

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT**

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :

Lucie PIGEON

soutenue le : **20 Décembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Interactions moléculaires et cellulaires entre
les protéines E3-14.7K, FIP-1 et les
microtubules :
Application dans le transfert de gènes**

THÈSE dirigée par :

Chantal PICHON
Patrick MIDOUX

Professeur d'Université, Orléans
Directeur de recherche INSERM, Orléans

RAPPORTEURS :

Daniel SCHERMAN
Jean-Serge REMY

Directeur de recherche CNRS, Paris
Directeur de recherche CNRS, Strasbourg

JURY

Karim BENIHOUD
Marc BOUDVILLAIN
Patrick MIDOUX
Chantal PICHON
Jean-Serge REMY
Daniel SCHERMAN
Ernst WAGNER

Professeur d'Université, Paris-Sud
Directeur de recherche CNRS, Orléans, Président du jury
Directeur de recherche INSERM, Orléans
Professeur d'Université, Orléans
Directeur de recherche CNRS, Strasbourg
Directeur de recherche CNRS, Paris
Professeur d'Université, Munich

Sommaire

Liste des abréviations	6
INTRODUCTION	10
Généralités.....	12
CHAPITRE I : THERAPIE GENIQUE ET VECTEURS NON VIRAUX	13
I-LA THERAPIE GENIQUE	13
I.1 : Principe et définition	13
I.2 : Les applications de la thérapie génique	13
Une stratégie thérapeutique en constante évolution	13
L'exemple de la Dystrophie Musculaire de Duchenne	14
Applications aux maladies polygéniques	17
I.3 : Les succès de la thérapie génique.....	18
I.4 : Les vecteurs viraux en thérapie génique	19
I.4.2 : Limites d'utilisation des vecteurs viraux.....	21
Taille de l'insert	21
Immunogénicité	22
Oncogénicité	23
Bioproduction.....	23
II-LES METHODES NON VIRALES DE TRANSFERT DE GENES	24
II.1 : Injection d'acides nucléiques dits nus	24
Injection intratissulaire	24
Injection hydrodynamique	25
II.2: Méthodes physiques	26
Biolistique	26
Electroporation.....	27
Magnetofection	27
Sonoporation	28
II.3 : Vecteurs synthétiques ou chimiques	28

II.3.1: Les liposomes cationiques	30
Lipoplexes	31
II.3.2: Les polymères cationiques.....	32
Polyplexes	32
Dissociation des polyplexes	33
II.3.3 : Lipopolyplexes.....	34
III-TRANSFERT DE GENES ET BARRIERES INTRACELLULAIRES.....	35
III.1 : Les barrières intracellulaires.....	35
III.2 : Endocytose	36
III.2.1 : Lipofection	37
III.2.2 : Polyfection	37
III.3 : Echappement des endosomes	38
III.3.1 : Polyplexes	38
III.3.2 : Lipoplexes.....	39
III.4 : Trafic cytosolique	41
III.5 : Importation nucléaire.....	41

CHAPITRE II : AMELIORATION DU TRAFIC CYTOSOLIQUE	43
I-TRAFIC CYTOSOLIQUE	43
Transport endosomal	43
ADNp nu	44
Virus	45
II-DYNEINE : PROTEINE MOTRICE DES MICROTUBULES	45
II.1 : Microtubules.....	45
Structure	45
Dynamique des microtubules.....	46
Fonction des microtubules	48
II.2 : Dynéine	49
II.2.1 : Différentes isoformes.....	49
II.2.2 : Dynéine cytosolique 1	49
II.2.2.1 : Structure et composition.....	49

II.2.2.2 : Interactions.....	51
Interaction avec les microtubules	51
Interaction avec la dynactine.....	51
Interactions via les chaînes légères	52
II.2.2.3 : Dynamique	54
II.2.2.4 : Fonction.....	56
II.3 : Dynéine et trafic des virus	56
Adénovirus.....	57
Herpès virus.....	58
Virus et chaîne légère de la dynéine.....	58
III-DYNEINE & TRANSFERT NON VIRAL DE GENES.....	59
III.1 : Interaction avec les chaînes légères de la dynéine	59
DLC-AS de LC8.....	59
Interaction avec TCTEX-1	60
III.2 : Interaction avec NFκB.....	61
III.3 : Utilisation de l'héxon de la capsid adénovirale	62
CHAPITRE III : LA PROTEINE D'ADENOVIRUS E₃-14.7K, FIP-1 ET LES MICROTUBULES	63
I-GENERALITES SUR LES ADENOVIRUS HUMAINS	63
Infection adénovirale	64
Génome adénoviral	65
Les protéines de la phase précoce	66
Les protéines E ₃	67
II-LA PROTEINE E₃-14.7K	69
II.1 : Structure	69
II.2 : Activité biologique	70
Effet protecteur de la mort cellulaire induite par TNFα	71
Implication dans la voie NFκB.....	71
Effet protecteur de l'apoptose induite par TRAIL	73
Effet protecteur de l'apoptose induite par Fas.....	73

Acide arachidonique	74
Interaction avec le facteur inducteur d'apoptose	74
II.3 : Les protéines FIPs	75
FIP-2	76
FIP-3	77
FIP-4	78
II.4 : La protéine FIP-1	78
Une GTPase homologue de Ras	78
Structure	79
Interaction avec E3-14.7K	80
Interaction avec Dynéine	80
PROJET	81

Résultats Partie I Etude des interactions entre E3-14.7K, FIP-1 et les microtubules in cellulo et identification du peptide P79-98 responsable de la fixation sur la protéine FIP-1..... 82

I-LES TECHNIQUES BASEES SUR LE TRANSFERT D'ENERGIE.....	84
I.1 : La technique de FLIM-FRET	84
I.1.1 : Le principe	84
Temps de vie de la fluorescence	84
FRET et temps de vie d'une molécule fluorescente	85
FLIM-FRET	86
I.1.2 : Mesure du temps de vie d'une molécule fluorescente	87
Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)	87
Préparation des analyses in cellulo	88
I.1.3 : Exemple de mesure FLIM-FRET	89
I.2 : La technique de FRET par photoblanchiment de l'accepteur.....	90
I.3- La technique de BRET.....	91
I.3.1 : Le principe	91
I.3.2 : BRET et interaction protéine protéine	92

I.3.3 : Le BRET comme technique de criblage.....	93
Courbe de Saturation	93
Compétition.....	94
II- RESULTATS : “Interaction of adenoviral E3-14.7K with microtubules network: identification of P79-98 peptide derived from E3-14.7K which interacts with FIP-1 and mediates cell cycle arrest.”	94

Résultats Partie II Utilisation du peptide P79-98 dans le transfert non viral de gènes 1377

I- COUPLAGE PEPTIDE / ADNp 138

II- RESULTATS : “Enhancement of polyplexes transfection efficiency by the use of P79-98 peptide from E3-14.7K that promotes a microtubules-mediated transport of plasmid DNA.”140

Conclusion Perspectives 167

I-ETUDE DES INTERACTIONS E3-14.7K / FIP-1 ET LES MICROTUBULES168

II- UTILISATION DU PEPTIDE P79-98 DANS LE TRANSFERT DE GENES.....170

Optimisation de la méthode de couplage ADNp/peptide171

Synergie avec signal d’importation nucléaire 3NF 172

Applications dans les méthodes physiques de transfert de gènes 173

Cellules différenciées – Taille des plasmides 174

Références bibliographiques 176

Liste des abréviations

AAV	: Adeno associated vector
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
ADNp	: ADN plasmidique
ADP	: Adenovirus Death Protein
AFM	: Association Française contre les Myopathies
AIF	: facteur inducteur d'apoptose
ALD	: Adrénoleucodystrophie
ANSM	: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AON	: Oligoribonucléotide anti-sens
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARP1	: Actin-related protein
as	: Anti-sens
ASFV	: Virus de la peste porcine africaine
ATP	: Adénosine TriPhosphate
bio	: Biotine
BCA	: Bicinchoninic acid
BGSC	: Bis-guanidium-spermidine-cholesterol
BGTC	: Bis-guanidium-tren-cholesterol
BPF	: Bonnes Pratiques de Fabrication
BPEI	: PEI branchée
BRET	: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CBM	: Centre de Biophysique Moléculaire
CLIP ₁₇₀	: cytoplasmic linker protein
CFTR	: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Cl-	: Ions chlorure
CLSM	: Confocal laser scanning microscopy
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	: Cytomégalovirus
CTL	: Lymphocytes T cytotoxiques
Da	: Dalton

DC-Chol	: 3β[N-(n',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol
Dcyto	: Constante de diffusion dans le cytoplasme
DD	: Death domain –Domaine de mort
DDAB	: DimethylDioctadecylAmmonium Bromide
DED	: Death Effector Domain
DHC	: Dynein Heavy Chain
Dhc1a	: Dynéine cytoplasmique 1
Dhc1b	: Dynéine cytoplasmique 2
DISC	: Death Inducing Signaling Complex
DLC-AS	: Dynein Light Chain Association Sequence
DMD	: Dystrophie musculaire de Duchenne
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPE	: Dimethyl diMyristoyl PhosphatidylEthanolamine
DMRIE	: 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium bromide
DODAC	: Dioctadecyldimethylammonium chloride
DOGS	: Dioctadecylamidoglycyl-spermine
DOPC	: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	: Dioleoylphosphatidylethanolamine
DOSPA	: 2,3-dioleyloxy-N-[2(spermine carboxaminino)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DOTA	: 1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)propane
DOTIM	: 1-[2-(9(Z)-octadecenoyloxy)-ethyl]-2-(8(Z)-heptadecenyl)-3-(2-hydroxyethyl)-imidazolinim chloride
DOTMA	: N-[1-(2, 3-dioleyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
DSP	: Dithiobis(succinimidylpropionate)
D-SPM	: Dextran-spermine
DsRed	: Discosoma Red Fluorescent Protein
DTBP	: Diméthyl-3,3'-dithiobispropionimide
DTS	: DNA nuclear Targeting Sequences
D _w	: Constante de diffusion dans l'eau
Dyh1	: Dynéine cytoplasmique 1
Dyh2	: Dynéine cytoplasmique 2
DYNC1LI	: Dynein Light Intermediate Chain
DYNC1I	: Dynein Intermediate Chain
DYNLL	: Dynein Light Chain LC8

DYNLRB	: Dynein Light Chain RoadBlock
DYNLT	: Dynein Light Chain TCTEX-1/TCTEL1
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EphA2	: Ephrin type-A receptor 2
ESE	: Exonic Splicing Enhancer
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FADD	: Fas-associated Death Domain
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Food and Drug Administration
FIP	: Fourteen.7k Interacting protein
FIX	: Facteur de coagulation hépatique IX
FLICE	: FADD-Interleukin 1 β Converting Enzyme
FLIM	: Fluorescence Lifetime Microscopy
FRAP	: Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	: Förster resonance energy transfer
GDP	: Guanosine DiPhosphate
GFP	: Green fluorescent protein
GIP-1	: GTPase-interacting protein
GRMD	: Golden retriever muscular dystrophy
GSK	: GlaxoSmithKline
GTP	: Guanosine TriPhosphate
H ⁺	: Protons
HB	: Homogenization buffer
His-IPEI	: Histidylated-IPEI
HIV	: Human immunodeficiency virus
HLA	: Human Leukocyte Antigen
HLV	: Hydrodynamic Limb vein
HSC	: Cellules Souches Hématopoïétiques
HSV	: Virus Herpès Simplex
HSV TK	: Thymidine kinase du
IC ₇₄	: Intermediate Chain 74 kDa
ICS	: Image Correlation Spectroscopy
IKKAP1	: IKK associated protein
IL2RG	: chaîne γ du récepteur de l'interleukine 2
IRF	: Réponse Instrumentale

ITR	: séquences Terminales Répétées Inversées
kb	: Kilo bases
kDa	: Kilo Dalton
kg	: Kilogramme
LC7	: Light Chain 7
LC8	: Light Chain 8
LCA	: Leber's congenital amaurosis
LGMD2B	: Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2B
LIC	: Light Intermediate Chain
LIS1	: Lissencephaly 1
LNA	: Locked nucleic acid
LPD	: Lipid-Polycation-DNA
LPEI	: PEI linéaire
LPR	: Lipid-Polycation-RNA
LTC	: Lymphocytes T cytotoxiques
LTR	: Long Terminal Repeats
MAP	: Protéine Associée aux Microtubules
MLP	: Major Late Promoter
miRNA	: Micro ARN
MT	: Microtubules
MTBD	: Microtubule binding domain
MTOC	: Centre organisateur des microtubules
NRP	: NEMO Related Protein
NEMO	: NFκB Essential Modulator
NLS	: Signal de Localisation Nucléaire
nNOS	: Neuronal nitric oxide synthase
NUDEL	: NUDE-like
OTCD	: Ornithine TransCarboxylase Deficiency
PAGA	: Poly(A-(4-aminobutyl)-L-acide glycolique)
PAMAM	: Poly(amidoamine)
pB	: Photoblanchiment
pDMAEMA	: Poly(2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate)
PEG	: Poly(Ethylène)Glycol
PEI	: Poly(EthylèneImine)
PEIC	: Poly(EthylèneImine) bisCarbamate

PHP	: Poly(4-hydroxy-L-proline ester)
pHPMA	: Poly(N-2-hydroxypropylméthacrylamide)
Pi	: Phosphate inorganique
PLGA	: Poly(D,L-acide lactique co-glycolique)
PLL	: Poly(L-lysine)
PNA	: Peptide Nucleic Acid
PPA	: Poly(phosphoramidate)
PPE	: Poly(phosphoester)
PPE-EA	: Poly(2-aminoéthyle propylène phosphate)
PPI	: Poly(propylenimine)
PPZ	: Poly(phosphazene)
PV	: Papillomavirus
PVP	: Poly(N-vinylpyrrolidone)
Qdot	: Quantum Dots
RCC1	: Regulator Chromosome Condensation
RE	: Reticulum endoplasmique
RID α	: Internalisation et Dégradation Récepteur
RIP	: Receptor-Interacting Protein
RPE65	: Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa
ROI	: Region of interest
RPP	: Phosphoprotéine rabique
RRAGA	: Ras-related GTP-binding protein A
RZZ	: Rod-ZW10-Zwilch
s	: Sense
SAINT-4	: Dioleilmethylpyridinium chloride
SCID-X1	: Severe Combined Immune Deficiency
siRNA	: Small interfering RNA
SPAD	: Single Photon Avalanche Diodes
SS-PAEI	: Poly(amido éthylènimine)
STR	: Streptavidine
SV	: Simimian virus
TCTEX-1	: T-Complex <i>Testis</i> -Expressed-1
TCSPC	: Time-Correlated Single Photon Counting
td-Tomato	: Tandem dimer Tomato
TETA	: Triéthylènetetramine

TK	: Thymidine kinase
TNF	: Tumor necrosis Factor
TNFR	: Tumor necrosis Factor Receptor
TP	: Protéine Terminale
TRADD	: TNF-Receptor associated Death Domain
TRAF	: TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLM	: Vaincre La Mucoviscidose
VV	: Virus de la vaccine
ZW ₁₀	: Zest White 10

INTRODUCTION

"Si on considère le but d'un médicament comme étant la restauration d'une fonction particulière du corps, alors l'ADN doit être tenu comme le médicament absolu"

[Aphosian, 1970].

Depuis la fin des années 1980, la thérapie génique apparaît comme une stratégie thérapeutique au potentiel révolutionnaire dans le traitement d'un grand nombre de maladies qu'elles soient d'ordre génétiques ou non. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et des gènes impliqués dans l'apparition et le développement de certaines pathologies a élargi les applications de la thérapie génique aux maladies polygéniques. La thérapie génique s'attaque ainsi désormais à un large éventail de pathologies tout en se focalisant toutefois principalement sur le traitement des cancers. Les vecteurs chargés de délivrer efficacement des gènes thérapeutiques aux cellules sont majoritairement des virus modifiés. Malgré des essais cliniques de thérapie génique employant des vecteurs viraux mis en place depuis plus de 20 ans, la FDA (Food and Drug Administration) et l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) n'ont jusqu'à aujourd'hui autorisé la commercialisation d'aucun traitement. En effet les traitements viraux de thérapie génique posent toujours des problèmes majeurs de sécurité sanitaire. Les vecteurs non viraux basés sur l'utilisation de lipides ou polymères cationiques sont parallèlement activement développés et représentent une alternative aux vecteurs viraux.

L'efficacité des différents vecteurs chimiques réside dans leur capacité à franchir les différentes barrières qui s'opposent au transfert de gènes. En effet, pour que le transfert de gènes soit efficace, le gène thérapeutique doit franchir des barrières biologiques extra- et intracellulaires pour atteindre le noyau des cellules cibles. Parmi ces barrières, le trafic cytosolique est un élément clé de l'efficacité du transfert de gènes. Au cours de mon projet de thèse je me suis intéressée à l'amélioration du trafic cytosolique d'un ADN plasmidique transféré par des vecteurs non viraux. La stratégie exposée dans ce manuscrit s'inspire de la capacité des virus à exploiter le mouvement de la dynéine, protéine motrice des microtubules, pour rejoindre activement le noyau des cellules infectées. Notre stratégie a consisté à identifier puis à exploiter un motif peptidique de la protéine E3-14.7K

d'Adénovirus connue pour interagir avec la chaîne légère de la dynéine TCTEL₁ *via* la protéine cytosolique FIP-1.

Dans une première partie de ce manuscrit je présenterai tout d'abord les différents types de vecteurs non viraux employés en thérapie génique (Généralités – Chapitre I). J'évoquerai ensuite le trafic cytosolique dans le cadre du transfert non viral de gènes et les stratégies s'inspirant des virus ayant pour but de l'améliorer (Généralités – Chapitre II). Dans une dernière partie des généralités, je me suis intéressée à la protéine E3-14.7K d'Adénovirus dont nous souhaitons exploiter l'interaction avec la dynéine (Généralités – Chapitre III). Les résultats obtenus sont présentés sous la forme de deux manuscrits rédigés en anglais :

- « Interaction of adenoviral E3-14.7K with microtubules network: identification of P79-98 peptide derived from E3-14.7K which interacts with FIP-1 and mediates cell cycle arrest. » qui est soumis à la publication dans la revue J. Cell Science.
- « Enhancement of polyplexes transfection efficiency by the use of P79-98 peptide from E3-14.7K that promotes a microtubules-mediated transport of plasmid DNA » qui est accepté à la publication dans la revue Small.

Enfin une conclusion générale permettra d'établir le bilan des résultats obtenus et d'évoquer les perspectives de travail suite à mes résultats.

Généralités

CHAPITRE I :

THERAPIE GENIQUE ET VECTEURS NON VIRAUX

I- LA THERAPIE GENIQUE

I.1 : Principe et définition

La thérapie génique est le transfert, véhiculé ou non par un vecteur, de molécules d'acides nucléiques à visée thérapeutique dans les cellules d'un patient atteint d'une pathologie d'ordre génétique ou non. Les acides nucléiques utilisés en thérapie génique peuvent être des ADNs (Acide DésoxyriboNucléique) ou ARNs (Acide RiboNucléique), les vecteurs chargés de les délivrer aux cellules sont majoritairement de type viral ou chimique (lipides, polymères). Le transfert d'acides nucléiques est appelé transfection ou transduction. L'expression génique de ces cellules s'en trouve modifiée afin de prévenir, stopper ou reverser une pathologie d'origine génétique ou non. Le transfert d'acides nucléiques nu est peu efficace et très variable selon les types cellulaires. Le succès de la thérapie génique repose donc sur deux éléments cruciaux et d'importance égale : la nature de la molécule d'acide nucléique thérapeutique et le vecteur.

Depuis 1990 près de 1500 essais cliniques utilisant des vecteurs viraux ou chimiques ont été approuvés à travers le monde [www.wiley.co.uk]. Pour la plupart d'entre eux, le transfert d'acides nucléiques est réalisé *ex vivo* sur des cellules préalablement prélevées au patient. Les cellules génétiquement modifiées lui sont ensuite réimplantées, on parle alors de thérapie génique cellulaire. Considérée comme une stratégie séduisante mais particulièrement délicate en ce qui concerne le ciblage, la dose et la voie d'administration, le transfert de gènes *in vivo* reste envisagé et représente l'un des défis majeur pour la thérapie génique.

I.2 : Les applications de la thérapie génique

Une stratégie thérapeutique en constante évolution

L'objectif initial de la thérapie génique est de restaurer l'expression d'un gène

fonctionnel dans un organisme pour corriger un déficit monogénique tel que la Mucoviscidose ou la Dystrophie Musculaire de Duchenne. La thérapie génique avait alors pour but d'outrepasser les multiples inconvénients liés à l'administration directe de protéines recombinantes thérapeutiques tels qu'une faible biodisponibilité, une forte toxicité systémique, une instabilité *in vivo* et une bioproduction difficile et onéreuse.

Aujourd'hui, les applications liées à la thérapie génique dépassent le cadre unique du transfert de gènes pour le traitement des maladies monogéniques [Martini *et al.*, 2011; Bordignon *et al.*, 1995; Welsh *et al.*, 1999]. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et des gènes impliqués dans l'apparition et le développement de certaines pathologies réoriente la thérapie génique sur l'utilisation d'acides nucléiques autres que l'ADNc codant une protéine tels que l'ARN, siRNA (Small interfering RNA), des petits ADN anti-sens ou encore miRNA (microRNA) au potentiel thérapeutique. La thérapie génique bascule ainsi vers une notion plus large de thérapie basée sur l'utilisation des acides nucléiques comme médicament.

L'exemple de la Dystrophie Musculaire de Duchenne

Cette évolution de la thérapie génique s'illustre parfaitement avec l'exemple de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). La DMD est une maladie génétique musculaire mortelle et incurable provoquée par la mutation du gène de la dystrophine [Hoffman *et al.*, 1987; Koenig *et al.*, 1987]. Cette protéine est impliquée dans le maintien de la fibre musculaire. Les différentes mutations du gène entraînent soit un déficit de la synthèse de dystrophine, soit une altération de cette dernière la rendant moins fonctionnelle. La séquence codante humaine de la dystrophine résulte de 79 exons et se traduit par un ADNc (ADN complémentaire) de très grande taille (14kb) [Kunkel *et al.*, 2005]. La taille du gène thérapeutique est un paramètre critique pour l'utilisation des vecteurs viraux (Chapitre I - I.4.2 : Limites d'utilisation des vecteurs viraux), des stratégies alternatives ont alors été mises en place après des études génétiques et phénotypiques de grande envergure permettant de mieux comprendre les différentes "versions" de la maladie [Gillard *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1989; England *et al.*, 1990; Beggs *et al.*, 1991].

Ces études, notamment celles concernant la Dystrophie Musculaire de Becker, révèlent que la délétion d'une grande partie du gène de la dystrophine a peu de conséquences phénotypiques tant que les parties cruciales restent dans le même cadre de

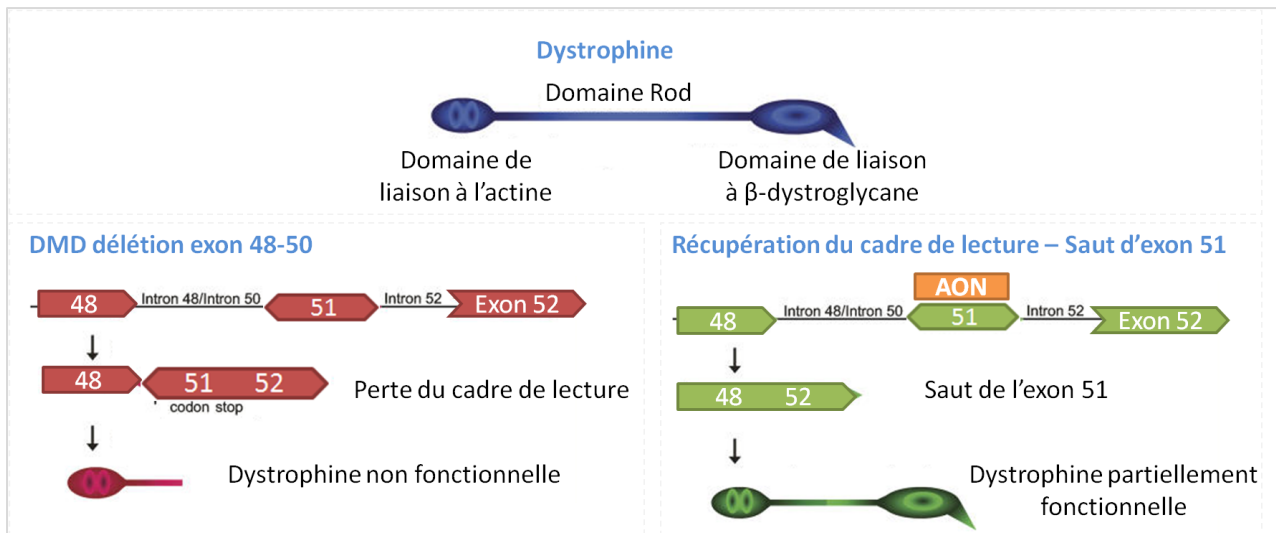


Figure 2 : Explication schématique de la stratégie du saut d'exon dans le cas de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Dans le cas de la DMD, le cadre de lecture est perdu (dans cet exemple par délétion des exons 48–50, qui est la mutation la plus fréquente chez les patients), aboutissant à une dystrophine tronquée. Un oligoribonucléotide anti-sens (AON) peut être utilisé afin de retrouver le cadre de lecture (cadre du bas). Des AONs spécifiques peuvent s'hybrider à l'exon 51 aboutissant ainsi à son épissage de même que les deux introns qui l'encadrent. Le cadre de lecture retrouvé permet la synthèse d'une dystrophine tronquée mais fonctionnelle. Adapté de [Aartsma-Rus *et al.*, 2007].

Un oligonucléotide 2'-O-methylphosphorothioate (PRO051) développé par la société Prosensa et un oligonucléotide de type morpholino ARN (AVI-4658) développé par le laboratoire GSK (GlaxoSmithKline) sont destinés à environ 13 % des patients souffrant de DMD dont l'effet délétère peut être corrigé par saut de l'exon 51 (**Figure 2**). PRO051 a fait l'objet d'un essai clinique chez l'homme de phase I/II au cours duquel 12 jeunes garçons ont reçu une fois par semaine, pendant 48 semaines, une injection systémique de PRO051 à une dose de 6 mg/kg [Goemans *et al.*, 2011 ; Cirak *et al.*, 2011]. Le traitement permet une amélioration des capacités motrices des patients mesurée par le « test de marche durant six minutes ». Un essai de phase III incluant un groupe sous placebo est actuellement en cours. Prosensa développe cinq autres oligonucléotides anti-sens sur les exons 44, 45, 52, 53 et 55 du gène de la dystrophine permettant d'élargir à 41% le nombre de patients traitables.

Un autre domaine prometteur appliqué dans le traitement de la DMD est l'identification de modificateurs géniques. La surexpression de la follistatine, inhibiteur naturel du facteur de transcription myostatine agissant ainsi comme un stimulateur de la croissance musculaire, permet de réduire les myopathies chez la souris et les primates [Wagner *et al.*, 2002; Kota *et al.*, 2009].

Applications aux maladies polygéniques

Du fait de ces alternatives thérapeutiques, la thérapie génique de maladies polygéniques est actuellement en cours de développement pour le traitement des maladies cardiovasculaires [Baumgartner *et al.*, 2001], de l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes [Evans *et al.*, 2000; Seroogy & Fathman, 2000], ainsi que certaines pathologies du système nerveux central [Giordano *et al.*, 2008] ou d'origine virale [Bushschacer & Wong-Staal, 2001; Tsygankov *et al.*, 2009].

La thérapie génique s'attaque ainsi à un large éventail de pathologies tout en se focalisant toutefois principalement sur le traitement des cancers. Ainsi en 2012, 39 essais cliniques ont été nouvellement approuvés dans le monde ciblant principalement le cancer (64,4%), les maladies monogéniques ne représentant que 8,7%. La thérapie génique permet de combattre l'apparition et le développement du cancer par plusieurs fronts :

- Diverses stratégies [Koom *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2010], ont été utilisées comme le transfert d'un gène suppresseur de tumeur (comme par exemple p53). A l'inverse, d'autres stratégies s'intéressent à l'inactivation de gènes inducteurs de tumeur en utilisant la technologie anti-sens pour bloquer l'ARN messager (ARNm) d'un proto-oncogène [He *et al.*, 2010].

- Les tissus sains ou tumoraux peuvent être sensibilisés par modification de l'index thérapeutique de certaines drogues tout en essayant de préserver les tissus sains avoisinants, c'est la stratégie du gène suicide. Le système le plus utilisé à ce jour est celui de la thymidine kinase du virus herpès simplex (HSV TK). Le principe repose sur la transfection des cellules cibles (cancéreuses) avec le gène codant la HSVTK. Dans un deuxième temps, la prodrogue (le ganciclovir) non toxique administrée par voie systémique est catalysée en drogue active et cytotoxique, ganciclovir monophosphate, au niveau des cellules exprimant la TK [Su *et al.*, 2012]. Un effet "bystander" permet à la drogue de diffuser au-delà des cellules transfectées.

- L'immunothérapie anti-tumorale a pour but de modifier la spécificité de la réponse immunitaire anti-tumorale soit en stimulant les processus conduisant à la reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire de l'hôte [Gilboa & Vieweg, 2004 ; Chen *et al.*, 2010)], soit en améliorant les propriétés cytotoxiques des lymphocytes.

- Certaines stratégies se focalisent sur le réseau vasculaire de la tumeur. Par exemple, on délivre dans l'environnement immédiat de la tumeur un gène codant pour un inhibiteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) responsable de la néoangiogenèse tumorale [Favaloro *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012].

I.3 : Les succès de la thérapie génique

Après un premier essai en 1993, c'est en 2000 qu'a lieu le premier grand succès de la thérapie génique. Cet essai clinique français s'attaque au traitement chez l'enfant d'un grâve déficit immunitaire appelé SCID-X1 (Severe Combined Immune Deficiency) provoqué par la mutation du gène codant pour la chaîne γ du récepteur de l'interleukine 2 (IL2RG). Le transfert du gène de la chaîne γ c (commune à de nombreux récepteurs cytokine) dans des cellules souches hématopoïétiques CD34+ a permis le traitement efficace d'enfants atteints par cette maladie génétique [Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000]. Le succès était cependant partiel puisque que 4 enfants sur 10, pour l'essai clinique français, et 1 enfant sur 10, pour un essai clinique similaire réalisé en Angleterre, ont déclarés une leucémie [Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008].

En 2008, trois protocoles thérapeutiques apportent des résultats positifs dans le traitement de la LCA (Leber's Congenital Amaurosis) chez l'homme [Bainbridge & Ali *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008]. La stratégie consiste en des injections subrétinales répétées de faibles doses de vecteur AAV (Adeno Associated Vector) de sérotype 2 qui permettent d'éviter toute réponse immune importante contre le vecteur [Barker *et al.*, 2009]. Ce vecteur permet l'expression de la protéine RPE65 (Retinal Pigment Epithelium-specific 65 kDa). Les patients traités recouvrent une sensibilité à la lumière, et dans certain cas une partie de la vision. Des études supplémentaires montrent qu'un an après le traitement est toujours efficace [Cideciyan *et al.*, 2009]. De plus, les bénéfices visuels de ce traitement sont d'autant plus importants lorsqu'il est réalisé chez de jeunes enfants [Maguire *et al.*, 2010].

Des résultats prometteurs ont été obtenus chez le chien pour le traitement de l'hémophilie B. L'utilisation d'un vecteur AAV2 (Adeno associated vector serotype 2) a permis le transfert du gène codant pour FIX (Facteur de coagulation hépatique IX) et son expression stable pendant plus de 8 ans [LoDuca *et al.*, 2009; Niemeyer *et al.*, 2009]. Cet

effet thérapeutique n'a pas encore été atteint chez l'homme à cause de réactions immunitaires liées à la présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre la capside du sérotype 2 d'AAV chez l'homme [Manno *et al.*, 2006; Mingozzi *et al.*, 2007]. Un AAV de sérotype 8 de moindre séroprévalence chez l'homme a été utilisé lors d'un essai clinique de phase I/II conduit chez l'homme en 2011. Les problèmes de réponse immunitaire apparaissent comme le problème majeur de cet essai. Les résultats rapportent toutefois une expression sur le long terme du transgène FIX à un niveau thérapeutique chez des patients atteints d'hémophilie B sévère [Nathwani *et al.*, 2011].

De nouveaux vecteurs, lentivirus dérivés du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), permettent de meilleurs taux de transfection des HSCs (Cellules Souches Hématopoïétiques) associés à une expression élevée du transgène. Ces paramètres ont rendu possibles la thérapie génique pour la β -thalassémie [May *et al.*, 2000; Pawliuk *et al.*, 2001]. Les résultats d'un essai clinique français sont prometteurs, en effet un patient n'a pas eu besoin de transfusion sanguine pendant plus de 16 mois après le traitement [Kaiser, 2009].

Un autre grand succès de la thérapie génique concerne le traitement de l'adrénoleucodystrophie (ALD). L'ALD est une maladie neurodégénérative sévère liée à l'X qui touche les garçons entre 5 et 12 ans. Elle est causée par une mutation au niveau du gène ABCD1 codant pour la protéine ALD, elle entraîne la démyélinisation du système nerveux central. En 2009 un essai clinique français a permis le transfert *ex vivo* d'une copie saine du gène ABCD1 à l'aide d'un vecteur lentiviral dans des cellules hématopoïétiques CD34+[Cartier *et al.*, 2012]. Seize mois après la réimplantation des cellules l'imagerie du cerveau des quatre enfants traités montre l'arrêt de la démyélinisation cérébrale. Aujourd'hui, plusieurs années après le traitement trois d'entre eux ont une vie et une scolarité normale [ELA, 2012].

I.4 : Les vecteurs viraux en thérapie génique

Les virus sont les vecteurs « historiques » de la thérapie génique, utilisés depuis plus de trente ans ils sont à l'origine de ses principaux succès. Si des stratégies alternatives non virales sont de plus en plus étudiées, les vecteurs viraux représentent encore à l'heure actuelle plus de 65% des vecteurs employés (**Figure 3**).

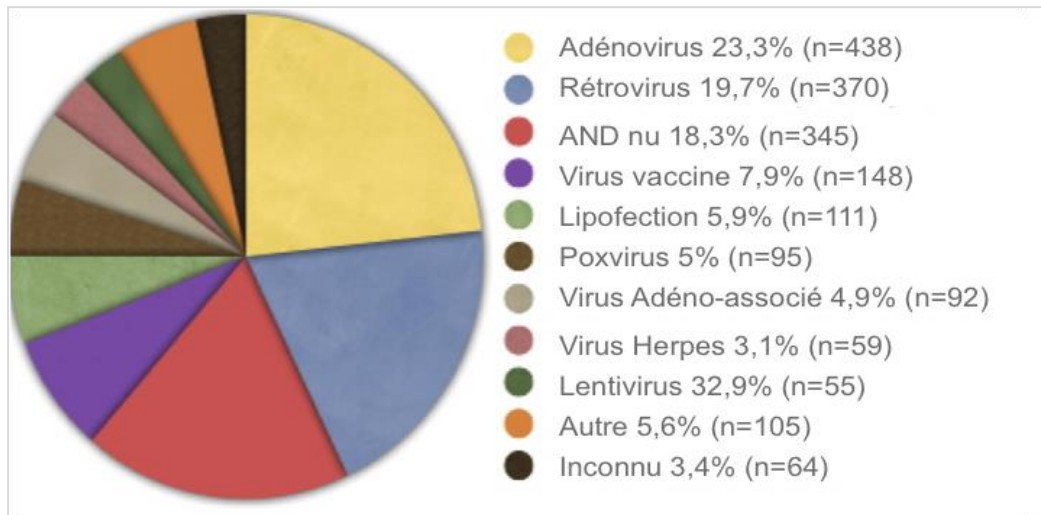


Figure 3 : Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique en 2012. Les vecteurs viraux représentent 66,8% des vecteurs employés. Les stratégies non virales sont représentées par la lipofection et le transfert d'ADN nu et représentent 24,2%. Adapté de [Journal of Gene Medicine, 2012].

I.4.1 : Les différents vecteurs viraux

L'exploitation de la capacité naturelle des virus à délivrer leur information génétique (ADN ou ARN) afin d'administrer un gène dans un but thérapeutique fut envisagée à l'aube du génie génétique et de la biologie moléculaire [Tatum, 1966]. Les virus employés pour les protocoles cliniques sont de différents types (**Figure 4**), tous sont des virus recombinants défectifs pour la réplication. Ce résultat est obtenu en supprimant tout, ou partie, des régions codantes du génome viral, mais en laissant intactes les séquences (généralement les séquences répétées terminales) qui sont nécessaires à des fonctions telles que l'emballage du génome dans la capside du virus ou l'intégration de l'ADN viral dans la chromatine hôte. La cassette d'expression de choix est alors clonée dans le squelette viral en place de ces séquences qui ont été supprimées.

Les caractéristiques des principaux vecteurs viraux sont présentées dans le **Tableau 1**. Comme on peut le voir dans ce tableau, aucun vecteur viral n'est idéal. Si les vecteurs intégratifs (rétrovirus, lentivirus) permettent une intégration stable du matériel génétique dans le génome des cellules cibles, le risque de mutations insertionnelles peut être à

l'origine de l'apparition de cancers. Le risque d'apparition de réactions immunitaires sont particulièrement élevés pour l'utilisation des adénovirus et d'HSV-1 alors qu'ils présentent le très grand avantage de pouvoir transférer des inserts de très grandes tailles

Tableau 1 : Les principaux vecteurs viraux.

Vecteur	Matériel génétique	Taille max. insert	Inflammation	Génome viral	Principaux inconvénients	Principaux avantages
<i>Enveloppé</i>						
Rétrovirus	ARN	8 kb	Faible	Intégratif	- Transfecte uniquement les cellules en division - Risque d'oncogénèse	- Transfert de gènes à long terme dans les cellules en division
Lentivirus	ARN	8 kb	Faible	Intégratif	- Risque d'oncogénèse	- Transfert de gènes à long terme dans la plupart des tissus
HSV-1	ADN double brin	40-150 kb	Haute	Episomique	- Risque élevé d'inflammation	- Taille de l'insert très élevée - Tropisme élevé pour les neurones
<i>Non Enveloppé</i>						
AAV	ADN simple brin	<5 kb	Faible	Episomique intégratif	- Taille de l'insert très limitée	- Non inflammatoire et non pathogène
Adénovirus	ADN double brin	8-30 kb	Haute	Episomique	- Risque élevé d'inflammation (capside)	- Très haute efficacité de transfection

Adapté de [Thomas et al., 2003].

I.4.2 : Limites d'utilisation des vecteurs viraux

Taille de l'insert

Selon le vecteur viral la longueur du transgène thérapeutique est variable. Les virus adénoviraux ne posent aucune limite de taille. Les rétrovirus et lentivirus permettent l'insertion de gènes d'une taille inférieure à 7,5kb. Les virus adéno-associés sont les plus restrictifs et ne permettent l'insertion que de petits gènes inférieurs à 3,5kb.

La limite de taille est un paramètre crucial dans le traitement de maladies monogéniques telles que la mucoviscidose (gène CFTR de 7,2kb), la dystrophie musculaire de Duchenne (gène dystrophine de 14kb) dont les gènes mutés sont particulièrement longs. Des stratégies alternatives peuvent être envisagées telles que le saut d'exon, le transfert de gène homologue (Chapitre I - I.2 - L'exemple de la Dystrophie Musculaire de Duchenne) mais qui ne peuvent pas être systématiquement employées. Des stratégies plus complexes et moins efficaces que le transfert de gènes classique comme la concatémérisation d'AAV sont imaginées dans le traitement de la dystrophie des ceintures

LGMD2B (Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2B) où le gène de la dysferline est supérieur à 6,2kb [Lostal *et al.*, 2010].

Immunogénicité

Les problèmes de réponse immunitaire sont considérés comme le "talon d'Achille" de la thérapie génique virale [Nayak *et al.*, 2010]. Les adénovirus sont les vecteurs viraux les plus immunogènes. La capside adénovirale induit le système immunitaire adaptatif déclenchant une réaction immunitaire à médiation cellulaire par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et une réponse immunitaire à médiation humorale par les anticorps neutralisants produits par les lymphocytes B. Les protéines structurales virales peuvent aussi d'entrer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH) et cibler les cellules transduites par des CTLs préexistants [Kafri *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001]. Les autres groupes de vecteurs sont moins inflammatoires et immunogènes, cependant pour ces vecteurs une immunité humorale pré-existante contre les types sauvages de ces virus peut entraîner une réaction immune.

La virulence de ces réponses immunes est une préoccupation majeure des essais cliniques réalisés chez l'homme. En 1999 ces risques se sont malheureusement avérés mortels pour le 18^{ème} et dernier patient d'un essai clinique de phase I dans le traitement de l'OTCD (ornithine transcarboxylase deficiency). Ce patient a reçu l'injection de $3,8 \times 10^{13}$ particules virales (3×10^9 unités de particules infectieuses/kg) par l'artère hépatique droite. Quatre jours après la délivrance du traitement une puissante réponse immunitaire provoque le décès du jeune homme de 18 ans [Lehrman, 1999; Wilson, 2011]. A la lumière de ce cas, le statut immunitaire des participants aux essais cliniques de thérapie génique est scrupuleusement surveillé avant et après l'administration des vecteurs [DNA Advisory Committee, 2002].

Outre les potentielles conséquences tragiques pour les patients, les problèmes d'immunogénicité sont un facteur majeur limitant la réussite de la thérapie génique virale. L'existence de la réponse immunitaire humorale, déclenchée par l'infection virale, limite toute stratégie thérapeutique qui nécessite des injections répétées de vecteurs. Elle diminue de plus l'efficacité de transfert de gènes et peut mener à la destruction des cellules infectées [Kay, 2011].

Oncogénicité

La thérapie génique virale peut mener au développement de cancers suite au phénomène de mutation insertionnelle. Ce phénomène est le fait des rétrovirus et lentivirus dont l'ADN est intégré au génome cellulaire. L'insertion a la capacité d'activer le potentiel transformant d'un gène voisin par différents mécanismes qui impliquent tous les régions non codantes présentes dans les LTR (Long Terminal Repeats) virales qui contiennent des séquences activatrices de la transcription présentes aux deux extrémités du provirus.

L'intégration du génome viral dans la chromatine hôte a longtemps été considérée comme aléatoire. Le risque d'intégration au sein d'une séquence cancérogène était donc très considérée comme très faible de l'ordre de 1 sur 10 millions d'insertions [Stocking *et al.*, 1993]. Une étude a démontré que ce risque n'était pas négligeable et que l'intégration rétrovirale n'est pas aussi aléatoire que l'on pouvait le penser. L'analyse de centaines de sites d'intégration du HIV (dont certains lentivirus sont dérivés) révèle que le génome viral est intégré préférentiellement au sein de gènes transcriptionnellement actifs plutôt que dans des régions non codantes [Schröder *et al.*, 2002].

Ce phénomène a provoqué les cas de leucémies dans l'essai clinique français de la SCID-X1 [Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008]. Des études concernant le site d'intégration du transgène l'ont localisé près de l'oncogène LMO2 [Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003]. L'apparition des cas de leucémies seraient la combinaison de deux phénomènes : la croissance des lymphocytes T traités due à l'expression du transgène et l'activation de LMO2 au sein de ces mêmes cellules. Après l'annonce de ces cas la FDA (Food and Drug Administration) a placé un arrêt temporaire de tous les essais de thérapie génique utilisant des vecteurs rétroviraux dans les cellules souches sanguines en janvier 2003.

Bioproduction

Le défi de la production virale réside en grande partie dans la conception d'infrastructures industrielles adaptées à la manipulation de grandes quantités de virus. En France peu de plateformes et centres permettent la production de vecteurs viraux de grade clinique produits selon les normes de niveau III de biosécurité de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Deux-mille douze marque l'ouverture d'un nouveau centre de

bioproduction : Généthon Bioprod. La mission de Généthon Bioprod sera de fabriquer des candidats thérapeutiques pour des essais cliniques menés en France ou à l'international dans le respect de la réglementation des produits pharmaceutiques.

L'utilisation de vecteurs viraux en thérapie génique pose de sérieux problèmes d'immunogénicité et de cancérogénicité remettant en cause la sécurité des stratégies virales. De surcroît, les limitations concernant la taille du transgène et la production des particules virales représentent des obstacles majeurs à leur utilisation.

II-LES METHODES NON VIRALES DE TRANSFERT DE GENES

Des méthodes de transfert de gènes non virales sont développées en alternative aux virus. Parmi elles on retrouve l'injection d'acides nucléiques non vectorisés (dits nus), des méthodes physiques, et des méthodes chimiques (lipides et polymères cationiques).

II.1 : Injection d'acides nucléiques dits nus

Injection intratissulaire

L'injection d'ADN plasmidique (ADNp) directement dans un tissu sans utilisation d'un agent qu'il soit chimique ou physique permet de transfecter des cellules *in vivo*. Des injections d'ADNp nu dans le muscle squelettique [Wolff *et al.*, 1990] le foie [Hickman *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997] et la peau [Choate *et al.*, 1997] ainsi que des inhalations dans les poumons [Meyer *et al.*, 1995] ont été réalisées et ont conduit à un faible niveau d'expression des gènes transférés. L'ADNp nu étant de grande taille, vulnérable aux nucléases et de nature hydrophile est difficilement internalisable dans les cellules, ceci rend cette méthode difficilement envisageable dans le cadre de la thérapie génique.

