Molecular Medicine *14*, 410–418.

Haar, T. von der, Gross, J.D., Wagner, G., and McCarthy, J.E.G. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. Nature Structural & Molecular Biology *11*, 503–511.

Han, J. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes & Development *18*, 3016–3027.

Hashizume, R., Ozawa, T., Dinca, E.B., Banerjee, A., Prados, M.D., James, C.D., and Gupta, N. (2009). A human brainstem glioma xenograft model enabled for bioluminescence imaging. Journal of Neuro-Oncology *96*, 151–159.

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 Letters *389*, 225–228.

Heller, R., Schultz, J., Lucas, M.L., Jaroszeski, M.J., Heller, L.C., Gilbert, R.A., Moelling, K., and Nicolau, C. (2001). Intradermal delivery of interleukin-12 plasmid DNA by in vivo electroporation. DNA Cell Biol *20*, 21–26.

Hesketh, J. (2004). 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. Biochem. Soc. Trans. *32*, 990–993.

Honda, M., Ping, L.-H., Rijnbrand, R.C.A., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., and Lemon, S.M. (1996). Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA. Virology *222*, 31–42.

Hua, J., and Muschel, R.J. (1996). Inhibition of Matrix Metalloproteinase 9 Expression by a Ribozyme Blocks Metastasis in a Rat Sarcoma Model System. Cancer Res *56*, 5279–5284.

Huang, Q., Hu, J.K., Lohr, F., Zhang, L., Braun, R., Lanzen, J., Little, J.B., Dewhirst, M.W., and Li, C.-Y. (2000). Heat-induced Gene Expression as a Novel Targeted Cancer Gene Therapy Strategy. Cancer Res *60*, 3435–3439.

Humphreys, D.T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. Proceedings of the National Academy of Sciences *102*, 16961–16966.

Hundt, W., O'Connell-Rodwell, C.E., Bednarski, M.D., Steinbach, S., and Guccione, S. (2007). In Vitro Effect of Focused Ultrasound or Thermal Stress on HSP70 Expression and Cell Viability in Three Tumor Cell Lines. Academic Radiology *14*, 859–870.

Huntzinger, E., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Braun, J.E., Eulalio, A., Wohlbold, L., and Izaurralde, E. (2012). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are

required for both translational repression and degradation of miRNA targets. Nucl. Acids Res.

Isken, O., Baroth, M., Grassmann, C.W., Weinlich, S., Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., and Behrens, S.-E. (2007). Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. RNA *13*, 1675–1692.

Jacobs, A., Voges, J., Reszka, R., Lercher, M., Gossmann, A., Kracht, L., Kaestle, C., Wagner, R., Wienhard, K., and Heiss, W. (2001). Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. The Lancet *358*, 727–729.

Jenkins, D., Oei, Y., Hornig, Y., Yu, S.-F., Dusich, J., Purchio, T., and Contag, P. (2003). Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. Clinical and Experimental Metastasis *20*, 733–744.

Jinek, M., Fabian, M.R., Coyle, S.M., Sonenberg, N., and Doudna, J.A. (2010). Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. Nature Structural & Molecular Biology *17*, 238–240.

Johansson, D.X., Ljungberg, K., Kakoulidou, M., and Liljeström, P. (2012). Intradermal electroporation of naked replicon RNA elicits strong immune responses. PLoS ONE *7*, e29732.

Juvvuna, P.K., Khandelia, P., Lee, L.M., and Makeyev, E.V. (2012). Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs. Nucl. Acids Res.

Kang, J.H., and Chung, J.-K. (2008). Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. J. Nucl. Med *49 Suppl 2*, 164S–79S.

Kijima, H., Ishida, H., Ohkawa, T., Kashani-Sabet, M., and Scanlon, K.J. (1995). Therapeutic applications of ribozymes. Pharmacology & Therapeutics *68*, 247–267.

Koren, J., Jinwal, U.K., Lee, D.C., Jones, J.R., Shults, C.L., Johnson, A.G., Anderson, L.J., and Dickey, C.A. (2009). Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease. Journal of Cellular and Molecular Medicine *13*, 619–630.

Kregel, K.C. (2002). Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J Appl Physiol *92*, 2177–2186.

Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nature Reviews Genetics *11*, 597–610.

Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. European Journal of Biochemistry *270*, 1628–1644.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature *367*, 645–648.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell *75*, 843–854.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J *23*, 4051–4060.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. Cell *120*, 15–20.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. Cancer Res *67*, 1030–1037.

Li, C.Y., and Dewhirst, M.W. (2002). Hyperthermia-regulated immunogene therapy. Int J Hyperthermia *18*, 586–596.

Li, S., Xia, X., Zhang, X., and Suen, J. (2002). Regression of tumors by IFN-α electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array. , Published Online: 26 March 2002; | Doi:10.1038/sj/gt/3301645 *9*,.

Lian, S.L., Li, S., Abadal, G.X., Pauley, B.A., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2009). The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. RNA *15*, 804–813.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature *433*, 769–773.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. Science *305*, 1437–1441.

Lorenz, W.W., McCann, R.O., Longiaru, M., and Cormier, M.J. (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 4438–4442.

Louie, A.Y., Hüber, M.M., Ahrens, E.T., Rothbächer, U., Moats, R., Jacobs, R.E., Fraser, S.E., and Meade, T.J. (2000). In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. Nat. Biotechnol. *18*, 321–325.

Lyashko, V.N., Vikulova, V.K., Chernicov, V.G., Ivanov, V.I., Ulmasov, K.A., Zatsepina, O.G., and Evgen'ev, M.B. (1994). Comparison of the heat shock response in ethnically and ecologically different human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 12492.

MacLaren, D.C., Gambhir, S.S., Satyamurthy, N., Barrio, J.R., Sharfstein, S., Toyokuni, T., Wu, L., Berk, A.J., Cherry, S.R., Phelps, M.E., et al. (1999). Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D2 receptor as a reporter gene in living animals. Gene Ther. *6*, 785–791.

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*, 1808–1812.

Matsuda, T., and Cepko, C.L. (2003). From the Cover: Inaugural Article: Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences *101*, 16–22.

Matthews, C., and Favard, C. (2007). Théorie, principes et applications des techniques de fluorescence en biologie cellulaire et cancérologie. Bulletin Du Cancer *94*, 115–125.

McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.-T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J., and Kay, M.A. (2002). Gene expression: RNA interference in adult mice. Nature *418*, 38–39.

Mir, L.M. (2001). Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. Bioelectrochemistry *53*, 1–10.

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*, 4262–4267.

Mir, L.M., Bureau, M.F., Rangara, R., Schwartz, B., and Scherman, D. (1998a). Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie *321*, 893–899.

Mir, L.M., Glass, L.F., Sersa, G., TeissiÃ©, J., Domenge, C., Miklavcic, D., Jaroszeski, M.J., Orlowski, S., Reintgen, D.S., Rudolf, Z., et al. (1998b). Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. British Journal of Cancer *77*, 2336.

Mir, L.M., Moller, P.H., André, F., and Gehl, J. (2005). Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. Adv. Genet *54*, 83–114.

Mizzen, L.A., and Welch, W.J. (1988). Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. The Journal of Cell Biology *106*, 1105.

Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev. *12*, 3788–3796.

Morimoto, R.I., and Santoro, M.G. (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. Nat. Biotechnol. *16*, 833–838.

Moseley, P.L. (1997). Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. J Appl Physiol *83*, 1413–1417.

Murakami, T., and Sunada, Y. (2011). Plasmid DNA Gene Therapy by Electroporation: Principles and Recent Advances. Current Gene Therapy *11*,.

Nagata, J., Kijima, H., Hatanaka, H., Asai, S., Miyachi, H., Abe, Y., Yamazaki, H., Nakamura, M., Watanabe, N., Mine, T., et al. (2002). Reversal of drug resistance using hammerhead ribozymes against multidrug resistance-associated protein and multidrug resistance 1 gene. International Journal of Oncology *21*, 1021.

Nilsen, T.W. (2007). Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. Trends in Genetics *23*, 243–249.

Nollen, E.A.A., Brunsting, J.F., Roelofsen, H., Weber, L.A., and Kampinga, H.H. (1999). In Vivo Chaperone Activity of Heat Shock Protein 70 and Thermotolerance. Molecular and Cellular Biology *19*, 2069.

