

Etude structure-fonction de vecteurs synthétiques pour la délivrance de protéines par microscopie corrélative

Laurence Dallet^{1,2*}, Pauline Peuziat^{3,4}, Marion Decossas^{1,2}, Bruno Pitard^{3,4} et Olivier Lambert^{1,2}

¹Univ. Bordeaux, CBMN UMR 5248, Bordeaux INP, IECB, F-33600 Pessac,.

²CNRS, CBMN UMR5248, F-33600 Pessac, France,

³Unité INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291, F-44000 Nantes.

⁴Université de Nantes, Faculté de médecine, L'institut du Thorax, F-44000 Nantes

*l.dallet@cbmn.u-bordeaux.fr; Téléphone : 0540006843; Fax : 0540002200

1. INTRODUCTION

La délivrance de molécules thérapeutiques (ADN, ARN, protéine) nécessite la mise au point de méthode efficace. A ce jour, de nombreuses études se sont intéressées à la vectorisation de l'ADN dans des vecteurs synthétiques à but thérapie génique ou vaccination à ADN [1][2]. Toutefois, la délivrance de protéines thérapeutiques est peu exploitée et jouerait un rôle dans les voies de signalisation intracellulaire. Cependant, cette approche nécessite un développement spécifique du fait que les protéines possèdent une charge électrique, une masse moléculaire élevée et ne franchissent pas spontanément la membrane plasmique. Ainsi, la vectorisation de protéine via des vecteurs synthétiques semble être une nouvelle approche pour certaines pathologies telles que la mucoviscidose.

La mucoviscidose est une maladie génétique récessive dont la plus fréquente mutation sur le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Channel) est présente sur la phénylalanine 508 (F508delta-CFTR). Cette mutation induit une mauvaise conformation de la protéine conduisant à sa rétention et sa dégradation dans le réticulum endoplasmique. Récemment, il a été montré que la kératine 8 (K8), composant des filaments intermédiaires de type II, était impliquée dans la rétention du CFTR en interagissant avec le domaine du CFTR muté [3]. La délivrance intracellulaire d'anticorps anti-K8 pourrait empêcher l'interaction entre K8 et le CFTR muté et ainsi modifier le trafic intracellulaire du CFTR.

2. RESULTATS

2.1 Conditions expérimentales

Un anticorps antiK8-FITC est formulé avec un système lipidique à base de de lipide cationique. Afin d'étudier le trafic intracellulaire de l'anticorps vectorisé par ces lipides cationiques, une approche de microscopie corrélative dite CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy) a été mise en place. Cette technique permet d'étudier une même cellule cultivée sur un support MatTeK (lame quadrillée) en utilisant deux types de microscopies : la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique à transmission.

2.2 Resultats

Des résultats préliminaires ont permis d'identifier et de caractériser la formulation lipidique la plus efficace pour la délivrance intracellulaire de l'anticorps anti-K8. Le complexe formé par DOSP/MM27 et l'anticorps présente une structure unique concentrique multilamellaire en « oignon » d'un diamètre de 100 à 200 nm avec la protéine à la surface.

Après avoir optimisé les ratios protéine/lipides, l'anticorps est internalisé efficacement dans des cellules HeLa et se distribue dans la cellule au niveau des filaments. Des coupes ultrafines (50 nm) de ces cellules contenant l'anticorps sont observées par microscopie électronique. Des premiers résultats encourageants montrent la présence de structures multilamellaires dans les cellules associés aux anticorps ce qui nous permet de corrélater la délivrance intracellulaire de l'anticorps à l'internalisation, validant la faisabilité de cette étude. Des études visant à identifier les voies d'internalisation et le trafic intracellulaire sont en cours pour approfondir les mécanismes d'action de l'anticorps notamment son association aux filaments intermédiaires.

3. CONCLUSION

Ce travail méthodologique permet d'analyser et de mieux comprendre les mécanismes de délivrance de protéines thérapeutiques. La méthodologie sera transposée sur des cellules HeLa exprimant le CFTR sauvage et le CFTR muté afin d'analyser la localisation du CFTR.

REFERENCES

- [1] D. McIlroy, B. Barteau, J. Cany, P. Richard, C. Gourden, S. Conchon, and B. Pitard, "DNA/Amphiphilic Block Copolymer Nanospheres Promote Low-dose DNA Vaccination," *Mol. Ther.*, vol. 17, no. 8, pp. 1473–1481, Aug. 2009.
- [2] O. Le Bihan, R. Chevre, S. Mornet, B. Garnier, B. Pitard, and O. Lambert, "Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 4, pp. 1595–1609, Mar. 2011.
- [3] J. Colas, G. Faure, E. Saussereau, S. Trudel, W. M. Rabeh, S. Bitam, I. C. Guerrero, J. Fritsch, I. Sermet-Gaudelus, N. Davezac, F. Brouillard, G. L. Lukacs, H. Herrmann, M. Ollero, and A. Edelman, "Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 3, pp. 623–634, Feb. 2012.