Les stratégies qui ont pour ambition d'améliorer cette méthode de transfert de gènes se sont orientées d'abord vers l'utilisation de protéines, ou de substances chimiques, destinées à augmenter l'internalisation de l'ADNp dans les cellules. Le greffage de l'ADNp avec la transferrine *via* un pont streptavidine-biotine a permis l'augmentation de la transfection *in vitro* [Sato *et al.*, 2000]. L'utilisation de solvants, copolymères non ioniques et solutions hypotoniques ont été utilisés comme adjuvants à l'injection. D'autres stratégies tentent de protéger l'ADNp de la dégradation dans l'environnement

extracellulaire en utilisant des inhibiteurs de nucléases et ont démontrées un bénéfice *in vitro* [Ross *et al.*, 1998] et *in vivo* dans le muscle [Walther *et al.*, 2005].

Injection hydrodynamique

L'injection hydrodynamique chez la souris par la veine caudale permet de transfecter l'ADNp au niveau du foie (organe hautement perfusé) avec une efficacité très importante [Zhang *et al.*, 1999]. L'efficacité de transfert de gènes est dépendante de plusieurs paramètres tels que la structure de l'organe, le volume d'injection et la vitesse d'injection. Dans le modèle murin cela consiste à injecter au niveau de la veine de la queue 1,6 à 1,8mL de solution saline contenant l'ADNp pour une souris de 20g (soit 8 à 9% du poids total), dans un temps rapide de 5 secondes. Grâce à cette méthode 30% to 40% des hépatocytes sont généralement transfectés par une injection hydrodynamique de 50 µg d'ADNp [Liu *et al.*, 1999].

Malgré des résultats impressionnants chez la souris cette méthode d'injection représente un défi chez l'homme. La transposition chez l'homme consisterait à injecter un volume de 7,5 L de solution saline (contenant plus de 200 mg d'ADNp) injectée à haute pression. Cette extrapolation démontre les difficultés d'adaptabilité chez l'homme où de plus les pathologies hépatiques sont souvent associées à d'autres problèmes de santé.

Des études de faisabilité sont réalisées chez le gros animal, notamment chez le porc et le chien, pour limiter le volume et la vitesse de l'injection. D'autres stratégies adaptent ce type d'injection à la délivrance au niveau d'un membre. C'est le principe de l'HLV (Hydrodynamic Limb vein). Le traitement de thérapie génique est injectée dans la veine saphène de la jambe après qu'un garrot ait été installé pour bloquer la circulation sanguine au niveau de ce même membre. Cette technique est particulièrement efficace puisqu'elle permet un haut niveau de transfection dans les cellules musculaires squelettiques (> 50%) (**Figure 4**) [Herweijer & Wolff, 2007; Wooddell *et al.*, 2011]. Cette technique a démontré son efficacité dans le traitement de la DMD chez le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) [Qiao *et al.*, 2009].

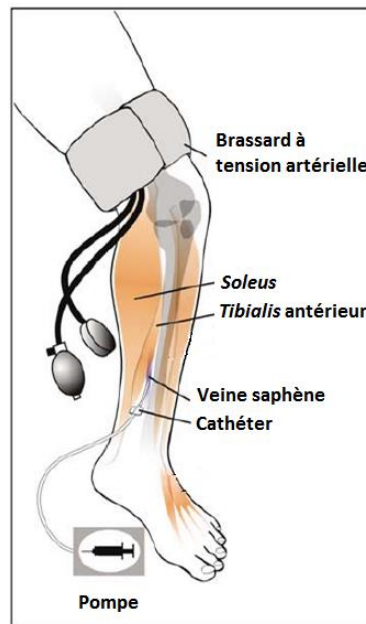


Figure 4 : Procédure de délivrance HLV au niveau de la jambe. Un brassard placé au niveau de la jambe au moment de l'injection de la solution d'ADNp permet l'augmentation de la pression vasculaire. L'ADNp est injecté à l'aide d'un cathéter au niveau de la veine saphène. L'ADNp est distribué uniquement dans le membre isolé. Adapté de [Herweijer₁ & Wolff, 2007].

II.2: Méthodes physiques

Plusieurs stratégies de transfert de gène physique ont été développées ces dernières années pour des applications *in vitro* et *in vivo*. Ces différentes méthodes physiques: méthode mécanique (biolistique ou gene gun), électrique (électroporation), magnétique (magnétofection) ou acoustique (sonoporation) perturbent transitoirement l'organisation de la membrane cellulaire ce qui permet à l'ADN de pénétrer les cellules par diffusion.

Biolistique

La biolistique (aussi appelée gene gun) a été pour la première fois employée chez les plantes [Klein *et al.*, 1992], elle est actuellement la méthode la plus employée pour le transfert de gènes chez les végétaux. Elle est désormais utilisée chez l'homme pour le transfert de gènes au niveau de la peau, des muscles, des tumeurs ou organes exposés suite à une procédure chirurgicale [Muangmoonchai *et al.*, 2002]. Les cellules ou les tissus sont bombardés par des macroparticules de métal (or, tungstène ou argent) enrobées de molécules d'ADN et accélérées grâce à un gaz inerte hautement pressurisé (Hélium). La

pression, la taille des particules, et la fréquence sont des paramètres critiques qui déterminent l'efficacité de la pénétration tissulaire du transfert de gène, et la toxicité [Uchida *et al.*, 2002]. Le problème principal de cette méthode réside dans la pénétration superficielle (seulement quelques millimètres) des particules au sein des tissus traités, ce paramètre limite son utilisation chez l'homme à la peau.

Electroporation

L'électroporation est une méthode physique utilisée pour le transfert de gènes *in vitro* comme *in vivo*, ses applications concernent la plupart des tissus même si la peau et les muscles sont particulièrement concernés [Heller *et al.*, 2005]. De brèves impulsions électriques induisent une perméabilisation transitoire et réversible de la membrane cellulaire qui autorise l'entrée d'ADN au sein de la cellule. L'application des impulsions électriques nécessitent le contact des tissus à traiter avec des électrodes, une procédure chirurgicale préalable est donc indispensable pour atteindre les organes internes. De plus les courants électriques de hauts voltages peuvent provoquer des dommages irréversibles aux tissus traités, cette technique reste invasive et quelque peu toxique.

Magnétofection

La magnétofection est l'usage de forces magnétiques pour faciliter l'apport des acides nucléiques aux cellules cibles. Elle a permis *in vitro* d'augmenter jusqu'à plusieurs centaines de fois l'efficacité de transfection aussi bien pour le transfert de gènes viral que non viral [Scherer *et al.*, 2002; Krotz *et al.* 2003]. Une augmentation de l'efficacité de transfert de divers vecteurs viraux et non viraux a également été observée *in vivo* dans la zone gastro-intestinale et dans les vaisseaux sanguins mais aussi dans l'épithélium des voies aériennes [Scherer *et al.*, 2002 ; Xenariou *et al.*, 2006]. D'un point de vue pratique le vecteur utilisé est associé à des nanoparticules superparamagnétiques et le transfert est ciblé en appliquant un champ magnétique qui va permettre de concentrer le vecteur dans une zone d'intérêt. Il a été montré *in vitro*, sur différentes lignées cellulaires, et en utilisant un vecteur à base de PEI couplé à des nanoparticules superparamagnétiques (magnétofectine), que la magnétofection agit en accélérant la sédimentation des magnétofectines à la surface des cellules et non en agissant sur l'endocytose qui est le mécanisme d'entrée dans la cellule des vecteurs à base de PEI (poly(éthylénimine)) [Huth *et al.*, 2004].

Sonoporation

La sonoporation est basée sur l'utilisation d'ultrasons couplés à des microbulles de gaz. Les ultrasons, en tant qu'ondes mécaniques, permettent l'oscillation de microbulles de gaz suivant les phases de compression et d'expansion. L'interaction des microbulles avec la cellule suivie de leur oscillation va induire une perméabilisation de la membrane plasmique et permettre la formation de pores. Les pores ainsi formés permettent l'entrée de l'ADNp nu.

Des expériences de sonoporation au niveau du tendon d'Achille de souris ont permis d'observer une expression stable du transgène pendant plus de 100 jours. De la même façon cette méthode a été utilisée dans un modèle de souris transgénique invalidée pour le gène de la fibromoduline et a permis une restauration du phénotype au niveau des tendons [Delalande *et al.*, 2011]. La limite principale de la sonoporation en thérapie génique reste la trop faible efficacité de transfection comparativement à d'autres systèmes [Unger *et al.*, 2001].

II.3 : Vecteurs synthétiques ou chimiques

L'utilisation de lipides et de polymères cationiques pour le transfert de gènes a été décrite pour la première fois en 1987 respectivement par Felgner et Wu [Felgner *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1987]. Ces molécules cationiques forment des complexes électrostatiques avec l'ADN (chargé négativement). Les complexes ainsi formés permettent de protéger l'ADN de la dégradation dans le milieu extracellulaire ainsi que de faciliter les interactions avec la membrane cellulaire.

Depuis 1995 des lipides, polymères et lipo-polymères ont été utilisés dans des essais cliniques de thérapie génique notamment pour la vaccination anti-tumorale et pour le traitement de différents cancers ainsi que de la mucoviscidose (**Tableau 2**). Des vecteurs chimiques de faible toxicité et immunogénicité pourraient permettre d'élaborer des protocoles comportant des administrations répétées d'acides nucléiques.

Tableau 2 : Les vecteurs synthétiques utilisés dans les essais de thérapie génique.

NCT	Investigateur	Pathologie	Vecteur	Acide Nucléique	Nombre patients	Année	Délivrance
00004471	Université Alabama	Mucoviscidose	Liposome DMRIE/DOPE	Gène CFTR (PGT-1)	9	1995	Instillation nasale
00009841	Université Pittsburgh	Carcinome (tête/cou)	Liposome DC-cholestérol	ADN anti-sens EGFR	20-36	1999	Intratumorale
00006033	H. Lee Cancer research institute	Carcinome (tête/cou)	Liposome DOTMA/cholestérol	Gène Interleukine 2 (IL2)	80	2000	Injection intratumorale
00024661	Université Georgetown	Tumeurs solides	Liposome LEraFAON	Oligonucléotide anti-sens c-raf	30	2001	Intraveineuse
00050388	Vical	Mélanome & Carcinome	Liposome DMRIE/DOPE	HLA-B7 β 2-microglobuline	-	2002	Intratumorale
00059605	M. D. Anderson Cancer center	Cancer du poumon	Liposome DOTAP	Gène fus-1	32	2003	Intraveineuse
00393809	Université de Jerusalem	Cancer de la vessie	Polymère PEI	Gène DTA-H19	18	2006	Infusion dans la vessie
01274455	Hôpital universitaire de Toulouse	Carcinome pancréatique	Polymère PEI	Récepteur Somastatine 2 Déoxycytidine kinase	24	2010	Intratumorale

DC-Chol, 3 β [N-(n',N'-diméthylaminoethane)-carbamoyle]cholestérol - DMPE diméthyl dimyristoyl phosphatidylethanolamine - DMRIE, 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyethylammonium bromide - DOPC 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine - DOPE dioléoylphosphatidylethanolamine - DOTAP, 1,2-dioléoyloxy-3-(triméthylammonio)propane - DOTMA N-[1-(2, 3-dioléoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium chlorure - EGFR épidermal growth factor récepteur - HLA human leukocyte antigen- PEI Poly(éthylèneimine) - SiRNA small interfering RNA - sst2 somatostatine récepteur 2 - dck::umk désoxycytidine kinase et uridylylate monophosphate kinase - EphA2 Ephrin type-A récepteur 2. [Données issues de l'U.S. National Institutes of Health <http://clinicaltrials.gov>].

II.3.1 : Les liposomes cationiques

Les liposomes cationiques sont des vésicules lipidiques composées d'une bicouche de lipides cationiques. Depuis les premiers résultats de transfert de gènes obtenus par Felgner suite à l'utilisation de DOTMA (N-[1-(2,3-dioleil)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride) des centaines de lipides cationiques destinés au transfert de gènes ont été développés [Felgner *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 2003]. Une liste non exhaustive est présentée dans la **figure 5**.

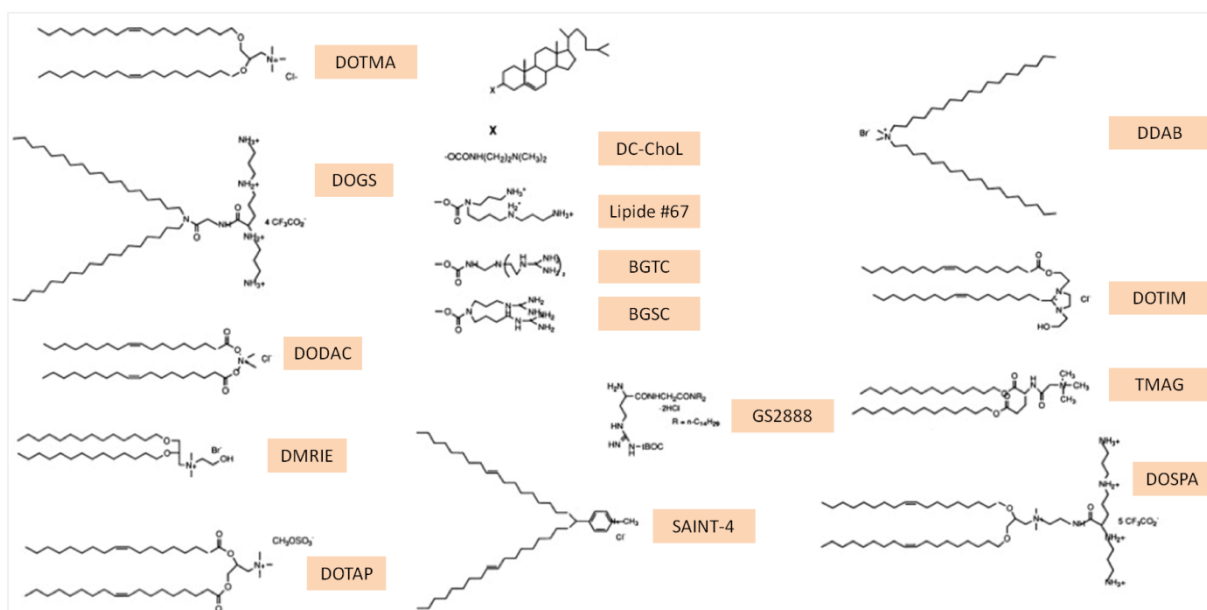


Figure 5 : Structure des lipides cationiques utilisés en transfert de gènes. BGSC, bis-guanidium-spermidine-cholesterol; BGTC, bis-guanidium-tren-cholesterol; DC-Chol, 3-[N-(n',N'-diméthylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol; DDAB, dimethyldioctadecylammonium bromide; DMRIE, 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium bromide; DODAC, dioctadecyldimethylammonium chloride; DOGS, dioctadecylamidoglycyl-spermine; DOSPA, 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermine carboxaminino)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate; DOTAP, 1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)propane; DOTIM, 1-[2-(9(Z)-octadecenoyloxy)-ethyl]-2-(8(Z)-heptadecenyl)-3-(2-hydroxyethyl)-imidazolinim chloride; DOTMA, N-[1-(2,3-dioleil)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride; GS2888, Boc-arginine dimyristylamide; lipid #67, 3- β -(sperminecarbamoyl)cholesterol; SAINT-4, dioleilmethylpyridinium chloride; TMAG, didodecyl-N-(a-(triméthylammonio)acetyl)-d-glutamate chloride. Adapté de [Tros de Ilarduya *et al.*, 2010]

Les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles comportant trois domaines : une chaîne hydrophobe composée principalement d'acides gras, une tête polaire hydrophile mono ou multi-cationique, et un groupe espaceur. Ces trois domaines sont reliés la plupart du temps par un squelette glycérol [Tranchant *et al.*, 2004].

La charge positive des dérivés monocationiques provient d'amines quaternaires simples (DOTMA) ou hydroxyéthylées (DMRIE), et d'amines tertiaires (DC-Chol). Les charges des dérivés multicationiques proviennent généralement de la spermine (DOSPA ou DOGS). Certains phospholipides neutres comme le dioléylphosphatidyléthanolamine (DOPE), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) ou le cholestérol [Semple *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997] sont utilisés comme co-lipides pour faciliter la formation des liposomes. L'incorporation de lipides neutres permet de diminuer la quantité de charges positives au sein des liposomes, les lipides cationiques sont en effet toxiques et sont tous d'origine synthétique.

Lipoplexes

Lorsqu'il est mélangé avec des liposomes cationiques l'ADN plasmidique est condensé en structures nano ou micrométriques appelées lipoplexes. Les lipoplexes se forment spontanément *via* des interactions électrostatiques unissant les liposomes polycationiques et l'ADN polyanionique [Pedroso de Lima *et al.*, 2001]. Les lipoplexes sont organisés en multiples bicouches lipidiques au sein desquelles l'ADN s'intercale (**Figure 6**) [Koynova *et al.*, 2010]. La taille des lipoplexes est très variable, elle est comprise en moyenne entre 50 nm et 1 µm [Labat-Moleur *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997; Templeton *et al.*, 1997].

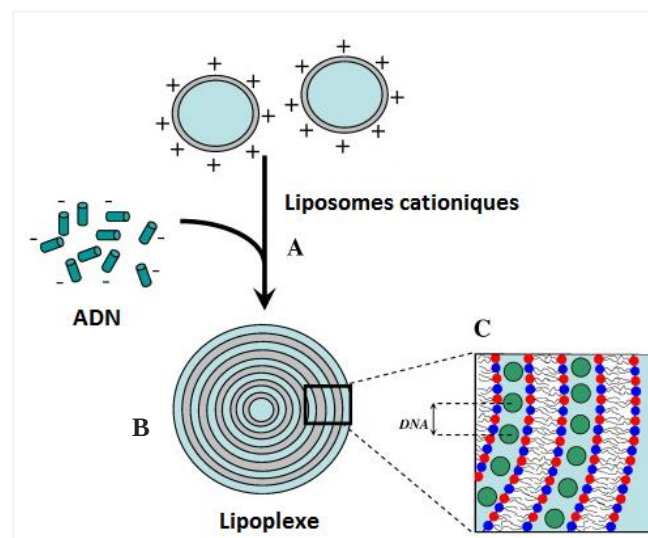


Figure 6 : Structure multilamellaire des lipoplexes. (A) Le mélange de liposomes cationiques unilamellaires et d'ADN est à l'origine de la formation de lipoplexes. (B) Les lipoplexes ont une structure multilamellaire résultant d'une alternance de bicouches lipidiques entre lesquelles l'ADN est confiné. (C) Vue agrandie de la structure des lipoplexes, lipides cationiques (rouge), lipides neutres (bleu), ADN (vert). Adapté de [Caracciolo *et al.*, 2010].

La taille et la structure des lipoplexes sont des paramètres déterminants pour l'efficacité de transfection. Ainsi à composition lipidique identique les structures de lipoplexes en phase hexagonale inversée plus fusiogènes permettent une meilleure efficacité de transfection que les phases lamellaires [Koltover *et al.*, 1998; Smisterova *et al.*, 2001].

II.3.2: Les polymères cationiques

De nombreux polymères cationiques linéaires ou branchés sont utilisés en transfert de gènes *in vitro* et *in vivo*. Dans le **tableau 3** est reportée une liste non exhaustive des différents polymères cationiques utilisés pour le transfert de gènes. La Poly(l-lysine) (PLL) est le premier polymère cationique à avoir été utilisé *in vivo* dans le cadre de la thérapie génique [Wu and Wu, 1988]. La poly(éthylèneimine) (PEI) est actuellement le polymère le plus performant pour la transfection, elle a été utilisée pour la première fois en 1995 [Boussif *et al.*, 1995; Godbey *et al.*, 1999; Hildebrandt *et al.*, 2003]. Elle existe sous forme branchée (BPEI) ou linéaire (LPEI), et présente la plus forte densité en groupement amines non protonés à pH physiologique. Cependant, comme de nombreux autres polymères cationiques non-dégradables, la PEI est fortement cytotoxique [Schaffer *et al.*, 2000]. Des versions moins toxiques ont été développées en introduisant des ponts biodégradables au sein de la structure de la PEI [Lim *et al.*, 1999] diminuant en contrepartie son efficacité. De même le greffage de résidus histidines sur la LPEI permet de réduire très fortement la toxicité [Bertrand *et al.*, 2011].

Polyplexes

Les polymères forment spontanément des complexes avec l'ADN grâce aux interactions électrostatiques entre leurs groupements amines chargés positivement et les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN. Les polyplexes ainsi formés ont une taille moyenne d'environ 100 nm avec des formes toroïques et globulaires. Comparativement aux lipides cationiques les polymères condensent plus fortement l'ADN.

Tableau 3 : Polymères utilisés en transfert de gènes.

Polymère	Abréviation	Caractéristique
Poly(éthylène)glycol	PEG	Inerte
Polyéthylèneimine	PEI	Cationique
Dithiobis(succinimidylpropionate)	DSP	PEI Biodégradable
Diméthyl-3,3'-dithiobispropionimide	DTBP	PEI Biodégradable
Poly(éthylèneimine) biscarbamate	PEIC	PEI Biodégradable
Poly(L-lysine)	PLL	Cationique
PLL Histidinylée		Biodégradable
Poly(N-vinylpyrrolidone)	PVP	Neutre
Poly(propylèneimine)	PPI	Dendrimère
Poly(amidoamine)	PAMAM	Dendrimère
Poly(amido éthylèneimine)	SS-PAEI	Biodégradable
Triéthylènetetramine	TETA	Cationique
Poly(B-aminoester)		Biodégradable
Poly(4-hydroxy-L-proline ester)	PHP	Biodégradable
Poly(allylamine)		Cationique
Poly(A-(4-aminobutyl)-L-acide glycolique)	PAGA	Biodégradable
Poly(D,L-acide lactique co-glycolique)	PLGA	Biodégradable
Poly(N-éthyle-4-vinylpyridinium bromide)		Cationique
Poly(phosphazène)	PPZ	Biodégradable
Poly(phosphoester)	PPE	Biodégradable
Poly(phosphoramidate)	PPA	Biodégradable
Poly(N-2-hydroxypropylméthacrylamide)	pHPMA	Cationique
Poly(2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate)	pDMAEMA	Cationique
Poly(2-aminoéthyle propylène phosphate)	PPE-EA	Biodégradable
Chitosan		Polysaccharide
Chitosan galactosylé		Chitosan synthétique
Chitosan N-Dodecylate		Chitosan synthétique
Histone		Naturel
Collagène		Naturel
Dextran-spermine	D-SPM	Polysaccharide

Adapté de [Al-Dosari & Gao, 2009].

Dissociation des polyplexes

La taille des polyplexes (de l'ordre de 100 nm) étant supérieure au diamètre des pores nucléaires (39 nm), l'ADNp doit être dissocié du polymère pour pouvoir entrer dans

le noyau des cellules en absence de division. Cependant le mécanisme de dissociation est à l'heure actuelle toujours mal connu.

Une diminution des forces électrostatiques unissant l'ADNp et la PLL favorise la dissociation des complexes dans le cytoplasme et provoque une augmentation de l'efficacité de transfection de 10 à 50 fois. Ce résultat a été observé après diminution du nombre de charges de la PLL suite à la substitution d'un certain nombre de groupements amines par des résidus gluconoyles non chargés [Erbacher *et al.*, 1997; Pichon *et al.*, 2002].

La cinétique de dissociation de polyplexes a été réalisée par microscopie à fluorescence grâce au double marquage des polyplexes permettant de suivre la localisation de l'ADN et du polymère individuellement. Après 4 heures d'incubation avec les cellules B16F10 les polyplexes PEI/ADNp ne sont pas dissociés [Ogris *et al.*, 2001]. Un autre travail montre qu'après 18 heures d'incubation avec des cellules de carcinome pancréatique (PaTu 8902) la plupart des polyplexes étaient dissociés [Bieber *et al.*, 2002].

De façon intéressante, grâce à des expériences de FRAP et de FRET Breuzard *et al.* mettent en évidence la présence de polyplexes LPEI et PLL-histidine au sein du noyau de cellules HeLa et C2C12 dès les premières heures de la transfection [Breuzard *et al.*, 2008]. La question de l'entrée des polyplexes à travers les pores nucléaires est toujours sans réponse, en effet le diamètre du pore nucléaire (39nm) est limitante pour l'entrée de polyplexes dont la taille est comprise entre 70 et 300nm. La possible dissociation des polyplexes dans le cytosol suivie de leur reconstitution dans le noyau est envisagée, de même que des modifications de forme et de taille des polyplexes.

II.3.3 : Lipopolyplexes

Les lipopolyplexes représentent une autre classe de vecteurs non viraux [García *et al.*, 2007]. Ces vecteurs hybrides sont des complexes ternaires LPD (Lipid-Polycation-DNA) ou LPR lorsqu'ils sont formés avec de l'ARNm (Lipid-Polycation RNA). De la PLL, protamine, histone, et des polypeptides synthétiques ont été utilisés pour condenser l'acide nucléique. Les polyplexes ainsi formés sont formulés avec des liposomes. La structure de ces complexes ternaires n'est cependant pas encore bien élucidée [García *et al.*, 2007; Mockey *et al.*, 2007; Perche *et al.*, 2012].

III-TRANSFERT DE GENES ET BARRIERES INTRACELLULAIRES

III.1 : Les barrières intracellulaires

La clé de l'efficacité des différents vecteurs chimiques réside dans leur habilité à franchir les différentes barrières intracellulaires s'opposant au transfert de gènes. En effet pour que le transfert de gènes soit efficace l'acide nucléique doit franchir de nombreuses barrières biologiques (extracellulaires et intracellulaires) pour atteindre le noyau des cellules cibles. Brièvement, l'acide nucléique doit passer la membrane plasmique délimitant la cellule, traverser le cytosol et enfin franchir l'enveloppe nucléaire (**Figure 7**). Pour accomplir ce trajet les vecteurs chimiques doivent disposer de moyens permettant de surmonter ces multiples barrières.

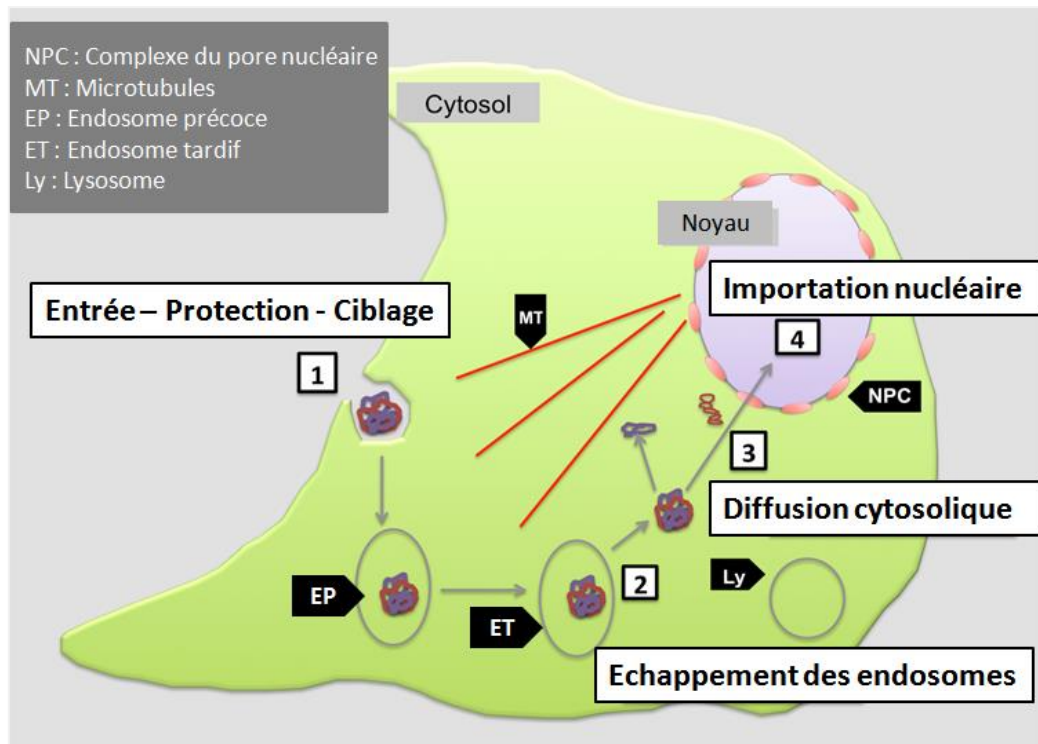


Figure 7 : Les barrières intracellulaires du transfert de gènes par des vecteurs chimiques. Pour un transfert de gènes efficace la molécule d'ADNp thérapeutique doit être acheminée de l'extérieur de la cellule jusqu'au compartiment nucléaire pour être accessible par la machinerie cellulaire transcriptionnelle. (1) Les complexes doivent être endocytés par la membrane cellulaire. (2) Une fois dans la cellule les complexes vecteurs/ADNp doivent s'échapper des endosomes, (3) se déplacer dans le cytosol des cellules et (4) être importés dans le noyau cellulaire.

III.2 : Endocytose

Les cellules eucaryotes internalisent en permanence les fluides, des macromolécules et autres particules par le processus d'endocytose. Dans la plupart des cellules quatre mécanismes de bases sont à l'origine de l'endocytose : la macropinocytose, l'endocytose clathrine dépendante, l'endocytose cavéoline dépendante, et la voie clathrine et cavéole indépendante (**Figure 8**). Ces différents mécanismes contrôlent des phénomènes physiologiques complexes tels que la présentation des antigènes, l'homéostasie cellulaire, l'immunosurveillance ou la transduction des signaux hormonaux.

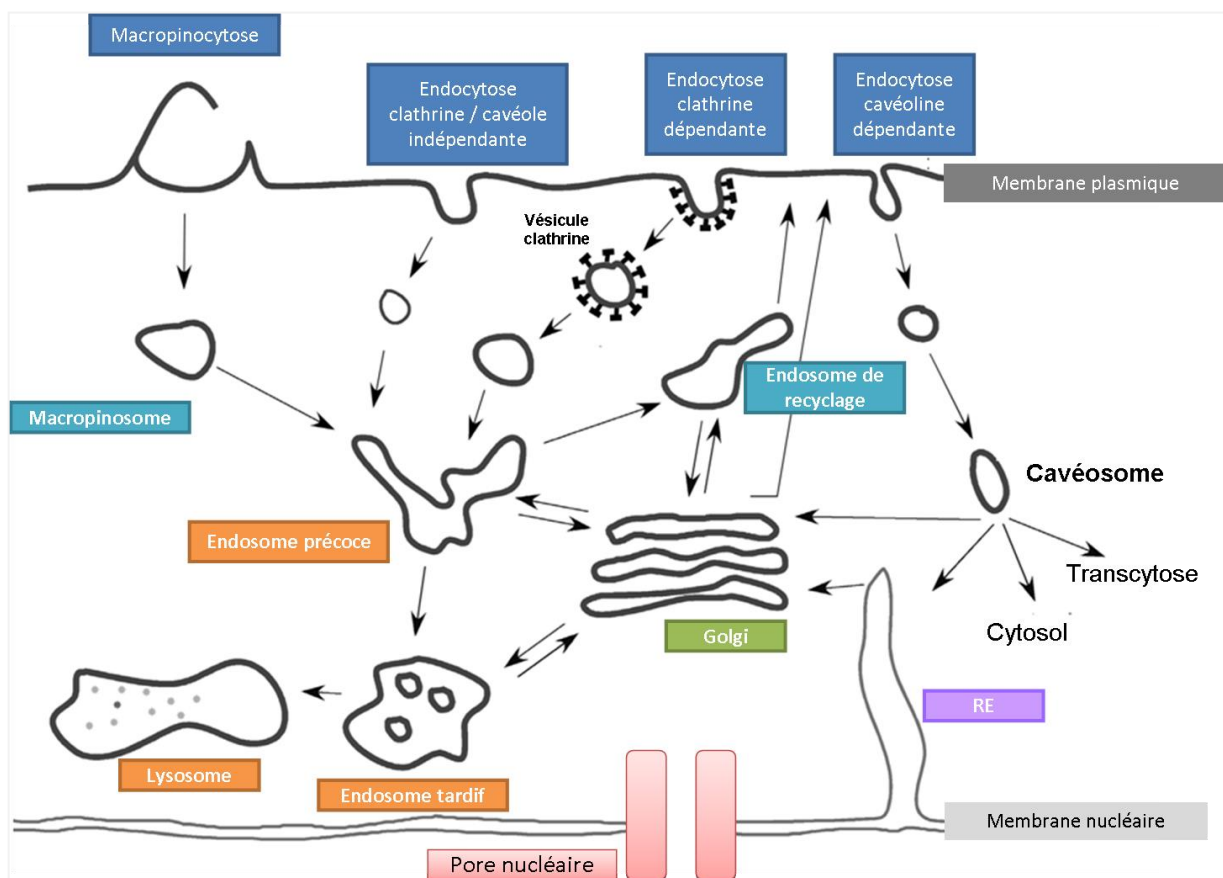


Figure 8 : Les voies d'endocytose dans les cellules eucaryotes. Quatre voies d'endocytoses principales sont décrites chez les cellules mammifères : la macropinocytose, l'endocytose clathrine dépendante, l'endocytose cavéoline dépendante, et la voie clathrine et cavéole indépendante. Adapté de [Veldhoen et al., 2008].

III.2.1 : Lipofection

Des observations en microscopie permettent de détecter les lipoplexes au sein de vésicules intracellulaires après incubation avec des cellules *in vitro*. Les lipoplexes peuvent donc pénétrer la cellule par endocytose [El Ouahabi *et al.*, 1999] et non par fusion avec la membrane plasmique. L'internalisation des lipoplexes est majoritairement un phénomène cellulaire dépendant qui est dans la plupart des cas le fait d'une endocytose clathrine dépendante. L'utilisation d'un inhibiteur de cette voie, la chlorpromazine, inhibe drastiquement l'internalisation et l'efficacité de transfection de différentes formulations de lipides cationiques (DOTAP, SAINT-2) [Pichon *et al.*, 2010]. De plus la mutation de Eps15, une protéine nécessaire à la formation des puits à clathrine, permet d'obtenir le même résultat inhibiteur [Zuhorn *et al.*, 2002]. La voie clathrine dépendante n'est pas la voie unique d'endocytose des lipoplexes étant donné qu'une inhibition totale de l'internalisation n'est obtenue avec aucun des types d'inhibition. Cela suggère que des voies secondaires sont empruntées simultanément à la voie principale d'endocytose, ou alternativement lorsque celle-ci est bloquée. Ainsi, l'inhibition de la voie d'endocytose des cavéoles grâce à la filipin III inhibe de 10 à 20% l'efficacité de transfection de SAINT-2/DOPE en cellules COS7 et HepG2, démontrant un rôle secondaire de cette voie [Zuhorn *et al.*, 2002]. La voie des cavéoles peut cependant être majoritaire quand des lipoplexes à base de DOTAP/DOPE sont enveloppés d'albumine sérique humaine [Pichon *et al.*, 2010].

La taille des lipoplexes est un paramètre déterminant de la voie d'endocytose. Pour des lipoplexes dont la taille moyenne est de 200 nm, la voie clathrine dépendante est la voie d'entrée principale [Zuhorn *et al.*, 2002;Rejman *et al.*, 2005]. Pour des lipoplexes de plus grande taille (supérieure à 300 nm) il est supposé que la voie principale soit caveolae dépendante par analogie avec des études réalisées sur des particules de latex [Rejman *et al.*, 2005].

III.2.2 : Polyfection

De façon similaire, tous les polymères cationiques condensent l'ADN en petites particules et facilitent son absorption cellulaire par endocytose grâce à des interactions avec la surface anionique des cellules. Cependant, la voie d'endocytose des différents

polyplexes et leur toxicité est dépendant du type cellulaire et de la nature du polymère [Midoux *et al.*, 2008; Pichon *et al.*, 2010].

La voie d'endocytose des polyplexes est dépendante de la composition du polymère impliqué dans la complexation de l'acide nucléique. A titre d'exemple au sein des cellules HepG2 (lignée hépatocellulaire), les polyplexes composés de polylysine histidinylée sont internalisés via la voie clathrine dépendante et la macropinocytose mais le processus de transfection est uniquement le fait de cette dernière [Gonçalves *et al.*, 2004]. Le constat est inversé lorsqu'on s'intéresse à la PEI qu'elle soit branchée ou linéaire [von Gersdorff *et al.*, 2006].

En fonction du type cellulaire, la voie d'endocytose d'un polymère donné peut aussi être différente. Aussi, si les complexes à base de PEI pénètrent les HepG2 par la voie clathrine dépendante, c'est la voie des cavéoles qui est impliquée pour ces mêmes complexes dans les cellules HeLa [von Gersdorff *et al.*, 2006]. De la même façon les polyplexes d'alginate-chitosan sont internalisés par la voie clathrine dépendante en HEK293T et COS-7 alors que c'est la voie des cavéoles en cellules CHO [Douglas *et al.*, 2008].

III.3 : Echappement des endosomes

De nombreuses stratégies s'intéressent à la sortie des endosomes des complexes ADNp/vecteurs chimiques. La théorie du flip-flop et l'utilisation de lipides fusiogéniques dans la formulation de liposome, ainsi que le phénomène d'éponge à protons pour les polymères cationiques PEI et histidinylés, sont les phénomènes principalement impliqués.

III.3.1 : Polyplexes

L'efficacité d'un polymère relève en grande partie de sa capacité à s'extraire des endosomes après son endocytose. Le mécanisme le plus invoqué dans ce processus est celui du phénomène d'"éponge à protons". Ce phénomène est provoqué par l'afflux de base faible à l'intérieur des vésicules d'endocytose acide. Des polymères cationiques ont été développés pour induire ce phénomène. C'est le cas de la PEI et des polymères et résidus

riches en histidine ou imidazole. La PEI présente des amines secondaires non protonés à pH physiologique et protonables en milieu acide. A pH endosomal ces amines secondaires en se protonant neutralisent les protons générés dans la lumière des endosomes par une ATPase spécifique. L'augmentation d'ions H^+ au sein des endosomes est contrebalancée par l'entrée d'ions chlorure (Cl^-) dans les vésicules. Après neutralisation des protons un phénomène osmotique est induit qui conduit à la destabilisation de la membrane des endosomes et un relargage du contenu dans le cytosol (**Figure 9**) [Sonawane *et al.*, 2003].

La LPEI ne présente que des amines secondaires alors que la BPEI contient des amines secondaires ainsi que d'autres amines non protonables. La LPEI a meilleur pouvoir tampon que la BPEI, cela explique en partie la meilleure efficacité de transfection de la LPEI par rapport à la BPEI.

Cet effet éponge à protons peut être obtenu en utilisant l'histidine, qui présente un noyau imidazole protonable à pH endosomal (≤ 6), dans la composition de polymères cationiques. Le greffage de résidus histidine sur la PLL permet d'augmenter très fortement l'efficacité de transfection comparativement à la polylysine nue [Midoux & Monsigny, 1999].

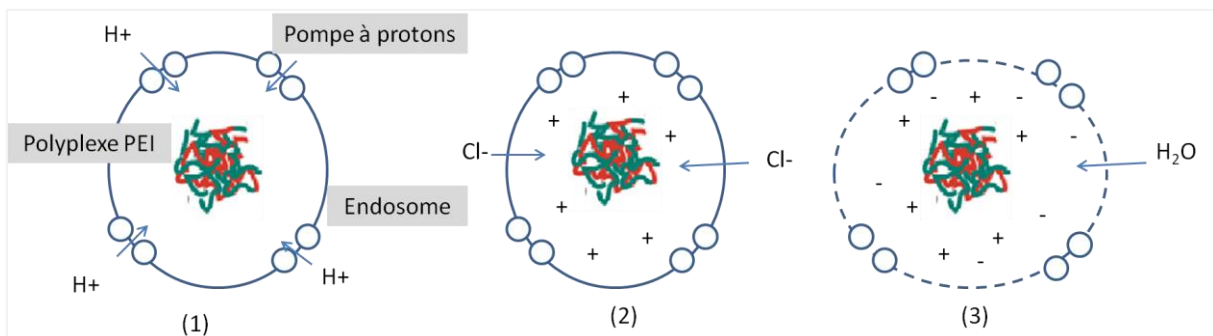


Figure 9 : L'effet éponge à protons. (1) Le polyplexes à base de PEI accroît l'accumulation de protons dans les endosomes, (2) provoquant une entrée passive d'ions chlorure (contre-ion). (3) Par gonflement osmotique la membrane endosomale est rompue. Adapté de [Medina-Kauwe *et al.*, 2005].

III.3.2 : Lipoplexes

Après internalisation par endocytose, les lipoplexes se retrouvent piégés au sein des vésicules endosomales. Les endosomes peuvent alors soit fusionner avec les lysosomes, afin de dégrader leur contenu, soit le relarguer à l'extérieur de la cellule. L'échappement des endosomes s'avère donc essentiel pour un transfert de gènes efficace.

La nature positive des lipoplexes peut contribuer à la déstabilisation de la membrane endosomale et à la libération de l'acide nucléique vers le cytoplasme de la cellule par un mécanisme de «flip-flop» entre les lipides cationiques et les lipides anioniques de la paroi cytoplasmique (**Figure 10**). Cette stratégie a également été développée dans le cas des lipides cationiques

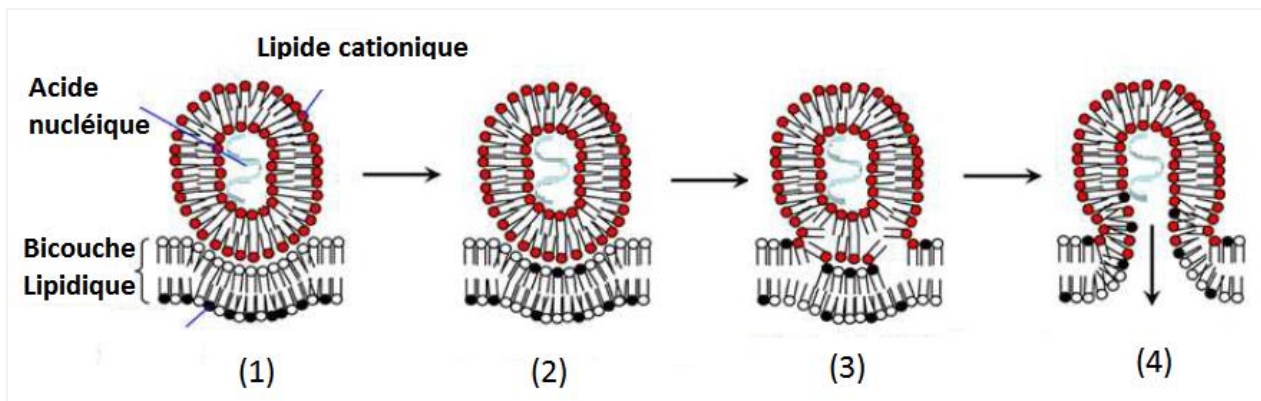


Figure 10 : Echappement des endosomes des lipoplexes grâce au mécanisme de «flip-flop». (1) Après endocytose les lipides cationiques induiraient (2) une inversion des lipides anioniques de l'extérieur vers l'intérieur de la vésicule endosomale (3). Les lipides anioniques permettent la neutralisation des lipides cationiques et la libération de l'ADN dans le cytoplasme (4). Adapté de [Medina Kauwe *et al.*, 2005].

En marge de ce mécanisme de «flip-flop», des lipides auxiliaires neutres et fusiogènes permettent d'une autre façon la déstabilisation de la membrane endosomale. Le lipide DOPE est un lipide fusiogénique sensible au pH, c'est un composant de nombreuses formulations de liposomes principalement pour son rôle dans la déstabilisation de la membrane endosomale [Farhood *et al.*, 1995]. Au pH physiologique (pH7) le lipide DOPE forme une bicouche lipidique stable. Lorsque le pH s'acidifie (pH5-6), comme c'est le cas au sein des endosomes, la bicouche lipidique se réarrange en une structure hexagonale inversée qui fusionne et déstabilise la membrane endosomale. Au cours de ce processus les acides nucléiques contenus dans la vésicule peuvent être ainsi relargués dans le cytosol.

De la même façon que pour les polymères cationiques, des lipides histidinylés ou comportant des groupements imidazoles ont été développés pour faciliter l'échappement endosomal [Midoux *et al.*, 2009].

III.4 : Trafic cytosolique

Dans la mesure où la stratégie développée dans mon travail de thèse s'intéresse à l'amélioration du trafic cytosolique du transfert non viral de gènes, cette partie fera l'objet d'un chapitre complet dans la suite des généralités (Généralités - Chapitre II).

III.5 : Importation nucléaire

Le passage de l'enveloppe nucléaire est une des barrières principale qui s'oppose au transfert de gènes, en particulier dans les cellules post-mitotiques ou quiescentes [Mortimer *et al.*, 1999 ; Escriou *et al.*, 2001]. En effet lorsque les cellules procèdent à leur division par la mitose, l'enveloppe nucléaire est rompue, les plasmides présents dans le cytoplasme peuvent donc entrer dans le noyau à ce stade du cycle cellulaire. Bien qu'étant faible, la transfection des cellules qui ne se divisent pas est toutefois possible. En absence de division les particules d'ADNp doivent pénétrer le noyau par un complexe macromoléculaire (125 MDa) qui perfore l'enveloppe nucléaire appelé complexe du pore nucléaire (NPC) [Dowty *et al.*, 1995]. En fonction du type cellulaire transfecté il a été évalué que seul 1 à 10% des plasmides internalisés par les cellules se retrouvent dans le compartiment nucléaire [Cohen *et al.*, 2009]. L'amélioration du passage nucléaire de l'ADNp est donc un élément clé pour l'optimisation des stratégies de transfert de gènes.