Ntziachristos, V., Bremer, C., and Weissleder, R. (2003). Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. European Radiology *13*, 195–208.

Ntziachristos, V., Tung, C.-H., Bremer, C., and Weissleder, R. (2002). Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. Nature Medicine *8*, 757–761.

Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., and LaFerla, F.M. (2004). Aβ Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome. Neuron *43*, 321–332.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Aβ and Synaptic Dysfunction. Neuron *39*, 409–421.

Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3′ UTR evolution. Nature Structural & Molecular Biology *15*, 354–363.

Otto-Duessel, M., Khankaldyyan, V., Gonzalez-Gomez, I., Jensen, M.C., Laug, W.E., and Rosol, M. (2006). In vivo testing of Renilla luciferase substrate analogs in an orthotopic murine model of human glioblastoma. Mol Imaging *5*, 57–64.

Parker, R., and Sheth, U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. Molecular Cell *25*, 635–646.

Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. Nature Reviews Genetics *13*, 271–282.

Pavco, P.A., Bouhana, K.S., Gallegos, A.M., Agrawal, A., Blanchard, K.S., Grimm, S.L., Jensen, K.L., Andrews, L.E., Wincott, F.E., Pitot, P.A., et al. (2000). Antitumor and Antimetastatic Activity of Ribozymes Targeting the Messenger RNA of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. Clin Cancer Res *6*, 2094–2103.

Pavlin, D., Cemazar, M., Kamensek, U., Tozon, N., Pogacnik, A., and Sersa, G. (2009). Local and systemic antitumor effect of intratumoral and peritumoral IL-12 electrogene therapy on murine sarcoma. Cancer Biology & Therapy *8*, 2114–2122.

Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. Molecular Cell *21*, 533–542.

Ramos, D.M., Kamal, F., Wimmer, E.A., Cartwright, A.N., and Monteiro, A. (2006). Temporal and spatial control of transgene expression using laser induction of the hsp70 promoter. BMC Dev. Biol. *6*, 55.

Ritossa, F. (1996). Discovery of the heat shock response. Cell Stress & Chaperones *1*, 97.

Rome, C., Couillaud, F., and Moonen, C.T.W. (2005). Spatial and temporal control of expression of therapeutic genes using heat shock protein promoters. Methods *35*, 188–198.

Scanlon, K.J., Ishida, H., and Kashani-Sabet, M. (1994). Ribozyme-mediated reversal of the multidrug-resistant phenotype. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 11123.

Scanlon, K.J., Jiao, L., Funato, T., Wang, W., Tone, T., Rossi, J.J., and Kashani-Sabet, M. (1991). Ribozyme-mediated cleavage of c-fos mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and metallothionein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *88*, 10591.

Scherr, M., and Eder, M. (2007). Gene Silencing by Small Regulatory RNAs in Mammalian Cells. Cell Cycle *6*, 444–449.

Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two Genetic Circuits Repress the Caenorhabditis elegans Heterochronic Gene lin-28 after Translation Initiation. Developmental Biology *243*, 215–225.

Shamovsky, I., and Nudler, E. (2008). New insights into the mechanism of heat shock response activation. Cell. Mol. Life Sci *65*, 855–861.

Shcherbo, D., Merzlyak, E.M., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Ermakova, G.V., Solovieva, E.A., Lukyanov, K.A., Bogdanova, E.A., Zaraisky, A.G., Lukyanov, S., et al. (2007). Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. Nature Methods *4*, 741–746.

Shi, X.-B., Tepper, C.G., and deVere White, R.W. (2008). Cancerous miRNAs and their regulation. Cell Cycle *7*, 1529–1538.

Shibata, M.-A., Morimoto, J., Doi, H., Morishima, S., Naka, M., and Otsuki, Y. (2007). Electrogene therapy using endostatin, with or without suicide gene therapy, suppresses murine mammary tumor growth and metastasis. Cancer Gene Therapy *14*, 268–278.

Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N., and Schatz, D.G. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 6522.

Shu, X., Royant, A., Lin, M.Z., Aguilera, T.A., Lev-Ram, V., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2009). Mammalian Expression of Infrared Fluorescent Proteins Engineered from a Bacterial Phytochrome. Science *324*, 804–807.