La principale stratégie visant à l'amélioration de l'importation nucléaire d'ADNp exploite la capacité de certaines protéines à être activement internalisées *via* le NPC grâce à une séquence peptidique appelée signal de localisation nucléaire (NLS). La séquence NLS de ces protéines est prise en charge par l'importine α , celle-ci se dimérise ensuite avec l'importine β . Le dimère ainsi formé empreinte le NPC pour rejoindre le noyau. Une fois dans le noyau la protéine RanGTP reconnaît le complexe, elle induit un changement conformationnel des importines qui libèrent le NLS. L'approche la plus développée pour l'amélioration de l'importation nucléaire d'ADNp est de le coupler avec des peptides NLS (**Figure 11A**) par des interactions électrostatiques, un couplage covalent ou par l'utilisation de « clamp PNA » (Peptide Nucleic Acid) [Lam & Dean, 2010]. Utilisés *in vivo* les ADNp couplés à des peptides NLS induisent une meilleure expression du transgène dans les souris injectées en intra-musculaire accompagnées d'une augmentation des CTLs [Choi *et al.*, 2007].

Une autre stratégie consiste à insérer dans la séquence du plasmide une séquence DTS (DNA nuclear Targeting Sequence), ce type de séquence permet l'interaction avec un ou plusieurs facteurs de transcription (tels que NFκB, Oct1 ...). Les facteurs de transcription étant fonctionnels dans le noyau ils possèdent des séquences NLS pour leur importation nucléaire. L'interaction DTS / facteur de transcription permet le passage du pore nucléaire de l'ADNp grâce aux importines (**Figure 11B**). Parmi ces séquences la séquence 3NF a été mise au point au laboratoire [Breuzard *et al.*, 2008 ; Gonçalves *et al.*, 2009]. Cette séquence consiste en une triple répétition de la séquence d'interaction à NFκB (GGACTTTCC). Les trois séquences sont séparées par une séquence espaceur de 5bp (AGCTG), optimisée *in silico*, pour une meilleure reconnaissance de trois facteurs de transcription NFκB simultanément. Des expériences d'hybridation *in situ* montrent que la présence de la séquence 3NF augmente l'importation nucléaire d'ADNp ainsi que l'expression luciférase. De façon intéressante il a été montré que la présence de deux séquences 3NF, encadrant la cassette d'expression, au sein d'un plasmide prolonge l'expression de luciférase *in vitro*. De plus cette version plasmidique est celle qui est associée à la plus forte expression de luciférase *in cellulo*.

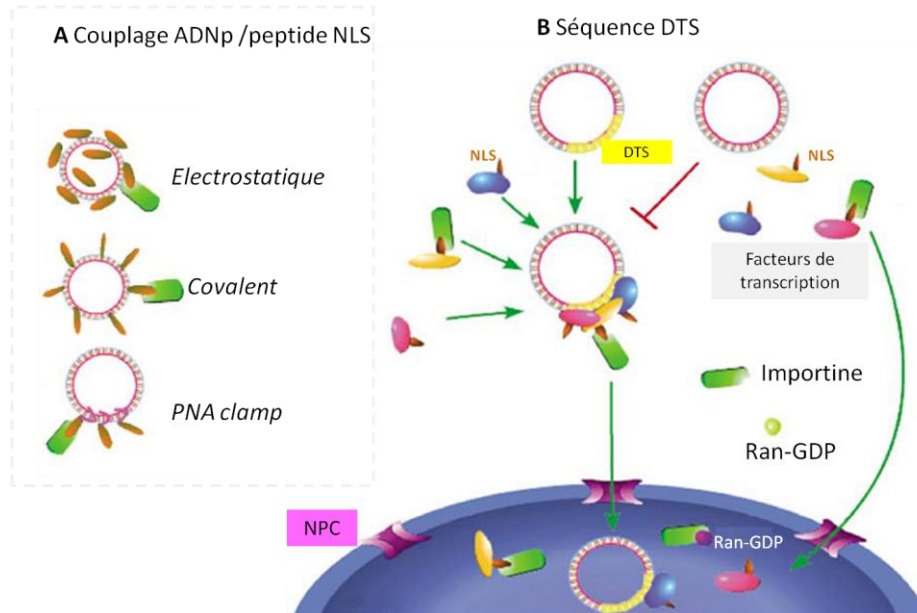


Figure 11 : Méthodes pour améliorer l'importation nucléaire d'ADNp. Un certain nombre d'approches différentes ont été développées pour promouvoir la reconnaissance des plasmides par les membres de la famille importine, de façon à augmenter leur importation nucléaire. (A) L'ADNp peut être couplé directement avec un peptide NLS. (B) La séquence de l'ADNp dispose d'une séquence DTS (DNA targeting sequence) qui lui permet d'interagir avec un ou plusieurs facteur de transcription). Adapté de [Dean *et al.*, 2005].

CHAPITRE II :

AMELIORATION DU TRAFIC CYTOSOLIQUE

Comme il a été précisé dans le Chapitre I, le transfert de gènes par des vecteurs non viraux est un procédé complexe dont l'efficacité repose entre autres sur la capacité de l'ADN thérapeutique à atteindre le noyau. Ainsi après internalisation par endocytose et échappement des endosomes, l'ADN thérapeutique peut se retrouver dissocié du vecteur ce qui le rend vulnérable aux DNases intracellulaires. La durée de vie de l'ADN dans le cytosol est de ce fait courte de l'ordre de 60 à 90 min en cellule HeLa et COS-1 [Lechardeur *et al.*, 1999], voir même très courte de l'ordre de 5 min dans des cellules musculaires [Bureau *et al.*, 2004]. Le transport de l'ADN jusqu'au noyau doit ainsi être le plus actif possible pour un transfert de gènes efficace. Des stratégies mimant les virus tentent d'exploiter la dynéine, protéine motrice des microtubules, qui exerce un mouvement en direction du noyau cellulaire.

I-TRAFIC CYTOSOLIQUE

Transport endosomal

Les complexes ADNp/vecteurs chimiques sont internalisés par endocytoses par les cellules. Ainsi avant l'étape d'échappement des endosomes les polyplexes comme les lipoplexes se retrouvent à l'intérieur de ces vésicules prises en charge par les microtubules par l'intermédiaire des protéines motrices [Kulkarni *et al.*, 2005]. Ce transport endosomal des complexes est dépendant de l'intégrité du réseau de microtubules, en effet la dépolymérisation des microtubules par le Nocodazole inhibe le mouvement des complexes [Suh *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2006]. Le mouvement de ces vésicules s'apparente à un mouvement de va et viens, le transport étant pris en charge de façon alternative par la kynésine et la dynéine qui ont toutes deux une direction contraire [Kulkarni *et al.*, 2005 ; Kulkarni *et al.*, 2006 ; de Bruin *et al.*, 2007].

En fonction de la cinétique d'échappement des complexes des vésicules d'endocytose, les complexes se retrouvent plus ou moins loin du centre organisateur des

microtubules (MTOC) qui se trouve à proximité du noyau cellulaire. La distance les séparant du noyau réduit leur chance d'être importé dans le noyau.

ADNp nu

Lukacs *et al* ont étudié la mobilité d'ADN fluorescent de tailles variables après microinjection dans le cytoplasme de cellules HeLa [Lukacs *et al.*, 2000]. Les constantes de diffusion des différentes molécules dans le cytoplasme (D_{cyto}) ont été obtenues par FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) et comparées aux constantes de diffusion dans l'eau (D_w). Cette étude a montré que les petits fragments d'ADN compris entre 100 et 250 bp diffusent facilement à travers le cytoplasme ($0,06 < D_{\text{cyto}} / D_w < 0,2$), leur petites tailles leur permet ensuite de pénétrer librement le noyau. Entre 250 et 2000 bp leur constante de diffusion ne cesse de diminuer ($D_{\text{cyto}} / D_w < 0,05$). Au delà de 2000 bp la diffusion est très faible, voir même nulle pour les molécules de plus grandes tailles ($D_{\text{cyto}} / D_w < 0,01$). De façon cohérente avec ces résultats il a été démontré qu'après microinjection d'ADNp de plus de 7 kb dans le cytosol, moins de 0,1% est exprimé dans la cellule comparativement à une injection nucléaire [Pollard *et al.*, 1998].

Plusieurs paramètres peuvent être à l'origine de la mobilité réduite des molécules d'ADN dans la cellule eucaryote : le blocage par des partenaires protéiques et l'encombrement cellulaire. La nature polyanionique de la molécule d'ADN pourrait entraîner des interactions avec des protéines positivement chargées, c'est le cas par exemple avec les histones dans le compartiment nucléaire. L'encombrement que constitue le cytosquelette apparaît comme l'obstacle principal de la diffusion de l'ADN, en particulier le réseau d'actine. Après déstabilisation du réseau d'actine, la fraction mobile de l'ADN ainsi que sa constante de diffusion est augmentée [Dauty *et al.*, 2005]. De plus, dans ces mêmes conditions la constante de diffusion de l'ADN dans le cytoplasme s'affranchit de la taille des molécules.

En 2006, Vaughan et Dean émettent l'hypothèse que de l'ADNp nu se déplace dans le cytosol le long des microtubules en exploitant la dynéine à partir de résultats obtenus par microinjection et électroporation d'ADNp nu. Au cours de cette étude, les plasmides employés présentent une séquence DTS (DNA nuclear Targeting Sequences) qui empêchent de généraliser cette hypothèse à l'ensemble des molécules d'ADNp nu [Vaughan & Dean, 2006] (Chapitre II - III.2 : Interaction avec NFκB).

Virus

Les virus, de par leur taille, rencontrent les mêmes problèmes de mobilité que les macromolécules telles que l'ADN nu au sein de la cellule. Des stratégies de déstabilisation du squelette d'actine existent chez certains virus. SV40 par exemple active par son entrée une cascade de signalisation thymidine kinase qui mène à une dissociation locale des filaments d'actine [Pelkmans *et al.*, 2002]. La stratégie principale développée par la plupart des virus consiste à exploiter un complexe protéique moteur, la dynéine, une fois dans le cytosol (Chapitre II - II.3 Dynéine et trafic des virus). Par diverses interactions la dynéine tracte les particules virales le long des microtubules en direction du noyau cellulaire.

II-DYNEINE : PROTEINE MOTRICE DES MICROTUBULES

II.1 : Microtubules

De la même façon que les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, les microtubules (MTs) composent le cytosquelette des cellules eucaryotes (**Figure 12**). Ils sont impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires et leur intégrité est indispensable au fonctionnement de la cellule.

Structure

Les microtubules forment des structures tubulaires creuses d'un diamètre de 25 nm. Leur paroi est constituée en moyenne de 13 protofilaments de tubuline qui s'assemblent latéralement entre eux. Chaque protofilament est constitué d'un enchaînement hélicoïdal d'hétérodimères d' α et de β tubuline. Toutes deux sont capables de lier le GTP mais seul le GTP lié à la sous-unité β est échangeable et hydrolysable en GDP et phosphate inorganique (Pi) [Mandelkow *et al.*, 1988].

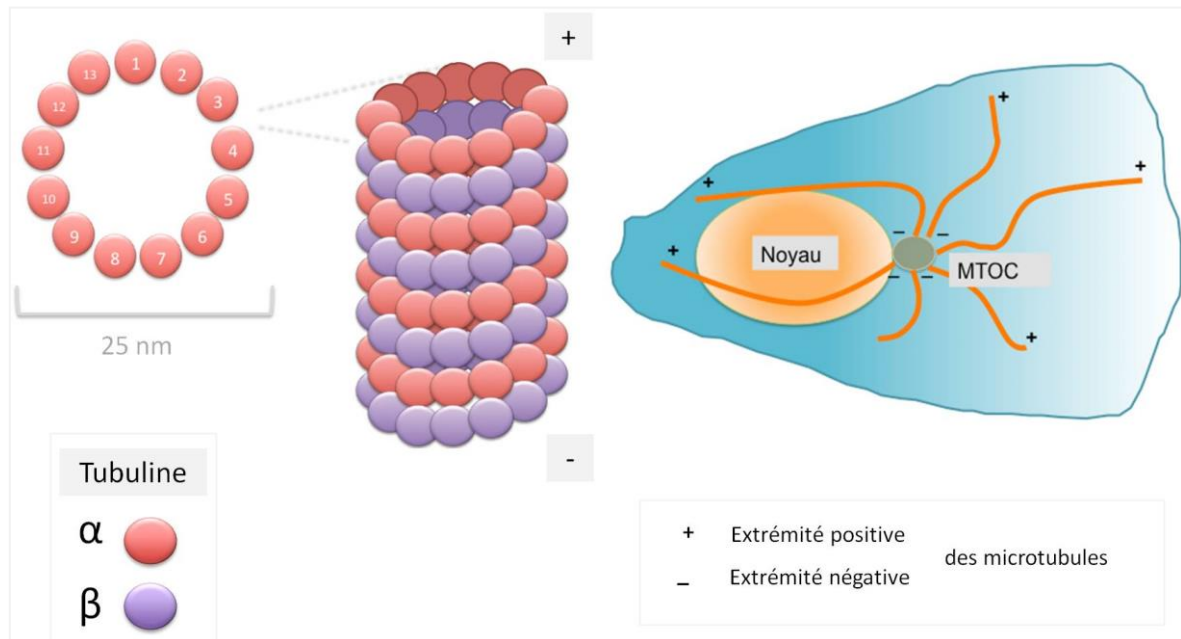


Figure 12: Structure et disposition des microtubules dans la cellule. Les microtubules sont des structures tubulaires creuses constituées de 13 protofilaments de tubuline. L'extrémité négative des microtubules est arrimée au MTOC ou centrosome tandis que l'extrémité positive pointe vers la périphérie de la cellule.

Les microtubules sont des structures polarisées, chaque extrémité peut être considérée comme un pôle. Le pôle négatif présente exclusivement des sous-unités α , à l'autre extrémité le pôle positif expose des sous-unités β [Mitchinson *et al.*, 1993]. En règle générale les extrémités positives des microtubules se localisent en périphérie cellulaire, les extrémités négatives quant à elles se regroupent à proximité du noyau au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC) (**Figure 12**).

Dynamique des microtubules

Les microtubules sont des structures très dynamiques qui se réorganisent continuellement. Ils alternent des phases d'élongation et de raccourcissement au cours desquelles des transitions appelées catastrophes et sauvetages subviennent [Mitchison *et al.*, 1984; Dimitrov *et al.*, 2008]. Cette instabilité dynamique se produit principalement au niveau de l'extrémité positive (+), l'extrémité négative (-) étant la plupart du temps séquestrée au niveau du centrosome. On parle d'un phénomène de "tapis roulant" lorsque l'extrémité (-) est libre et en dépolymérisation alors que l'extrémité (+) est en phase de croissance.

La théorie de la "coiffe GTP" est un modèle qui tente d'expliquer cette instabilité mécanique. Pendant l'élongation, des dimères de tubuline liés à deux molécules de GTP (une par monomère de tubuline) sont incorporés à l'extrémité en croissance des microtubules. La molécule de GTP associée avec la β tubuline est hydrolysée après un laps de temps qui autorise l'accumulation de tubuline-GTP jusqu'à former une «coiffe ou couronne GTP». Cette coiffe stabilise l'élongation du microtubule [Pantaloni & Carlier, 1986]. L'hydrolyse du GTP provoque un changement de conformation des sous-unités et affaiblit les liaisons dans la structure des microtubules. La perte de la coiffe entraîne ainsi un événement de catastrophe qui peut aller jusqu'à la dépolymérisation totale du MT. Avant d'atteindre cette situation critique un processus de sauvetage permet de restaurer la polymérisation du MT et de reformer une coiffe GTP (**Figure 13**).

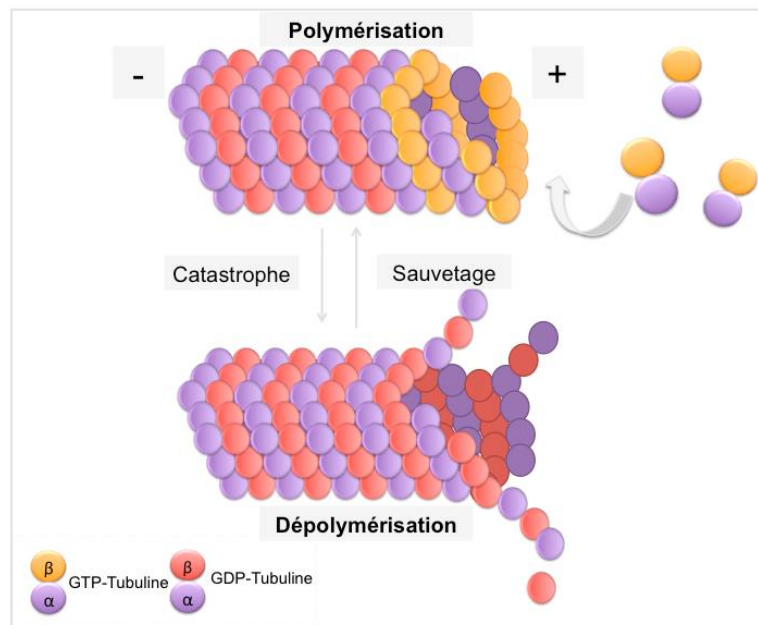


Figure 13: Modèle de la "coiffe GTP" expliquant l'instabilité des microtubules. Des dimères de tubuline GTP sont incorporés aux microtubules en formation et forment une coiffe. L'hydrolyse du GTP entraîne la perte de la coiffe, les microtubules se dépolymérisent suite à un processus de catastrophe. Les microtubules peuvent entrer à nouveau en polymérisation suite à un processus de sauvetage.

La dynamique des microtubules, notamment l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation, est régulée par un groupe de protéines appelées MAPs (Protéines Associées aux Microtubules). Les MAPs sont divisées en deux groupes selon leur activité au

niveau de la formation des microtubules. Certaines MAPs sont des stabilisateurs, l'exemple le plus connu est la protéine tau, qui interagissent avec les microtubules et favorisent leur polymérisation. D'autres MAPs déstabilisent les microtubules en favorisant leur dépolymérisation, c'est le cas de la stathmine. Tau et stathmine sont les MAPs les plus étudiées à cause de leur implication dans des pathologies neurodégénératives et le cancer [Devred *et al.*, 2010].

De nombreuses modifications post-traductionnelles de la tubuline ont été identifiées [Janke & Bulinski, 2011]. Parmi elles, on trouve la phosphorylation, l'ubiquitylation, la palmitoylation, la détyrosination, la $\Delta 2$ -tubuline génération, la polyglutamylation, la polyglycylation et l'acétylation [Westermann & Weber, 2003; Wloga & Gaertig, 2010]. La fonction biologique de ces modifications n'est pas encore totalement comprise, il est toutefois clair qu'elles influencent la dynamique et la stabilité des microtubules. Par exemple l'acétylation et la détyrosination sont directement corrélées à la durée de vie des microtubules et ont tendance à les stabiliser.

Fonction des microtubules

Le réseau de microtubules est particulièrement dynamique et joue un rôle crucial dans un grand nombre de fonctions cellulaires critiques telles que l'architecture cellulaire, la division cellulaire, le transport vésiculaire, le mouvement des organites et des chromosomes ou encore la migration cellulaire.

Les dynéines et kinésines sont deux familles de complexes protéiques moteurs qui assurent des mouvements contraires le long des microtubules. Elles guident de façon active des organites et vésicules à travers le cytoplasme. La tête de ces complexes interagit avec les microtubules, la queue quand à elle interagit avec des vésicules et organites intracellulaires. Les kinésines (à l'exception de la kinésine 14) se déplacent en direction de l'extrémité (+) des microtubules, soit en périphérie cellulaire. Nous nous intéresserons dans la suite de ce chapitre aux dynéines qui réalisent un mouvement vers l'extrémité (-) en direction du noyau cellulaire qui pourraient être exploitées pour la transfection avec des vecteurs chimiques.

II.2 : Dynéine

II.2.1 : Différentes isoformes

La dynéine est une famille de protéines qui réalise un mouvement rétrograde le long des microtubules, c'est à dire de la périphérie cellulaire jusqu'au noyau. Toutes les isoformes de dynéines s'organisent de façon similaire et sont des complexes macromoléculaires composés de chaînes lourdes, intermédiaires et légères [Asai & Koonce, 2001]. Au sein de ce complexe, c'est la chaîne lourde présente en deux exemplaires qui est responsable de l'activité motrice. Les différentes isoformes de la chaîne lourde sont à la base des différents isoformes de dynéine. On distingue ainsi de multiples dynéines axonémales (bras de dynéine interne et externe) et deux dynéines cytoplasmiques : - La dynéine cytoplasmique 1 ou MAPC₁, Dhc_{1a} et Dyh₁ (non-axonémale) - La dynéine cytoplasmique 2 ou Dhc_{1b} et Dyh₂ (non-axonémale) [Gibbons, 1995].

La dynéine cytoplasmique 1 est le moteur moléculaire majeur pour le déplacement des organites et autres vésicules (appelés cargos) dans le cytoplasme de la plupart des cellules eucaryotes. Dans la suite de ce chapitre nous nous intéresserons donc exclusivement à la dynéine cytosolique 1, ainsi le terme dynéine s'appliquera uniquement à cet isoforme.

II.2.2 : Dynéine cytosolique 1

La dynéine cytosolique 1 a été découverte en 1987 et initialement appelée MAPC₁ pour sa relation avec les microtubules [Paschal *et al.*, 1987]. Elle a ensuite été rapidement identifiée comme une protéine motrice rétrograde grâce à son activité d'hydrolyse de l'ATP et son mouvement opposé à celui de la kinésine-1 [Paschal & Vallee, 1987].

II.2.2.1 : Structure et composition

La dynéine est un complexe protéique de 1,2 MDa. Elle est composée de deux têtes globulaires qui se rejoignent en une base commune par l'intermédiaire de tiges minces, ce sont les deux chaînes lourdes de la dynéine (DHC : Dynein Heavy Chain) de 530 kDa (**Figure 14**). On retrouve au niveau de ces DHCs, le site d'interaction avec les microtubules

et le site d'hydrolyse de l'ATP. A la base de ce complexe moteur se trouvent deux chaînes intermédiaires de 74 kDa (IC74 : Intermediate Chain) et quatre chaînes intermédiaires légères (LICs : Light Intermediate Chains) qui interagissent directement avec les DHCs [King, 2000]. Trois différents homodimères de chaînes légères interagissent quant à elles avec les ICs : TCTEX-1 (DYNLT), LC8 (DYNLL) et LC7 (DYNLRB) [Makokha *et al.*, 2002; Allan, 2011]. Des délétions réalisées au niveau de l'IC74 révèlent que l'interaction de LC8 nécessite la présence d'un motif KETQT situé en N-terminal de IC74, TCTEX-1 interagissant par l'intermédiaire d'une séquence RRLNK [Lo *et al.*, 2001; Mok, 2001].

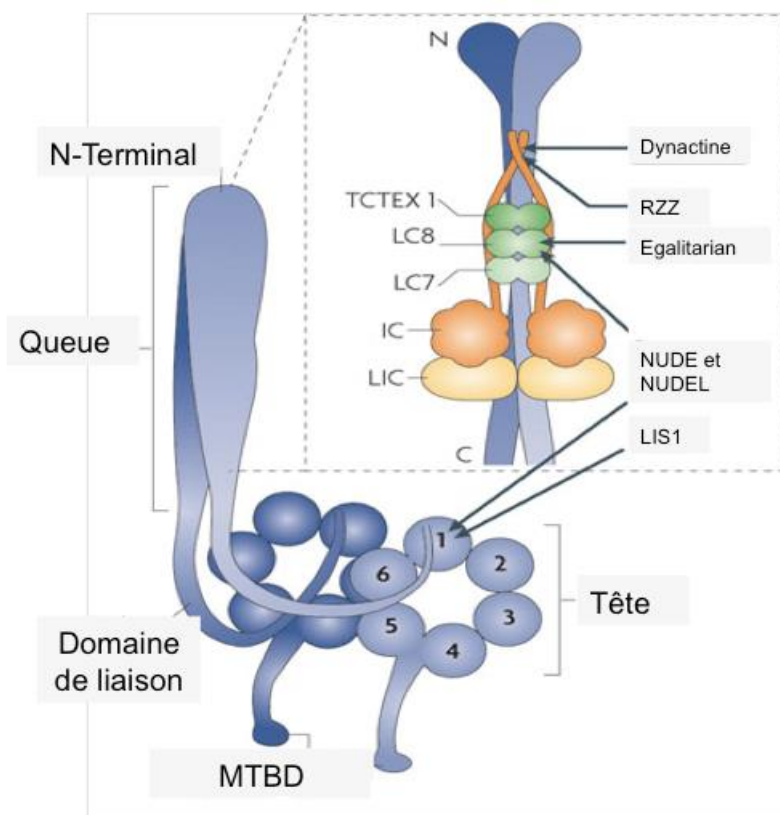


Figure 14: Composition et structure de la dynéine cytoplasmique. La chaîne intermédiaire de la dynéine (IC) et la chaîne légère intermédiaire (LIC) se lient directement à la chaîne lourde. Les chaînes légères LC8, LC7 et TCTEX-1 s'assemblent à l'IC. L'IC interagit avec la sous-unité p150 de la dynactine, ainsi qu'avec la sous-unité ZW10 (Zest White 10) de RZZ (Rod-ZW10-Zwilch). LC8 se lie à des protéines adaptatrices telles que NUDE (nuclear distribution protein E) NUDEL (NUDE-like) ou Egalitarian. LIS1 (Lissencephaly 1) interagit avec AAA1 de la chaîne lourde. Adapté de [Kardon & Vale, 2009].

II.2.2.2 : Interactions

Interaction avec les microtubules

La dynéine interagit directement avec les microtubules par l'intermédiaire d'un petit domaine globulaire appelé MTBD (MicroTubule Binding Domain) localisé à l'extrémité d'une longue et fine tige de 10 à 15 nm au niveau du domaine AAA₄ de la DHC [Gibbons *et al.*, 2005]. L'interface d'interaction du MTBD avec les microtubules est constituée d'un groupe d'hélices H₁, H₃, et H₆. La structure du MTBD a été résolue par cristallographie [Carter *et al.*, 2008] et par identification des mutations qui empêche l'interaction avec les microtubules [Koonce & Tikhonenko; 2000].

Interaction avec la dynactine

La dynéine interagit de façon indirecte avec certains cargos cellulaires qu'elle transporte par l'intermédiaire de la dynactine (activateur de la dynéine). Le complexe dynactine a une masse moléculaire de 1 MDa et est constitué de 11 sous-unités différentes . Parmi elles on retrouve la sous-unité p150 qui interagit avec les microtubules [Walterman-Storer *et al.*, 1995; Culver-Hanlon *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2006] et l'IC du complexe moteur [Karki & Holzbaur, 1995; Vaughan *et al.*, 1995]. Le blocage de l'IC de la dynéine ou de p150 par des anticorps inhibe la mobilité de la dynéine *in vitro* et *in cellulo* [Burkhardt *et al.*, 1997; Schroer & Sheetz, 1991; Gaglio *et al.*, 1997; Steffen *et al.*, 1997; Waterman-Storer *et al.*, 1997; King & Schroer, 2000].

La présence de la dynactine aux côtés de la dynéine est essentielle pour une activité totale de la protéine motrice [Gill *et al.*, 1991; Schroer & Sheetz, 1991; Karki & Holzbaur, 1999; Boylan *et al.*, 2000; Schroer, 2004]. La dynactine contribue par différents aspects à l'accomplissement des fonctions de la dynéine :

- Elle lui permet de s'arrimer aux microtubules au niveau de leurs extrémités positives en reconnaissant entre autres les protéines CLIP₁₇₀ (Cytoplasmic Linker Protein) [Dujardin *et al.*, 1998; Coquelle *et al.*, 2002] et EB₁ [Faulkner *et al.*, 2000; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000].
- La dynactine augmente l'activité motrice de la dynéine [Karki & Holzbaur, 1999; King & Schroer, 2000]. Il semblerait que la présence d'un second site de liaison avec les microtubules au niveau de p150, capable de diffuser seul sur les microtubules collaborerait

au mouvement de la dynéine [Culver-Hanlon *et al.*, 2006].

- Sa fonction la plus connue est d'occuper le poste d'adaptateur entre la dynéine et les vésicules et organites [Kardon *et al.*, 2009]. Le filament ARP1 (Actin-Related Protein) de la dynactine est un partenaire de la β III spectine que l'on retrouve à la surface de l'appareil de golgi et d'autres membranes cellulaires [Holleran *et al.*, 2001]. De plus, sa sous-unité p150 interagit avec des GTPases régulatrices que l'on retrouve sur la membrane des vésicules provenant du réticulum endoplasmique [Watson *et al.*, 2005].

Interactions via les chaînes légères

De la même façon que la dynactine, les homodimères LC8 et TCTEX-1 permettent l'interaction du complexe dynéine avec des cargos. Les homodimères de chaînes légères de la dynéine interagissent donc d'une part avec le reste du complexe dynéine (IC74) et d'autre part avec les cargos. Bien qu'étant différentes en ce qui concerne leur séquence, LC8 et TCTEX-1 ont des structures tertiaires très similaires comprenant deux hélices α suivies par cinq feuillets β . La structure tertiaire des deux types d'homodimères est ainsi similaire cependant les interactions que chacun d'eux engage avec les cargos sont différentes.

L'homodimère LC8 interagit avec les deux IC74 au niveau des sillons qui se trouvent entre les deux monomères (**Figure 15A**). C'est au niveau de ces mêmes sites qu'a lieu l'interaction avec les molécules cargos. Pour que cet homodimère joue son rôle d'adaptateur avec les molécules à transporter, une des deux chaînes intermédiaires doit donc être remplacée. L'interaction avec ces sites est régie par une séquence peptidique consensus bien connue, l'IC74 et les molécules cargos partagent ainsi des motifs protéiques hautement conservés. Les motifs de liaisons à LC8 sont de deux types : KXTQTX ou XG(I/V)QVD [Rapali *et al.*, 2011]. Au sein de ces deux classes de peptide de liaison, la glutamine (Q) a une position centrale, elle interagit avec la partie N-terminale de la seconde hélice α de LC8 tandis que le reste du peptide se cale dans le sillon intermonomérique. Toutefois on peut noter que les protéines MYO5A [Hodi *et al.*, 2006], Pak1 [Day *et al.*, 2004] et GRINL1A [Garcia-Mayoral *et al.*, 2010] ont leur motif de liaison à LC8 est dépourvu de glutamine.

De même que pour LC8, un motif peptidique de 19 acides aminés d'IC74 assurant la liaison avec TCTEX-1 a été identifié [Mok *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2005]. Au sein de ce peptide une séquence consensus (R/K)(R/K)XX(R/K) est retrouvée dans de nombreuses protéines d'interaction à TCEX-1. TCTEX-1 peut donc interagir avec les cargos et IC74 soit par le même site soit par deux sites opposés de la structure garantissant moins de compétition (**Figure 15B**).

Outre IC74, TCTEX-1 interagit avec de nombreux autres partenaires cellulaires comme la rhodopsine [Tai *et al.*, 1999], Doc-2 [Nagano *et al.*, 1998], le récepteur CD155 du virus de la polio [Mueller *et al.*, 2002], le récepteur de l'hormone parathyroïde [Sugai *et al.*, 2003], la protéine VP26 de la capsid du virus Herpes simplex [Douglas *et al.*, 2004], ou encore la protéine FIP-1 [Lukashok *et al.*, 2000] dont nous reparlerons plus loin.

Les séquences protéiques hautement conservées connues pour interagir avec les chaînes légères de la dynéine sont appelées DLC-AS (Dynein Light Chain Association Sequence) [Moseley *et al.*, 2007].

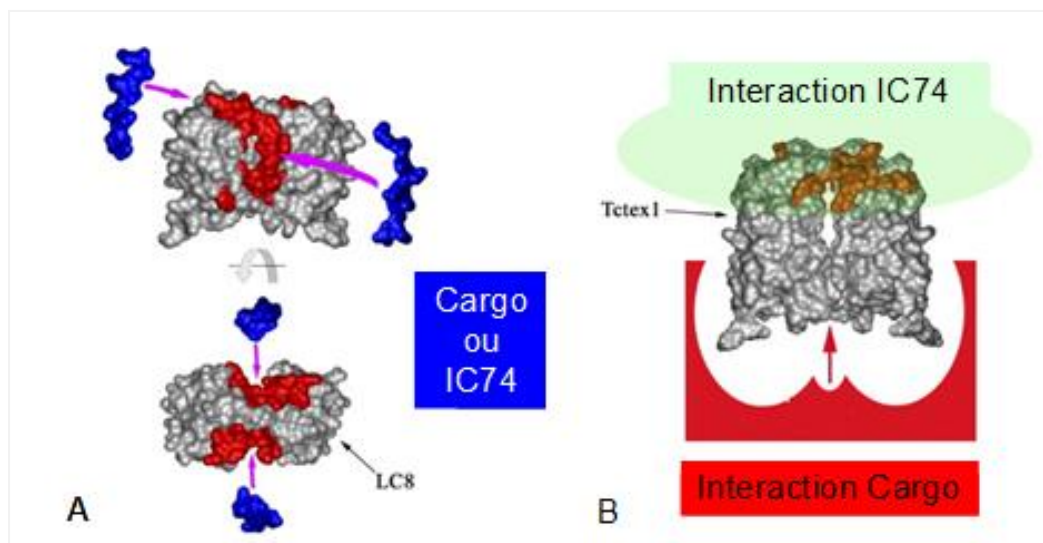


Figure 15 : Représentation de l'interaction Dynéine/cargo par l'intermédiaire des chaînes légères. (A) Les dimères LC8 interagissent avec la chaîne intermédiaire IC74 et les cargos au niveau des mêmes sites par l'intermédiaire d'un même motif peptidique KXTQTX ou XG(I/V)QVD. (B) TCTEX-1 interagit avec la chaîne intermédiaire IC74 (R/K)(R/K)XX(R/K) et certains cargos par deux mécanismes différents qui n'impliquent de ce fait aucune compétition. Adapté de [Wu *et al.*, 2005].

II.2.2.3 : Dynamique

Au cœur du mécanisme de transport de la dynéine se trouve le cycle d'hydrolyse de l'ATP et les changements conformationnels qu'elle entraîne sur le complexe moteur [White & Luring, 2007]. La DHC est une ATPase composée de six domaines AAA+ (ATPases Associated with cellular Activities) organisés en un anneau dont seuls quatre sont capables d'hydrolyser l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP par les domaines AAA2 et AAA4 a un rôle de régulation, leur mutation n'est pas délétère à la mobilité de la dynéine. C'est l'hydrolyse au niveau des sites AAA1 et AAA3 qui provoque les changements conformationnels à l'origine de la dynamique [Kon *et al.* 2004; Imamula *et al.*, 2007; Cho *et al.* 2008].

La force motrice est générée par un changement de position du domaine de liaison (domaine qui fait le pont entre la queue et le domaine AAA1 de la DHC) qui agit comme un levier au cours du cycle d'hydrolyse de l'ATP [Burgess *et al.*, 2003; Houdusse & Carter, 2009]. Ce phénomène est couplé avec une modification de l'affinité du MTBD avec les microtubules. Le couplage de ces deux phénomènes est la clé du mouvement de la dynéine, et nécessite une communication entre la tête et la tige [Carter *et al.*, 2011].

En l'absence d'ATP, la dynéine s'accroche aux MTs par l'intermédiaire du MTBD au niveau de la tête (**Figure 16A**). Lorsque la dynéine lie l'ATP cela provoque son détachement des microtubules (**Figure 16B**) [Johnson, 1985]. Un changement conformationnel entraîne alors "l'armement" du domaine de liaison (**Figure 16C**). Le MTBD se lie à nouveau sur les microtubules ce qui stimule l'activité ATPase du domaine AAA1 (**Figure 16D**). La libération d'énergie permet le "désarmement" du domaine de liaison qui crée la force motrice (**Figure 16E**) [Imamula *et al.*, 2007].

La figure 16 schématise le mouvement d'une seule chaîne lourde, or les deux DHCs fonctionnent en alternance dans un mouvement coordonné. On dit que la dynéine "marche" sur les microtubules, ainsi lorsqu'un des MTBD est libre le second est en interaction avec les microtubules. La technique de piège optique (optical trap) permet d'analyser des forces de l'ordre de la centaine de piconewton, et de détecter des déplacements à l'échelle du nanomètre [Rice *et al.*, 2003]. Cette technologie a été utilisée pour étudier *in vitro* le déplacement de billes de polystyrènes liées à la dynéine le long des microtubules [Mallik *et al.*, 2004]. En règle générale, on admet que le mouvement de la

dynéine est d'environ $1\mu\text{m/s}$ dans la cellule, cependant cette étude nous apprend que le pas de la dynéine varie en fonction des pressions qu'on lui impose. En effet, en fonction des forces qui lui sont appliquées la dynéine a un pas qui peut être de 8, 16, 24 ou 32 nm [Mallik *et al.*, 2004]. Plus les forces sont importantes et plus la taille de son pas diminue; cette adaptabilité est unique puisqu'aucune autre protéine motrice n'a cette capacité. La dynamique de la dynéine sur les microtubules est actuellement encore mal connue comparativement à celle de la kinésine.

Il est à noter que la dynéine a un mouvement qui n'est pas strictement unidirectionnel. Gennerich *et al.* ont montrés que lorsque des forces de l'ordre de 7-10 pN sont imposées au complexe moteur, son mouvement est orienté en direction de l'extrémité positive des microtubules [Gennerich *et al.*, 2007].

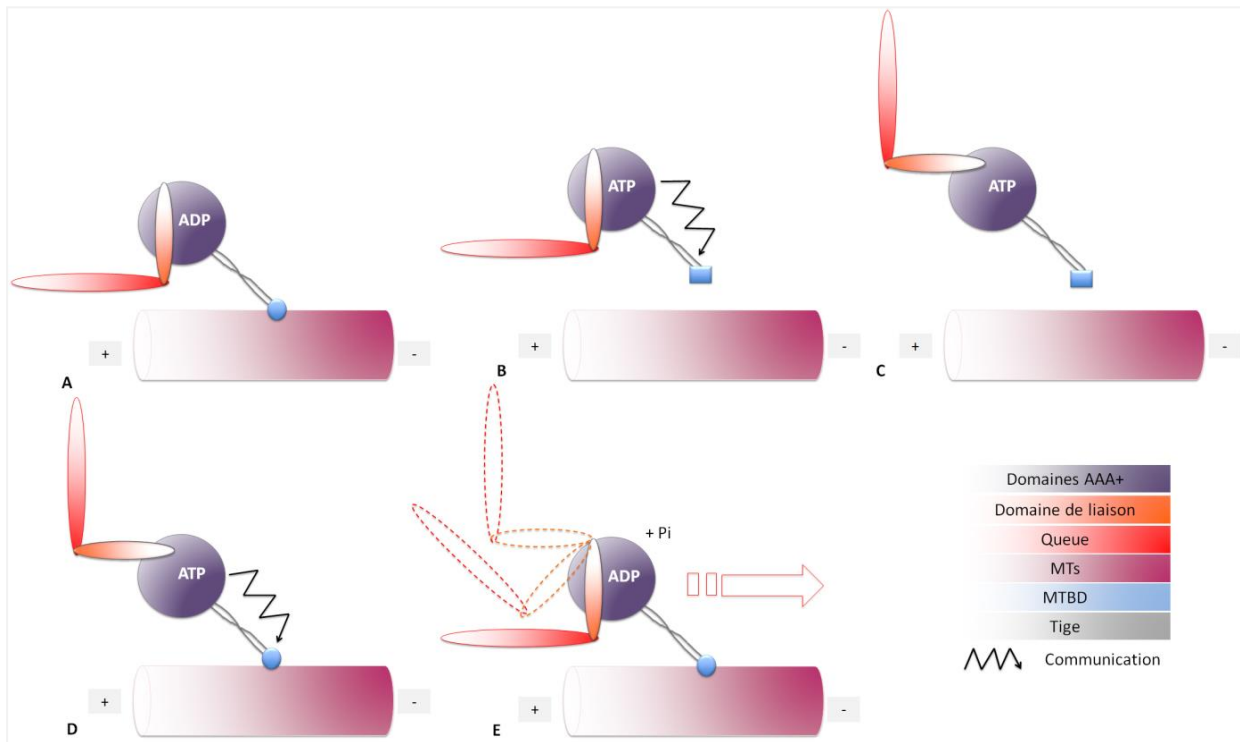


Figure 16 : Mouvement rétrograde de la dynéine suivant le cycle d'hydrolyse de l'ATP. (A,B) En fixant l'ATP le MTBD de la dynéine perd son affinité pour les microtubules. (C,D) Le domaine de liaison de la chaîne lourde s'arme l'affinité du MTBD pour les microtubules est alors retrouvée. (E) L'hydrolyse de l'ATP désarme le domaine de liaison ce qui provoque le mouvement du complexe moteur.

II.2.2.4 : Fonction

La dynéine a de nombreuses fonctions. Parmi elles, le transport rétrograde le long des microtubules de vésicules et organites est la plus étudiée. Ainsi la dynéine est impliquée dans le mouvement des mitochondries, de protéines, d'ARN, des lysosomes, des endosomes tardifs [Chevalier-Larsen & Holzbaur, 2006; Lin & Collins, 1992; Aniento *et al.*, 1993]. Elle participe à la formation du réticulum endoplasmique et à la localisation de l'appareil de golgi au niveau du centrosome [Corthesy-Theulaz *et al.*, 1992]. Elle a de plus un rôle dans la stabilité du réseau de MTs [Ross *et al.*, 2008]. Présente dans les kinétochores [Pfarr *et al.*, 1990], elle participe à la ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire [Matanis *et al.*, 2002].

II.3 : Dynéine et trafic des virus

Le cytoplasme constitue un environnement très encombré où les structures cytosquelettiques et autres organites entravent la diffusion de molécules supérieures à 500 kDa. Ainsi en absence d'un phénomène actif de transport, il a été évalué qu'un virus type Herpes mettrait plus de deux ans à parcourir 10 µm dans le cytoplasme [Dohner & Sodeik, 2005]. Certains virus utilisent la dynéine pour réaliser leur déplacement en direction du MTOC pendant le processus d'infection. Ce transport actif le long des microtubules est déterminant pour un processus d'infection viral efficace. En effet, il a été montré que seul 10% des particules d'adénovirus atteignent le noyau après dépolymérisation des microtubules à l'aide de Nocodazole [Suomalainen *et al.*, 1999; Engelke *et al.*, 2011]. Il en va de même pour d'autres virus : herpes simplex virus (HSV) [Sodeik *et al.*, 1997; Mabit *et al.*, 2002], hépatite B [Funk *et al.*, 2004], cytomegalovirus humain [Ogawa-Goto *et al.*, 2003], virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [McDonald *et al.*, 2002], virus de la peste porcine africaine (ASFV) [Jouvenet *et al.*, 2004], parvovirus [Suikkanen *et al.*, 2003], virus influenza [Lakadamyali *et al.*, 2003], papillomavirus (PV) [Schneider *et al.*, 2011].

Ce transport actif est un des paramètres cruciaux qui explique l'efficacité des vecteurs viraux en thérapie génique. Selon les types de virus le recrutement de la dynéine engage des processus et des partenaires différents [Dodding & Way, 2011] (**Tableau 4**). On peut citer les exemples des adénovirus et virus herpès qui ont des mécanismes de recrutement de la dynéine différents.

Tableau 4: Protéines virales impliquées dans l'interaction des virus avec la dynéine.

Virus	Protéine virale interagissant avec la dynéine	Protéine de la dynéine impliquée dans l'interaction
Herpès simplex	UL34	DYNC1L1a
	UL9	DYNLL1
	UL35(VP26)	DYNLT1 et 3
Herpès virus 7	UL19	DYNLL1
Peste porcine africaine	p54	DYNLL1
Mokola	Phosphoprotéine virale	DYNLL1
Rage	Phosphoprotéine virale	DYNLL1
Papillomavirus	Protéine de capsid L2	DYNLT1 et 3
Maladie de Borna	Protéine E4	DYNLL1
	Glycoprotéine virale G	DYNLRB1
Singe Mason-Pfizer	Matrice virale	DYNLT1
Adénovirus	Hexon de la capsid	DYNC1LI1 et 2
Virus Ebola	Phosphoprotéine virale	DYNLL1

*DYNLL (Dynein Light Chain LC8) – DYNLRB (Dynein Light Chain RoadBlock) – DYNC1LI (Dynein Light Intermediate Chain) – DYNC1I (Dynein Intermediate Chain). Adapté de [Merino-Garcia *et al.*, 2011].*

Adénovirus

Suite à l'injection d'anticorps anti-dynéine et à la surexpression de dynamitine, les adénovirus perdent la capacité de rejoindre le noyau [Leopold *et al.*, 2000; Suomalainen *et al.*, 1999]. La dynéine a donc été identifiée comme étant indispensable au mouvement des adénovirus, cependant jusqu'à très récemment le processus de son recrutement sur les microtubules était inconnu. C'est en 2009 que Bremner *et al.* ont montrés par co-immunoprécipitation que c'est l'héxon (sous-unité de la capsid) qui interagit directement avec l'IC et la LIC1 de la dynéine [Bremner *et al.*, 2009]. Ces interactions peuvent avoir lieu à la condition que l'héxon ait été soumis à un pH acide. Ce résultat suggère que seuls les virus ayant transités par des vésicules d'endocytose sont capables de recruter la dynéine. La microinjection d'anticorps ciblant l'IC de la dynéine ou l'héxon de la capsid virale, l'extinction de la dynéine ou la surexpression d'héxons empêche l'accumulation de virions dans le noyau. La dynactine n'est pas impliquée dans le processus de recrutement de la dynéine par les adénovirus. De la même façon, les protéines accessoires de la dynéine (NudE, NudEL, LIS et ZW10) n'interviennent pas dans ce processus.

Herpès virus

Pour les virus de type Herpès, l'interaction avec la dynéine a lieu avec des protéines de la capsid et des protéines téguments qui l'entourent. La technique double hybride a permis d'identifier l'interaction entre les protéines UL9, UL34, UL35 (VP26) directement avec différents composants du complexe moteur [Martinez-Moreno *et al.*, 2003; Douglas *et al.*, 2004]. La protéine UL9 présente une séquence consensus de liaison à DYNLL1 aussi appelée LC8 (746-KSTQT-750) [Martinez-Moreno *et al.*, 2003]. La petite protéine de la capsid VP26 s'attache directement aux LCs TCTEX-1 et TCTEX-3. L'importance relatives des protéines téguments et de la capsid dans le recrutement de la dynéine est encore mal connue [Diefenbach *et al.*, 2008].

Virus et chaîne légère de la dynéine

Parmi les différentes sous unités constituant la dynéine ce sont les chaînes légères (LCs) qui sont majoritairement ciblées par les virus, et en particulier LC8. Les virus font appel à un mécanisme bien connu pour recruter la dynéine qui sont les séquences DLC-AS de LC8. Ce motif de liaison à LC8 est donc présent dans de nombreuses protéines virales (Tableau 5).

Tableau 5: Protéines virales interagissant avec LC8 grâce à une séquence DLC-AS.

Protéine	Virus	Séquence DLC-AS	Référence
Protéine P	Rage	RSSEEDKSTQTT	[Rodriguez-Crespo <i>et al.</i> , 2001]
Protéine P	Mokola	KSTEDKSTQTP	[Rodriguez-Crespo <i>et al.</i> , 2001]
UL19	Herpès Humain 7	TILVSRSTQTG LGHFTRSTQTS	[Martinez-Moreno <i>et al.</i> , 2003]
UL9	Herpès Humain 1	GVQMAKSTQTF	[Martinez-Moreno <i>et al.</i> , 2003]
VP35	Ebola	PKTRNSQTQTD	[Kubota <i>et al.</i> , 2009]
ADE41	Adénovirus	CITLVKSTQTV	[Martinez-Moreno <i>et al.</i> , 2003]
p54	Peste porcine africaine	VTTQNTASQTM	[Martinez-Moreno <i>et al.</i> , 2003]

Adapté de [Rapali *et al.*, 2011].

III-DYNEINE & TRANSFERT NON VIRAL DE GENES

L'idée d'exploiter la dynéine pour améliorer le trafic cytosolique d'ADNp dans le cadre du transfert non viral de gènes est assez récente. Actuellement encore peu de publications se font l'écho de cette stratégie possible. Depuis le début des années 2000, ces études s'orientent principalement sur le ciblage des chaînes légères de la dynéine dont certains motifs d'interaction sont particulièrement bien caractérisés. Dans cette partie, des travaux utilisant NFκB ou l'héxon de la capsid adénovirale seront aussi présentés.

III.1 : Interaction avec les chaînes légères de la dynéine

DLC-AS de LC8

Comme nous avons pu le voir précédemment (Chapitre II - II.2.2.- Interactions via les chaînes légères), les DLC-AS sont des séquences protéiques hautement conservées qui permettent l'interaction avec les chaînes légères de la dynéine. Les DLC-AS de LC8 sont particulièrement bien décrites et sont de deux types KXTQTX ou XG(I/V)QVD.

Le travail de Moseley *et al.* en 2007 est à l'origine des premiers travaux concernant l'utilisation des DLC-AS dans le transfert non viral de gènes. Ce travail concerne la phosphoprotéine rabique (RPP) qui présente une séquence DLC-AS de LC8 (DKSTQT) ainsi qu'une séquence NLS (KKYK). La présence de la séquence DLC-AS assure l'interaction avec la dynéine et augmente l'accumulation nucléaire de la protéine RPP ainsi que d'autres protéines présentant un NLS. Cette augmentation implique l'augmentation du taux d'importation nucléaire et est dépendante de l'intégrité des microtubules ainsi que de l'interaction avec la dynéine. Ces résultats suggèrent le mécanisme suivant : la séquence DLC-AS permet l'association de la protéine à la dynéine, la dynéine tracte ensuite la protéine dans un mouvement rétrograde le long des microtubules à proximité du noyau, finalement la protéine pénètre dans le noyau grâce à sa séquence NLS.

Suite à cette étude, le potentiel d'un peptide DLC-AS de LC8 a été étudié pour améliorer le trafic intracellulaire de cargos artificiels. Ce peptide de 12 acides aminés (PRMLHRSTQTTNC) est issu de la séquence de la protéine adénovirale BS69 [Kelkar *et al.*, 2004]. Les études biochimiques réalisées indiquent que ce peptide a la capacité d'interagir avec le LC8 libre dans le cytoplasme, *a contrario* de la LC8 du complexe moteur.

L'incorporation de ce peptide dans la formulation de polyplexes qu'il soit greffé sur l'ADNp ou sur un polymère cationique ne montre aucune amélioration du transfert de gènes. Deux arguments peuvent expliquer cette situation. Tout d'abord LC8 est une protéine qui n'est pas uniquement associée à la dynéine, seul 12% de la LC8 intracellulaire se trouve intégrée au complexe moteur [King *et al.*, 1996]. De plus des études structurales de la dynéine montrent que les sites d'interaction des séquences DLC-AS de LC8 sont naturellement occupés par les chaînes intermédiaires IC74 [Fan *et al.*, 2001]. Un peptide DLC-AS de LC8 exogène a donc une probabilité réduite de rencontrer sa cible sur le complexe moteur où une forte compétition inhibe son interaction. Partant de ces constats les séquences DLC-AS de LC8 seraient donc de mauvais candidats pour l'interaction avec la dynéine d'ADNp thérapeutique [Bergen & Pun, 2007].

En 2011, une publication rapporte toutefois un effet positif du transfert de gènes avec une séquence DLC-AS de LC8 [Tanaka *et al.*, 2011a]. Après formation des complexes entre le vecteur cationique Stéaroyl-CH₂R₄H₂C et l'ADNp, le peptide de 15 acides aminés (CKSSQDKSTQTTGDC) est greffé grâce à une liaison disulfure sur le vecteur. Si la présence du peptide inhibe de plus de 60% l'internalisation des complexes d'ADNp par les cellules, l'expression du transgène est en contrepartie faiblement mais significativement améliorée. La séquence DLC-AS améliorerait le trafic des rares polyplexes ayant transfectés les cellules [Tanaka *et al.*, 2011b].

Interaction avec TCTEX-1

Les différences qui opposent LC8 et TCTEX-1 tendent à démontrer que des séquences ciblant TCTEX-1 seraient des candidats plus performants pour l'interaction avec la dynéine d'ADNp thérapeutique. En effet, contrairement à LC8, les dimères de TCTEX-1 peuvent interagir avec les chaînes intermédiaires IC74 et les cargos par deux mécanismes différents au sein du complexe dynéine ce qui n'implique par conséquent aucune compétition [Wu *et al.*, 2005]. En outre TCTEX-1 se retrouve presque exclusivement au sein du complexe dynéine [DiBella *et al.*, 2001]. Ces séquences garantiraient de ce fait une meilleure spécificité et seraient moins en compétition.

Les 40 derniers acides aminés de la protéine L2, protéine de la capsid du papillomavirus humain, a été identifiée comme interagissant avec TCTEX-1 [Florin *et al.*, 2006]. Kwon *et al.* ont rapporté qu'une partie de la séquence de L2 a été exploitée en

transfert de gènes sans toutefois préciser si elle a été greffée sur l'ADNp ou le vecteur [Kwon *et al.*, 2008]. La séquence ne montre aucun effet positif sur l'efficacité de transfection.

Pour analyser cet échec, il est important de s'intéresser aux 40 acides aminés d'intérêt au sein de la protéine L2 (**Figure 17**). Lorsqu'on observe la séquence de ce fragment protéique on identifie la présence de la séquence consensus (R/K)(R/K)XX(R/K) (II.2.2.2 -Interactions *via* les chaînes légères) présente chez IC74 et qui lui permet de se lier à TCEX-1 pour constituer le complexe moteur dynéine. Une trop forte compétition entre le peptide testé en transfection et IC74 peut expliquer l'échec de cette stratégie.

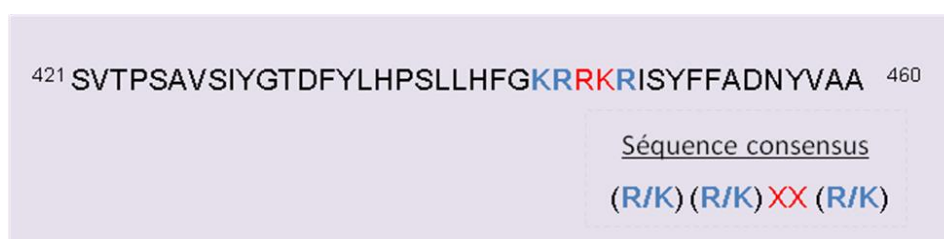


Figure 17: Séquence protéique des 40 derniers acides aminés de la protéine L2 de la capside du papillomavirus humain. On identifie une séquence consensus présente chez IC74 et retrouvée dans de nombreuses protéines d'interaction à TCEX-1.

III.2 : Interaction avec NFκB

La présence de sites κB au niveau de l'ADNp augmente l'efficacité de transfection des cellules. Ces sites κB permettent l'interaction de l'ADNp avec les protéines de NFκB p50 et p65 qui disposent d'un NLS [Mesika *et al.*, 2001 ; Gonçalves *et al.*, 2009]. Si l'augmentation de la transfection observée est une conséquence de l'amélioration de l'importation nucléaire grâce aux importines α et β, elle serait aussi en partie due à l'interaction avec la dynéine. Le transport intracellulaire d'ADNp disposant de 5 motifs κB répétés en tandem (5'-GGGGACTTTCC-3') et complexé avec la protéine p50 (ADNp-p50) a été étudié en microscopie confocale après microinjection [Mesika *et al.*, 2005]. Le transport de l'ADNp-p50 dans le cytoplasme serait facilité grâce à une interaction avec la dynéine. L'interaction avec la dynéine serait médiée par l'importine α qui ferait le lien entre le complexe moteur et p50.

Une autre explication peut être envisagée en s'intéressant au travail de Mikenberg *et al.* qui a montré que la sous-unité p65 de NFκB interagit directement avec l'IC74 de la dynéine ainsi que p150 de la dynactine dans les cellules neuronales. Ces interactions seraient nécessaires pour la localisation nucléaire de NFκB en situation d'inflammation [Mikenberg *et al.*, 2007]. Les hétérodimères p50-p65 se déplaceraient sur les microtubules grâce l'interaction de p65 avec la dynéine.

III.3 : Utilisation de l'héxon de la capsid adénovirale

En 2001, l'héxon de la capsid adénovirale a été conjugué de façon covalente à la PEI pour étudier principalement son effet sur l'importation nucléaire d'ADNp dans le cadre du transfert de gènes non viral. Les polyplexes formulés en présence d'héxon augmentent de 10 fois l'expression du transgène [Carlisle *et al.*, 2001]. L'implication de l'héxon de la capsid adénovirale dans la migration du virus sur les microtubules n'étant pas connue a cette époque, le trafic des polyplexes ainsi formulés n'a pas été étudié. Les auteurs concluent que l'effet de l'héxon sur l'efficacité de transfection serait la conséquence d'une meilleure importation nucléaire de l'ADNp.

CHAPITRE III :

LA PROTEINE D'ADENOVIRUS E₃-14.7K, FIP-1 ET LES MICROTUBULES

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la protéine E₃-14.7K d'Adénovirus. Certaines publications indiquent qu'*in vitro* E₃-14.7K interagirait avec la chaîne légère de la dynéine TCTEL₁ (homologue à TCTEX-1) par l'intermédiaire de la protéine cytosolique FIP-1 [Lukashok *et al.*, 2000]. Sur cette base, nous souhaitons exploiter l'interaction d'E₃-14.7K avec la dynéine pour améliorer le trafic nucléocytoplasmique d'ADNp dans le cadre du transfert de gènes par des vecteurs chimiques.

I- GENERALITES SUR LES ADENOVIRUS HUMAINS

Chez l'homme, plus d'une cinquantaine de sérotypes d'adénovirus ont été répertoriés, ils sont alors responsables de maladies relativement bénignes. Ces virus infectent essentiellement les cellules épithéliales des muqueuses respiratoires, gastro-intestinales ou oculaires. Ils peuvent parfois atteindre le foie ou les reins. Les sérotypes humains sont classés en six sous-groupes (A à F) selon des critères biochimiques, génétiques et structuraux. Les sérotypes les plus étudiés sont les sérotypes 2 et 5 (utilisé en thérapie génique) qui appartiennent tous les deux au sous-groupe C.

Les adénovirus sont des particules virales non enveloppées d'un diamètre de 60 à 110 nm. Ils sont constitués extérieurement d'une capsidie icosaédrique (**Figure 18A**). Trois protéines composent principalement la capsidie : l'héxon constituant les faces icosaédriques, le penton base et la fibre qui s'associent pour former le complexe penton à chacun des 12 sommets. Les protéines internes IIIa, VI, VIII et IX s'associent aux hexons et pentons pour assurer la stabilité de la capsidie. Les protéines V, VII et Mu interagissent avec l'ADN viral pour former des structures nucléoprotéiques. Un exemplaire de la protéine Terminale (TP) est lié de façon covalente à chacune des extrémités 5' des 2 brins d'ADN (**Figure 18B**).

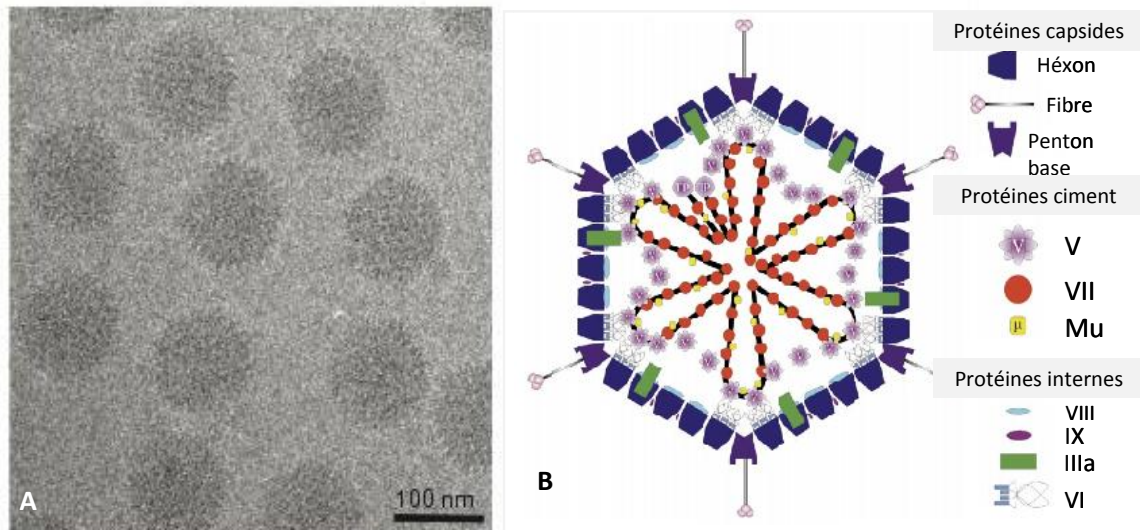


Figure 18 : Morphologie et structure des adénovirus. (A) Adénovirus humain de sérotype 5 observé par microscopie électronique à transmission en cryomicroscopie. (B) Schéma structural de la capside des adénovirus. Adapté de [Bakkouri *et al.*, 2008 ; Russell *et al.*, 2000].

Infection adénovirale

Les adénovirus pénètrent la cellule après reconnaissance de récepteurs spécifiques au niveau de la membrane plasmique tels que CAR (Récepteur Coxsackievirus et adénovirus) et acide sialique [Bergelson *et al.*, 1997; Nemerow *et al.*, 2000]. Après cette reconnaissance une deuxième interaction s'effectue avec les intégrines $\alpha 2 \beta 5$ via la séquence peptidique RGD contenue dans les fibres. Cette interaction induit l'endocytose des particules virales via des vésicules à clathrine puis passent dans les endosomes. Les fibres de la capside déstabilisent les endosomes, les virions sont ensuite relargués dans le cytosol et migrent le long des microtubules jusqu'au pore nucléaire [Suomalainen *et al.*, 1999] (**Figure 19**). Après désassemblage de la capside, le génome adénoviral et les protéines qui lui sont associées sont importées dans le noyau où les gènes précoces puis tardifs sont transcrits [Russell, 2000; Whittaker *et al.*, 2000].

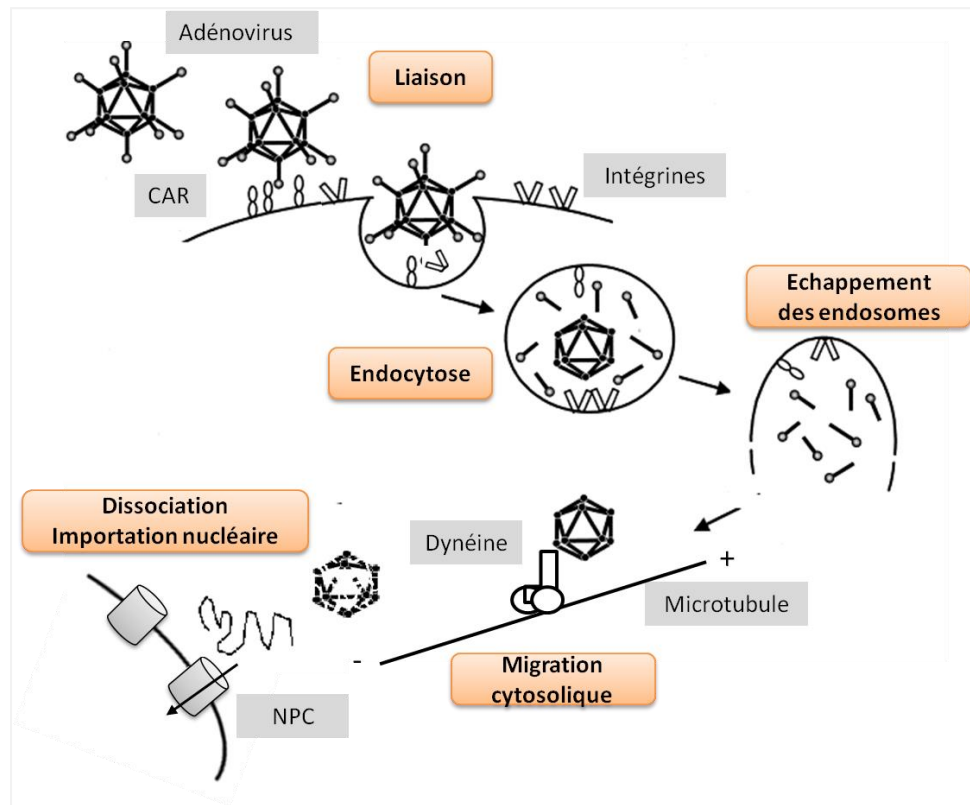


Figure 19 : L'infection adénovirale. Adapté de [Barnett *et al.*, 2002]

Génome adénoviral

Le génome adénoviral est une séquence d'ADN double brin linéaire de 30 à 45 kb. Ses extrémités sont formées par des ITR (séquences Terminales Répétées Inversées) qui interviennent dans la réplication du génome viral. Les deux brins d'ADN sont codants et subdivisés en deux régions principales (**Figure 20**) :

- La région E (pour Early) correspond aux gènes précoces impliqués dans la préparation de la cellule à la réplication de l'ADN viral. La phase précoce intervient environ 1h après le début de l'infection adénovirale. Elle code des protéines fonctionnelles dont nous parlerons plus précisément dans le prochain sous-chapitre.

- La région L (pour Late) correspond aux gènes transcrits tardivement qui sont impliqués dans la formation des nouvelles particules virales. La transcription de l'unité transcriptionnelle L intervient au moment de la réplication de l'ADN viral. *In vitro* la phase tardive commence 9 à 12H après l'infection. Le promoteur MLP (Major Late Promoter) contrôle la synthèse d'un transcrit polycistronique qui est à l'origine de 18 ARNm qui

codent presque exclusivement pour des protéines structurales. Les protéines structurales néosynthétisées sont importées dans le noyau où sont assemblées les capsides virales vides, l'ADN viral y est ensuite empaqueté [Philipson *et al.*, 1984].

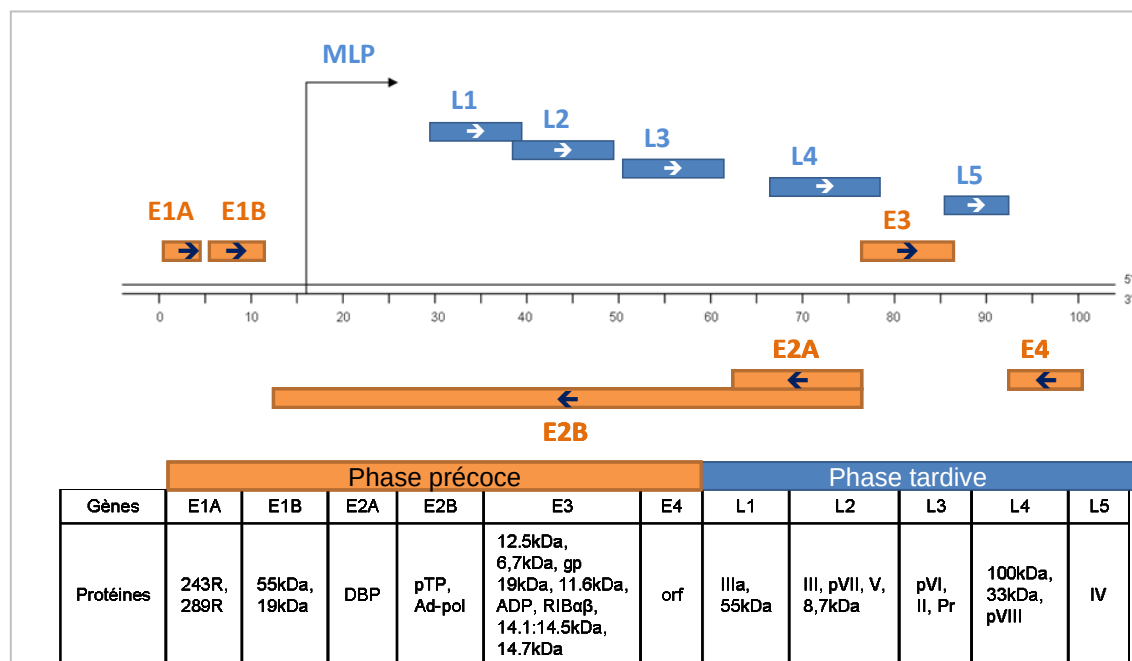


Figure 20 : Organisation génomique de l'adénovirus de sérotype 5.

Les protéines de la phase précoce

Les protéines exprimées au cours de la phase précoce interagissent entre elles ainsi qu'avec les protéines de la cellule hôte afin de préparer la synthèse de nouveaux virions. Les ARNm codants pour les protéines adénovirales précoces sont transcrits depuis six différents *loci* du génome viral. La région précoce 1A (E1A) est la première région à être transcrite, suivie par E1B, E3 puis E4 [Nevins *et al.*, 1977; Lewis *et al.*, 1980]. Le promoteur E2 est le dernier à être activé (**Figure 20**).

Les gènes issus de la région E1A sont les premiers à être transcrits et traduits. Les protéines de la région E1A (243R et 289R) ont un rôle régulateur dans l'expression des gènes viraux et cellulaires. En effet 289R stimule la transcription des autres régions E ainsi que le cycle cellulaire de la cellule hôte en rendant actif les facteurs de transcription E2F [Frisch *et al.*, 2002]. Suite à l'activation de gènes favorisant la croissance cellulaire, le rythme du cycle des cellules infectées est perturbé, les cellules deviennent quiescentes et s'accumulent en phase S du cycle cellulaire [Babiss *et al.*, 1985; Cress and Nevins *et al.*,

1996]. L'expression des gènes E1A sensibilise les cellules infectées à la mort associée au TNF- α .

Le changement de rythme de la mitose de la cellule infectée permet l'accumulation des acteurs de l'apoptose parmi lesquels p53 et BAX [Villunger *et al.*, 2003]. Afin d'enrailler la lyse de la cellule infectée avant la multiplication des particules virales, l'adénovirus va développer différentes stratégies menées par les protéines des régions E1B, E3 et E4 s'attaquant aux différentes voies d'apoptose et aux mécanismes de l'immunité.

Certaines protéines favorisent le métabolisme du virus. Ainsi, l'association des protéines E1B-55K et E4-34K induit le transport des ARNm viraux dans le cytoplasme de la cellule hôte [Goodrum *et al.*, 1999; Weigel *et al.*, 2000]. A l'inverse, 243R coopère avec E1B-19K et 55K pour inhiber la traduction des ARNm cellulaires en bloquant leur transport du noyau jusqu'au cytoplasme [Babiss *et al.*, 1985]. Le fonctionnement des mécanismes de l'immunité sont perturbés par la protéine E3-gp19K qui empêche les molécules du CMHI d'être exprimées à la surface de la cellule [Bennett *et al.*, 1999]. L'expression des protéines précoces relève d'une régulation complexe qui implique les niveaux d'expression des protéines de types E1A et E4. Après avoir été toutes traduites et amenées à maturité au niveau du cytoplasme de la cellule hôte, la plupart d'entre elles sont adressées au niveau du noyau de la cellule. En revanche, une partie des protéines de types E1B, E3 et E4 reste dans le cytoplasme de la cellule.

Les protéines E3

L'unité de transcription virale E3 code pour sept protéines qui sont, dans l'ordre du génome adénoviral, E3-12.5K [Hawkins & Wold, 1992], E3-6.7K, E3-gp19K [Persson *et al.*, 1980], E3-11.6K ou ADP (Adenovirus Death Protein, E3-10.4K ou RID α (Internalisation et Dégradation Récepteur) [Tollefson *et al.*, 1990], E3-14.5K ou RID β [Tollefson *et al.*, 1990 b] et E3-14.7K [Persson *et al.*, 1978; Tollefson *et al.*, 1988]. En règle générale, les protéines E3 s'attaquent aux mécanismes de défense cellulaire comme la présentation antigénique, l'apoptose, et la réponse inflammatoire. Il est intéressant de noter que certaines protéines E3 sont des protéines transmembranaires, qui se localisent dans le RE, le Golgi, les membranes plasmique et nucléaire [Wold *et al.*, 1994; Burgert & Blusch., 2000]. En ce sens la région E3 est unique puisqu'aucune autre unité de transcription adénovirale ne code pour des protéines transmembranaires.

Le système immunitaire peut contrôler l'infection virale par la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées par les Lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Les CTLs reconnaissent les épitopes peptidiques viraux présentés par les molécules CMH de classe I situées à la surface des cellules infectées. La reconnaissance du complexe antigène/CMH déclenche la libération de facteurs cytotoxiques tels que perforine et granzymes. Ces derniers peuvent induire l'apoptose cellulaire par les voies caspase dépendante et indépendante [Trapani *et al.*, 2000]. L'apoptose des cellules infectées peut être aussi déclenchée par l'expression de facteurs proapoptotiques tels que Fas ligand, TNF (Tumor necrosis Factor), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Les protéines E3 contrôlent ces mécanismes de protection contre l'infection virale.

E3-gp19K retient les molécules CMH de classe I dans le RE [Burgert, 1996]. L'explication du mécanisme se trouve dans la structure de la protéine qui comprend deux composantes essentielles : - Un domaine d'interaction avec les molécules CMH. - Un domaine de localisation au RE (au niveau du domaine transmembranaire et de l'extrémité cytoplasmique de la protéine).

Un complexe de deux protéines E3, RID $\alpha\beta$, confère une résistance à la cytolysse induite par le TNF α . De surcroît ce complexe protéique inhibe l'expression des récepteurs apoptotiques EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), TRAIL (1 et 2) et Fas de la surface des cellules infectées en induisant leur internalisation et leur dégradation dans les lysosomes [Mahr & Gooding, 1999; Burgert & Blusch *et al.*, 2000; Tollefson *et al.*, 1998]. C'est de cette fonction que provient l'origine du nom du complexe RID.

La protéine E3-14.7K est principalement connue pour protéger les cellules infectées de la mort cellulaire induite par TNF- α et pour son implication dans l'inhibition de la réponse inflammatoire. Nous allons nous attarder sur les différents mécanismes d'action d'E3-14.7K.

II-LA PROTEINE E3-14.7K

La protéine E3-14.7K fait l'objet de plusieurs publications rapportant son activité anti-cytotoxique liée au TNF α , mais son mécanisme d'action n'est cependant toujours pas complètement résolu. Cette protéine est exprimée par de nombreux sérotypes adénoviraux et sa séquence est hautement conservée [Horton *et al.*, 1990]. Contrairement à d'autres protéines E3, E3-14.7K ne contient pas de domaine transmembranaire et a une double localisation nucléaire et cytoplasmique [Gooding *et al.*, 1990].

II.1 : Structure [Kim & Foster, 2002]

Des études biophysiques réalisées sur la protéine E3-14.7K ont permis de résoudre en partie l'organisation et la structure de cette protéine (**Figure 21**). E3-14.7K adopte une structure tertiaire composée d'un enchainement de six feuillets β encadrés de part et d'autre par deux hélices α . Pour délimiter les différents domaines structuraux de la protéine, E3-14.7K a été soumise à la protéolyse par la trypsine ou l' α -chymotrypsine. L'analyse des produits de digestion enzymatique révèle que les sites de protéolyse sont rares, en effet les deux tiers en C-terminal d'E3-14.7K sont particulièrement résistants à la protéolyse. De plus E3-14.7K a la capacité de lier le zinc et d'autres ions divalents comme le cobalt avec un rapport stœchiométrique 1:1. En solution la protéine E3-14.7K pourrait s'assembler en une structure multimérique composée de neuf monomères.

La mutation ponctuelle des différents résidus cystéines en positions 44, 50 et 119 inhibe l'activité anti-apoptotique d'E3-14.7K [Ranheim *et al.*, 1993]. D'après Foster et Kim ces mutations la protéine E3-14.7K empêcheraient la liaison au zinc, cruciale pour l'accomplissement de son action anti-apoptotique. Aucun résultat biologique n'appuie cette hypothèse jusqu'à présent.

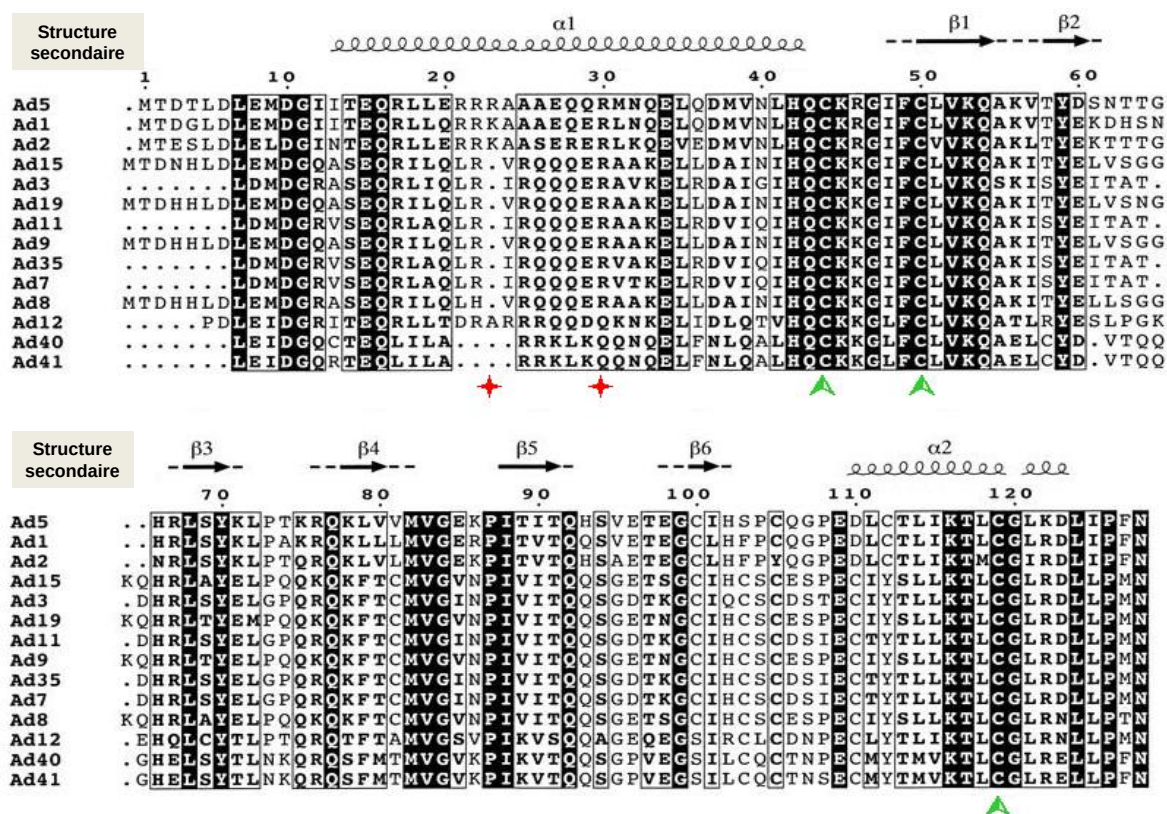


Figure 21 : Alignement des séquences protéiques des protéines E3-14.7K issues de différents sérotypes d'adénovirus humains. L'alignement des séquences protéiques est réalisé avec le programme CLUSTALW. La structure secondaire est prédite à l'aide des serveurs Predict Protein et PSIPRED. ♦, sites de clivage de la trypsine en condition native ; ▲, résidus cystéine (C) d'E3-14.7K du sérotype 5 d'adénovirus qui, lorsqu'il est muté en Sérine (S) inhibe le rôle anti-apoptotique de la protéine. Adapté de [Kim & Foster, 2002].

II.2 : Activité biologique

Des rats infectés par voie intranasale avec un adénovirus mutant dont l'expression d'E3-14.7K est invalidée présentent une réponse inflammatoire pulmonaire moins sévère comparativement à une infection un adénovirus sauvage [Ginsberg *et al.*, 1989]. A l'inverse chez un modèle murin de pneumonie une augmentation des infiltrations alvéolaires est observée en l'absence d'E3-14.7K [Sparer *et al.*, 1996]. L'expression du gène d'E3-14.7K par le virus de la vaccine (VV) a un effet antagoniste sur l'activité anti-virale du TNF α chez la souris [Tufariello *et al.*, 1994]. Ces études *in vivo* révèlent principalement le rôle protecteur d'E3-14.7K vis-à-vis de la mort cellulaire induite par TNF α mais aussi une action ambiguë sur la réponse inflammatoire.

Effet protecteur de la mort cellulaire induite par TNF α (Figure 22A)

Indépendamment des autres protéines adénovirales, E3-14.7K protège les cellules de l'apoptose induite par le TNF α . Cet effet anti-apoptotique n'est pas la conséquence d'une perte d'affinité du récepteur TNF (TNFR) pour son ligand, ou de sa délocalisation de la membrane cellulaire [Horton *et al.*, 1991]. L'explication du processus vient du rôle inhibiteur d'E3-14.7K sur l'internalisation du récepteur TNFR₁ après liaison du TNF α par E3-14.7K, perturbant de ce fait la suite de la cascade de signalisation induite par TNF α [Schneider-Brachert *et al.*, 2006].

Le TNF α est une cytokine proinflammatoire qui a de nombreuses fonctions biologiques qui se transmettent par l'interaction avec deux récepteurs spécifiques à la surface cellulaire : TNFR₁ et TNFR₂. Alors que TNFR₁ est exprimé dans la plupart des tissus, l'expression de TNFR₂ est limitée aux cellules du système immunitaire. En présence de son ligand (TNF α) le récepteur TNF se trimérise, les domaines de mort (DD) des monomères TNFR et de l'adaptateur TRADD (TNF-Receptor associated Death Domain) s'associent. L'interaction avec TRADD permet l'activation des caspases et l'apoptose. Le TNFR₁ est aussi un activateur de la voie NF κ B via le recrutement indirect de RIP et TRAF par TRADD. Le recrutement des protéines TRADD, FADD et de la procaspase 8 au niveau du TNF-R₁ forme le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le DISC permet l'oligomérisation et l'activation de la caspase 8 déclencheuse de la cascade de caspases.

En inhibant l'internalisation du récepteur TNFR₁, E3-14.7K interdit le recrutement des protéines du DISC [Schneider-Brachert *et al.*, 2006]. Cependant le recrutement de RIP et de TRAF impliqués dans l'activation de NF κ B induite par le TNF α n'est pas affecté par E3-14.7K

Implication dans la voie NF κ B (Figure 22B-C)

E3-14.7K est directement impliquée dans la voie NF κ B grâce à son interaction avec FIP-3 (Fourteen.7k Interacting protein 3). Qui est plus connue sous les noms NEMO (NF κ B Essential Modulator), IKK γ et IKKAP₁ (IKK associated protein-1).

NF κ B désigne un groupe de facteurs de transcription dont la version la plus connue est l'hétérodimère p65/p50. NF κ B peut activer des facteurs anti-apoptotiques impliqués dans la réponse liée au TNFR₁ [Tai *et al.*, 2000]. Brièvement, NF κ B est régulée par les

protéines I κ Bs inhibitrices qui le retiennent dans le cytoplasme. En réponse à une stimulation (TNF α), les I κ Bs sont phosphorylées par un complexe I κ B kinase (auquel participe FIP-3) conduisant à leur ubiquitination suivie de leur dégradation par le protéasome. NF κ B ainsi libre migre dans le noyau et joue son rôle de facteur de transcription [Karin & Ben-Neriah, 2000].

Si FIP-3 est généralement considérée comme un élément activateur de NF κ B [Yamaoka *et al.*, 1998]. Son rôle est toutefois plus celui d'un régulateur. Lorsque FIP-3 est surexprimée par transfection transitoire, l'activité transcriptionnelle de NF κ B est inhibée [Li *et al.*, 1998]. FIP-3 interagit et inhibe deux protéines essentielles pour l'activation de NF κ B : RIP et NIK. En outre, FIP-3 inhibe l'activation de NF κ B par TNF α dans les cellules HEK293 lorsqu'elle est cotransfectée avec le récepteur TNFR1 ou IKK β .

En interagissant avec FIP-3, E3-14.7K bloquerait son interaction avec RIP et lèverait par conséquent son action inhibitrice de NF κ B [Wold *et al.*, 1999]. De plus en présence d'E3-14.7K, FIP-3 qui est normalement localisé dans le noyau et le cytosol, se retrouve piégé dans le cytoplasme.

Malgré ces différents éléments, il n'est pas clairement admis qu'E3-14.7K active la voie NF κ B. Klingseisen *et al.* indiquent qu'E3-14.7K n'affecte pas l'activation de NF κ B [Klingseisen *et al.*, 2012], alors que Carmody *et al.* défendent qu'E3-14.7K inhibe la voie NF κ B [Carmody *et al.*, 2006]. De façon intéressante par la présence de sites κ B au sein du promoteur adénoviral E3, NF κ B peut induire la transcription des gènes E3. En activant cette voie, E3-14.7K activerait sa propre synthèse [Deryckere *et al.*, 1995].

L'étude minutieuse de la bibliographie permet toutefois de conclure sereinement qu'E3-14.7K agit sur la voie NF κ B pour protéger les cellules de l'apoptose induite par le TNF α , soit en stimulant le rôle activateur de FIP-3 soit en bloquant son activité inhibitrice. L'activité de NF κ B ainsi stimulée permet d'activer la traduction de gènes anti-apoptotiques [Ye *et al.*, 2000].

E3-14.7K interagit aussi avec la protéine FIP-2 (Fourteen Interacting protein 2) qui présente 53% d'homologie avec FIP-3, et qui à ce titre elle est aussi appelée NRP (NEMO-related protein) [Schwamborn *et al.*, 2000]. FIP-2 est clairement impliquée dans l'apoptose et la signalisation de NF κ B. En effet la transcription de FIP-2 est activée en réponse au

TNF- α et agit comme un inhibiteur de la voie NF κ B [Li *et al*, 1998; Sudhakar *et al*, 2009]. De plus, lorsque FIP-2 est surexprimée, elle inhibe l'effet anti-apoptotique d'E3-14.7K. Par l'intermédiaire d'un domaine présent dans la partie C-terminal présent de FIP-2 et de FIP-3, ces deux protéines sont capables de lier et d'inhiber RIP et entreraient en compétition dans le cadre de cette interaction [Zhu *et al*, 2007]. Le rôle respectif de FIP-2 et 3 dans l'implication d'E3-14.7K dans la voie NF κ B notamment concernant RIP est encore inconnu.

Effet protecteur de l'apoptose induite par TRAIL (Figure 22D)

Les adénovirus codent pour trois protéines qui, séparément, sont capables d'inhiber l'apoptose induite par TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Il s'agit de RID α β , E1B-19K et E3-14.7K. Le mécanisme par lequel E3-14.7K inhibe l'apoptose induite par TRAIL est encore inconnu [Tollefson *et al*, 2001].

Effet protecteur de l'apoptose induite par Fas (Figure 22E)

Outre l'effet lié au TNF α , E3-14.7K serait capable de bloquer l'apoptose initiée par la voie Fas. La voie Fas a un mécanisme de déclenchement de l'apoptose plus simple que la voie liée au TNF α . En présence de son ligand (FasL), le récepteur Fas se timérise, les domaines de mort (DD) des monomères Fas et de l'adaptateur FADD (Fas Associated Death Domain) entrent en interaction. La protéine FADD possède un domaine DED (Death Effector Domain) qui lui permet de recruter des procaspases 8 par l'intermédiaire de ses domaines DED homologues. L'accumulation des procaspases 8 au sein de ce complexe suffit à leur activation en caspases 8 (aussi appelé FLICE pour FADD-Like Interleukin-1 β -Converting Enzyme). En fonction des lignées cellulaires où la voie Fas est initiée, les caspases 8 permettent soit : - Le déclenchement de la cascade des caspases en clivant directement la procaspase-3 (lignées cellulaires appelées de type I). - Le clivage de Bid qui peut alors causer la fuite du cytochrome c des mitochondries et activer indirectement la cascade de caspases.

Par son interaction directe avec la caspase 8, E3-14.7K inhiberait l'activation de la cascade de caspase et ainsi serait capable d'inhiber la voie d'apoptose Fas [Chen *et al*, 1998]. La séquence protéique d'E3 14.7K responsable de son interaction avec FLICE est comprise entre les acides aminés 31 à 128 [Kim & Foster, 2002]. Il est important de noter

que la caspase 8 en tant qu'élément de la cascade de caspase est aussi partie prenante de la voie d'apoptose liée au TNF α .

Acide arachidonique

E3-14.7K inhibe l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) et empêche par conséquent la synthèse d'acide arachidonique. Son mécanisme d'action est mal connu, il est cependant différent du complexe RID $\alpha\beta$ qui bloque directement la translocation de la PLA₂ du cytoplasme à la membrane cellulaire [Dimitrov *et al.*, 1997]. Sachant que PLA₂ peut être activée par le clivage de caspase, le rôle inhibiteur de la caspase 8 d'E3-14.7K peut expliquer en partie ce phénomène [Wissing *et al.*, 1997].

Interaction avec le facteur inducteur d'apoptose (Figure 22F)

Le facteur inducteur de l'apoptose (AIF) ou FIP-4 (Fourteen Interacting protein 4) est une molécule pro-apoptotique localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Pour exercer son activité pro-apoptotique, AIF doit être libéré dans le cytosol puis pénétrer dans le noyau. La voie d'apoptose qui implique AIF est indépendante des caspases, à lui seul AIF est capable de provoquer l'apoptose nucléaire. E3-14.7K interagit avec FIP-4, le rôle de cette interaction dans l'activité anti-apoptotique d'E3-14.7K n'est pas encore élucidée [Li *et al.*, 1996]. Il est toutefois à noter qu'au cours de l'infection adénovirale AIF ne se retrouve dans le noyau que très tardivement dans le cycle infectieux [Fessler & Horwitz, 2004].