Silcox, C.E., Smith, R.C., King, R., McDannold, N., Bromley, P., Walsh, K., and Hynynen, K. (2005). MRI-guided ultrasonic heating allows spatial control of exogenous luciferase in canine prostate. Ultrasound in Medicine & Biology *31*, 965–970.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature *432*, 396–401.

Smith, R.C., Machluf, M., Bromley, P., Atala, A., and Walsh, K. (2002). Spatial and Temporal Control of Transgene Expression Through Ultrasound-Mediated Induction of the Heat Shock Protein 70B Promoter In Vivo. Human Gene Therapy *13*, 697–706.

Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R., and Niepmann, M. (2006). The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated Region Strongly Enhances Translation Directed by the Internal Ribosome Entry Site. Journal of Virology *80*, 11579–11588.

Stephenson, M.L., and Zamecnik, P.C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *75*, 285.

Szentirmai, O., Baker, C.H., Lin, N., Szucs, S., Takahashi, M., Kiryu, S., Kung, A.L., Mulligan, R.C., and Carter, B.S. (2006). Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect. Neurosurgery *58*, 365–372; discussion 365–372.

Takabatake, Y., Isaka, Y., Mizui, M., Kawachi, H., Shimizu, F., Ito, T., Hori, M., and Imai, E. (2005). Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. Gene Therapy *12*, 965–973.

Takimoto, K., Wakiyama, M., and Yokoyama, S. (2009). Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. RNA *15*, 1078–1089.

Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R.L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. Cell Stress & Chaperones *1*, 23.

Tavernier, G., Andries, O., Demeester, J., Sanders, N.N., De Smedt, S.C., and Rejman, J. (2011). mRNA as gene therapeutic: How to control protein expression. Journal of Controlled Release *150*, 238–247.

Thompson, J.F., Hayes, L.S., and Lloyd, D.B. (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. Gene *103*, 171–177.

Titomirov, A.V., Sukharev, S., and Kistanova, E. (1991). In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. Biochim. Biophys. Acta *1088*, 131–134.

Tsien, R.Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. Annual Review of Biochemistry *67*, 509–544.

Tsien, R.Y. (2010). Fluorescence readouts of biochemistry in live cells and organisms. In Molecular Imaging: Principles and Practice, (USA: People's Medical Publishing House), pp. 808–828.

Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., and Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev. *20*, 515–524.

Vicat, J.M., Boisseau, S., Jourdes, P., Lainé, M., Wion, D., Bouali-Benazzouz, R., Benabid, A.L., and Berger, F. (2000). Muscle transfection by electroporation with high-

voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression. Hum. Gene Ther *11*, 909–916.

Waerzeggers, Y., Monfared, P., Viel, T., Winkeler, A., Voges, J., and Jacobs, A.H. (2009). Methods to monitor gene therapy with molecular imaging. Methods *48*, 146–160.

Waldrop, M.M. (1989). Catalytic RNA wins chemistry Nobel. Science *246*, 325.

Wang, C.-H., Tsai, L.-J., Tsao, Y.-P., Hsieh, J.-T., Chien, W.-W., Liao, C.-L., Wang, H.-W., Liu, H.-S., and Chen, S.-L. (2002). Recombinant adenovirus encoding H-ras ribozyme induces apoptosis in laryngeal cancer cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. Biochemical and Biophysical Research Communications *298*, 805–814.

Wang, L. (2004). Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. Proceedings of the National Academy of Sciences *101*, 16745–16749.

Wang, Z., Rao, D., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2011). RNA Interference and Cancer Therapy. Pharmaceutical Research *28*, 2983–2995.

Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E.A., and Basilion, J.P. (2000). In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. Nat. Med. *6*, 351–355.

Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. Nature *452*, 580–589.

Weissleder, R., Simonova, M., Bogdanova, A., Bredow, S., Enochs, W.S., and Bogdanov, A., Jr (1997). MR imaging and scintigraphy of gene expression through melanin induction. Radiology *204*, 425–429.

Widera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S.W., Chen, M., Leung, L., Otten, G.R., Thudium, K., Selby, M.J., et al. (2000). Increased DNA Vaccine Delivery and Immunogenicity by Electroporation In Vivo. J Immunol *164*, 4635–4640.