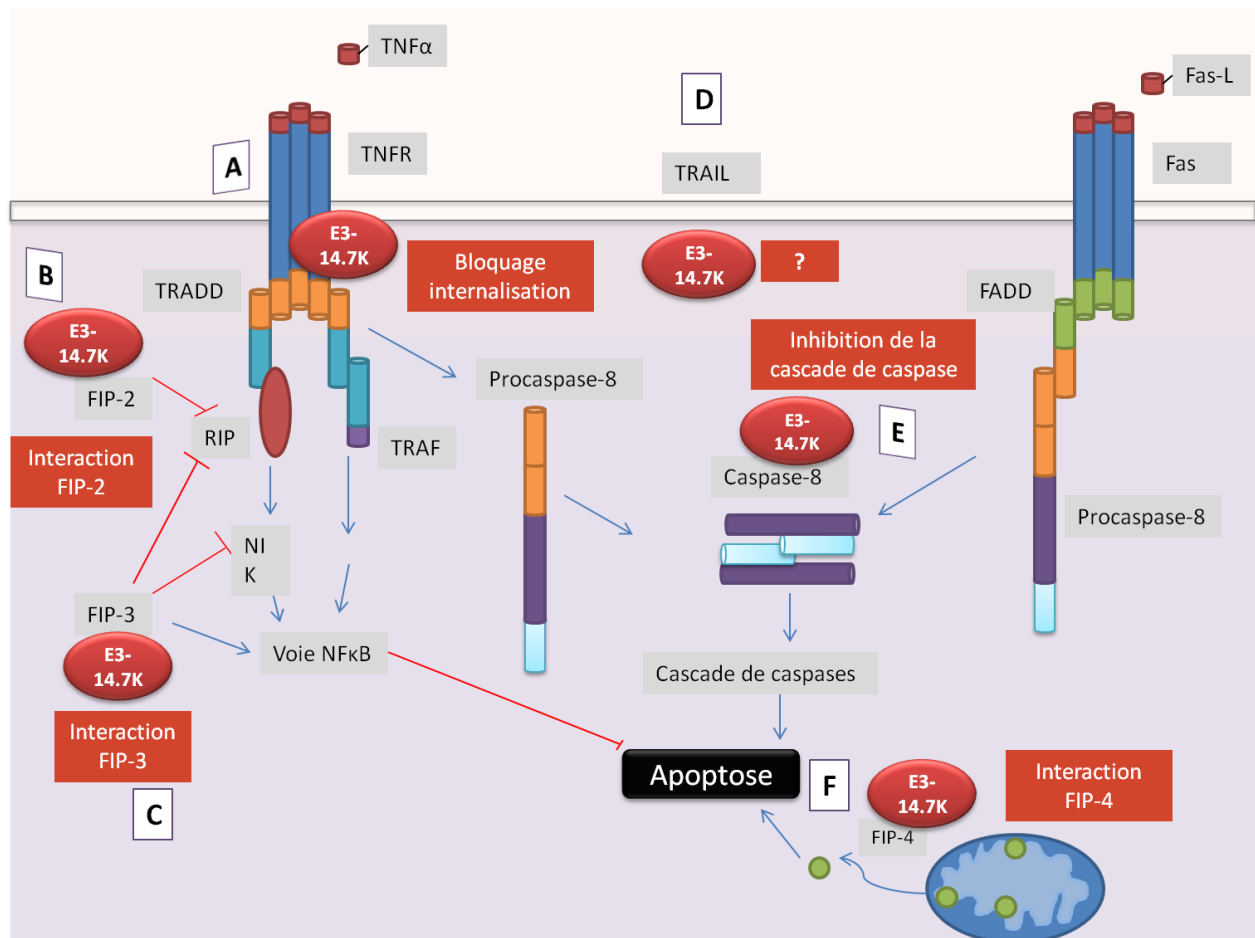


Figure 22 : Activité anti-apoptotique d'E3-14.7K. (A) E3-14.7K bloque l'internalisation du récepteur TNFα. (B) E3-14.7K active la voie NFκB protectrice de l'apoptose par son interaction avec FIP-3 (ou NEMO) et (C) FIP-2. (D) E3-14.7K inhibe l'apoptose induite par TRAIL par un mécanisme encore mal connu. (E) Par son interaction directe avec la caspase 8, E3-14.7K inhibe l'activation de la cascade de caspase et donc la voie d'apoptose Fas et TNFR. (F) E3-14.7K interagit avec FIP-4 (aussi appelé AIF), le rôle de cette interaction dans l'activité anti-apoptotique d'E3-14.7K n'est pas encore élucidée.

II.3 : Les protéines FIPs

Comme nous venons de le voir, les partenaires protéiques intracellulaires d'E3-14.7K sont appelés FIPs pour Fourteen.7K Interacting Proteins. Quatre protéines FIPs ont été identifiées par la technique double hybride chez la levure (**Figure 23**). FIP-2, 3 et 4 ont déjà été mentionnées dans ce chapitre lors de l'évocation de l'activité biologique d'E3-14.7K (II.2 : Activité biologique). FIP-1 quant à elle occupe une place à part n'étant pas clairement liée à l'apoptose.

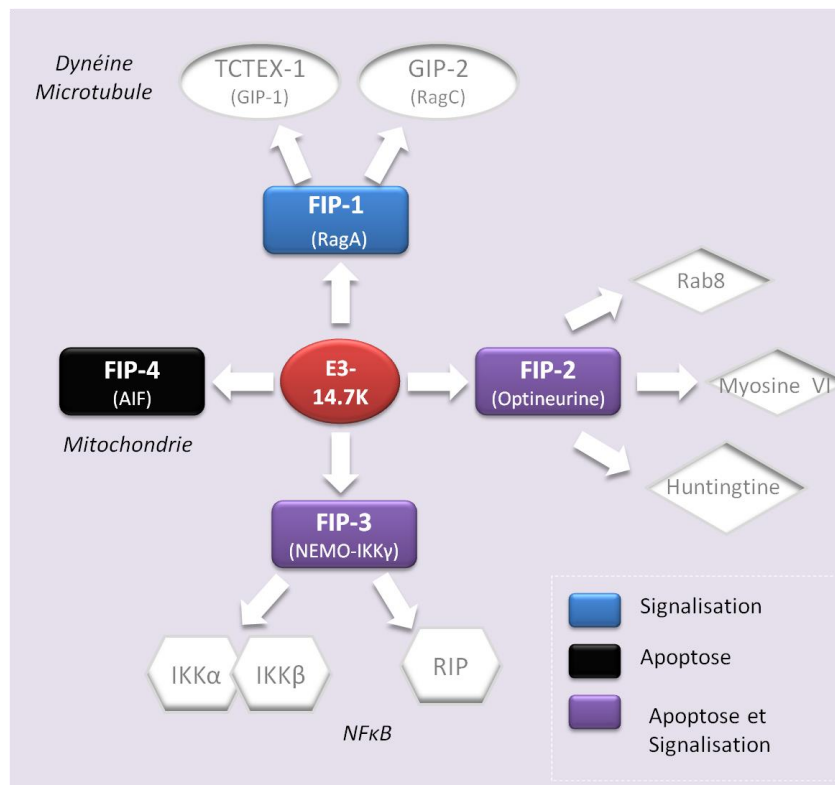


Figure 23 : Les partenaires d'interaction d'E3-14.7K. Quatre protéines appelées FIPs (Fourteen-Interacting proteins). FIP-1 est impliquée dans la signalisation cellulaire grâce à son implication dans le trafic intracellulaire de macromolécules. FIP-2 est impliquée dans la voie de signalisation du TNF α . FIP-3 est une protéine régulatrice de la voie NF κ B. FIP-4 est une molécule pro-apoptotique localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial.

FIP-2

FIP-2 est une protéine cytoplasmique de 67 kDa composée de deux domaines « leucine zipper » et présenterait un domaine en doigt de zinc dans sa partie C-terminale. La partie C-terminale de FIP-2 (acides aminés 395 à 577) interagit avec E3-14.7K [Li *et al.*, 1998]. FIP-2 est exprimée de façon ubiquitaire bien qu'elle soit majoritairement représentée dans la rétine, le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le placenta et le rein [Li *et al.*, 1998; Rezaie *et al.*, 2005; De Marco *et al.*, 2006]. FIP-2 est aussi connue sous les noms NRP et Optineurine (OPTN) soulignant pour le premier son implication dans la voie NF κ B et pour le second son rôle dans l'apparition de glaucomes primaires à angle ouvert (POAG : Primary Open Angle Glaucoma).

NRP (NEMO Related Protein) fait référence à la grande homologie constatée entre FIP-2 et NEMO (FIP-3). Toutes deux entrent en compétition pour interagir et d'inhiber RIP

[Zhu *et al*, 2007](II.2 : Activité biologique). Malgré les 53% d'homologie entre FIP-2 et NEMO FIP-2 est incapable de se substituer à NEMO au sein du complexe I κ B kinase activateur de NF κ B.

Des mutations au sein du gène FIP-2, fortement exprimée au niveau de la rétine, sont associées à l'apparition de certains glaucomes [Rezaie *et al*, 2002; Rao *et al*, 2011]. FIP-2 est nommée dans ce cadre Optineurine (Optic neuropathy-inducing protein). La mutation E50K du gène FIP-2 provoque la mort liée au TNF α des cellules ganglionnaires de la rétine, FIP-2 ne pouvant plus jouer son rôle inhibiteur de NF κ B [Chalasani *et al*, 2007].

La surexpression de FIP-2 protège les cellules d'une mort cellulaire induite par H₂O₂ en inhibant la libération du Cytochrome c par les mitochondries. La rétention du Cytochrome c empêche de ce fait l'activation de la caspase 9 par l'apoptosome et par conséquent la cascade de caspases au cœur du déclenchement de l'apoptose [Rao *et al*, 2011].

FIP-2 interagit avec certains partenaires intracellulaires qui l'implique dans le trafic vésiculaire parmi lesquels Rab8, Huntingtine et Myosine VI [Hattula & Peränen, 2000; Sudhakar *et al*, 2009; Sahlender *et al*, 2005]. Myosine VI est une protéine motrice qui se déplace, contrairement aux autres protéines Myosine, en direction du pôle négatif des filaments d'actine [Wells *et al*, 1999]. Un motif RRL au niveau de la queue de Myosine VI interagit avec la partie C-terminale de FIP-2, les deux protéines étant colocalisées au niveau de l'appareil de Golgi. La déplétion en FIP-2 grâce à des siRNA révèle son implication dans l'exocytose de vésicules golgiennes [Sahlender *et al*, 2005].

FIP-3

Comme il a été précisé précédemment E3-14.7K est impliquée directement dans la voie NF κ B grâce à son interaction avec FIP-3 [Li *et al*, 1999]. FIP-3 est plus connue sous les noms NEMO et IKK γ soulignant son rôle dans la voie NF κ B. Le mécanisme par lequel l'interaction d'E3-14.7K et FIP-1 a un rôle protecteur de l'apoptose liée au TNF α est développée dans le paragraphe II (II.2 : Activité biologique).

En 2000, la mutation du gène codant FIP-3 est désignée comme responsable d'une maladie rare l'*Incontinentia pigmenti* ou syndrome de Bloch-Sulzberger [Smahi *et al.*, 2000]. Cette maladie provoque de graves lésions cutanées et s'accompagne d'atteintes ophtalmologiques (anomalies vasculaires rétinienne, décollement de rétine...) dentaires (anodontie partielle, dents coniques, alignement anormal) et neurologiques (retard mental, convulsions). L'absence de FIP-3 rend le complexe I κ B kinase non fonctionnel inhibant par conséquent l'activité de NF κ B [Smahi *et al.*, 2000; Aradhya *et al.*, 2002]. Les cellules mutées sont rendues vulnérables à l'apoptose liée au TNF α .

FIP-4

FIP-4, appelée aussi facteur inducteur d'apoptose (AIF), est la première protéine mitochondriale identifiée impliquée dans le déclenchement de la mort cellulaire indépendante des caspases [Susin *et al.*, 1999]. En dehors d'un contexte apoptotique AIF est encrée dans la membrane mitochondriale interne par l'intermédiaire d'un domaine N-terminal transmembranaire. AIF est impliquée dans le métabolisme mitochondrial, c'est une flavine adenine dinucléotide oxidoréductase qui joue un rôle dans la phosphorylation oxydative (OxPhos) [Joza *et al.*, 2009]. Les cellules et souris déficientes en AIF montre une sensibilité accrue au stress oxydatif suggérant un rôle anti-oxydant de FIP-4. De plus ces souris mutantes présentent la particularité d'être protégée du diabète et de l'adipogénèse suite à une alimentation hypercalorique [Pospisilik *et al.* 2007].

II.4 : La protéine FIP-1

Une GTPase homologue de Ras

En 1995 Schürmann *et al.* sont les premiers à isoler FIP-1 au sein d'une banque d'ADNc humains en utilisant des oligonucléotides dégénérés issus de séquences hautement conservées présentes au sein des protéines GTPases. FIP-1 est alors initialement nommé RagA ou RRAGA (Ras-related GTP-binding protein A) [Schürmann *et al.*, 1995].

Les GTPases homologues de Ras, parmi lesquelles on retrouve FIP-1 (RagA), constituent une superfamille incluant de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation. Ces protéines alternent entre un état actif associé au GTP et un état inactif

associé au GDP [Boguski & McCormick, 1993]. Outre Rag cinq autres sous-familles appartiennent à la superfamille Ras : Ras, Rho, Rab, Ran, et ARF. Ces sous-familles ont en commun six domaines conservés trois sont des sites de liaisons phosphate/magnésium (PM₁-PM₃), les trois autres sont impliqués dans l'interaction au GTP/GDP (G₁-G₃) [Valencia *et al.*, 1991].

Surexprimée au niveau de la glande surrénale puis du muscle squelettique FIP-1 est toutefois présente dans la plupart des tissus humains. Parmi les tissus examinés les poumons apparaissent comme les plus dépourvus en FIP-1 [Li *et al.*, 1997; Schürmann *et al.*, 1995].

Structure

La région N-terminale de FIP-1 présente des motifs hautement conservés dans la superfamille Ras : - Les domaines de liaison phosphate/magnésium PM₁, PM₂ et PM₃. - Le domaine d'interaction au GTP/GDP G₁. Le domaine G₂ présent chez FIP-1 (127-HKMD) est en partie différent des autres membres Ras (NKXD). Le domaine G₃ qui est généralement représenté par un motif TSA ou TCA n'est pas identifiable chez FIP-1, deux séquences putatives (156-ECAC et 162-TSI) semblent en être une alternative. Il est à noter que G₃ est le domaine le moins conservé entre les protéines Ras et n'est qu'indirectement impliqué dans la liaison au GTP.

La région C-terminale de FIP-1, qui n'est pas impliquée dans la liaison au GTP/GDP, est plus longue que les autres membres de la superfamille Ras présentant une séquence supplémentaire de 100 acides aminés. Cette région contient un enchaînement d'acides aminés hydrophobes (259-276) constituant potentiellement une structure hélicoïdale d'interaction avec la membrane [Schürmann *et al.*, 1995].

L'ordre et la distance entre les différents domaines de liaisons au GTP de FIP-1 sont identiques aux autres protéines homologues de Ras. La structure des 200 acides aminés de FIP-1 en N-terminal impliqués dans la liaison au GTP est similaire à celle de Ras et ARF [Pai *et al.*, 1990; Amor *et al.*, 1994].

Interaction avec E3-14.7K

En 1997, Li *et al.* identifient FIP-1 comme le premier partenaire intracellulaire d'E3-14.7K. Par la technique double hybride l'interaction de 12 FIP-1 de tailles variables issues de cellules HeLa a été démontrée avec E3-14.7K. Cette interaction a été confirmée *in vitro* entre GST-E3-14.7K produite en bactérie et FIP-1, leur localisation serait de plus identique en cellule murine C3HA [Li *et al.*, 1997].

La délétion des 34 premiers résidus, comprenant un domaine de liaison au GTP, ou les 43 acides aminés en C-terminal de FIP-1 abolie complètement son interaction avec E3-14.7K [Li *et al.*, 1997]. Concernant E3-14.7K, Foster & Kim ont identifié une version tronquée d'E3-14.7K (31-128) qui serait toujours capable de lier FIP-1, cette même séquence interagirait avec la caspase 8 (FLICE) [Kim & Foster, 2002].

Il est intéressant de noter que FIP-1 présente 98% d'homologie avec RagB. Les différences entre ces deux protéines consiste en sept substitutions d'acides aminés et un ajout de 33 acides aminés en N-terminal de RagB. En dépit de cette très forte homologie RagB n'est pas un partenaire d'E3-14.7K

Interaction avec Dynéine [Lukashok et al., 2000]

La technique de double hybride a permis de révéler que FIP-1 interagit spécifiquement avec une protéine appelée GIP-1 (GTPase-interacting protein). Cette interaction entre FIP-1 et GIP-1 est confirmée *in vitro* et *in vivo* sans que l'ajout de TNF α soit nécessaire. Après analyse de la séquence par le programme BLAST les 113 acides aminés de GIP-1 révèlent 100% d'homologie avec la protéine TCTEL1, chaîne légère du complexe moteur dynéine [Watanabe *et al.*, 1996].

FIP-1 est capable d'interagir simultanément avec TCTEL1 et E3-14.7K servant ainsi d'intermédiaire entre la protéine précoce adénovirale et la chaîne légère du complexe moteur dynéine.

Dans la mesure où E3-14.7K n'est pas une protéine structurale de la capside adénovirale et n'est pas exprimée au moment du transport nucléocytoplasmique des particules virales, elle n'est pas impliquée dans l'interaction de la capside adénovirale avec la dynéine [Bremner *et al.*, 2009].

PROJET

Comme nous l'avons vu précédemment (Généralités-Partie I), de nombreuses barrières s'opposent au transfert de gènes par des méthodes non virales. Parmi elles, la migration de l'ADNp dans le cytosol apparaît comme un paramètre critique pour l'efficacité du transfert de gènes. En effet, une fois sorti des endosomes, la migration d'ADNp nu est nulle dans le cytosol des cellules eucaryotes.

Des stratégies consistent à s'inspirer des virus pour optimiser le trafic intracytosolique de l'ADNp en direction du noyau. Au cours de l'infection virale certains virus réalisent un déplacement actif en exploitant le mouvement de la dynéine, protéine motrice des microtubules. Pour la plupart, les virus font appel à un mécanisme bien connu pour recruter la dynéine qui sont les séquences DLC-AS (Dynein Light Chain Associated sequence) de LC8 (Chaîne Légère 8 de la dynéine). Ce motif de liaison à LC8 est donc présent dans de nombreuses protéines virales (Généralités-Partie II). Cependant nous sommes intéressés à la protéine E3-14.7K d'Adénovirus (Généralités-Partie III), car certaines publications indiquent qu'*in vitro* E3-14.7K interagirait avec la chaîne légère de la dynéine TCTEL1 par l'intermédiaire de la protéine cytosolique FIP-1 [Lukashok *et al.*, 2000]. Les différences qui opposent LC8 et TCTEL1 tendent à démontrer que des séquences ciblant TCTEL1 seraient des candidats plus performants pour l'interaction avec la dynéine d'ADNp thérapeutique. En effet, contrairement à LC8, les dimères de TCTEL1 peuvent interagir avec les chaînes intermédiaires IC74 et les cargos par deux mécanismes différents au sein du complexe dynéine ce qui n'implique par conséquent aucune compétition [Wu *et al.*, 2005]. Sur cette base, mes travaux ont consisté à exploiter l'interaction d'E3-14.7K avec la dynéine (TCTEL1) pour améliorer le trafic nucléocytoplasmique d'ADNp dans le cadre du transfert de gènes par des vecteurs chimiques.

Dans une première partie de ce travail, je me suis concentrée sur l'étude *in cellulo* de la connexion entre E3-14.7K, FIP-1, TCTEL1 et les microtubules. Une fois établies les interactions entre les différents partenaires, j'ai ensuite identifié une séquence peptidique de 20 acides aminés responsable de l'interaction directe d'E3-14.7K avec FIP-1, et indirectement avec la dynéine. Dans une dernière partie, j'ai greffé le peptide sur l'ADNp et ensuite étudié l'influence de ce peptide sur le trafic de l'ADNp au cours du processus de transfection. Enfin j'ai évalué son influence sur l'efficacité de transfection.

Résultats

Partie I

*Etude des interactions entre E3-
14.7K, FIP-1 et les microtubules in
cellulo et identification du peptide
P79-98 responsable de la fixation sur
la protéine FIP-1*

Lukashok *et al.* ont mis en évidence l'interaction entre la protéine d'Adénovirus E3-14.7K, la protéine cytosolique FIP-1 et la chaîne légère de la dynéine TCTEL1 [Lukashok *et al.*, 2000]. Par des études *in vitro* de transcription traduction ils ont identifié FIP-1 comme faisant le lien entre E3-14.7K et TCTEL1.

Dans un premier temps, j'ai utilisé des techniques biochimiques, d'imagerie confocale, de pB-FRET (FRET par photoblanchiment de l'accepteur) et de FLIM-FRET (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy - Förster Resonance Energy Transfer) pour étudier les interactions *in cellulo* entre E3-14.7K FIP-1 et les microtubules. La technique de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) m'a ensuite permis d'identifier un peptide d'E3-14.7K de 20 acides aminés (P79-98) responsable de son interaction directe avec FIP-1 et j'ai montré que le peptide P79-98 est capable d'interagir avec les microtubules *in vitro* et *in cellulo*.

FIP-1 est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire en participant à la formation des asters induite par la protéine RCC1 au niveau des centrosomes. De façon intéressante, je montre que lorsque P79-98 ou E3-14.7K sont surexprimés dans les cellules HeLa, le cycle cellulaire est perturbé de façon similaire. Cet effet sur le cycle cellulaire de P79-98 est un élément nouveau qui permet d'isoler sa spécificité parmi les rôles multiples d'E3-14.7K. En effet P79-98 ne montre aucun effet activateur de la voie NFκB contrairement à la protéine E3-14.7K totale. L'activation de la voie NFκB par E3-14.7K est liée à son interaction directe avec FIP-3 (NEMO). Le peptide P79-98 n'interagirait pas avec FIP-3 et est donc spécifique de l'interaction avec FIP-1.

Les techniques de FLIM-FRET, pB-FRET, BRET sont toutes trois basées sur le transfert d'énergie et ont pour vocation d'étudier les interactions protéine-protéine. Dans la mesure où ces techniques sont relativement récentes, leurs principes et utilisation seront détaillées dans une première partie. Dans une deuxième partie, les résultats obtenus seront présentés sous la forme d'un manuscrit rédigé en anglais qui est soumis à la publication dans la revue J. Cell Science.

I-LES TECHNIQUES BASEES SUR LE TRANSFERT D'ENERGIE

I.1 : La technique de FLIM-FRET

I.1.1 : Le principe

Temps de vie de la fluorescence

Après une absorption de photons suite à une excitation lumineuse, une molécule fluorescente se retrouve dans un état de haute énergie, généralement singulet (S_1'), aussi appelé état excité. Par un phénomène de relaxation non-radiative, la molécule se stabilise en un état excité S_1 de moindre énergie. Pour les molécules fluorescentes, le retour à l'état fondamental (S_1 à S_0) se fait en restituant une partie de cette énergie sous forme de photons (émission lumineuse) ou fluorescence. L'excitation et l'émission de la molécule fluorescente se font à deux longueurs d'onde (λ) différentes, l'émission étant de plus basse énergie par rapport à l'excitation (**Figure 24A**). Chaque molécule fluorescente peut être caractérisée par trois paramètres principaux :

- Sa section efficace d'absorption. Ce paramètre évalue le "pouvoir absorbant" de la molécule, plus sa section efficace est grande et plus un fluorophore est susceptible d'être excité.
- Son rendement quantique. Ce paramètre reflète l'efficacité de l'émission de fluorescence pour une molécule donnée. Il est défini par le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Les fluorochromes ont des rendements quantiques (Φ , ϕ) compris entre 0,1 et 1.
- Son temps de vie. Ce paramètre correspond au temps moyen (τ , τ) pendant lequel la molécule reste dans son état excité avant de retourner à son état de bas niveau d'énergie. Il s'agit donc du temps moyen que met la molécule pour émettre un photon. Les durées de vie de fluorescence sont généralement très courtes de l'ordre de quelques nanosecondes, l'excitation doit donc être une impulsion ultra-brève. A l'échelle d'une population de molécules, l'intensité de fluorescence émise décroît exponentiellement c'est la décroissance ou déclin de l'intensité de fluorescence (**Figure 24B**). Le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) mesure le temps de vie en l'enregistrant le déclin de l'intensité de fluorescence. Les techniques de mesure des durées de vie de fluorescence

font appel à des détecteurs ultra-rapides et très sensibles ainsi qu'à des sources laser pulsées adaptées.

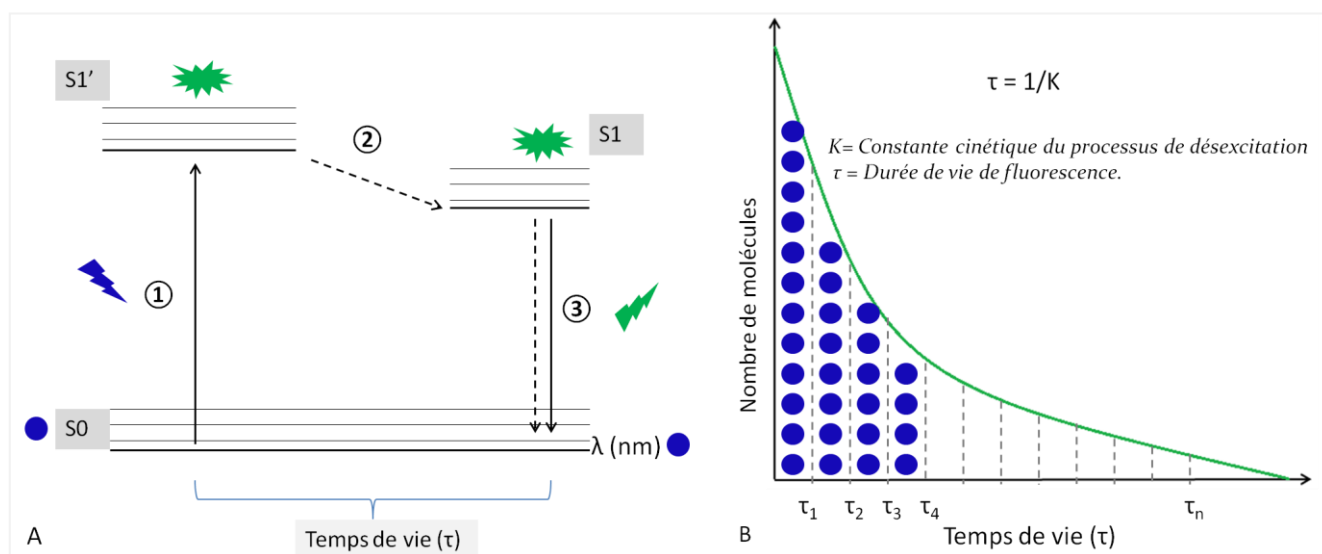


Figure 24 : Temps de vie de la fluorescence. (A) Diagramme de "Perrin-Jablonsky". La flèche (1) met en évidence le processus d'absorption d'énergie, la flèche (2) celui de la relaxation non-radiative dans l'état excité et la flèche (3) indique la fluorescence. (B) La durée de vie de fluorescence est le temps moyen pendant lequel une molécule reste à l'état excité. A l'échelle d'une population de n molécules la durée de vie est $\tau = (\tau_1 + \tau_2 + \tau_3 + \dots + \tau_n)/n$ et se traduit par une fonction exponentielle $\tau = 1/K$ avec $K = \text{constante cinétique du processus de désexcitation radiatif (r) et non radiatif (nr)}$ ($K = K_r + K_{nr}$).

FRET et temps de vie d'une molécule fluorescente

Le phénomène de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) est un processus non radiatif par lequel de l'énergie d'un fluorophore (donneur) à l'état excité est transmise à un autre fluorophore (accepteur) à proximité immédiate (1-10nm). Pour que le FRET ait lieu un chevauchement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur est indispensable. Au cours de notre étude, nous avons choisi comme donneur d'énergie la GFP (Green fluorescent protein) et deux différentes protéines fluorescentes acceptrices ont été utilisées DsRed2 et td-Tomato, toutes deux émettant dans le rouge.

Lorsqu'il y a transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur, le FRET s'ajoute aux autres processus non radiatifs de désexcitation. La fonction de la courbe de déclin de fluorescence s'en trouve alors modifiée, le temps de vie moyen de fluorescence du donneur est ainsi diminué (**Figure 25**). Cette propriété est exploitée dans la méthode FLIM-FRET.

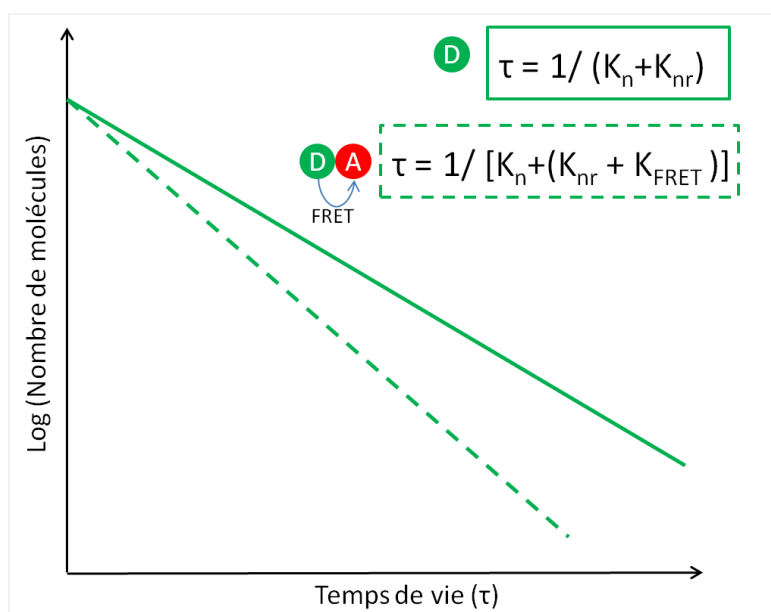


Figure 25 : FRET et temps de vie d'une molécule fluorescente. Lorsqu'il y a FRET l'intensité de fluorescence du donneur ainsi que son temps de vie moyen (τ) sont diminués. Le FRET s'ajoute à la constante cinétique du processus de désexcitation non radiatif (K_{nr}).

FLIM-FRET

La technique de FLIM-FRET (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy - Förster Resonance Energy Transfer) permet de quantifier le transfert d'énergie entre deux partenaires suite à la mesure du temps de vie de la fluorescence du donneur. Une diminution plus ou moins importante du temps de vie du donneur est révélatrice d'une plus ou moins grande proximité entre les deux partenaires fluorescents.

Comparativement aux techniques classiques de FRET la technique de FLIM-FRET est moins dépendante des concentrations et intensités relatives des deux partenaires qui peuvent être particulièrement variables d'une cellule à une autre. De plus, elle est moins dépendante du photoblanchiment et des recouvrements de spectres.

I.1.2 : Mesure du temps de vie d'une molécule fluorescente

Les méthodes de mesure du temps de vie des molécules fluorescentes peuvent être classées en deux groupes : les méthodes dans le domaine fréquentiel et le domaine temporel. Parmi les méthodes dans le domaine temporel, le mode de comptage de photon unique corrélé dans le temps (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC), est développé par la société Becker & Hickl (Becker & Hickel, Allemagne). Cette technique est adaptable sur les microscopes confocaux de marque Zeiss comme Leica. C'est cette technique que nous avons employé au cours de notre étude.

Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)

Comme le suggère le nom de la technique, les mesures sont basées sur la détection de photons de fluorescence uniques. Le principe TCSPC consiste en la mesure précise de la durée séparant le moment de l'excitation de la molécule fluorescente de l'arrivée du premier photon de fluorescence émis. Le départ de la mesure est défini par le moment de l'excitation par une brève impulsion laser détecté par une photodiode rapide. L'arrivée du premier photon de fluorescence est détectée par un photomultiplicateur rapide de photon unique de type SPAD (Single Photon Avalanche Diodes) (**Figure 26A**). Le détail de l'appareillage que nous avons utilisé est indiqué Page 102-103.

A chaque impulsion laser un seul photon est détecté, la mesure de son temps d'arrivée et sa position (en xy) sont enregistrés. La durée entre l'impulsion laser et la détection du photon est mesurée plusieurs millions de fois pour rendre compte de la nature statistique de l'émission de fluorescence sur la totalité du champ d'étude. Pour une même position, les photons sont triés de façon à obtenir un histogramme de distribution du nombre de photons en fonction du temps décrivant une courbe de déclin de fluorescence (**Figure 26B**). En tout point du champ d'analyse, et par conséquent de l'image acquise, la durée de vie moyenne de fluorescence est déterminée à partir de la courbe de déclin de la fluorescence. Les durées de vie de fluorescence sont ensuite obtenues en utilisant le logiciel SPCImage (Becker & Hickel) grâce à l'ajustement par un déclin mono-exponentiel ($\chi_r^2 = 1.0$) des courbes de déclin de fluorescence déconvoluées de la fonction de réponse instrumentale (IRF).

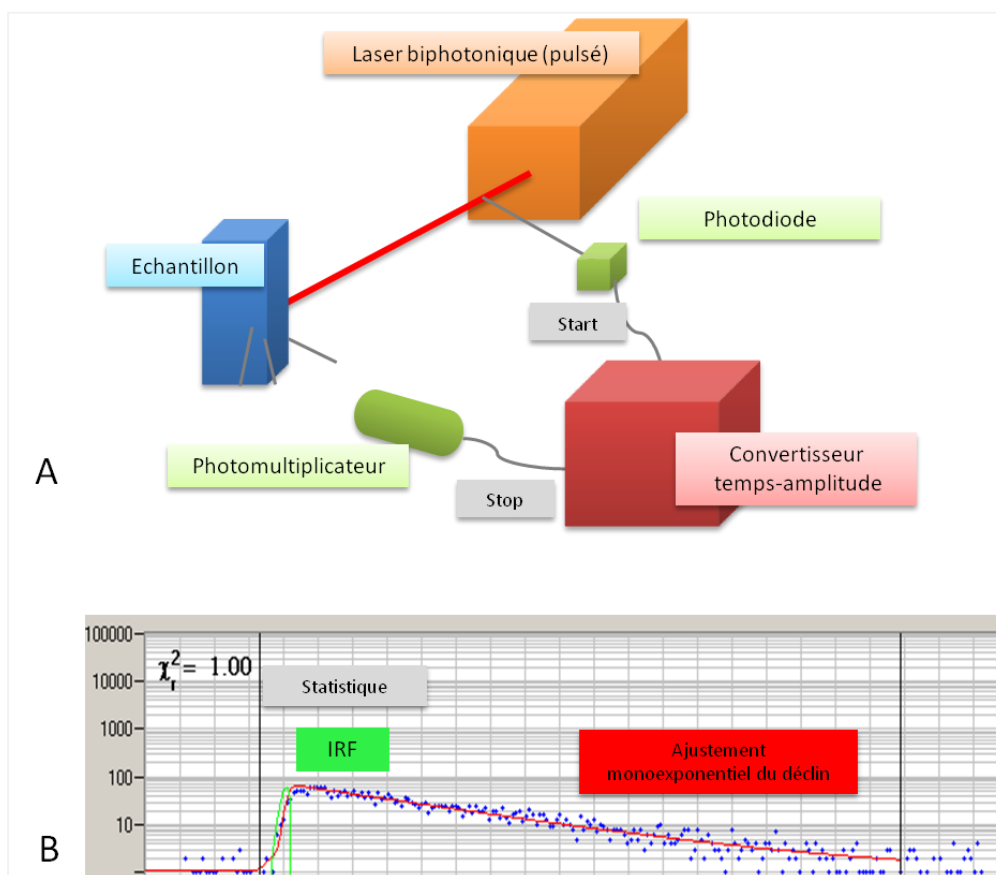


Figure 26 : Mesure de déclin de fluorescence par le mode de comptage de photon unique corrélé dans le temps. (A) Le train d'impulsions du laser sert de signal de déclenchement d'un convertisseur temps-amplitude. Chaque impulsion émise par le photomultiplicateur suite à la détection d'un photon de fluorescence sert de signal d'arrêt du convertisseur temps-amplitude. (B) Affichage de la courbe de déclin de fluorescence (points bleus) ainsi que celle de la courbe d'ajustement (rouge) et de la réponse instrumentale (IRF-vert) en une position xy de l'image grâce au logiciel SPCImage (Becker & Hickel). La qualité de l'ajustement est déterminé par la valeur de χ réduit, plus il est proche de 1 et plus l'ajustement est correct.

Préparation des analyses in cellulo

Dans le cadre de nos études, des cellules HeLa, ensemencées sur des lamelles de verre, ont été cotransfectées avec deux plasmides : un plasmide de fusion à la GFP (donneur) et un plasmide de fusion avec la DsRed2 ou td-Tomato (accepteur). Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont fixées au para-formaldéhyde et montées sur lames. Elles sont ensuite conservées à -20°C avant la mesure du temps de vie de la GFP par la technique TCSPC.

I.1.3 : Exemple de mesure FLIM-FRET

Les résultats d'expériences de FLIM-FRET sont représentés classiquement comme indiqué dans la figure 27. Dans cet exemple, les cellules HeLa coexpriment la protéine cytosolique FIP-1 en fusion avec l'eGFP (donneur) et la protéine E3-14.7K en fusion avec la td-Tomato (accepteur). Dans un premier temps, une acquisition de l'émission du donneur et de l'accepteur est réalisée individuellement en épifluorescence (**Figure 27**) pour vérifier l'expression d'un seul ou des deux fluorophores dans les cellules analysées. On observe ainsi par exemple qu'à l'instar des cinq autres cellules analysées, la cellule en haut à droite de la figure 27(1) exprime uniquement le donneur, en l'occurrence FIP-1-eGFP. L'acquisition du déclin de la fluorescence est ensuite réalisée par la technique TCSPC, les informations sont traitées par le logiciel SPCImage qui fournit les éléments représentés en figure 27(2) et (3). La figure 27(2) représente l'intensité de fluorescence au niveau des cellules analysées. La figure 27(3) représente l'image du temps de vie de la fluorescence ; le code couleur est le même que celui de l'histogramme de distribution du temps de vie de la fluorescence. Les cinq cellules en bas à gauche de l'image coexpriment le donneur et l'accepteur, le temps de vie moyen du donneur étant mesuré à 1.6ns (pic de gauche de l'histogramme). La cellule en haut à droite de l'image exprime uniquement le donneur son temps de vie moyen est mesuré à 2.1ns (pic de droite de l'histogramme). Ce résultat permet d'affirmer la présence de FRET entre FIP-1-eGFP et E3-14.7K-dt-Tomato, et de conclure à leur interaction au sein des cellules HeLa.

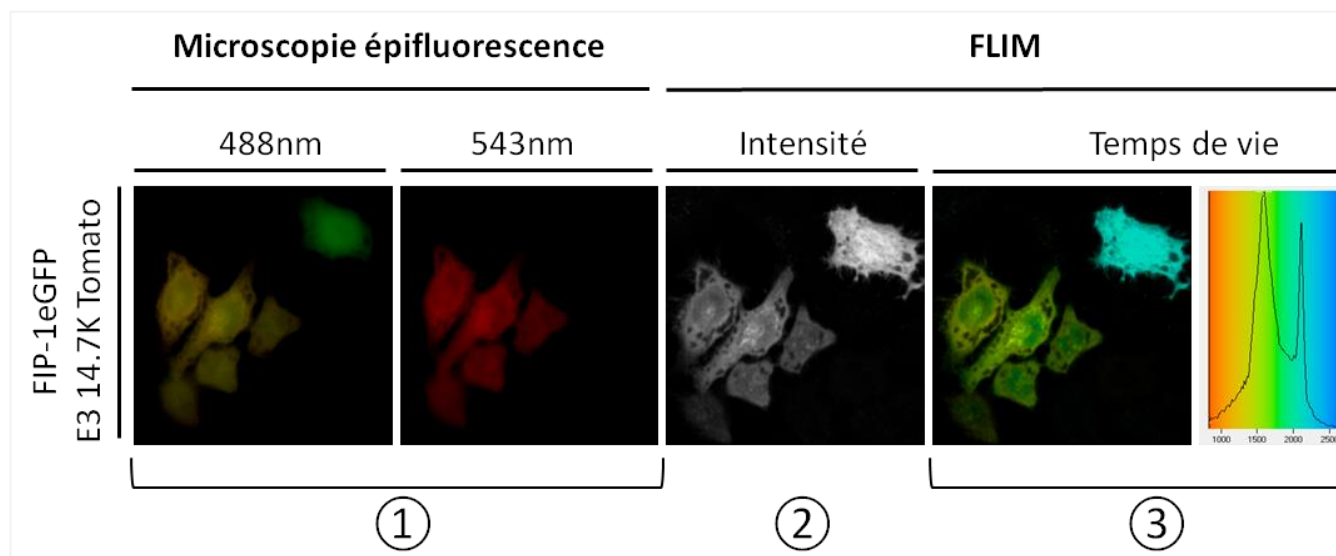


Figure 27 : Représentation des résultats de FLIM-FRET. Cellules HeLa cotransfectées avec des plasmides permettant l'expression de la protéine cytosolique FIP-1 en fusion avec l'eGFP (donneur) et la protéine d'Adénovirus E3-14.7K en fusion avec la td-Tomato (accepteur). (1) Une acquisition du donneur et de l'accepteur est réalisée individuellement en épifluorescence. (2) Image de l'intensité de fluorescence. (3) Image et histogramme de distribution du temps de vie de la fluorescence, le code couleur est identique. Voir texte pour plus de précision.

1.2 : La technique de FRET par photoblanchiment de l'accepteur

La technique de FRET par photoblanchiment de l'accepteur est appelée pB-FRET. Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par une quantité excessive d'énergie, elle perd ses capacités de fluorescence, c'est le photoblanchiment (pB). Le photoblanchiment permet d'éteindre sélectivement l'émission d'un fluorophore dans toute ou partie d'une cellule.

Dans une situation où un transfert d'énergie (FRET) intervient entre deux fluorophores, l'intensité du donneur est diminuée puisqu'une partie des photons qu'il émet est transféré à l'accepteur plutôt qu'émis sous forme de fluorescence. A l'inverse, en absence de FRET, cette intensité sera plus forte. Dans la technique de pB-FRET l'intensité de la fluorescence du donneur est comparée avant et après extinction de l'accepteur par photoblanchiment.

I.3- La technique de BRET

I.3.1 : Le principe

Le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) est une technique basée sur le transfert d'énergie non radiatif par résonance dont le donneur d'énergie est une molécule bioluminescente le Coelentéramide. La molécule acceptrice d'énergie est typiquement une protéine fluorescente (YFP, GFP ou eGFP) [Galés *et al.*, 2005]. L'enzyme *Renilla* luciférase effectue une dégradation oxydative de la Coelentérazine en Coelentéramide générant ainsi de la lumière. Lorsque la luciférase est à proximité d'une protéine GFP ou YFP, l'énergie de résonance de la bioluminescence émise par le Coelentéramide peut être transférée à la GFP qui fluoresce à une autre longueur d'onde (Figure 28) [Xu *et al.*, 1999].

Le transfert d'énergie entre la luciférase et la GFP est dépendant de plusieurs paramètres : - L'orientation des deux protéines. - La distance qui sépare les deux partenaires (<100 Å). - Le chevauchement des spectres d'émission du Coelentéramide et l'excitation de l'accepteur fluorescent [Angers *et al.*, 2001]

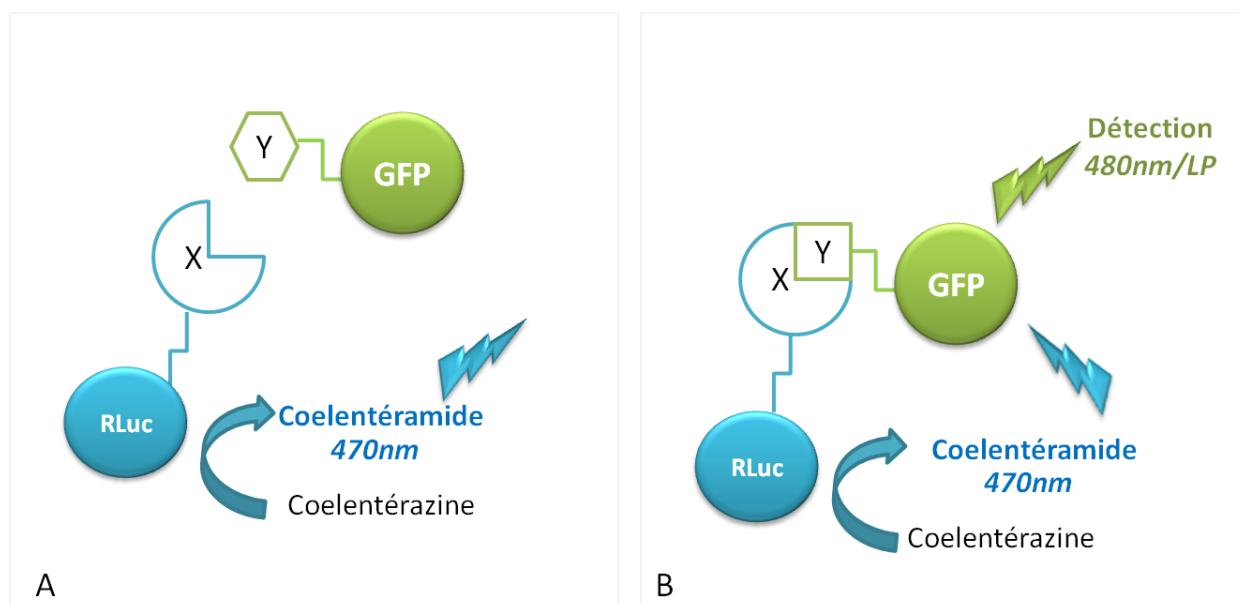


Figure 28 : Principe du BRET. La protéine X est en fusion avec la *Renilla* luciférase (RLuc) et la protéine Y est en fusion avec la GFP. (A) Lorsque les protéines X et Y n'entrent pas en interaction aucun transfert d'énergie n'a lieu entre RLuc (Coelentéramide) et la GFP. Seul le signal de bioluminescence à 470nm est émis. (B) Un signal de BRET est mesuré lorsque les deux protéines X Yfusionnées interagissent et réduisent la distance de leur fluorophores à moins de 100 Å.

1.3.2 : BRET et interaction protéine protéine

La technique de BRET est une méthode de choix pour étudier des interactions protéine-protéine. Ces études d'interaction peuvent être réalisées directement dans les cellules vivantes, mais aussi à partir de lysats cellulaires ou de protéines recombinantes purifiées [Pfleger & Eidne, 2006]. La **figure 29** présente le protocole de BRET pour une analyse *in cellulo* de l'interaction de deux partenaires protéiques.

La première étape du BRET consiste en la construction de plasmides d'expression eucaryotes permettant l'expression des deux partenaires protéiques en fusion avec RLuc et eGFP. Ces plasmides sont ensuite transfectés simultanément dans la lignée cellulaire d'intérêt (cellules HeLa dans le cadre de notre étude) (**Figure 29 (1)**). Quarante-huit heures après transfection, les cellules sontensemencées en microplaque (**Figure 29 (2)**) et le substrat (Coelentérazine) de la *Renilla* luciférase est incubé directement en présence des cellules vivantes (**Figure 29 (3)**). La lecture du signal BRET est obtenue grâce à un spectrofluoromètre type Mithras LB 940 (Berthold Instruments, Oak Ridge, TN) capable de détecter la luminescence du donneur et la fluorescence de l'accepteur (**Figure 29 (4)**). Le signal BRET est un rapport obtenu en divisant l'émission de l'accepteur à 540 nm par l'émission du donneur à 480 nm.

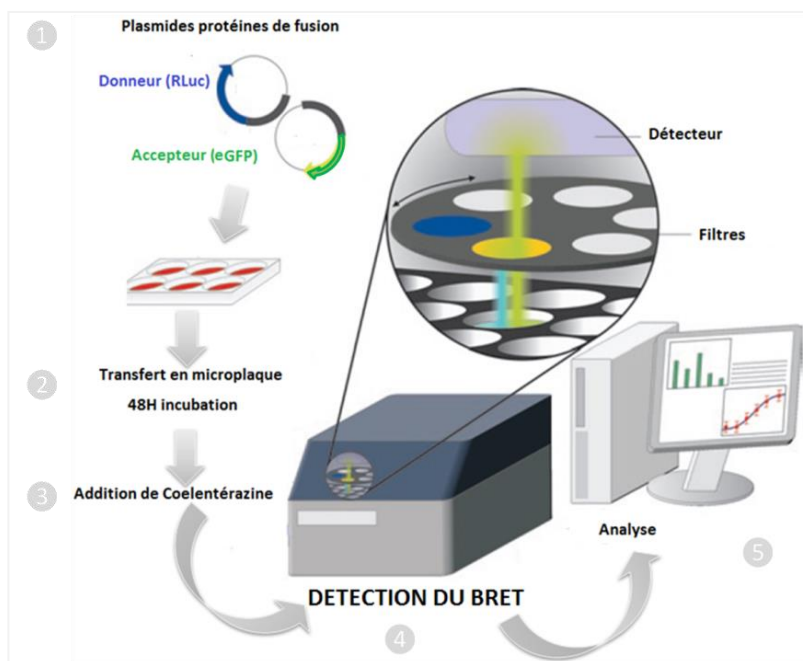


Figure 29 : Illustration du protocole de BRET sur cellules vivantes utilisant un luminomètre à microplaques. Voir texte pour plus de précision. Adapté de [Pfleger et al., 2006].

I.3.3 : Le BRET comme technique de criblage

Courbe de Saturation

Les mesures de BRET résultant d'une interaction spécifique entre deux partenaires sont représentées par une courbe de saturation. Pour ce faire, le signal de BRET est représenté en fonction du rapport entre l'émission de fluorescence de l'accepteur (eGFP) et l'émission de bioluminescence du donneur d'énergie (Rluc).

S'il y a interaction spécifique entre les deux partenaires, le signal de BRET augmente pour une même concentration de donneur, en fonction de la concentration de l'accepteur d'énergie jusqu'à atteindre un plateau [Hamdan *et al.*, 2006 ; Mercier *et al.*, 2002]. L'atteinte du plateau traduit la spécificité de l'interaction entre les deux partenaires, en effet en excès de donneur par rapport à l'accepteur, le signal de BRET reste constant. La valeur maximale de BRET obtenue est appelée $BRET_{max}$. Dans la situation d'une interaction non spécifique le signal de BRET n'est pas saturable et augmente linéairement (**Figure 30**). Ce signal non spécifique peut aussi être désigné comme «*bystander BRET*» [Mercier *et al.*, 2002].

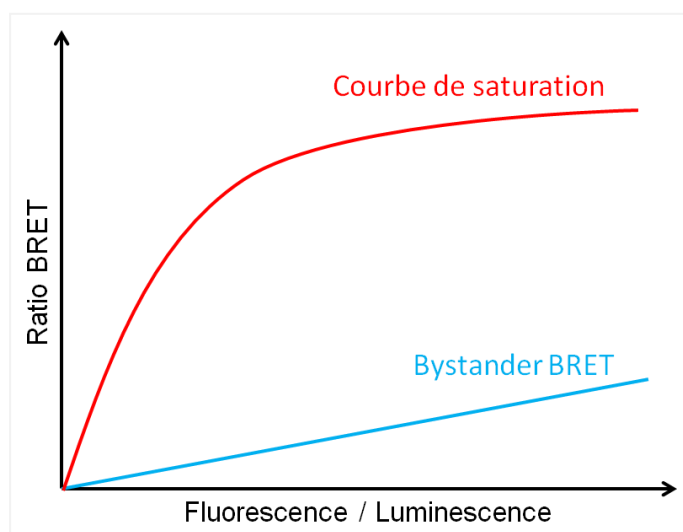


Figure 30 : Courbe de saturation de BRET. Lorsqu'il y a interaction spécifique entre les deux partenaires de BRET, le signal de BRET est représenté par une courbe saturation. L'atteinte du plateau traduit l'interaction spécifique entre les deux partenaires.

Compétition

Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé la technique de BRET pour cribler cinq peptides chevauchants d'E3-14.7K susceptibles d'entrer en compétition dans l'interaction entre E3-14.7K et FIP-1. Une courbe de saturation de BRET est réalisée en présence de lysat cellulaire de HeLa exprimant transitoirement E3-14.7K en fusion avec RLuc et la protéine recombinante FIP-1 en fusion avec l'eGFP. La compétition se traduit par une diminution ou une perte du transfert d'énergie spécifique entre les deux partenaires [Pfleger & Eidne, 2006].

II- RESULTATS : “Interaction of adenoviral E3-14.7K with microtubules network: identification of P79-98 peptide derived from E3-14.7K which interacts with FIP-1 and mediates cell cycle arrest.”

Interaction of adenoviral E3-14.7K with dynein motors and microtubules network: identification of P79-98 peptide derived from E3-14.7K which interacts with FIP-1 and mediates the cell cycle arrest.

Lucie Pigeon¹, Cristine Gonçalves¹, Gilles Breuzard¹, Etienne Henry², Eric Deprez², Patrick Tauc², Jean-Pierre Gomez¹, Séverine Morisset-Lopez¹, Patrick Midoux¹ and Chantal Pichon^{1*}.

¹Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Inserm and University of Orléans, Orléans, 45071, cedex 02, France.

²Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée, CNRS, Ecole Normale Supérieure Cachan, Institut d'Alembert, 94235, France.

*Corresponding author: Chantal.pichon@cnrs-orleans.fr

Key Words: adenovirus; Early region 3, dynein; TCTEL1; FRET; BRET; FLIM

Running title: E3-14.7K/FIP-1 interactions.

Summary

In this study, we have investigated the connection between E3-14.7K, FIP-1 and the microtubules network in order to improve knowledge on the role of their interactions in cellulo. E3-14.7K of human adenoviruses is expressed during the early phase of the infection to inhibit apoptosis of host cells. E3-14.7K is a multifunctional protein that interacts with four FIPs proteins (FIP-1, -2, -3, -4) involved in various apoptosis pathways. Compared to other FIPs proteins, the role of the E3-14.7K/FIP-1 interaction is not clearly understood. Previous in vitro study showed that FIP-1 was able to bind to TCTEL1, one of the dynein light chain. Here, in cellulo interaction studies based on colocalization experiments by confocal microscopy, FRET, FLIM and BRET techniques as well as biochemical analyses were conducted to more deeply delineate the connection between E3-14.7K, FIP-1 and TCTEL1. A 20 amino acids motif named P79-98 (amino-acid residues from 79 to 98 of E3-14.7K), was identified as responsible for the E3-14.7K/FIP-1 interaction. We also showed that P79-98-tagged Qdots were able to bind to isolated microtubules in vitro and colocalized with the microtubules network inside HeLa cells. Moreover, overexpression of E3-14.7K or P79-98-luciferase chimeric protein promoted the arrest of the cell cycle with an accumulation of HeLa cells in the S phase. Noteworthy, the expression of P79-98 chimeric protein did not interfere on NFκB activation showing P79-98 specificity. Altogether, our results highlight the crucial roles of P79-98 motif both in the E3-14.7K/FIP-1 interaction inside the microtubules network and in the cell cycle. Moreover, P79-98 could be a new microtubule targeting signal opening its use for targeting cargo via microtubules and blocking the cell cycle.

Introduction

During their early phase of infection, adenoviruses express several proteins which are necessary to downregulate the immune response of their host cells (Burgert et al., 2002; Wold et al., 1999). The early region 3 (E3) of group C human adenoviruses encodes seven immunoregulatory proteins including three proteins that inhibit the cytolytic effects of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (Lichtenstein et al., 2004; Wold et al., 1995). One of them is a 14.7-kDa protein (E3-14.7K) that protects cells, independently of the other adenoviral proteins, against TNF- α (Gooding et al., 1988; Gooding et al., 1990; Horton et al., 1991; Krajcsi et al., 1996), Fas ligand (Chen et al., 1998) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis (Tollefson et al., 2001).

E3-14.7K has been found to be located both in the nuclear and in the cytoplasm, each localization related to its action on cellular pathways through four cellular proteins interaction (Gooding et al., 1990). These interacting proteins have been identified by the yeast two-hybrid techniques and were designated as FIPs (Fourteen. seven K-interacting proteins). FIP-1 is a small GTPase previously known also as RagA or RBag for Ras-related GTP-binding protein A. This protein is a functional human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Gtr1p (Nakashima et al., 1996). FIP-1 interacts with RagC and RagD (Sekiguchi et al., 2001), and also with NOP132 nucleolar protein (Sekiguchi et al., 2004). FIP-2, also known as NF κ B Essential Modulator (NEMO) Related Protein (NRP) (Schwamborn et al., 2000) or Optineurin (Klingseisen et al., 2012), is involved in the TNF- α signaling pathway. As a crucial subunit of the IKK complex, FIP-3 (NEMO or IKK γ) is a key regulator of NF κ B pathway (Li et al., 1999; Yamaoka et al., 1998). FIP-4 or AIF (Apoptosis-Inducing Factor) is a mitochondrial protein which translocates into

the nucleus in response to apoptotic stimuli and the significance of its interaction with E3-14.7K is still unknown (Li and Horwitz, 1996).

By contrast to the above cited partners of E3-14.7K, FIP-1 was not described to be directly involved in any apoptosis pathway yet (Li et al., 1997). FIP-1 was found associated with cell cycle control by affecting aster formation induced by chromosome-binding protein RCC1 (Regulator of chromosome condensation 1) at centrosomes and by controlling microtubule assembly originating from this structure during mitosis (Pennisi, 1999; Wilde and Zheng, 1999). As E3-14.7K, FIP-1 is localized both in the cytoplasm and in the nucleus. It shuttles between the cytoplasm and the nucleus depending on its nucleotide state. FIP-1 association with the Ran/Gsp1 GTPase pathway makes it responsible for the nucleus-cytoplasm trafficking of macromolecules (Hirose et al., 1998). Moreover, FIP-1 is known to interact with the light chain TCTEL1 of dynein motor complex (Lukashok et al., 2000). By their interaction with TCTEL1, some macromolecules are towed along microtubules towards the cell nucleus (Mueller et al., 2002; Tai et al., 1999). In a previous study, in vitro binding assay has shown that FIP-1 is the bridging protein allowing E3-14.7K to form a complex with TCTEL1 (Lukashok et al., 2000). The formation of the complex was independent on the addition of TNF- α (Lukashok et al., 2000). The peptide sequence of E3-14.7K that is responsible for its binding to FIP-1 has been indentified and it corresponds to the 31-128 amino acids sequence (Kim and Foster, 2002).

In mammalian cells, the interactions between E3-14.7K, FIP-1 and TCTEL-1 have not been extensively studied. Li et al., have reported that E3-14.7K and FIP-1 were colocalized in perinuclear area of C3HA murine cells (Li et al., 1998). Lukashok et al., have observed interaction between FIP-1 and TCTEL1 by coimmunoprecipitation and

immunolabelling experiments in human embryonic kidney HEK 293T cells and in human lung carcinoma A549 cells, respectively (Lukashok et al., 2000). In this work, we ought to determine in more details intracellular interactions between E3-14.7K, FIP-1 and TCTEL1. For this purpose, we first analyzed the interaction between E3-14.7K, FIP-1 in HeLa cells using colocalization experiments, Fluorescence Resonance Energy transfer (FRET)/ Fluorescence Lifetime Microscopy (FLIM) or Bioluminescence Resonance Energy transfer (BRET) techniques as well as biochemical approaches. Our data demonstrate that E3-14.7K interacts with microtubules network via FIP-1 thanks to a 20 amino acids motif located in the fifth β strand of E3-14.7K. This peptide named as P79-98, was able to bind to microtubules either isolated or in HeLa cells context. We also found that the arrest of cell cycle was induced when cells overexpress E3-14.7K or chimeric protein bearing the P79-98 sequence. Noteworthy, no impact on NF κ B activation was observed showing the existence of P79-98 specificity toward FIP-1 amongst other FIPs molecules. Altogether, our results highlight the role of the P79-98 motif both in E3-14.7K/FIP-1 interaction inside the microtubules network and in the cell cycle disruption.

Results

E3-14.7K is interacting with FIP-1 and TCTEL1 to form a microtubule interacting complex.

Our first goal was to validate our plasmid vectors encoding either FIP-1 or E3-14.7K fused with eGFP and to assess their distribution in HeLa cells. Since FIP-1/RagA has been found to interact with GIP1 (GTPase interacting protein-1)/TCTEL1, the light chain of dynein motor (Li et al., 1998), we compared the distribution of E3-14.7K and

FIP-1 to that of α -tubulin-eGFP. Fig. 1 shows that these 3 proteins have a fibrillar-like network distribution similar to that of microtubules, clearly different to the diffuse distribution of eGFP (Fig. 1D).

Next, the colocalization of FIP-1, E3-14.7K and microtubules was assessed in HeLa cells co-transfected with plasmids encoding for FIP-1 fused with eGFP and for E3-14.7K fused with td-Tomato. To facilitate the intracellular localization of these fluorescent proteins, cells were treated first with DSP to cross-link proteins that are in close interaction. Then, they were gently permeabilized with digitonin in order to wash out soluble proteins that are not interacted with any partners in the cytoplasm. In a representative image shown in Fig. 2A, FIP-1 was found as green spots close to immunostained microtubules (red). Interestingly, the distribution of these green spots is organized as a fibrillar network. In Fig. 2B, punctuate fluorescent staining of FIP-1-eGFP and E3-14.7K-Tomato was observed in the center of the cell. Moreover, FIP-1-eGFP spots were aligned as above and some of them were colocalized with E3-14.7K-Tomato in the perinuclear area as indicated by the yellow foci. Of note, the position of eGFP tag, at N- or C-terminus of FIP-1, had no influence on their subcellular localization (data not shown). These observations are in line with those reported by Li et al., in C3HA murine cells (Li et al., 1997).

To assess whether FIP-1 and E3-14.7K proteins are in close interaction in cellulo, we performed FRET experiments in cell context, either by measuring the steady state fluorescence intensity (pB-FRET methodology) or the fluorescence lifetime of the donor. First, pB-FRET experiments were conducted on HeLa cells that co-expressed FIP-1-eGFP as a fluorescent donor and E3-14.7K-Tomato as a fluorescent acceptor. When the excited donor transfers its energy to the acceptor, FRET accounts for a

decrease of the fluorescence emission of the donor and a concomitant increase of the emission of the acceptor (Lakowicz et al., 2006). FRET cannot occur anymore when the acceptor is photobleached. As a consequence, an increase of the fluorescence emitted by the excited donor should be observed after photobleaching when FRET initially occurs between the donor and the acceptor. In contrast, in the absence of any interaction, the fluorescence emission of the donor is not influenced by the photobleaching of the acceptor. In our experiments, when E3-14.7K-Tomato was photobleached before the excitation of FIP-1-eGFP, the fluorescence emission of FIP-1-eGFP was clearly increased in bleached regions of interest (Fig. 2C), demonstrating that FIP-1 and E3-14.7K are in close proximity compatible with an energy transfer between eGFP and td-Tomato. Note that FIP-1 was also localized in the nucleus as observed previously in HEK 293 cells (Li et al., 1997).

FIP-1 is also known to be responsible for nucleocytoplasmic trafficking (Hirose et al., 1998) of several macromolecules and this is mediated through an interacting partner which is TCTEL1, one of dynein light chain (Lukashok et al., 2000). Even though FIP-1 and TCTEL1 interaction has been evidenced by in vitro assay using reticulocyte lysate system with T7 expressing vectors, this interaction has not yet been demonstrated in cellulo. For this purpose, a triple colocalization experiments were performed on cells that co expressed FIP-1-eGFP (green) and E3-14.7K-mCherry (red) and the microtubules were immunostained and revealed with a Cy5-tagged secondary antibody (blue). As shown in Fig. 2D, FIP-1-eGFP were found close to microtubules (blue). This is in accordance with the role of TCTEL1/GIP-1, the light chain of dynein, as a bridging protein between FIP-1 and the microtubule filament (Lukashok et al., 2000). FIP-1-

eGFP and E3-14.7K-mCherry were clearly colocalized (see enlarged area) and aligned along microtubules, confirming the results shown in Fig. 2C.

Second, we performed FLIM-FRET (Fluorescence Lifetime Microscopy) experiments which are particularly well suitable to readout a FRET interaction in the cell context. In contrast to the emission intensity, the fluorescence lifetime of the donor which corresponds to an intensive parameter is independent of the fluorophore concentration. This approach allows the measurement of the fluorescence lifetime of the donor which corresponds to the mean time spent by the donor in the excited state (Wallrabe and Periasamy, 2005). The donor lifetime value is expected to decrease when FRET occurs. Moreover, as stated above, the ability to measure fluorescence lifetimes of fluorescent proteins in the cell context is less dependent of their relative concentrations and intensities, photobleaching as well as spectral bleed through (Alcor et al., 2009; Chen et al., 2003). FLIM-FRET was then used to confirm the interaction between FIP-1, E3-14.7K, TCTEL1 and α -tubulin. In our experiments, the fluorophore donor was eGFP and two different protein acceptors were used: td-Tomato or DsRed2. We first measured the fluorescence lifetime of eGFP in cells that coexpress either eGFP and td-Tomato or eGFP and DsRed2. In these cells, the lifetime values of eGFP fluorescence were comprised between 2.1 and 2.2 ns (± 0.04) a value corresponding to that of free eGFP 2.2 ns (Fig. 3A-B) in accordance with reported values (Llères et al., 2009). This lifetime decreased to ≈ 1.6 ns (± 0.04) in cells coexpressing FIP-1-eGFP and E3-14.7K-Tomato (Fig. 3C) indicating that FRET occurs between these 2 proteins and confirming pB-FRET results (Fig. 2C). Note that the remaining subpopulation of donor characterized by a lifetime value of 2.2 ns corresponds to the donor lifetime when no FRET occurs accounting for cells characterized by a defect in the expression of the

chimeric acceptor protein. A significant reduction of eGFP lifetime ($\approx 1.9 \text{ ns} \pm 0.04$) was also observed in cells co expressing eGFP- α -tubulin and E3-14.7K-Tomato (Fig. 3D), indicating the interaction between these 2 molecules albeit in a less efficient manner than observed for FIP-1-eGFP and E3-14.7K-Tomato. Accordingly, in cells coexpressing E3-14.7K-eGFP/TCTEL1-DsRed2, the lifetime of eGFP was about 1.7 ns (± 0.04) (Fig. 3E). These data indicate for the first time interaction of E3-14.7K between both dynein light chain TCTEL1 and microtubules in cellulo. The FLIM-FRET data allows us to propose the interaction pattern of E3-14.7K shown in Fig. 4A.

Determination of a E3-14.7K derived peptide responsible for its interaction with FIP-1.

Next, we determined the peptide sequence of E3-14.7K that is responsible for its interaction with FIP-1 and consequently with the other partners. Kim and Forster have previously determined by protein-binding experiments that the determinants of E3-14.7K for recognition of FIP-1 are retained within residues 31–128 of its C-terminal fragment (Kim and Foster, 2002). Therefore, we selected overlapping peptides of 20 amino lengths covering this 97 amino acid sequence of the C-terminal fragment (Fig. 4B). To screen the interaction of these peptides with FIP-1, we performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) which is a sensitive tool for monitoring macromolecular interactions (Pfleger et al., 2006) and particularly well-adapted for screening studies. E3-14.7K fused with Renilla (E3-14.7K-Rluc) luciferase was used with FIP-1-eGFP. Cytosolic extract of cells expressing E3-14.7K-Rluc was incubated with recombinant FIP-1-eGFP produced in *E. Coli*. Of note, we have first checked by immunoprecipitation experiments that recombinant E3-14.7K was able to

recognize either FIP-1-eGFP produced in *E. Coli* (Supplementary Fig. 1, lane E) or expressed in HeLa cells (Supplementary Fig. 1 lane B, C).

In BRET experiments shown in Fig. 4C, a constant amount of cytosolic extract from cells expressing E3-14.7K-Rluc was incubated with increasing amounts of recombinant FIP-1-eGFP. The observed saturation curve evidences the energy transfer between these 2 molecules. This indicates that a specific interaction occurred between FIP-1 and E3-14.7K. To determine the peptide derived from E3-14.7K that can counteract this interaction, we performed similar BRET experiments in the presence of 10 μ M of either peptides (P38-57, P50-69, P65-84, P79-98, and P106-125). Amongst the 5 selected peptides, only P79-98 induced a significant decrease of BRET ratio suggesting a competition between this peptide and E3-14.7K/FIP-1 interaction. In presence of 200 μ M of P79-98, the interaction between E3-14.7K-Rluc and FIP-1-eGFP was fully abolished. By contrast, no competition was observed with other peptides.

Interaction of P79-98 with microtubules.

To get deeper insight into the role of the P79-98 in the E3-14.7K/FIP-1 interaction, we determined whether P79-98 peptide was sufficient to mediate the binding to microtubules.

This peptide was then biotinylated (P79-98-bio) and labeled with Qdot 545 streptavidin (P79-98-Qdot) (Fig. 5A). The interaction was first assessed in vitro on isolated polymerized X-rhodamine microtubules. Binding assay was done by incubating P79-98-Qdot with isolated microtubules in cytosolic extract of HeLa cells supplemented with ATP. Fluorescence microscopy observations show that P79-98-Qdot bind to microtubules (Fig. 5C, D) whilst the control corresponding to Qdot without the peptide does not (Fig. 5B). This interaction was also evidenced following

microinjection of P79-98-Qdot in HeLa cells expressing mRFP-tubulin (Supplementary Fig. 2).

Next, we assessed this interaction could also occur endogenously. Plasmids encoding either P79-98-Tomato or a control peptide P37-58-Tomato were constructed and used to transfect HeLa cells stably expressing eGFP- α -tubulin. Confocal microscopy analyses of these cells evidenced that P79-98-Tomato was colocalized with eGFP- α -tubulin (Fig. 6A) in contrast to P37-58-Tomato (Fig. 6B), confirming the propensity of P79-98 to interact with microtubules and suggesting the ability of P79-98 to act as a microtubule targeting signal.

Biological activity of P79-98.

FIP-1 has been described to participate in cell cycle control by affecting aster formation induced by chromosome-binding protein RCC1 at centrosomes (Pennisi, 1999; Wilde and Zheng, 1999). It controls the microtubule assembly originating from this structure during mitosis. Knowing that E3-14.7K is strongly interacting with FIP-1 and that it is also associated with microtubules, we have tested the influence of E3-14.7K via P79-98 on the control of cell cycle by FIP-1. HeLa cells were transfected with plasmids encoding E3-14.7K-Rluc, P79-98-Rluc or RLuc. Two days post-transfection, the cell cycle of these transfected cells was analyzed by flow cytometry. Remarkably, the cell cycle of HeLa cells overexpressing E3-14.7K or P79-98 was different to that of control cells (Fig. 7A). Indeed, cell cycle of these transfected cells show that no cell population was found in G₂/M phase (0% versus 13.70%) in favor to an increase of cell percentage in S phase (43.43% versus 31.78%). Note that the cell cycle of cells expressing RLuc was similar to non transfected cells (data not shown). Altogether, these observations might

suggest that the cell cycle blockade observed could be due to the binding of E3-14.7K to FIP-1 via P79-98 sequence, blocking FIP-1 involvement in the cell division.

Since E3-14.7K is also known to be involved in NF κ B pathway mainly due to its interaction with FIP-3 (NEMO, IKK γ), we investigated the impact of P79-98 on NF κ B pathway in cells stably expressing firefly luciferase gene under NF- κ B promoter. These cells were transfected with plasmids expressing RLuc, P37-58-RLuc, P79-98-RLuc or E3-14.7K-RLuc. One day post-transfection, NF κ B pathway was activated by TNF- α treatment. Then, firefly luciferase activity was measured to monitor NF κ B activation and subsequently that of Renilla luciferase activity as readout of transfection efficiency. As shown in Fig. 7B, whatever the RLuc-proteins expressed, TNF- α treatment enhanced the firefly luciferase activity. This enhancement was 10-fold higher when E3-14.7K-RLuc was expressed compared to that obtained with P37-58-RLuc and P79-98-RLuc expressions which display similar enhancement level than RLuc expression. Therefore, the region of E3-14.7K that is involved in FIP-3 interaction is not present on P37-58 and P79-98 peptides.

Discussion

The type 2 adenovirus E3-14.7-kDa protein is one of seven gene products expressed by early region 3 (E3) of group C human adenoviruses (Ad). E3-14.7K has been reported to play a central role in regulating host cell response during adenovirus infection *via* FIPs interactions. This protein is expressed during the early phase of the infection and its primary role is to inhibit apoptosis of host cells in response to TNF- α activation. E3-14.7K binds with four FIPs proteins that interact with different partners involved in various apoptosis pathways (Horwitz, 2001; Horwitz, 2004).

The present study aims to understand intracellular interactions between FIP-1, E3-14.7K and microtubules network which are still ill-known. FIP-1 named also as Rag A is a member of Ras GTPase family acting as a biological switch (Boguski and McCormick, 1993). It shuttles between the nucleus and the cytoplasm and its subcellular localization is changed depending on the nucleotide-bound forms, either GDP-or GTP-bound forms. FIP-1 has been found to bind to the light chain of cytoplasmic dynein TCTEL1/Tctex-1 and several intracellular proteins (Lukashok et al., 2000). Cytoplasmic dynein is a protein motor complex that uses ATP hydrolysis to transport cargoes toward the minus end of microtubules. Data reported so far concerning E3-14.7K and FIP-1 interactions have been obtained mainly from in vitro studies.

Here, we show for the first time, direct intracellular interactions between E3-14.7K and FIP-1 and microtubules via TCTEL1 (Fig. 3). Data from FLIM-FRET experiments clearly demonstrate a direct interaction between E3-14.7K and FIP-1. Based on the FRET lifetime values, it is highly suggested that E3-14.7K and FIP-1 are in closer proximity compared to E3-14.7K/tubulin reinforcing the idea that FIP-1 could be the bridging molecule between microtubules and E3-14.7K. The role of the functional interaction of E3-14.7K with microtubules is unknown but it is unlikely related to the migration of adenoviral particles on the microtubules. Indeed, adenovirus exploits dynein via interaction with viral hexon to cross the cytoplasm during early phase of infection (Bremner et al., 2009). Since E3-14.7K is not produced at this time of infection, the role of its interaction with FIP-1 and TCTEL1 has to be deciphered. Note that microtubules and dynein motors are implicated in the vesicular trafficking particularly in vesicles migration along the endocytosis process (Horgan and McCaffrey, 2011). E3-14.7K has been reported to inhibit TNF- α induced apoptosis upon inhibition of the

internalization of TNF receptor 1 (TNFR₁) via vesicle formation from the cell surface. TNF- α mediated apoptosis is initiated by the recruitment of TNF receptor-associated death domain (TRADD), Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8 to the death domain of TNFR₁ which results in the death-inducing signalling complex (DISC) formation. DISC is established within minutes after TNFR₁ internalization via clathrin coated vesicles ending up to so called TNF receptosomes which are “death signalling” vesicles (Schneider-Brachert et al., 2006). The formation and/or trafficking of these TNF receptosomes could involve microtubules-mediated transport. Inhibition of TNFR₁ endocytosis prevents TNF- α induced DISC formation and E3-14.7K affected the assembly of endocytic machinery including Rab5 and dynamin 2 at the site of activated TNFR₁ (Schneider-Brachert et al., 2006). Noteworthy that FIP-1 (Rag A) is a member of Ras GTPase family. As other small GTPases (Rab GTPases), FIP-1 could mediate the transport of these vesicles along microtubules by recruiting adapters/motors or molecular binding directly to molecular motors. One hypothesis would imply that the binding of E3-14.7K to FIP-1 could compete with the binding of FIP-1 to those vesicles inhibiting their transport along microtubules and the trafficking of TNF receptosomes. Furthermore, the fusion of TNF receptosomes with trans-Golgi vesicles is required to activate acid sphingomyelinase and cathepsin D. This trafficking is mediated by microtubules which could also be altered by interaction of FIP-1 with E3-14.7K.

As said above, E3-14.7K is also found to interact with FIP-2, blocking TNF- α induced cytolysis. FIP-2 is known to be involved in the retrograde and anterograde vesicular trafficking (Ying and Yue, 2012). Recently, E3-14.7K has been clearly shown to inhibit TNF- α cytolysis via its recruitment to TNFR₁. However, this effect is independent to the presence of FIP-2. Indeed, siRNA knockdown of FIP-2 did not alter the protective

effect of E3-14.7K infection (Klingseisen et al., 2012). Interestingly, in knocked down FIP-2 cells, E3-14.7K and TNFR₁ were still co-immunoprecipitated suggesting that E3-14.7K interacts with TNFR₁.

In another hand, the interaction of E3-14.7K with FIP-3 is related to its action on the NF κ B pathway independently of TNF- α receptor internalization (Schneider-Brachert et al., 2006).

Here, using BRET methodology, we have identified among several peptides derived from E3-14.7K, the peptide P79-98 containing residues from 79 to 98 located in β structures of E3-14.7K that is responsible of E3-14.7K/FIP-1 interaction (Figs 4, 5, 6). This is in line with previous data indicating that the determinants of E3-14.7K for recognition of FIP-1 are retained within residues 31–128 of its C-terminal fragment (Kim and Foster, 2002).

It has been reported that FIP-1 seems to be involved in the Ran/Gsp 1 GTPase pathway. Moreover, Ran-GTP has also recently been associated with cell cycle control by affecting aster formation induced by chromosome-binding protein RCC1 at centrosomes and controlling microtubule assembly originating from this structure during mitosis. We observed that overexpression of E3-14.7K induced arrest of cell cycle in S phase (Fig. 7A). Similar effect was obtained with P79-98 peptide responsible for the interaction between E3-14.7K and FIP-1 meaning that E3-14.7K blockade of the cell cycle occurred upon FIP-1 recognition. This is in agreement to the probable involvement of FIP-1 in the cell division via Ran-GTP as stated above. In contrast, we showed that P79-98 has no effect on NF κ B pathway (Fig. 7B) which would mean that this part of the E3-14.7K protein is not involved in the apoptosis inhibition mediated by FIP-3.

Overall, we would like to propose from our results that E3-14.7K produced by adenoviruses could act as a decoy to trap FIP-1 protein and interfering its activity relative to its involvement in cellular trafficking (Fig. 8).

Since E3-14.7K induces apoptosis and a cell cycle blockade, therapeutic application could be possible especially for cancer treatment. P79-98 peptide that bears the cell cycle arrest function of E3-14.7K could be exploited for cancer growth inhibition as itself or by determining agonist peptides. The binding of P79-98-tagged cargo to microtubules would be also of great interest to target intracellular trafficking of molecules, macromolecules or drug delivery systems via microtubules. This research exploitation is ongoing in our laboratory.

Materials and Methods

Cells and cell culture:

HeLa cells (human epithelial ovarian carcinoma; CCL2, ATCC, Rockville MD, USA) were routinely grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% of a 100x non-essential amino acid solution, 1% of a 100x Glutamax and 100 U/ml penicillin and 100 µg/mL streptomycin (PAA Laboratories, Les Mureaux, France).

HeLa FIP-1-eGFP cells and HeLa eGFP- α -tubulin cells: These clones were HeLa cells that stably expressed either FIP-1-eGFP or eGFP- α -tubulin. They were grown in the same medium as HeLa cells but in the presence of 400 µg/ml of G418 (PAA Laboratories, Les Mureaux, France). These cells were prepared by transfection of HeLa cells with plasmid encoding FIP-1-eGFP or eGFP- α -tubulin (Clontech) complexed with Histidylated-IPEI (His-IPEI) (30) prepared at a DNA/polymer weight ratio of 1:6.

After 48 h, 800 µg/mL of G418 was added to the medium for selection of clones that stably expressed the transgene. Clones were collected, amplified and those expressing the fluorescent protein were selected by flow cytometry (FACSort, Becton Dickinson Grenoble, France; $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ nm}$). Then, positive clones were subcloned using a cell sorter (FACSVantage, Becton Dickinson; $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \pm 30 \text{ nm}$).

HEK 293/NFκB-luc cells: These cells were human embryonic kidney (HEK 293) cells which are stably expressing the Firefly luciferase gene under NF-κB promoter (Promega). They were grown in DMEM High Glucose (4.5%) cell medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin, 1% streptomycin and 50 µg/mL hygromycin. To activate the NFκB pathway, the cells were treated with 25 ng/mL of human TNF-α (Sigma) in complete medium for 6 hours.

The absence of mycoplasma infection in the cell lines was routinely checked by using MycoAlert[®] Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Levallois Perret, France).

Plasmids:

pTCTEL₁-DsRed2, pE3-14.7K-RLuc and pE3-14.7K-Tomato were pDNA encoding TCTEL₁ fused with DsRed2 or E3-14.7K fused with Renilla luciferase and td-Tomato. Briefly, the cDNAs encoding Dynein Light chain 1 (NCBI Reference Sequence: NM_006519.2) and Human adenovirus 5 E3-14.7K protein (NCBI Reference Sequence: AP_000224.1) without stop codon were synthesized by Genscript (Piscataway, NJ, USA). TCTEL₁ and E3-14.7K cDNA were then subcloned (HindIII/EcoRI) in pDsRed2-N₁, or pRLuc-N₁ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and ptd-Tomato-N₁ (Clontech) under the control of the human cytomegalovirus (CMV) promoter.

pP38-57-Tomato and pP79-98-Tomato were pDNA encoding P38-57 and P79-98 fused with td-Tomato. Single stranded sense (s) and antisense (as) oligonucleotides coding for P38-57 and P79-98 were synthesized by Eurogentec (Anger, France): sP38-57: atgggcgaattcATGGTTAACTTGCACCAGTGCAAAAGGGGTATCTTTTGTCTGGTAAGCA GGCCAAAGTCACcttgatccatgggc; asP38-57: gcccatggatccaaGGTGACTTTGGCCTGC TTTACCAGACAAAAGATACCCCTTTTGCACCTGGTGCAAGTTAACCATgaattcgcccat; sP79-98: atgggcgaattcATGGTGGTCATGGTGGGAGAAAAGCCCATTACCATAACTCA GCACTCGGTAGAAACCGAAGGcttgatccatgggc; asP79-98: gcccatggatccaaGCCTTCG GTTTCTACCGAGTGCTGAGTTATGGTAATGGGCTTTTCTCCCACCATGACCACCATga attcgcccat. s and as oligonucleotides of P38-57 or P79-98 were annealed in 1X annealing buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl and 1 mM EDTA, pH 7.5) for 10 min at 95°C. Double stranded oligonucleotides were digested by EcoRI and BamHI and cloned in fusion with td-Tomato in ptd-Tomato-N1.

pFIP-1-eGFP was a homemade plasmid DNA constructed from pcDNA-T7-FIP-1 (kindly given by Prof MS Horwitz, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA) (Lukashok et al., 2000) and pEGFP-N3 from Clontech (Mountain View, CA, USA) encoding eGFP under CMV promoter.

Supercoiled DNA was isolated from *E. Coli* DH5 α super competent bacteria (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) by alkali lysis and purification with Qiagen Mega Kit Endotoxin free Plasmid (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Chemicals:

Except when otherwise stated, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). E3-14.7K peptides containing either residues 38-57 (P38-57: VNLHQCKRGIFCLVKQAKVT; Mw = 2810.33 Da), 50-69 (P50-69: LVKQAKVTYDSN

TTGHRLSY; Mw = 2810.33 Da), 65-84 (P65-84: HRLSYKLPTKRQKL VVMVGE; Mw = 2810.33 Da), 79-98 (P79-98: VVMVGEKPITITQHSVETEG; Mw = 2810.33 Da) or 106-125 (P106-125: GPEDLCTLIKTLCGLKDLIP; Mw = 2810.33 Da) and biotinylated P79-98 (VVMVGEKPITITQHSVETEG-Ttds-biotine (P79-98-bio) (Molecular weight = 2810.33 Da) were synthesized by JPT Innovative Peptide Solutions (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany). Ttds was a (N-(3-{2-[2-(3-amino-propoxy)-ethoxy]-ethoxy}-propyl)-succinamic acid linker. His-IPEI is IPEI (22kDa) modified with 16% histidine residues per polymer molecule was synthesized as described (Bertrand et al., 2011).

Expression and purification of recombinant protein FIP-1-eGFP and E3-14.7K:

pTRC6His-FIP-1eGFP and pET28a-E3-14.7K plasmids encoded expression of recombinant FIP-1-eGFP and E3-14.7K in *E. coli* BL21 (DE3) cells (Novagen). BL21 were grown in a shaker incubator at 37°C in LB media supplemented with proper antibiotics, and induced for 3 h at 30°C by addition of 1 mM IPTG at an OD600 nm of 0.6 - 0.8. After 16 hours at 13°C, FIP-1-eGFP was extracted from bacterial pellet in Y-PER (Pierce) containing 2 mM PMSF, 1 mM MgCl₂ and inhibitor protease cocktail (Sigma-Aldrich). E3-14.7K was extracted following inclusion body purification protocol with 0.5 M urea. The soluble extracts were then loaded directly onto a Histidine affinity purification resin (Novagen). FIP-1-eGFP and E3-14.7K were eluted in 200 mM and 100 mM imidazole buffer, respectively.

Cytosolic extracts preparation:

HeLa cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% BSA, scraped from the dish and resuspended in Homogenization buffer (HB: 250 mM sucrose, 3 mM imidazole, 0.1% gelatin pH7.4). Cells were then lysed in HB completed

with inhibitor cocktail protease using 22G syringe. Cytosolic extract were collected after centrifugation at 3000 rpm 4°C during 5 min.

Co-immunoprecipitation of FIP-1 and E3-14.7K:

Recombinant E3-14.7K protein was incubated in PBS at 4°C for 16 h either with HeLa FIP-1-eGFP cytosolic extract or recombinant FIP-1-eGFP protein. Samples were pre-cleared with normal mouse IgG (Santa Cruz, SC-2343) for 30 min at 4°C prior to immunoprecipitation at 4°C for 16 h using anti-eGFP antibody coupled with agarose beads (Santa Cruz, SC-9996AC). Beads were washed and collected by centrifugation at 3000 rpm during 5 min at 4°C. Beads were suspended in denaturing charge buffer, boiled and analyzed in 12% SDS-PAGE gel.

Preparation of isolated microtubules:

Isolated microtubules were formed using X-rhodamine labeled α -tubulin extracted from bovine brain (Cytoskeleton Inc., ville). Microtubules were polymerized and stabilized in vitro for fluorescence microscopy according to manufacturer instructions in G-PEM buffer (80 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP, pH 6.9) supplemented with 30% (w/v) glycerol and 20 μ M taxol. Isolated microtubules were incubated with Qdot® labeled with P79-98-bio in cytosolic extract from HeLa cells supplemented with 10mM ATP.

Images were acquired using a Zeiss Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany) equipped with a COLIBRI Lamp allowing fluorescence analysis (4 LED λ ex 365nm, 470nm, 530nm 625nm).

Peptide conjugation with Quantum Dots (Qdot):

P79-98-bio was conjugated with Qdot streptavidin conjugate 545 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The conjugate was formed in PBS for 1h at

room temperature in 30-fold molar excess of P79-98-bio. Considering that 5 to 10 streptavidin molecules were covalently attached on the surface of Qdot, we assumed that 15 to 30 P79-98-bio were conjugated per Qdot.

Microinjection experiments:

Microinjections were performed using an Eppendorf Femtojet in combination with an Eppendorf Injectman NI2 micromanipulator (Eppendorf). HeLa cells were seeded on 35 mm Petri dish with an imprinted 500 μm relocation grid (Biovalley, Marne la Vallée, France). Qdot samples were diluted in nucleocytoplasmic buffer (Adam et al., 1990) and were loaded in glass injection capillary Femtotips II (Eppendorf), 0.5 μm inner and 0.7 μm outer diameter. Air was administrated at 50–100 hPa for 0.1–0.3 s.

Transfection:

Polyplexes were prepared at a DNA/polymer weight ratio of 1:6, i.e His-IPEI (15 μg in 15 μL of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4) to pDNA (2.5 μg in 32.5 μL of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4). After mixing by vortex, the solution was kept for 30 min at room temperature before use. For transfection, the volumes of the solutions containing polyplexes were adjusted with complete HeLa medium. The cells were incubated with the transfection mixtures (24-well; 500 μL ; 2.5 μg pDNA) for 4 h at 37°C. Then, the transfection medium was replaced with a fresh medium.

Colocalization experiments:

Cells (1.5×10^5) were grown on glass coverslips in 4-wells plate two days before experiments. They were transfected as described above with indicated pDNA/His-IPEI polyplexes. Two days after transfection, cells were washed two times in PBS and fixed with 4% p-formaldehyde during 15 min at 37°C. After two washes in PBS, cover slips were mounted on slides using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories,

Burlingame CA, USA). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analyses were performed using a Zeiss Axiovert 200M microscope coupled with a Zeiss LSM 510 scanning device (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany). The inverted microscope was equipped with a Plan-Apochromat 63× objective (NA = 1.4) and a temperature controlled stage.

pB-FRET experiments:

pB-FRET (photobleaching FRET) is the measurement of steady state fluorescence intensity under confocal microscopy. These experiments were performed by using FIP-1-eGFP as donor and E3-14.7K-Tomato as acceptor. eGFP was excited (λ_{exc} = 488 nm) at moderate laser power and emission was detected at λ_{em} = 510 nm. td-Tomato was excited (λ_{exc} = 543 nm) and emission was recorded at λ_{em} = 581 nm. Two confocal images were acquired under the same imaging conditions before and after photobleaching fluorescence of td-Tomato (λ_{exc} = 543 nm) in square region of interest (ROI). Images were recorded with Carl Zeiss's LSM Image Browser software and were calculated with the public-domain ImageJ software (Schneider et al., 2012).

BRET experiments:

HeLa were transfected with a plasmid expressing E3-14.7K-Rluc. Fourty hours after transfection cytosolic extracts were processed as previously described. Fixed amount of cytosolic extracts and increasing amount of FIP-1-eGFP produced in bacteria were incubated into white 96 wells microplates (CELLSTAR-Greiner Bio-One). BRET were performed using Coelenterazine H (Molecular Probes) at a final concentration of 5 μ M. Signals were collected using a 450/58 filter (Luciferase) and a 480/LP (cutoff at 480 nm) filter (EGFP). BRET measurements were taken using the Mithras LB 940 with

MikroWin 2000 software (Berthold Technologies). All experiments were repeated at least 2 times.

Determination of cell cycle:

HeLa cells transfected with pRLuc-N1, pE3-14.7K-RLuc or pP79-98-RLuc or untransfected cells were harvested and washed in ice-cold PBS. Cells were resuspended in propidium iodide solution (10 mg/ml) with DNase-free RNase (20 u/ml) in PBS, the cell cycle status was tested by flow cytometry on a FACSort (Becton Dickinson). Cell cycle distribution was studied with Modfit software (Verity Software House, Inc.).