Wu, D., Wang, Y., Fan, L., Luo, H., Han, B., Sun, L., Wang, X., Zhang, J., Cao, L., Wang, X., et al. (2011). MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression. Chin. Med. J. *124*, 2616–2621.

Yamamoto, A., Kormann, M., Rosenecker, J., and Rudolph, C. (2009). Current prospects for mRNA gene delivery. Eur J Pharm Biopharm *71*, 484–489.

Yang, W., and Paschen, W. (2008). Conditional gene silencing in mammalian cells mediated by a stress-inducible promoter. Biochem. Biophys. Res. Commun *365*, 521–527.

Zamecnik, P.C., and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *75*, 280.

Zhang, L., Nolan, E., Kreitschitz, S., and Rabussay, D.P. (2002). Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects *1572*, 1–9.

Valorisation de la thèse

Activité d'enseignement

Activité d'enseignement de travaux dirigés et de travaux pratiques à l'Université Bordeaux Segalen dans l'unité d'enseignement Génétique moléculaire et physiologique (192 heures d'enseignement pour les années scolaires 2009 à 2012) de Licence 2ème année.

Présentations orales

1 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Contrôle spatio-temporel de l'inhibition génique in vivo.* 8èmes journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Octobre 2012, Montpellier.

2 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Pierre-Yves Fortin ; Coralie Genevois ; Matthieu Lepetit-Coiffé ; Chrit Moonen ; Franck Couillaud. *Contrôle spatial et temporel de l'activation et de l'inhibition de l'expression génique*. Journée « ARNs et Cancer », Décembre 2010, Bordeaux.

Posters

1 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Optical imaging of thermo-induced gene silencing in tumors.* 8èmes journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Octobre 2012, Montpellier.

2 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Optical imaging of thermo-induced gene silencing in tumors.* World Molecular Imaging Congress 2012, Septembre 2012, Dublin, Irlande. Student travel stipend award.

3 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Spatio-temporal control of gene silencing in vivo*. Journée de l'école doctorale des sciences de la vie de Bordeaux Segalen, Mars 2012, Arcachon.

4 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Spatio-temporal control of gene silencing in vivo.* Imagiv, Décembre 2011, Paris.

5 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Contrôle spatio-temporel de l'inhibition génique in vivo.* 7èmes journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Octobre 2011, Bordeaux.

6 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Spatio-temporal control of gene silencing in vivo.* 1ères rencontres du Réseau Santé Industrie Recherche

Aquitain, Thérapies Guidées par l'imagerie: théranostique et transport ciblé, Juillet 2011, Bordeaux.

7 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Spatio-temporal control of gene silencing in vivo.* ARN et cancer, Workshop, Juin 2011, Bordeaux.

8 - Karine Pinel ; Coralie Genevois ; Franck Couillaud. *Contrôle spatio-temporel de l'inhibition de l'expression génique par interférence ARN.* Journée de l'école doctorale des sciences de la vie de Bordeaux Segalen, Avril 2011, Arcachon.

9 - Karine Pinel ; Christelle Debeissat ; Coralie Genevois ; Chrit Moonen ; Franck Couillaud. *Contrôle spatio-temporel de l'inhibition de l'expression génique par interférence ARN*. 6èmes journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Octobre 2010, Toulouse. Prix poster.

Stratégie de publications

Les travaux présentés dans ce manuscrit seront soumis à publication sous la forme de 2 articles :

1 - « *In vivo* imaging of IRES and Cap dependant translated RNA for gene therapy »
Karine Pinel[1] ; Jérôme Lacoste[2] ; Guillaume Plane[2] ; Michel Ventura[3] ; Franck Couillaud[1].
Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex.
1- Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques – CNRS UMR 5536
2- MitoProd, The RNA factory – Plateforme Génomique fonctionnelle
3- Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité – CNRS UMR 5234
En préparation.

2 - « Spatio-temporal control of gene silencing *in vivo* »
Karine Pinel[1] ; Christelle Debeissat[2] ; Coralie Genevois[3] ; Franck Couillaud[1].
Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex.
1- Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques – CNRS UMR 5536
2- Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle – CNRS UMR 5231
3- Unité Mixte de service – CNRS UMS 3428
En préparation.