Luciferase assays:

Cells in 24 wells plate were washed with PBS 24 h after transfection then harvested using trypsin/EDTA solution. The lysis buffer (200 µl of 8 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 15% glycerol, 25 mM Tris-phosphate buffer, pH 7.8) was added to the pellet. The suspension was mixed with a Vortex and kept for 10 min at room temperature. The solution was spun down (5 min, 800 g). For firefly luciferase measurement, ATP (95 µl of a 2 mM solution in the homogenization buffer without Triton X-100) was added to 60 µl of supernatant before addition of luciferin (167 µM, 150 µl). The luminescence was recorded for 4s by using a luminometer (Lumat LB 9501, Berthold, Wildbach, Germany). Experiments were done in triplicate. The data shown correspond to the number of RLU per mg proteins. Protein concentration was determined for each sample using the bicinchoninic acid (BCA) colorimetric assay modified by Hill and Straka (Hill and Straka, 1988).

FLIM-FRET experiments:

The FLIM experiments were performed using an inverted Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) coupled to a 80-MHz mode-

locked Mai-Tai® Ti:Sapphire tunable laser (720-920 nm, 100 fs laser pulse; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA) for two-photon excitation. The time-resolved fluorescence intensity was obtained using the time-correlated single-photon counting approach. In FLIM/FRET experiments, the donor was eGFP and was excited at 900 nm. Two different protein acceptors, compatible with eGFP as a donor, were used: td-Tomato and DsRed2. Fluorescence emission of eGFP fusion proteins was detected in descanned mode through the external port of the microscope and further filtered by a bandpass filter (510 ± 42 nm) (Semrock). The external detector was a high-speed photomultiplier (PMC-100, Becker & Hickl) connected to a SPC-830 TCSPC card (Becker & Hickl). The card was configured in FIFO mode with 256x256 pixels and 256 time channels (48.8ps/channel). The excitation light pulse was triggered by a Hamamatsu photodiode (model S4753). The power of the laser source was adjusted to yield a photon counting rate in the $1\text{--}5 \times 10^4$ photons/s range. This value was found to be optimal to ensure the single photon counting condition while minimizing photobleaching of eGFP. From 20 to 25×10^3 photons per fluorescence intensity decay were collected, which was found to be statistically relevant for the calculation of the donor fluorescence lifetime. To ensure that the determination of the fluorescence lifetime of eGFP cannot be influenced by the presence of the acceptor protein in the absence of any interaction – for instance due to a bleed-through of fluorescence emission – control cells were either transfected by free eGFP alone or co-transfected by free eGFP and red-fluorescent acceptor proteins, i.e. not fused to another protein. The fluorescence lifetime of free eGFP was found to be the same (i.e. $\tau = 2.4$ ns) in the absence or presence of free acceptor protein. Fluorescence lifetimes were calculated for

all pixels in the field of view (256×256 pixels) or for a particular selected region of interest using the SPImage software (Becker & Hickl GmbH).

Acknowledgments:

We warmly thank Prof Horwitz (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA) for kindly providing us plasmid encoding FIP-1, Dr Ronald Rooke from Transgene SA for plasmid encoding E3-14.7K. We also acknowledge Dr Friedrich Piller (CBM, Orléans) for his help in FIP-1 plasmids constructions and David Gosset (Cytometry and Cellular Imaging platform CBM) for his technical assistance. We also thank Sara Resina, Aida Duarte and Vedrana Bukal who have participated in this work during their Master degree internship. The French Association “Vaincre la Mucoviscidose” (VLM) and “Association Française contre les Myopathies” (AFM) are gratefully acknowledged for their financial support. LP received a Ph.D fellowship from VLM.

References

- Adam, S. A., Marr, R. S. and Gerace, L.** (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* **111**, 807–816.
- Alcor, D., Calleja, V. and Larijani, B.** (2009). Revealing signaling in single cells by single- and two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. *Methods Mol. Biol.* **462**, 307–343.
- Bertrand, E., Gonçalves, C., Billiet, L., Gomez, J. P., Pichon, C., Cheradame, H., Boguski, M. S. and McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643–654.

- Bremner, K. H., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S. P. and Vallee, R. B.** (2009). Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* **6**, 523–535.
- Burgert, H. G., Ruzsics, Z., Obermeier, S., Hilgendorf, A., Windheim, M. and Elsing, A.** (2002). Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **269**, 273–318.
- Chen, P., Tian, J., Kovesdi, I. and Bruder, J. T.** (1998). Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 5815–5820.
- Chen, Y., Mills, J. D. and Periasamy, A.** (2003). Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation* **71**, 528–541.
- Gooding, L. R., Elmore, L. W., Tollefson, A. E., Brady, H. A. and Wold, W. S.** (1988). A 14,700 MW protein from the E₃ region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**, 341–346.
- Gooding, L. R., Sofola, I. O., Tollefson, A. E., Duerksen-Hughes, P. and Wold, W. S.** (1990). The adenovirus E₃-14.7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytolysis. *J. Immunol.* **145**, 3080–3086.
- Hill, H. and Straka, J.** (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analytical biochemistry* **1**, 203–8.
- Hirose, E., Nakashima, N., Sekiguchi, T. and Nishimoto, T.** (1998). RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtrp involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *J. Cell. Sci.* **111** (Pt 1), 11–21.
- Horgan, C. P. and McCaffrey, M. W.** (2011). Rab GTPases and microtubule motors. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1202–1206.

Horton, T. M., Ranheim, T. S., Aquino, L., Kusher, D. I., Saha, S. K., Ware, C. F., Wold, W. S. and Gooding, L. R. (1991). Adenovirus E3 14.7K protein functions in the absence of other adenovirus proteins to protect transfected cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Virol.* **65**, 2629–2639.

Horwitz, M. S. (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* **279**, 1–8.

Horwitz, M. S. (2004). Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S172–183.

Kay, R. J. and Israël, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* **93**, 1231–1240.

Kim, H.-J. and Foster, M. P. (2002). Characterization of Ad5 E3-14.7K, an adenoviral inhibitor of apoptosis: Structure, oligomeric state, and metal binding. *Protein Science* **11**, 1117–1128.

Klingseisen, L., Ehrenschröder, M., Heigl, U., Wajant, H., Hehlhans, T., Schütze, S. and Schneider-Brachert, W. (2012). E3-14.7K is recruited to TNF-receptor 1 and blocks TNF cytotoxicity independent from interaction with optineurin. *PLoS ONE* **7**, e38348.

Krajcsi, P., Dimitrov, T., Hermiston, T. W., Tollefson, A. E., Ranheim, T. S., Vande Pol, S. B., Stephenson, A. H. and Wold, W. S. (1996). The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J. Virol.* **70**, 4904–4913.

Lakowicz, J. R., Chowdhury, M. H., Ray, K., Zhang, J., Fu, Y., Badugu, R., Sabanayagam, C. R., Nowaczyk, K., Szmajewski, H., Aslan, K., et al. (2006).

Plasmon-controlled fluorescence: A new detection technology. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng* **6099**, 609909.

Li, Y. and Horwitz, M. S. (1996). *Identification and Characterization of Cellular Proteins which Interact with Adenovirus E3-14.7KDA Protein an Antagonist of TNF-[alpha]*. The College.

Li, Y., Kang, J. and Horwitz, M. S. (1997). Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytotoxicity with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *J. Virol.* **71**, 1576–1582.

Li, Y., Kang, J. and Horwitz, M. S. (1998). Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1601–1610.

Li, Y., Kang, J., Friedman, J., Tarassishin, L., Ye, J., Kovalenko, A., Wallach, D. and Horwitz, M. S. (1999). Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1042–1047.

Lichtenstein, D. L., Toth, K., Doronin, K., Tollefson, A. E. and Wold, W. S. M. (2004). Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol.* **23**, 75–111.

Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D. G. and Lamond, A. I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J. Cell Biol.* **187**, 481–496.

Lukashok, S. A., Tarassishin, L., Li, Y. and Horwitz, M. S. (2000). An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and a small GTPase. *J. Virol.* **74**, 4705–4709.

- Midoux, P. and Guégan, P.** (2011). Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun. (Camb.)* **47**, 12547–12549.
- Mueller, S., Cao, X., Welker, R. and Wimmer, E.** (2002). Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 7897–7904.
- Nakashima, N., Hayashi, N., Noguchi, E. and Nishimoto, T.** (1996). Putative GTPase Gtrp genetically interacts with the RanGTPase cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **109** (Pt 9), 2311–2318.
- Pennisi, E.** (1999). Nuclear transport protein does double duty in mitosis. *Science* **284**, 1260–1261.
- Pfleger, K. D. G., Seeber, R. M. and Eidne, K. A.** (2006). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc* **1**, 337–345.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Merkel, O., Jakob, M., Hallas, C., Kruse, M.-L., Groitl, P., Lehn, A., Hildt, E., Held-Feindt, J., et al.** (2006). Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J. Clin. Invest.* **116**, 2901–2913.
- Schwamborn, K., Weil, R., Courtois, G., Whiteside, S. T. and Israël, A.** (2000). Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 22780–22789.

Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M. and Nishimoto, T. (2001). Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J. Biol. Chem.* **276**, 7246–7257.

Sekiguchi, T., Todaka, Y., Wang, Y., Hirose, E., Nakashima, N. and Nishimoto, T. (2004). A novel human nucleolar protein, Nop132, binds to the G proteins, RAG A/C/D. *J. Biol. Chem.* **279**, 8343–8350.

Tai, A. W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U. and Sung, C. H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* **97**, 877–887.

Tollefson, A. E., Toth, K., Doronin, K., Kuppuswamy, M., Doronina, O. A., Lichtenstein, D. L., Hermiston, T. W., Smith, C. A. and Wold, W. S. (2001). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins. *J. Virol.* **75**, 8875–8887.

Wallrabe, H. and Periasamy, A. (2005). Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 19–27.

Wilde, A. and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* **284**, 1359–1362.

Wold, W. S., Tollefson, A. E. and Hermiston, T. W. (1995). E3 transcription unit of adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199** (Pt 1), 237–274.

Wold, W. S., Doronin, K., Toth, K., Kuppuswamy, M., Lichtenstein, D. L. and Tollefson, A. E. (1999). Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 380–386.

Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E.,

Ying, H. and Yue, B. Y. J. T. (2012). Cellular and molecular biology of optineurin. *Int Rev Cell Mol Biol* **294**, 223–258.

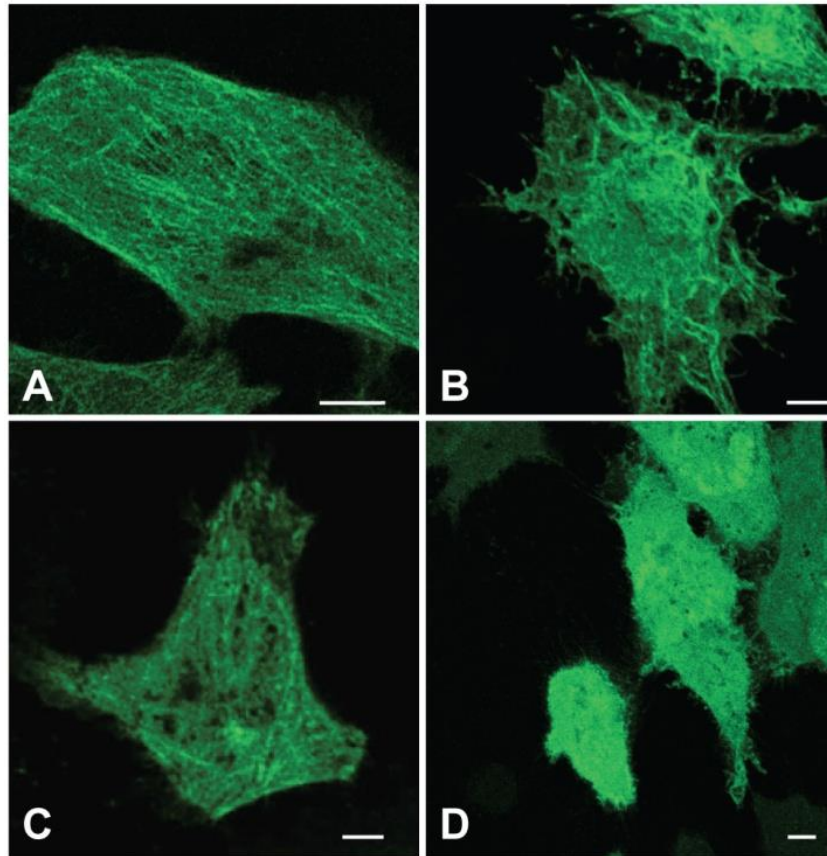


Fig. 1: Intracellular network of FIP-1, E3-14.7K and microtubules in HeLa cells. HeLa cells were transfected with a plasmid encoding either (A) eGFP- α -tubulin (B) FIP-1-eGFP (C) E3-14.7K-eGFP or (D) eGFP. After 48 hours post-transfection, cells were fixed with 4% PFA and analyzed under confocal microscope as described in Material and Methods section. Shown are representative images of each sample. Scale bar: 5 μ m.

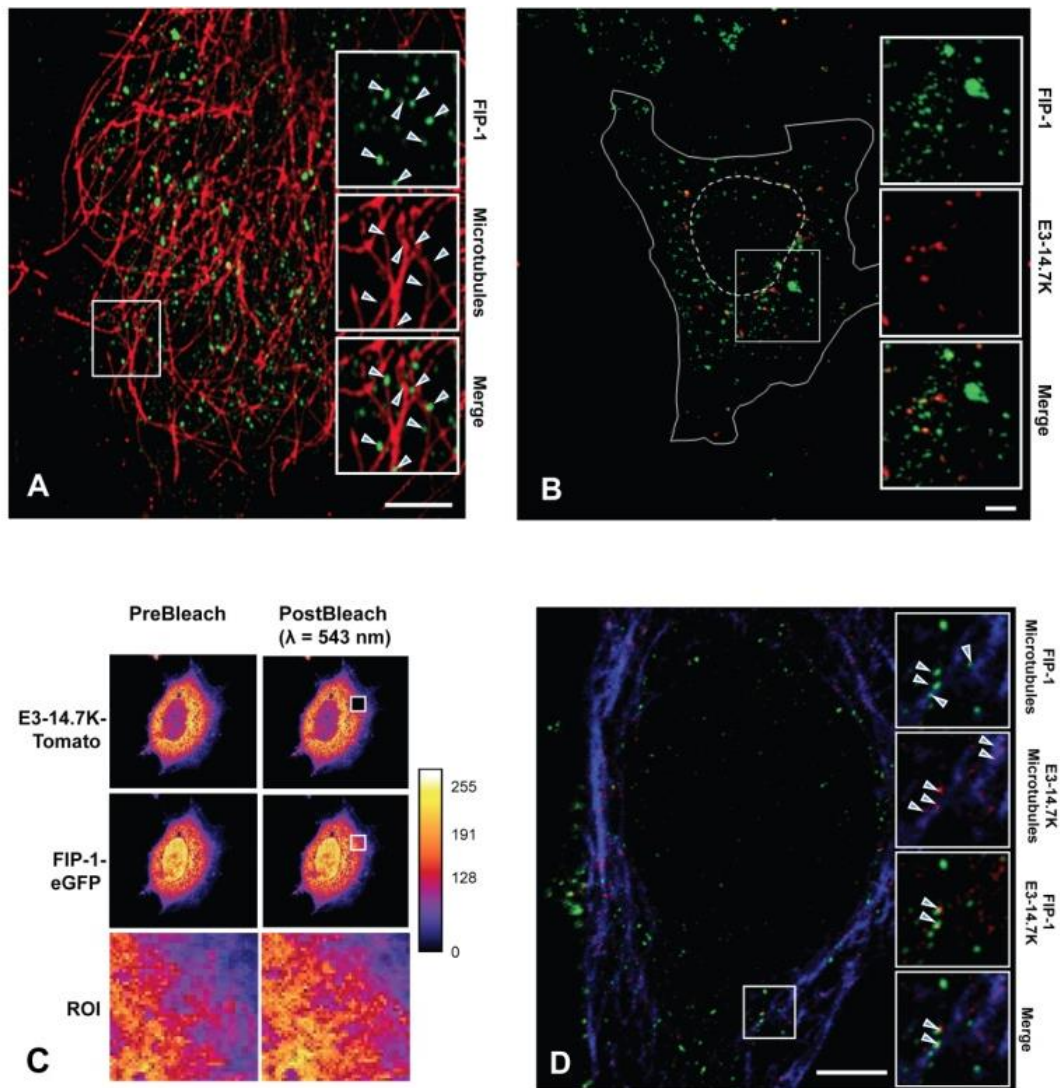


Fig. 2:

(A) Colocalization of FIP-1-eGFP with microtubules in HeLa cells. HeLa cells were transfected with a plasmid encoding FIP-1-eGFP (green). Two days after transfection, cells were treated with 1mM of DSP for 10 min in HBSS pH7.2 before permeabilization with digitonin. Cells were fixed and the staining of microtubules was performed with mouse MAb anti- α -tubulin revealed with Cy3 secondary anti-mouse antibodies (red). Then, cells were analyzed by confocal microscopy. Scale bar: 5 μ m.

(B) Intracellular distribution of E3-14.7K and FIP-1 in HeLa cells. Cells were cotransfected with plasmids encoding FIP-1-eGFP (green) and E3-14.7K-Tomato (red). Two days after transfection, cells were treated with 1mM of DSP for 10 min in HBSS pH7.2 before permeabilization with digitonin. Cells were fixed and analyzed by confocal microscopy. Scale bar: 5 μ m.

(C) Determination of E3-14.7K/FIP-1 interaction by pB-FRET experiment. HeLa cells were cotransfected with plasmids encoding FIP-1-eGFP and E3-14.7K-Tomato. Two days after transfection, cells were fixed and pB-FRET experiments were performed under confocal microscope. *Upper lane:* representative image of cell before bleaching; *Lower lane:* the same cell after photobleaching at 543 nm of indicated region of interest (ROI). *Right:* Zoom area of the ROI clearly showing the enhancement of GFP-tagged FIP-1 fluorescence after photobleaching of td-Tomato fluorescence as indicated by the fluorescence intensity scale pixels color.

(D) Triple colocalization between FIP-1, E3-14.7K and microtubules. HeLa cells were cotransfected with plasmids encoding FIP-1-eGFP (green) and E3-14.7K-cherry (red). Two days post-transfection, cells were treated with 1mM of DSP for 10 min in HBSS pH7.2. Cells were then permeabilized, fixed and microtubules were stained with mouse MAb anti- α -tubulin revealed with Cy5-labeled secondary anti-mouse antibodies (blue). Boxes on the right correspond to the enlarged ROI (square). Scale bar: 5 μ m.

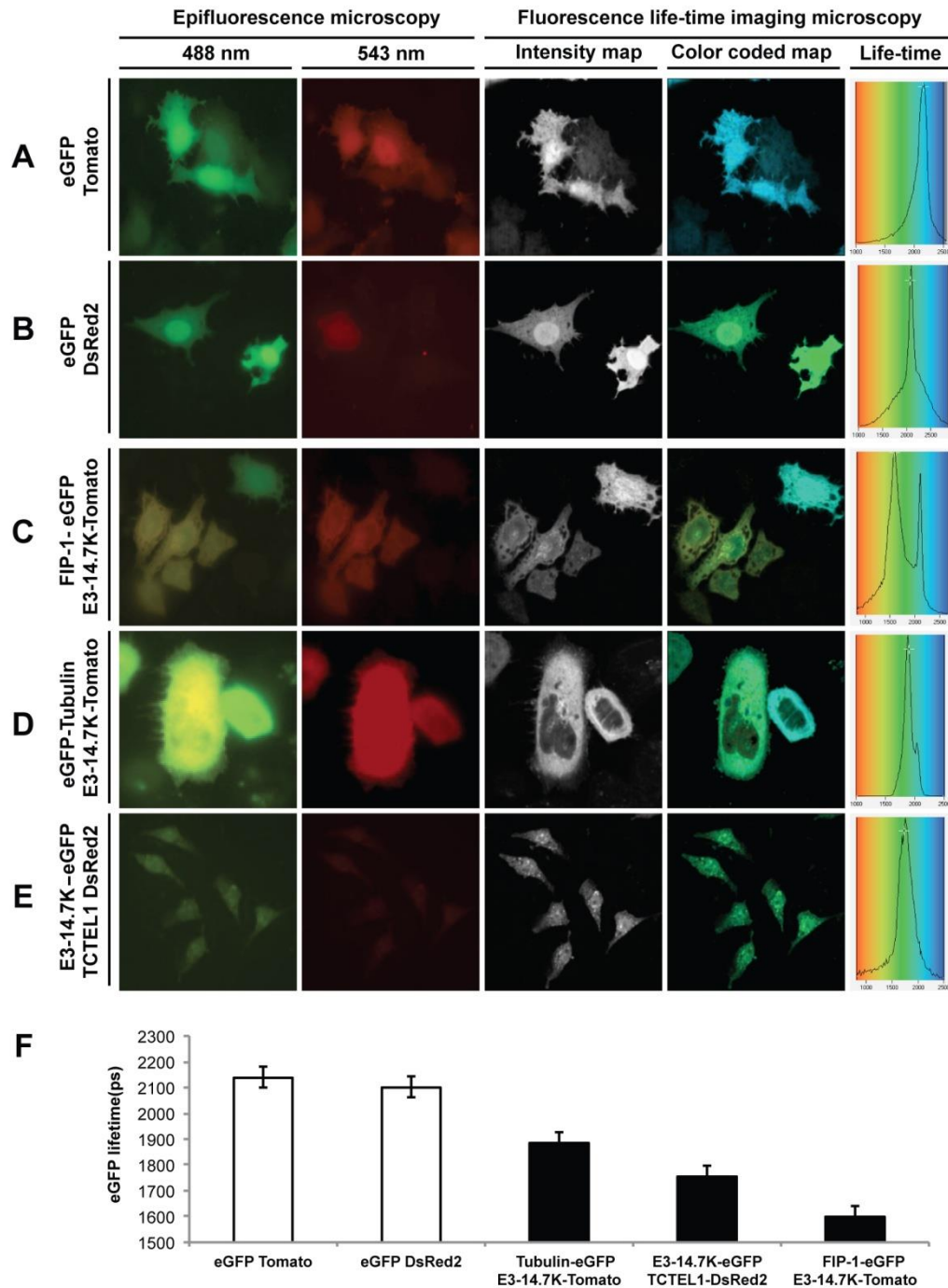


Fig. 3: FLIM-FRET experiments: E3-14.7K interacts with FIP-1, TCTEL1 and microtubules. Experiments were performed with HeLa cells expressing (A) eGFP/td-Tomato, (B) eGFP/DsRed2, (C) FIP-1-eGFP/E3-14.7K-Tomato, (D) eGFP- α -tubulin/E3-14.7K-Tomato, (E) E3-14.7K-eGFP /TCTEL1-DsRed2. For each panel the mean fluorescence lifetime of GFP is represented (F).

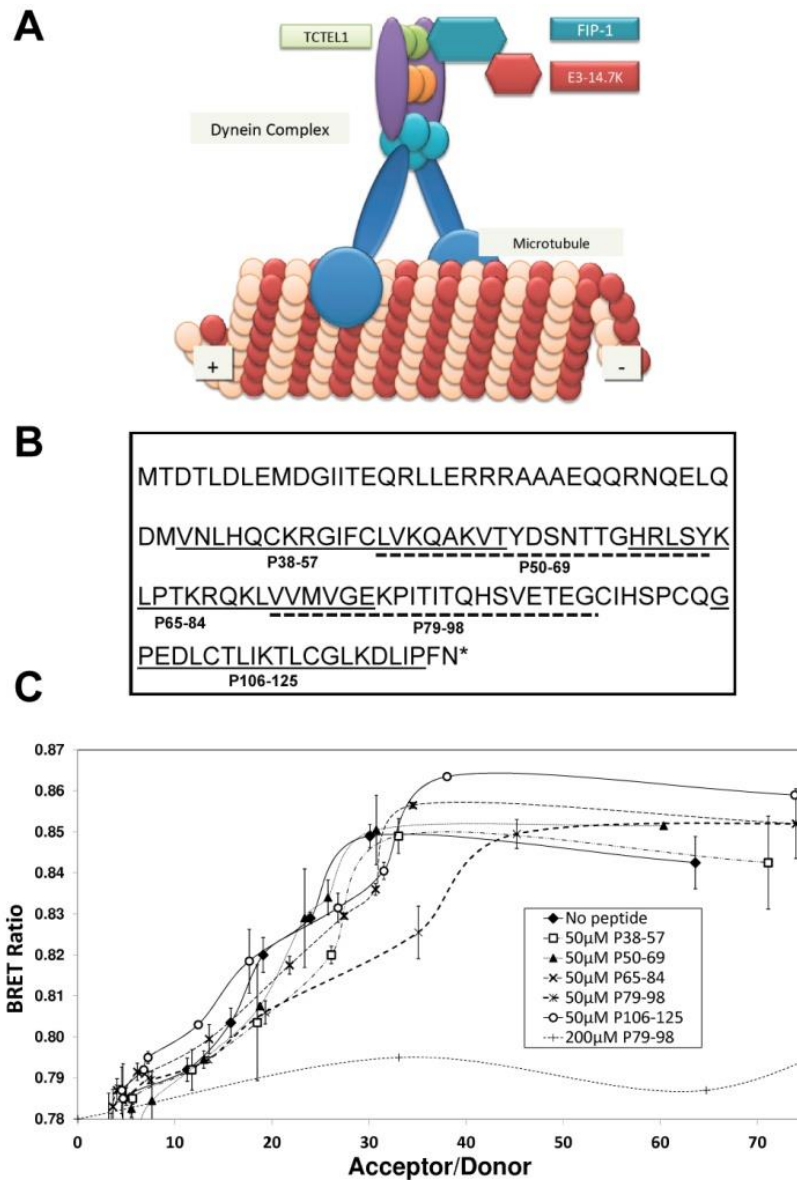


Fig. 4: (A) Schematic representation of the interactions between E3-14.7K, FIP-1 and TCTEL1. (B) Location of the 5 selected peptides covering amino acids 38 to 125 of E3-14.7K. (C) P79-98 peptide inhibits interaction between FIP-1 and E3-14.7K. HeLa cells were transfected with plasmid encoding E3-14.7K-Rluc. Two days after transfection, cytosolic extracts were processed. Fixed amount of cytosolic extracts and increasing amount of recombinant FIP-1-eGFP protein were incubated in the absence or in the presence of peptides (competitive experiments) as described in Material and Methods.

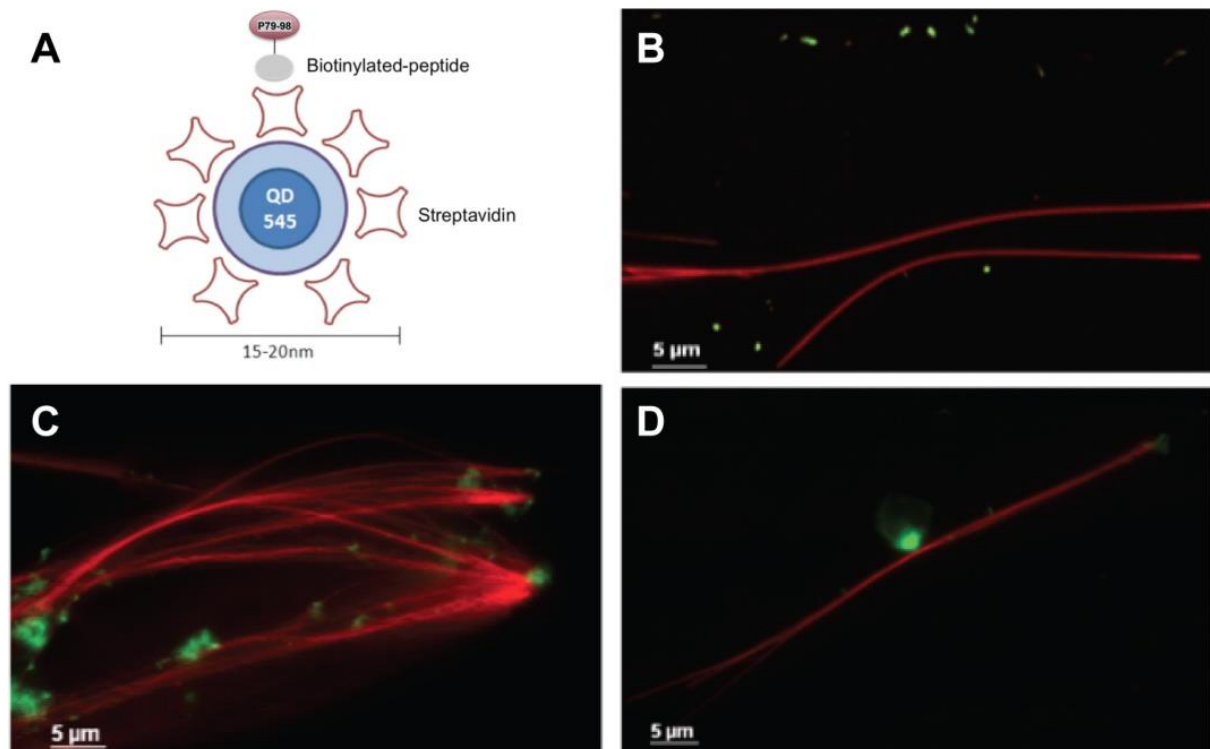


Fig. 5: P79-98 peptide binding to isolated microtubules. (A) Scheme of the loading of streptavidin-Qdot® 545 with biotinylated P79-98 peptide. X-rhodamine labeled microtubules (red) were polymerized *in vitro* and incubated with Qdot® 545 (B) alone or (C and D) linked to P79-98 peptide in HeLa cytosolic extracts supplemented with 10mM ATP. Images shown are representative confocal microscopy images of each sample.

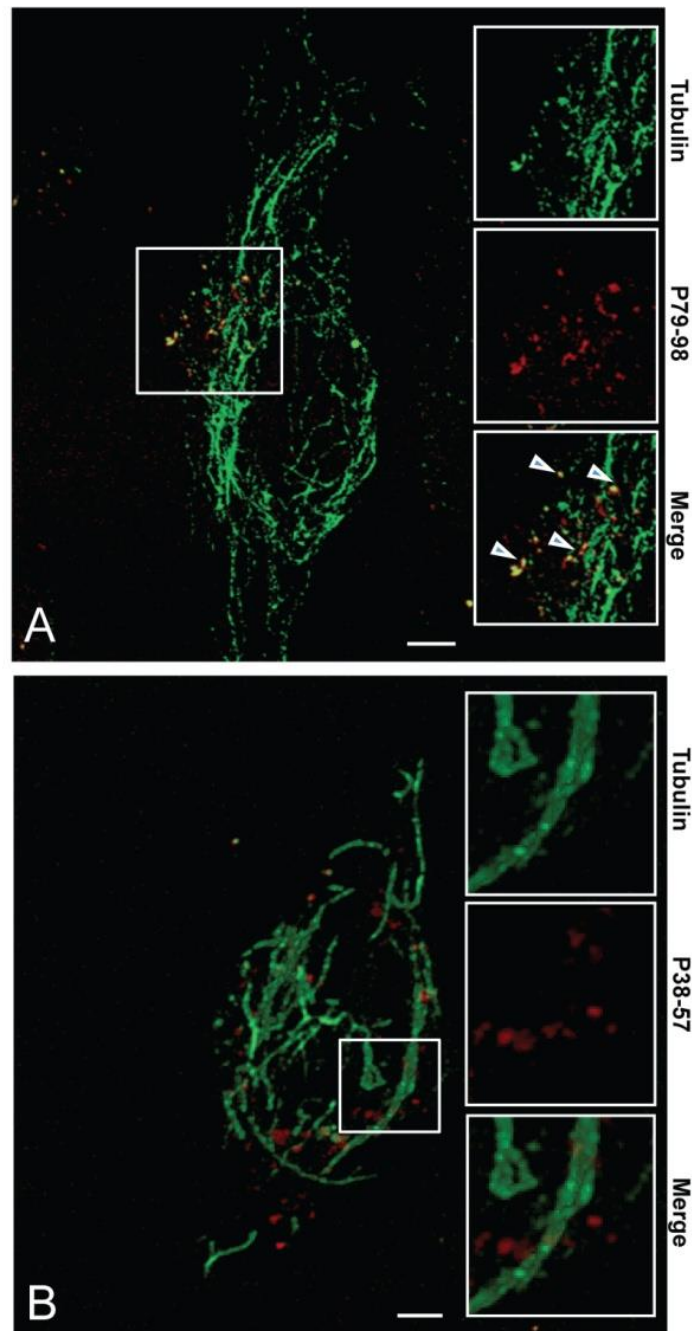


Fig. 6: P79-98 peptide binding to microtubules in HeLa cells. HeLa cells stably expressing eGFP- α -tubulin were transfected with plasmids encoding (A) P79-98 or (B) P38-57 fused to td-Tomato. Two days after transfection, cells were permeabilized with digitonin. Cells were fixed and analyzed by confocal microscopy. Scale bar: 5 μ m.

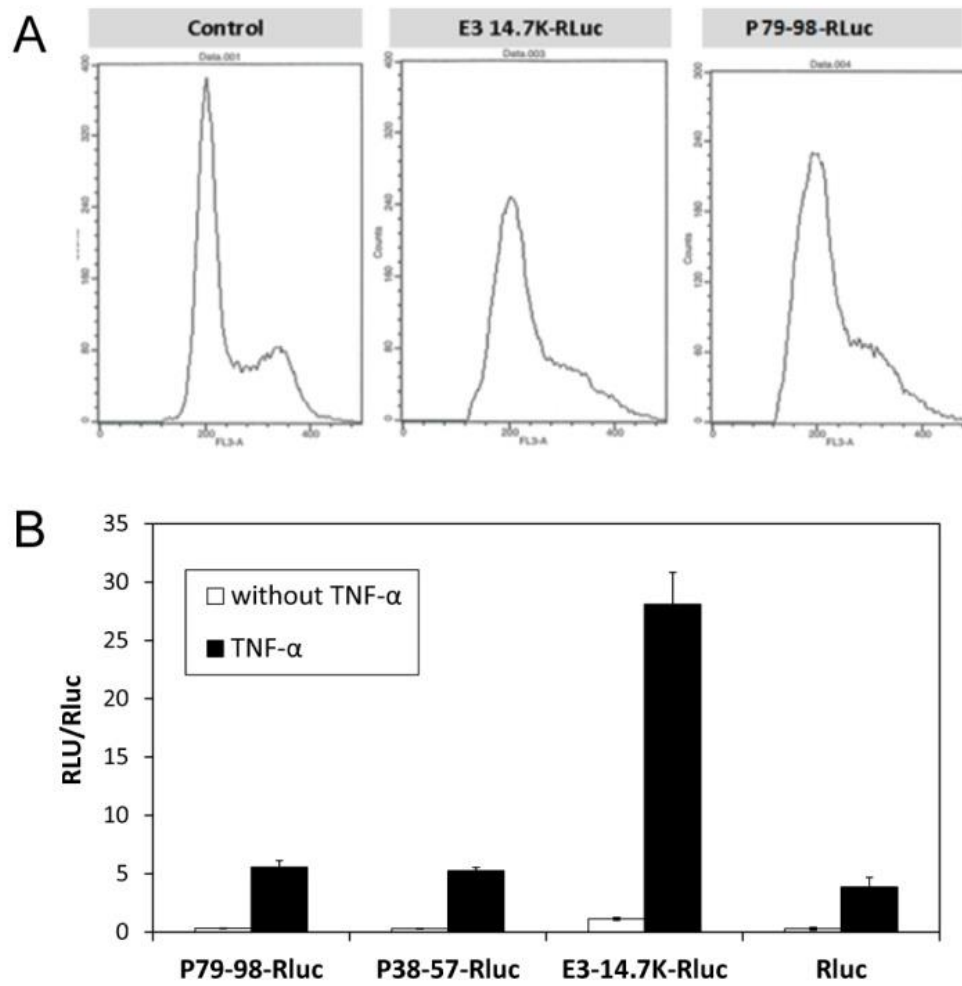


Fig. 7: Biological activity of P79-98 peptide. (A) E3-14.7K and P79-98 peptide arrest the cell cycle. HeLa cells were transfected with plasmid encoding either E3-14.7K or P79-98 peptide fused with *Renilla* luciferase. Two days post-transfection, the cells were stained with propidium iodide and their fluorescence was measured by flow cytometry. The cell cycle was analyzed with ModFit software. (B) **Overexpression of P79-98 peptide has no influence on NF κ B pathway.** HEK 293/NF κ B-luc cells were transfected with plasmid encoding *Renilla* luciferase fused either with E3-14.7K, P38-57 or P79-98. One day later, cells were incubated for 6 h with human TNF- α . Then, the Luciferase (RLU) and *Renilla* luciferase (Rluc) activity were measured and expressed as RLU/Rluc ratio.

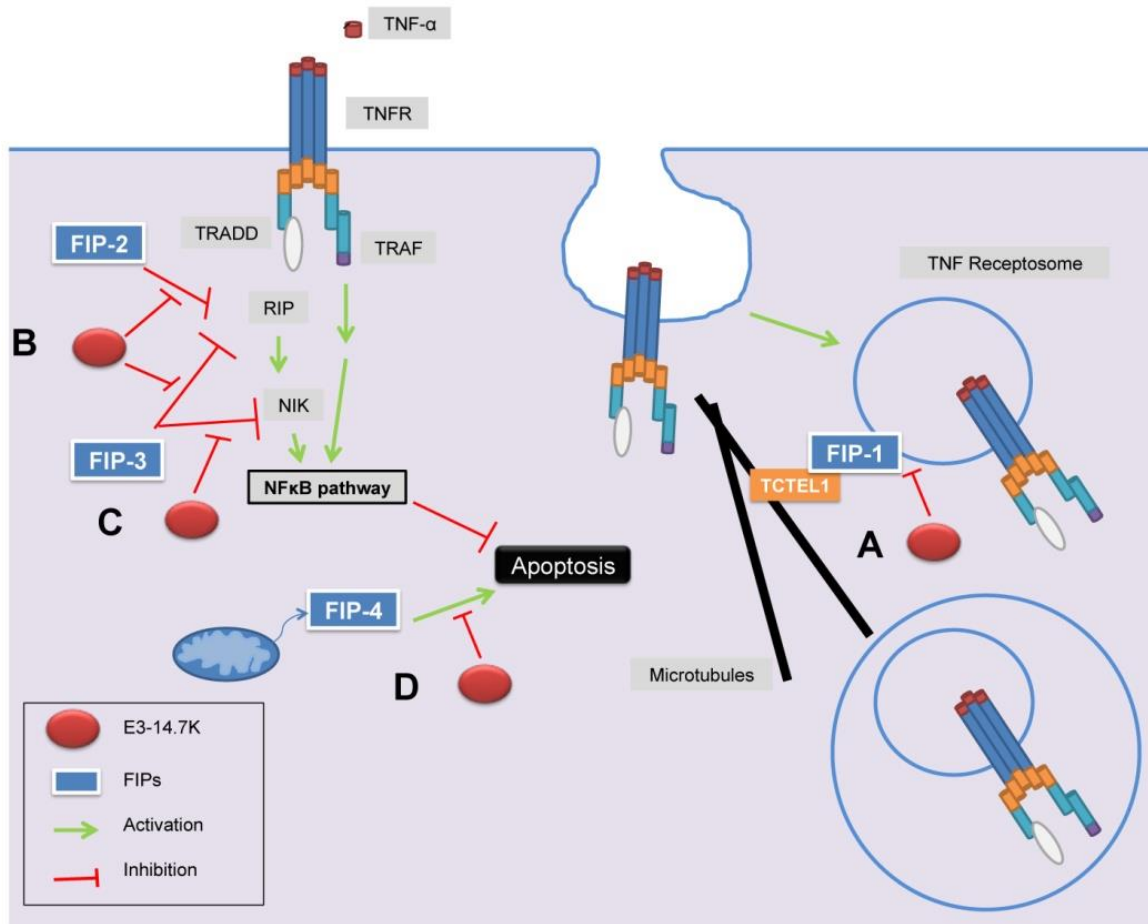
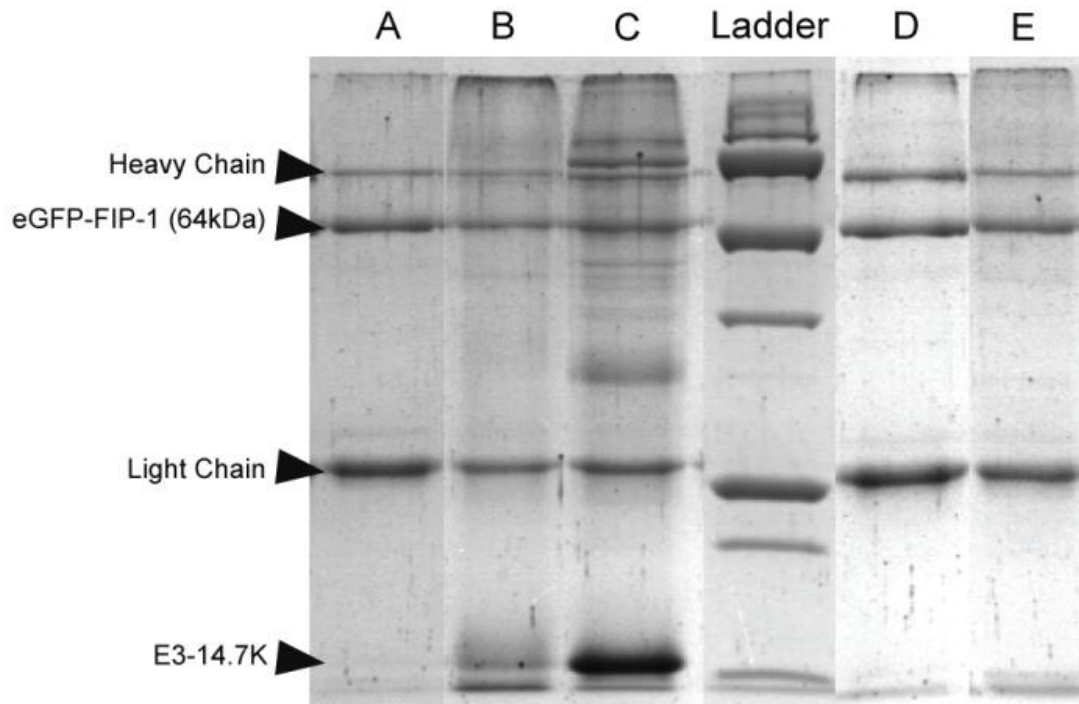
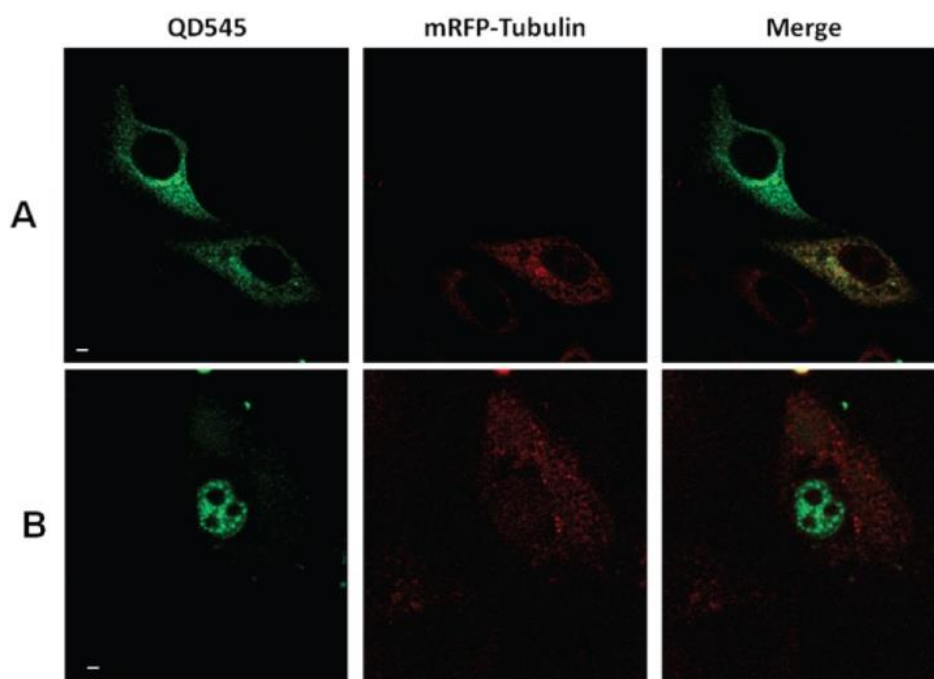


Fig. 8: New schematic model for the function of E3-14.7K with FIPs.

(A) Once the TNF-α bound to the TNF receptor, a complex of adaptor proteins is found. Internalization of this complex results in formation of TNF receptosomes. As other other small GTPases molecules, FIP-1 could be involved in trafficking of this TNF receptosomes. The binding of E3-14.7K to FIP-1 could compete with the binding of FIP-1 to TNF receptosomes vesicles inhibiting their transport along microtubules and their intracellular trafficking. (B and C) E3-14.7K can also inhibits NFκB via its interaction with FIP-2, or NFκB Essential Modulator (NEMO) Related Protein (NRP) and FIP-3 (NEMO or IKKγ). (D) E3-14.7K interacts with FIP-4 or AIF (Apoptosis-Inducing Factor), a mitochondrial protein which translocates into the nucleus in response to apoptotic stimuli.



Supplementary Fig. 1: Interaction between FIP-1 and E3-14.7K. Cytosolic extract of HeLa cells stably expressing eGFP-FIP-1 alone or in presence of recombinant E3-14.7K were pre-cleared with normal mouse IgG for 30min at 4°C prior to immunoprecipitation at 4°C for 16 h with anti-eGFP antibody coupled with agarose beads. Beads were washed and collected by centrifugation. Beads were suspended in denaturing charge buffer, boiled and analyzed in 12% SDS-PAGE gel. **Lane A:** cytosolic extract of HeLa cells stably expressing eGFP-FIP-1; **Lane B:** cytosolic extract of HeLa cells stably expressing eGFP-FIP-1 plus recombinant E3-14.7K; **Lane C:** cytosolic extract of HeLa cells stably expressing eGFP-FIP-1 plus recombinant E3-14.7K incubated with 10mM DSP; **Lane D:** Recombinant FIP-1-eGFP; **Lane E:** Recombinant FIP-1-eGFP plus recombinant E3-14.7K in the presence of 10mM DSP.



Supplementary Fig. 2: P79-98 peptide binding to microtubules in cellulo. HeLa cells transiently expressing mRFP-tubulin were microinjected with either (A) P79-98 linked to Qdot® 545 or (B) Qdot® 545 alone. Images shown are representative confocal microscopy image. Scale bar: 5 μ m.

Résultats

Partie II

Utilisation du peptide P79-98 dans le transfert non viral de gènes

J'ai identifié par la technique de BRET un peptide de 20 acides aminés (P79-98) appartenant à la séquence de la protéine adénovirale E3-14.7K lui permettant d'interagir avec la protéine cytosolique FIP-1. P79-98 interagit de ce fait indirectement avec la dynéine (**Figure 31**). La dynéine est un complexe protéique qui réalise un mouvement rétrograde le long des microtubules, c'est à dire de la périphérie cellulaire jusqu'au noyau. La dynéine est le moteur moléculaire majeur pour le déplacement des organites et autres vésicules (appelés cargos) dans le cytoplasme en direction du noyau de la plupart des cellules eucaryotes. La capacité du peptide P79-98 d'interagir avec la dynéine a été exploitée pour favoriser le trafic intracellulaire d'ADNp dans le cytosol et augmenter la quantité de plasmide à proximité du noyau et ainsi augmenter l'efficacité du transfert non viral de gènes.

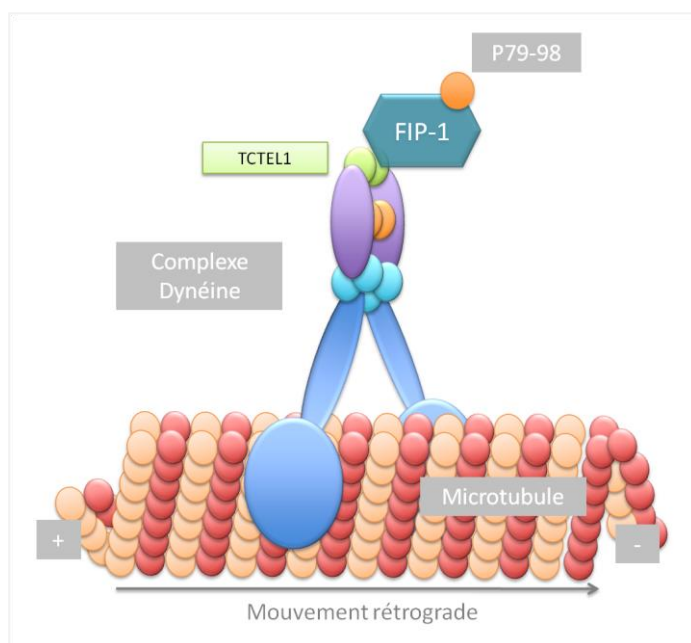


Figure 31 : Schéma d'interaction du peptide P79-98. Le peptide P79-98 issu de la protéine d'Adénovirus E3-14.7K interagit avec FIP-1. Cette interaction le lie au complexe moteur dynéine des microtubules.

I- COUPLAGE PEPTIDE / ADNp

Plusieurs méthodes peuvent être employées pour le couplage de peptides sur l'ADN. Ces méthodes peuvent être directes ou indirectes comme celle basée sur l'utilisation de PNA (Peptide Nucleic Acid) [Dean *et al.*, 2005]. Avant d'envisager ces méthodes qui demandent un investissement important, j'ai choisi de fixer le peptide sur l'ADNp grâce à un pont streptavidine/biotine. Le greffage est réalisé en trois étapes :

- Biotinylation du plasmide.
- Greffage du peptide biotinylé sur la streptavidine.
- Couplage entre le plasmide biotinylé et le peptide conjugué à la streptavidine.

La biotinylation de l'ADN plasmidique en l'utilisant le kit Label IT (Mirus) permet de contrôler la quantité de biotines fixée par copies de plasmides. Comme toutes les méthodes de greffage covalent l'ajout de biotine sur l'ADN est un phénomène aléatoire qui peut intervenir au niveau de séquences indispensables pour la transcription. Le nombre de biotines par copies de plasmide est donc critique pour l'expression génique (**Figure 32**). Ainsi nous avons évalué la quantité minimale de biotine susceptible d'être greffée par molécule de plasmide sans modifier l'expression génique. Les résultats montrent qu'il est possible de greffer une quantité de 16 à 48 biotines sur un plasmide de 9.6 kb soit une biotine toutes les 200 à 600bp sans modifier son expression. Cela laisse une marge suffisamment importante pour un greffage de peptide *via* streptavidine.

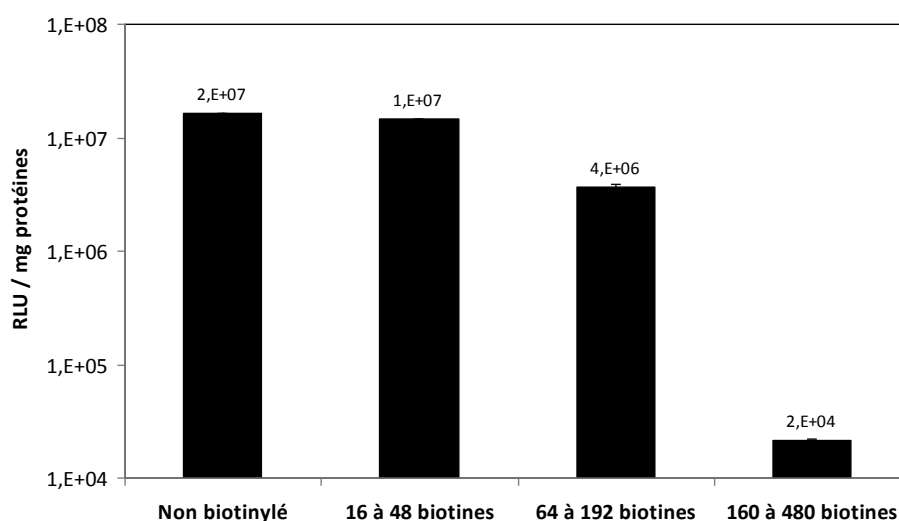


Figure 32 : La biotinylation aléatoire inhibe la transcription plasmidique. Les cellules HeLa sont transfectées avec le plasmide PTG11033 exprimant la luciférase. PTG11033 est biotinylé grâce au kit labelIT (MIRUS) de façon à obtenir 16 à 46, 64 à 192, 160 à 480 biotines par copies de plasmides. 48H après transfection l'activité luciférase est mesurée.

Le choix du nombre de biotines par copies de plasmides est déterminant pour l'exploitation du P79-98 dans le transfert de gènes. En effet le nombre de biotines doit être suffisant pour coupler un nombre de peptides adéquat pour qu'il soit disponible et efficace dans la reconnaissance de ses partenaires cellulaires. Le nombre de sites de couplage ne

doit cependant pas dépasser un certain seuil au-delà duquel la transcription est inhibée (Figure 32).

Sachant que quatre sites de liaison à la biotine sont disponibles par streptavidine dont un est consacré à l'interaction avec le plasmide, chaque site biotine présent sur le plasmide présente donc le potentiel de lier trois peptides. Nous décidons donc de fixer à trois le nombre de biotines par plasmide afin de pouvoir coupler 9 peptides par copie de plasmide.

II- RESULTATS : “Enhancement of polyplexes transfection efficiency by the use of P79-98 peptide from E3-14.7K that promotes a microtubules-mediated transport of plasmid DNA.”

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un manuscrit rédigé en anglais qui est accepté à la publication dans la revue Small. « Enhancement of polyplexes transfection efficiency by the use of P79-98 peptide from E3-14.7K that promotes a microtubules-mediated transport of plasmid DNA ».

Nous avons mis au point une méthode standardisée de greffage de peptides sur l'ADNp grâce à un pont streptavidine-biotine. Des expériences de vidéomicroscopie nous ont permis d'étudier l'influence du peptide P79-98 sur le trafic de l'ADNp au cours du processus de transfection. Les particules d'ADNp couplées au peptide P79-98 montre un transport linéaire de grande amplitude le long des microtubules après transfection avec les polyplexes. Les particules d'ADNp couplées au peptide contrôle P37-58 ont, quant à elles, un mouvement quasi nul. De plus les particules d'ADNp couplées au peptide P79-98 sont capables d'interagir avec les microtubules *in vitro* et *in cellulo*. La présence du peptide P79-98 sur l'ADNp augmente l'efficacité de transfection de polyplexes *in vitro* des cellules HeLa jusqu'à 77%.

Nos travaux montrent pour la première fois que l'efficacité de transfection avec des polyplexes peut être améliorée lorsque l'ADNp est capable de migrer jusqu'au noyau le long des microtubules. Ces résultats représentent une grande avancée dans le domaine du transfert non viral de gènes et participent à l'élaboration de virus artificiels.

An E3-14.7K peptide that promotes microtubules-mediated transport of plasmid DNA increases polyplexes transfection efficiency.

Lucie Pigeon, Cristine Gonçalves, David Gosset, Chantal Pichon and Patrick Midoux.*

*Corresponding author: Patrick.midoux@cnrs-orleans.fr

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Inserm and University of Orléans, 45071 Orléans cedex 02, France.

Supporting Information is available on the WWW under <http://www.small-journal.com> or from the author.

Keywords: DNA nanoparticles; dynein; microtubules; polyethyleneimine; polyplexes; non-viral vectors

Abstract

Chemical vectors as cationic polymers and cationic lipids are promising alternatives to viral vectors for gene therapy. Beside endosome escape and nuclear import, plasmid DNA (pDNA) migration in the cytosol toward the nuclear envelope is also regarded as a limiting step for efficient DNA transfection with non-viral vectors. Here, we have exploited the interaction between E3-14.7K and FIP-1 to favor migration of pDNA along microtubules. E3-14.7K is an early protein of human adenoviruses that interacts via FIP-1 (Fourteen.7K Interacting Protein 1) protein with the light-chain components of the human microtubule motor protein dynein (TCTEL₁). In a previous work, we identified the P79-98 peptide responsible of the E3-14.7K/FIP-1 interaction. In the present work, we conjugated this peptide with pDNA and we demonstrated that it mediates interaction of pDNA *in vitro* with isolated microtubules as well as with microtubules *in cellulo*. Videomicroscopy and tracking treatment of images clearly demonstrate that P79-98/pDNA conjugate exhibits a linear transport with large amplitude of along microtubules upon 2 h transfection with polyplexes whereas control pDNA conjugate exhibits small non-directional movements in the cytoplasm. Remarkably, P79-98/peGFP polyplexes enhance by a factor 2.5 - up to 76% - the number of transfected cells. Our results demonstrate for the first time that the transfection efficiency of polyplexes can be drastically increased when the microtubules migration of pDNA is facilitated by a peptide allowing pDNA docking to TCTEL₁. This is a real breakthrough in the non viral gene delivery field that opens hope to build artificial viruses.

1. Introduction

Gene therapy is a promising strategy to cure genetic and acquired diseases, and several clinical trials have been already reported.^[1-4] These remarkable results were obtained by using viral vectors to introduce transgenes into the cells. However, the transgene size that can be inserted into the viral genome is limited to 4.5-kb for adeno-associated viruses (AAV), 7-kb for retroviruses and 8-kb for lentiviruses. In the case of the Duchenne Muscular Dystrophy disease, the dystrophin cDNA is indeed as large as 14-kb. This drawback is circumvented by insertion of minidystrophin genes into AAV genome for skeletal muscle gene transfer.^[5,6] Although they are weakly efficient yet, electrostatic complexes between plasmid DNA (pDNA) and cationic polymers or cationic lipids would be a non-viral alternative for gene therapy.^[7,8] In this case, the pDNA size is not considered as a limiting factor for the endocytosis and endosomal escape of pDNA complexes because assembly *via* electrostatic interactions with cationic molecules induces large size reduction of pDNA. The nuclear import of pDNA through the nuclear pore that requires an active process might be pDNA size dependent. In contrast, the transport of pDNA in the cytosol drastically depends on its size. Indeed, it has been demonstrated that pDNA as high as 1-kp does not diffuse in the cytosol.^[9] Therefore, it is tempting to suggest that promoting the migration of pDNA in the cytosol could help to increase the number of plasmid copies close to the nuclear envelope before its passage through nuclear pores. This step could be favored by an active migration of pDNA on microtubules. The cytoplasmic transport (diffusion or transport velocities) of pDNA, polyplexes and lipopolyplexes is not yet well described. A microtubules transport toward the perinuclear region of polyplexes made with PEI, PEGylated PEI, EGF-PEI and cationic β -cyclodextrin has been evidenced in COS-7 and

HeLa cells.^[10-13] These studies revealed the presence of active transport periods for polyplexes with linear or curvilinear trajectories in line with that measured for some proteins moving along microtubules. However, it was not sure that those polyplexes were inside or outside endocytic vesicles during these observations. Thus, these results are likely to correspond to transport polyplexes inside endocytic vesicles rather than cytosolic polyplexes along microtubules.

Viruses and certain proteins take advantage of microtubules to reach the perinuclear region. The minus-end directed trafficking on the microtubule network is facilitated by the dynein motor and its associated protein complex. For instance, adenoviruses move along the microtubule network *via* interactions between the viral capsid hexon and the dynein complex.^[14,15] However, the mechanism involving capsid hexon by which the virus binds to the dynein complex remains yet unknown. Therefore, the discovery of proteins or peptides recognized by dynein is very challenging for docking pDNA onto microtubules with the aim to favor its transport toward the nuclear envelope. We have focused our attention on E3-14.7K/FIP-1 interaction.^[16] FIP-1 (Fourteen .7K Interacting Protein 1) is a cytosolic protein that interacts with GIP-1, a GTPase-interacting protein identical with the human homolog of mouse dynein light chain Tctex-1 (TCTEL1), one of the light-chain components of the human microtubule motor protein dynein.^[17] E3-14.7K, one of the adenovirus E3 early proteins that inhibits TNF- α induced apoptosis upon cells infection colocalizes with FIP-1 in the cytoplasm around the nuclear membrane.^[18] We recently demonstrated that E3-14.7K binds to microtubules *in cellulo* thanks to FIP-1 and we also identified a 20 amino acid peptide so called P79-98 containing residues 79 to 98 from the amino acids sequence of E3-14.7K that specifically interacts with FIP-1.^[19]

Here, we demonstrate for the first time that when linked to a plasmid DNA, the peptide P79-98 mediates interaction of pDNA with microtubules *in vitro* and *in cellulo*, and dramatically enhances polyplexes transfection.

2. Results and Discussion

2.1. P79-98 is responsible of E3-14.7K/FIP-1 interaction. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) was used to monitor E3-14.7K/FIP-1 interaction. BRET values showed the presence of a saturation curve when a constant amount of cytosol extract from HeLa cells expressing E3-14.7K fused with *Renilla luciferase* (E3-14.7K-Rluc) was incubated with increasing amounts of recombinant (r-) FIP-1-eGFP (**Figure 1**). We previously reported that when 5 selected overlapping peptides of 20 amino lengths covering residues 31-128 of the C-terminal fragment of E3-14.7K were screened for competition with E3-14.7K/FIP-1 interaction, only peptide P79-98 decreased BRET ratio indicating competition between this peptide and E3-14.7K/FIP-1 interaction^[19] Here, *Renilla luciferase* was fused either with peptide P79-98 (P79-98-Rluc) or the control peptide P38-57 (P38-57-Rluc) in order to know whether P79-98 was able to target a specific interaction of a protein cargo (i.e. RLuc) with FIP-1. As shown in **Figure 1**, BRET values indicated the presence of a saturation curve between FIP-1-eGFP and P79-98-Rluc while no BRET ratio was detected between FIP-1-eGFP and P38-57-Rluc. Thus, P79-98 can promote a specific interaction of a protein cargo with FIP-1. These results prompt us to explore the capacity of P79-98 to increase the cytosolic migration of pDNA thanks to FIP-1 and dynein.

2.2. Peptide/pDNA conjugation. pDNA was coupled with P79-98 or P38-57 via a streptavidin (STR) bridge (**Figure 2A**). First, 3 biotinylated peptide molecules (P79-98-bio or P38-57-bio) were linked *per* STR molecule in order to prevent an eventual

aggregation of biotinylated pDNA molecules (bio-pDNA) when STR contains more than one free biotin site. The number of peptide bound *per* STR was evaluated by SDS-PAGE. **Figure 2B** shows that the amount of free STR decreased when the amount of P79-98-bio increased for a constant STR quantity (**Figure 2Bb**) while that of P79-98-bio/STR conjugate increased (**Figure 2Ba**). Of note, samples were heat at 95°C to discriminate free STR from STR loaded with peptide-bio. Indeed, this treatment dissociates only unconjugated STR in 4 streptavidin monomers of 14 kDa (**Figure 2Bb**) while STR loaded with peptide-bio is not dissociated and migrates closely to 65 kDa (**Figure 2Ba**). When 3.5 P79-98-bio equivalents were mixed with STR, 3 P79-98-bio were estimated to be linked *per* STR molecule and one free biotin site remained available to bind to bio-pDNA. Only 3 biotin residues were linked to pDNA in order to preserve high gene expression and to bind few P79-98 peptides *per* pDNA molecules. Then, P79-98 conjugation with pDNA was achieved by mixing 6 P79-98-bio/STR molecules with one bio-pDNA molecule. SDS-PAGE indicated that ~ 90% of bio-pDNA was linked to P79-98-bio/STR leading to the formation of P79-98-bio/STR/bio-pDNA (P79-98/pDNA) conjugate which did not migrate compared to P79-98-bio/STR that migrated at 66 kDa molecular weight (**Figure 2C**).

2.3. P79-98/pDNA moves on microtubules. First, the binding of P79-98/pDNA to microtubules was assessed using *in vitro* polymerized microtubules. **Figure 3A** shows a clear interaction between P79-98/Cy5-pDNA and X-rhodamine microtubules. No interaction was detected with Cy5-bio-pDNA (**Figure 3B**). Next, we sought to determine the intracellular interaction between P79-98/Cy3-pDNA and microtubules by transfecting GFP-tubulin HeLa cells with P79-98/Cy3-pDNA/His-IPEI polyplexes. Confocal microscopy images show co-localisations between P79-98/Cy3-pDNA and

green microtubules upon 5 h transfection (**Figure 4A**). Moreover, P79-98/Cy3-pDNA is aligned with microtubules. In contrast, when the transfection was performed with Cy3-labeled STR-bio-pDNA without P79-98, pDNA did not colocalize and was not aligned with microtubules although red spots were close to microtubules (**Figure 4B**). These observations strengthen the binding P79-98/pDNA on microtubules *in cellulo* thanks to P79-98. Videomicroscopy experiments were conducted to evidence a microtubules-mediated P79-98/pDNA transport in GFP-tubulin HeLa transfected with P79-98/Cy3-pDNA/His-IPEI polyplexes. When intracellular movements of pDNA were monitored over 30 min after 2 h transfection, some fluorescent pDNA spots moving along microtubules were observed (Video S1 and S2). Comparatively, only small amplitude and unidirectional movements were observed in cells transfected with the control P38-57/pDNA (Video S3). Tracking treatment of these images evidenced a clear linear transport of some P79-98/pDNA with large amplitude along microtubules from periphery toward the nucleus (**Figure 5**). These results demonstrate clearly a transport of some P79-98/pDNA along microtubules. It is noticeable that no movement of P79-98/pDNA was observed before 2 h transfection. This could correspond to the period allowing endosome escape of pDNA upon polyplexes endocytosis. Upon 4 h transfection, a large amount of P79-98/pDNA was accumulated around the nucleus in contrast to P38-57/pDNA transfection (**Figure S1**). These results were in line with a microtubules-mediated transport of P79-98/pDNA toward the nucleus. Confocal microscopy and videomicroscopy experiments clearly show that P79-98 promotes microtubules binding of pDNA and its transport toward the nuclear envelope upon polyplexes transfection. These results are more convincing than those previously reported for the migration of polyplexes where observations probably corresponded to

endocytic vesicles containing polyplexes rather than polyplexes outside vesicles.^[10-13] Here, we can claim that P79-98/pDNA was escaped from endosomes, interacted and moved on microtubules because P79-98/pDNA buried inside endosomes is not expected to interact with microtubules. P79-98/pDNA remaining inside endosomes exhibited similar movements as P38-57/pDNA that does not interact with microtubules.

2.4. P79-98 increases transfection efficiency. HeLa cells were transfected with His-IPEI polyplexes made with bio-peGFP conjugated either with STR, P38-57-STR, P79-98-STR or P79-98(SS)-STR. The number of eGFP transfected cells was measured by flow cytometry 48h after the transfection. First, same pDNA conjugates were prepared with pDNA encoding luciferase in order to verify that pDNA substituted with 3 biotin molecules and then coupled to either with STR or peptide-bio-STR were as efficient as the unmodified pDNA to express luciferase. Gene expression of pDNA conjugates was assessed by *in vitro* translation and transcription assay. Compared to pGEM4Z-Luc, the luciferase activity was reduced at most 5% when the pGEM4Z-Luc was coupled with biotin, STR or peptide-STR meaning that all these pDNA formulations have the same capacity to express the transgene (**Figure 6**). As shown in **Figure 7**, the transfection efficiency of HeLa cells was increased when P79-98 was linked to pDNA. Indeed, 60% of the cells expressed eGFP when transfection was performed with P79-98/peGFP whereas 38% were transfected with P38-57/peGFP. The latter percentage was close to that obtained with peGFP without P38-57 (30%) (i.e. STR-bio-peGFP). These results demonstrated the specific involvement of P79-98 in the enhancement of the transfection efficiency with P79-98/peGFP. More remarkably, 76% of the cells were transfected when P79-98 was linked to pDNA *via* a disulfide bridge (P79-98(SS)-STR)

between the peptide and biotin linked to STR. This enhancement can result from the release of pDNA from microtubules upon cleavage of the disulfide bridge making pDNA available for its nuclear import. It should be stressed that this cleavage can also occur as soon as endosome escape and delivery of P79-98(SS)/pDNA in the cytosol. If so pDNA cannot bind microtubules anymore. The enhancement of the transfection efficiency suggests that once in the cytosol, the binding of P79-98(SS)/pDNA on microtubules and its migration toward the nuclear envelope are likely faster than the kinetic of the disulfide bridge reduction in the cytosol. The disulfide cleavage occurring when P79-98(SS)/pDNA is close to the nuclear envelope. This is a remarkable result because the enhancement of the transfection efficiency leads to an increase of the number of transfected cells. In other words, the presence of P79-98 on the plasmid promoting pDNA accumulation near the nuclear membrane thanks to a microtubule transport is a benefit for its nuclear import in a larger number of cells.

P79-98 does not interact directly with dynein but with FIP-1, a cytosolic protein identified to interact with TCTEL1.^[17] Dynein comprises two light chains, LC8 and TCTEL1, which interact with the IC74 intermediate light chains of dynein. The strategy we employed here contrasts with those using Dynein Light Chain Associated Sequences (DLC8-AS) of LC8 which have led to modest improvements of the transfection efficiency.^[20] DLC8-AS are highly conserved protein sequences of IC74 that interact with LC8. DLC8-AS are particularly well described and contain either KXTQTX or XG (I / V) QVD motifs. For example, the DKSTQT sequence of the rabic phosphoprotein (RPP) provides interaction with dynein and increases the NLS-mediated nuclear accumulation of RPP which is dependent on microtubules integrity and interaction with dynein.^[21] Unfortunately, only 12% of the intracellular LC8 is

integrated within the cytosolic dynein motor complex ^[22] and structural studies showed that dynein sites interacting with DLC8-AS are naturally occupied by IC74 intermediate chains.^[23] Therefore, a DLC8-AS exogenous peptide is unlikely to meet its target due to strong competition with IC74. For instance, the PRMLHRSTQTTNC peptide of the BS69 adenoviral protein containing the STQT motif did not improve the transfection efficiency of polyplexes when the peptide was whether grafted on pDNA or on the cationic polymer.^[24] In addition, this peptide has the ability to better interact with free LC8 in the cytoplasm than with LC8 within the motor complex.^[20] In another study, transgene expression was slightly improved when the CKSSQDKSTQTTGDC peptide - containing also STQT motif - was linked to preformed polyplexes.^[25] Thus, DLC8-AS peptides do not seem to be good candidates for interaction of pDNA with dynein. In contrast, FIP-1 binds to TCTEL₁ and several lines of evidence indicate that sequences targeting TCTEL₁ guarantee a better specificity to promote interaction of pDNA with dynein. First, TCTEL₁ dimers interact with IC74 and cargo by two different mechanisms within the dynein complex that are not in competition in contrast to LC8.^[26] Next, TCTEL₁ is almost exclusively found within the dynein complex.^[27] Here, the interaction of P79-98/pDNA with TCTEL₁ thanks to FIP-1 increases the transfection efficiency probably by decreasing the risk of competition for the binding of P79-98/pDNA on the dynein motor complex. The use of FIP-1 as a shuttle to bind onto microtubules is very powerful. Indeed, a sequence of the C-terminal part of the L2 protein of the capsid of human papillomavirus interacting directly with TCTEL₁ had shown no positive effect on the transfection efficiency when grafted onto pDNA or vector.^[28, 29]

Here, P79-98 was linked to pDNA, a strategy similar to that we have used to increase the nuclear import of pDNA by inserting NFκB motifs in the pDNA sequence.^[30, 31] P79-98 could be linked to the cationic polymer but if pDNA is dissociated from its vector upon internalization, it could never interact with FIP-1 and of course with microtubules. P79-98 was linked to pDNA *via* a streptavidin bridge but other strategies are in progress to link P79-98 with pDNA without streptavidin.

3. Conclusions

In our research, we have investigated the capacity of the peptide P79-98 containing residues 79 to 98 from the amino acids sequence of E3-14.7K to mediate migration of pDNA along microtubules. We demonstrated that this peptide fused to *Renilla luciferase* allows a specific interaction with FIP-1 *in cellulo*. We also demonstrated that P79-98 linked to pDNA, allows the binding of pDNA on isolated microtubules. Confocal microscopy and videomicroscopy experiments clearly showed that P79-98 promotes microtubules binding of pDNA and its transport toward the nuclear envelope upon polyplexes transfection. Finally, we found for the first time that the number of transfected cells with P79-98-pDNA polyplexes is dramatically improved presumably thanks to this specific molecular signal enabling binding to microtubules and migration toward the nuclear envelope. Our result is a real breakthrough in the non-viral gene delivery field that opens the way to build artificial viruses integrating several molecular signals for endosome escape, cytosol migration and nuclear import, helping pDNA to reach the nucleus.

4. Experimental Section

4.1. Chemical compounds. Unless otherwise stated, chemical products were purchased from Sigma-Aldrich. P38-57 (VNLHQCKRGIFCLVKQAKVT), P79-98

(VVMVGEKPITITQHSVETEG), bio-P38-57 (VNLHQCKRGIFCLVKQAKVT-Ttds-biotin), bio-P79-98 (VVMVGEKPITITQHSVETEG-Ttds-biotin) and bio-SS-P79-98 (VVMVGEKPITITQHSVETEG-Ttds-K(SS)biotin) were synthesized by JPT Innovative Peptide Solutions (GmbH, Berlin, Germany). Ttds was a (N-(3-{2-[2-(3-amino-propoxy)-ethoxy]-ethoxy}-propyl)-succinamic acid linker and biotin was linked to the Ttds carboxylic group. Linear polyethylenimine modified with 16% histidine residues (His-IPEI) (kindly given by Prof H. Cheradame, LAMBE, Evry, France) was synthesized as described.^[32]

4.2. Plasmids. pLuc (pTG11033, 9514 bp, Transgene S.A., Strasbourg, France) and pEGFP (5130 bp) encoded the *firefly luciferase* (Luc) and the *Yellow Fish enhanced Green Fluorescent Protein* genes under the control of the CMV promoter, respectively. pGEM-4Z-Luc encoded the firefly Luciferase gene under the T7 RNA polymerase promoter of λ -bacteriophage. pP38-57-RLuc and pP79-98-RLuc were pDNA encoding P38-57 and P79-98 fused with *Renilla luciferase* (RLuc). E3-14.7K cDNA (NCBI Reference Sequence: AP_000224.1) without stop codon synthesized by Genscript (Piscataway, NJ) was fused with RLuc in pRLuc-N1 under the control of the CMV promoter (Perkin Elmer, Waltham, MA). Single strand sense (s) and antisense (as) oligonucleotides coding for P38-57 and P79-98 were synthesized by Eurogentec (Anger, France):

sP38-57:

atgggcgaattcATGGTTAACTTGCACCAGTGCAAAAGGGGTATCTTTTGTCTGGTAAGCA
GGCCAAAGTCACCTtgatccatgggc; asP38-57: gcccatggatccaaGGTGACTTTGGCCTGCT
TTACCAGACAAAAGATACCCCTTTTGCACCTGGTGCAAGTTAACCATgaattcgcccat;

sP79-98: atgggcgaattcATGGTGGTCATGGTGGGAGAAAAGCCCATTACCATAACTCAG
CACTCGGTAGAAACCGAAGGCTtgatccatgggc; asP79-98: gcccatggatccaaGCCTTCGGT

TTCTACCGAGTGCTGAGTTATGGTAATGGGCTTTTCTCCCACCATGACCACCATgaattcgcccat. Oligonucleotides were annealed for 10 min at 95°C in 10mM Tris-HCl, 0.1M NaCl and 1mM EDTA, pH 7.5. Double stranded oligonucleotides were digested by EcoRI and BamHI and cloned in fusion with RLuc in pRLuc-N1. pFIP-1-eGFP was a homemade pDNA constructed from pcDNA-T7-FIP-1 (kindly given by Prof M. S. Horwitz, Albert Einstein College of Medicine of New York).^[17] pGFP-N3 from Clontech (Mountain View, CA) encoded eGFP under the CMV promoter. Supercoiled DNA was isolated from *E. Coli* DH5 α super competent bacteria by alkali lysis and purification with QIAGEN Mega Kit Endotoxin free Plasmid. pTG11033 was labeled with cyanine 3 (Cy3) or cyanine 5 (Cy5) using the respective Label IT nucleic acid labeling kit (MIRUS, Madison, WI) at 1:3 reagent/pDNA weight ratio. pDNA was linked with biotin using the Label-IT kit (MIRUS). The labeling density was estimated between one to three biotin molecules *per* pDNA copy.

4.3. Cells. HeLa cells (CCL2, ATCC, Rockville, MD) were routinely grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids and 100 U/mL penicillin and 50 U/mL streptomycin. The HeLa cells line stably expressing GFP-tubulin was prepared by transfecting 2.10⁶ HeLa cells with 20 μ g of pGFP-tubulin (Clontech) complexed with His-IPEI and stably transfected cells were selected with G418 (800 μ g/mL). A GFP clone was isolated with a cell sorter (FACSVantage, Becton Dickinson), and cultured in the presence of 400 μ g/mL G418.

4.4. Transfection. Polyplexes were prepared by mixing His-IPEI (15 μ g in 15 μ L of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4) to pDNA (2.5 μ g in 32.5 μ L of 10 mM HEPES buffer, pH 7.4). Upon 4 s mixing by vortex, the solution was kept for 30 min at 20°C before use. The

solution was then adjusted to 500 μ L with complete culture medium. Two days prior to transfection, cells were seeded at $5 \cdot 10^4$ cells/well in 500 μ L of culture medium in a 24-well plate. The cells were incubated with polyplexes (500 μ L; 2.5 μ g DNA) for 4 h at 37°C, the medium removed, replaced with complete medium without polyplexes and the cells were cultured at 37°C.

4.5. Laser Scanning Confocal Microscopy. Cells seeded in a 4-well Lab-Tek chambered cover glass were transfected with polyplexes made with fluorescent pDNA. Upon 2 h to 4 h transfection, cells were observed either upon fixation or in real-time by using a Zeiss Axiovert 200M microscope coupled with a Zeiss LSM 510 Meta scanning device (Carl Zeiss Co. Ltd., Jena, Germany). The inverted microscope was equipped with a Plan-Apochromat 63X objective (NA=1.4) and with a temperature controlled stage. Images were recorded with LSM 510 Meta software and analyzed with the ImageJ software.^[33] When indicated, cells were fixed with 4% *p*-formaldehyde. Cover slips were mounted on slides using Vectashield mounting medium.

4.6. Videomicroscopy. Cells were transfected with fluorescent pDNA as described above. Videomicroscopy was performed using a Zeiss Axio OBSERVER Z1 microscope (Carl Zeiss) equipped with a COLIBRI system Lamp allowing fluorescence analysis (4 LED λ ex 365 nm, 470 nm, 555 nm and 625 nm). The inverted microscope was equipped with a Plan NEOFLUAR 40X objective (NA = 0.75) and a temperature controlled stage. pDNA tracking was performed using the Imaris software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland).

4.7. BRET. HeLa cells in 24-well plates were transfected with polyplexes containing 2.5 μ g pDNA (pE3-14.7K-RLuc plus pFIP-1-eGFP or pP38-57-RLuc plus pFIP-1-eGFP or pP79-98-RLuc plus pFIP-1-eGFP). Cells were washed 24 h after transfection, harvested

by trypsin/EDTA treatment and transferred into 96-well white-optiplates containing 200 μ L of complete culture medium. Upon 24 h, cells were washed twice with PBS and 100 μ L Coelenterazine H in PBS (2.5 μ M final concentration) (Invitrogen) was added. BRET was measured after 15 min incubation. Signals were collected using a 450/58 filter (RLuc) and a 480/LP (cutoff at 480 nm) filter (GFP) with the Mithras LB 940 (Berthold Technologies). All experiments were repeated at least 2 times.

4.8. P79-98/pDNA interaction with isolated microtubules. Isolated microtubules were formed using X-rhodamine labeled tubulin extracted from bovine brain (Cytoskeleton Inc., Denver, CO). Microtubules were polymerized and stabilized in G-PEM buffer (80 mM PIPES, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP, 30% (w/v) glycerol and 20 μ M taxol, pH 6.9). Microtubules were incubated with fluorescent pDNA coupled or not with bio-P79-98 in cytosolic extract from HeLa cells supplemented with 10 mM ATP. Cytosolic extracts were prepared as followed: cells were washed with ice-cold PBS, scraped from the dish, suspended in Homogenization Buffer (250 mM sucrose, 3 mM imidazole, 0.1% gelatin, pH 7.4) and lysed in the presence of 1 μ g/mL antipain, 1 μ g/mL pepstatin, 1 μ g/mL leupeptin, 15 μ g/mL benzamidine using a disposable syringe size-22G needle.

4.9. In vitro translation and transcription. Experiments were performed using the TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems Kit (Promega) following the manufacturer instructions. In a 1.5 mL Eppendorf tube, 0.2 μ g of pT7-Luc plasmid (pGEM4Z-Luc) in 2.6 μ L 10 mM Hepes buffer, pH 7.4 free or complexed with vectors at various charge ratios was mixed with 40 μ L of Quick Master Mix and 1 μ L of 1mM Methionine. The solution was adjusted to 50 μ L with H_2O and the mixture was incubated for 1 h and 30 min at 30°C. Then 0.5 μ L of the mixture was added to 50 μ L of

LAR (Luciferase Assay Reagent) and the luciferase activity was measured for 10 s two times with a 2 s interval using a luminometer (LUMAT LB 9507).

Acknowledgements

The French Association “Vaincre la Mucoviscidose” (VLM) and “Association Française contre les Myopathies” (AFM) are gratefully acknowledged for their financial support. LP received a PhD fellowship from VLM. We also acknowledge Dr Corinne Laplace-Builhé and Sophie Salomé-Desnoulez (Photon Imaging and Flow Cytometry, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) for their help in image tracking analysis.

- [1] M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, A. Fischer, *Science* **2000**, 288, 669–672.
- [2] N. Cartier, S. Hacein-Bey-Abina, C. C. Bartholomae, G. Veres, M. Schmidt, I. Kutschera, M. Vidaud, U. Abel, L. Dal-Cortivo, L. Caccavelli, N. Mahlaoui, V. Kiermer, D. Mittelstaedt, C. Bellesme, N. Lahlou, F. Lefrère, S. Blanche, M. Audit, E. Payen, P. Leboulch, B. l’ Homme, P. Bougnères, C. Von Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, P. Aubourg, *Science* **2009**, 326, 818–823.
- [3] M. Cavazzana-Calvo, E. Payen, O. Negre, G. Wang, K. Hehir, F. Fusil, J. Down, M. Denaro, T. Brady, K. Westerman, R. Cavallesco, B. Gillet-Legrand, L. Caccavelli, R. Sgarra, L. Maouche-Chrétien, F. Bernaudin, R. Girot, R. Dorazio, G.-J. Mulder, A. Polack, A. Bank, J. Soulier, J. Larghero, N. Kabbara, B. Dalle, B. Gourmel, G. Socie, S. Chrétien, N. Cartier, P. Aubourg, A. Fischer, K. Cornetta, F. Galacteros, Y. Beuzard, E. Gluckman, F. Bushman, S. Hacein-Bey-Abina, P. Leboulch, *Nature* **2010**, 467, 318–322.

- [4] A. C. Nathwani, E. G. D. Tuddenham, S. Rangarajan, C. Rosales, J. McIntosh, D. C. Linch, P. Chowdary, A. Riddell, A. J. Pie, C. Harrington, J. O'Beirne, K. Smith, J. Pasi, B. Glader, P. Rustagi, C. Y. C. Ng, M. A. Kay, J. Zhou, Y. Spence, C. L. Morton, J. Allay, J. Coleman, S. Sleep, J. M. Cunningham, D. Srivastava, E. Basner-Tschakarjan, F. Mingozzi, K. A. High, J. T. Gray, U. M. Reiss, A. W. Nienhuis, A. M. Davidoff, *N. Engl. J. Med.* **2011**, 365, 2357–2365.
- [5] B. Wang, J. Li, X. Xiao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 13714–13719.
- [6] Y. Zhang, D. Duan, *Hum. Gene Ther.* **2012**, 23, 98–103.
- [7] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 259–302.
- [8] P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, P.-A. Jaffrès, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157, 166–178.
- [9] D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodvich, G. L. Lukacs, *Gene Ther.* **1999**, 6, 482–497.
- [10] J. Suh, D. Wirtz, J. Hanes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 3878–3882.
- [11] R. P. Kulkarni, S. Mishra, S. E. Fraser, M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.* **2005**, 16, 986–994.
- [12] R. P. Kulkarni, K. Castelino, A. Majumdar, S. E. Fraser, *Biophys. J.* **2006**, 90, L42–44.
- [13] K. de Bruin, N. Ruthardt, K. von Gersdorff, R. Bausinger, E. Wagner, M. Ogris, C. Bräuchle, *Mol. Ther.* **2007**, 15, 1297–1305.
- [14] P. L. Leopold, G. Kreitzer, N. Miyazawa, S. Rempel, K. K. Pfister, E. Rodriguez-Boulan, R. G. Crystal, *Hum. Gene Ther.* **2000**, 11, 151–165.
- [15] K. H. Bremner, J. Scherer, J. Yi, M. Vershinin, S. P. Gross, R. B. Vallee, *Cell Host Microbe* **2009**, 6, 523–535.

- [16] M. S. Horwitz, *J Gene Med* **2004**, 6 Suppl 1, S172–183.
- [17] S. A. Lukashok, L. Tarassishin, Y. Li, M. S. Horwitz, *J. Virol.* **2000**, 74, 4705–4709.
- [18] Y. Li, J. Kang, M. S. Horwitz, *J. Virol.* **1997**, 71, 1576–1582.
- [19] L. Pigeon, C. Gonçalves, G. Breuzard, E. Henry, E. Deprez, P. Tauc, J.-P. Gomez, S. Morisset-LopezMorisset-Lopez, P. Midoux, C. Pichon, *J Cell Sci.* **n.d.**
- [20] J. M. Bergen, S. H. Pun, *Mol. Pharm.* **2007**, 4, 119–128.
- [21] G. W. Moseley, D. M. Roth, M. A. DeJesus, D. L. Leyton, R. P. Filmer, C. W. Pouton, D. A. Jans, *Molecular Biology of the Cell* **2007**, 18, 3204–3213.
- [22] S. M. King, E. Barbarese, J. F. Dillman 3rd, R. S. Patel-King, J. H. Carson, K. K. Pfister, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 19358–19366.
- [23] J. Fan, Q. Zhang, H. Tochio, M. Li, M. Zhang, *J. Mol. Biol.* **2001**, 306, 97–108.
- [24] S. A. Kelkar, K. K. Pfister, R. G. Crystal, P. L. Leopold, *J. Virol.* **2004**, 78, 10122–10132.
- [25] K. Tanaka, T. Kanazawa, K. Sugawara, S. Horiuchi, Y. Takashima, H. Okada, *Int J Pharm* **2011**, 419, 231–234.
- [26] H. Wu, M. W. Maciejewski, S. Takebe, S. M. King, *Structure* **2005**, 13, 213–223.
- [27] L. M. DiBella, S. E. Benashski, H. W. Tedford, A. Harrison, R. S. Patel-King, S. M. King, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 14366–14373.
- [28] L. Florin, K. A. Becker, C. Lambert, T. Nowak, C. Sapp, D. Strand, R. E. Streeck, M. Sapp, *J. Virol.* **2006**, 80, 6691–6696.
- [29] E. J. Kwon, J. M. Bergen, I. K. Park, S. H. Pun, *J Control Release* **2008**, 132, 230–235.
- [30] G. Breuzard, M. Tertilt, C. Gonçalves, H. Cheradame, P. Géguan, C. Pichon, P. Midoux, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, e71.

- [31] C. Gonçalves, M.-Y. Ardourel, M. Decoville, G. Breuzard, P. Midoux, B. Hartmann, C. Pichon, *J Gene Med* **2009**, *11*, 401–411.
- [32] E. Bertrand, C. Gonçalves, L. Billiet, J. P. Gomez, C. Pichon, H. Cheradame, P. Midoux, P. Guégan, *Chem. Commun. (Camb.)* **2011**, *47*, 12547–12549.
- [33] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.

Figure 1: P79-98 of E3-14.7K interacts with FIP-1. BRET monitoring macromolecular interactions between FIP1-eGFP and *Renilla* luciferase fused either with (◆) E3-14.7K (E3-14.7K-Rluc), (○) P79-98 (P79-98-Rluc) or (■) P38-57 (P38-57-Rluc). A/D is the acceptor and donor ratio.

Figure 2: Conjugation of P79-98 with plasmid DNA. (A) Scheme of assembly of biotinylated and Cy5-pDNA with P79-98 peptide loaded streptavidin. (B) Conjugation of biotinylated P79-98 to streptavidin (STR). Increasing amounts of bio-P79-98 were mixed with STR for 1 h in PBS at room temperature. SDS-PAGE (12%): samples were heat at 95°C to dissociate unloaded STR in 4 monomers of 14 kDa. (a) STR loaded with peptide-bio (65 kDa); (b) streptavidin monomers (14 kDa). (C) Conjugation of pDNA with P79-98-bio/STR. Six P79-98-bio/STR molecules were mixed *per* bio-pDNA molecule for 1 h in PBS. SDS-PAGE (12%) Lane 1: P79-98-bio/STR/pDNA (P79-98/pDNA) conjugate; lane 2: P79-98-bio/STR conjugate.

Figure 3: Interaction of P79-98/pDNA with isolated microtubules. *In vitro* polymerized X-rhodamine microtubules were incubated with bio-Cy5-pDNA conjugated either with (A) P79-98-STR or (B) STR. Scale bar: 5 µm.

Figure 4: P79-98 allows intracellular interaction of pDNA with microtubules. LSCM images of live HeLa cells stably expressing GFP-tubulin upon transfection for 4

h with His-IPEI polyplexes made with bio-Cy3-pDNA conjugated with (A) P79-98-STR or (B) STR. On the right are zoom of areas in square a, b and c. Scale bar: 5 μ m.

Figure 5: P79-98 allows active movement of pDNA on microtubules. Tracking of bio-Cy3-pDNA conjugated with P79-98-STR in HeLa cells stably expressing GFP-tubulin transfected for 90 min with His-IPEI polyplexes. Time laps acquisitions were performed by videomicroscopy and particles tracking analyzed using Imaris software. Scale bar: 10 μ m.

Figure 6: *In vitro* translation and transcription assays of pT7-Luc (pGEM4Z-Luc) upon substitution with 3 biotin molecules (Bio) and upon association either with streptavidin (STR), P38-57-bio-streptavidin (P38-57-STR), P79-98-bio-streptavidin (P79-98-STR) or P79-98-SS-bio-streptavidin (P79-98(SS)-STR).

Figure 7: P79-98 increases the transfection efficiency of polyplexes. Hela cells were transfected with His-IPEI polyplexes made with bio-peGFP conjugated either with STR, P38-57-STR, P79-98-STR or P79-98(SS)-STR. The number of eGFP transfected cells was measured by flow cytometry 48h after the transfection.

Figure 1

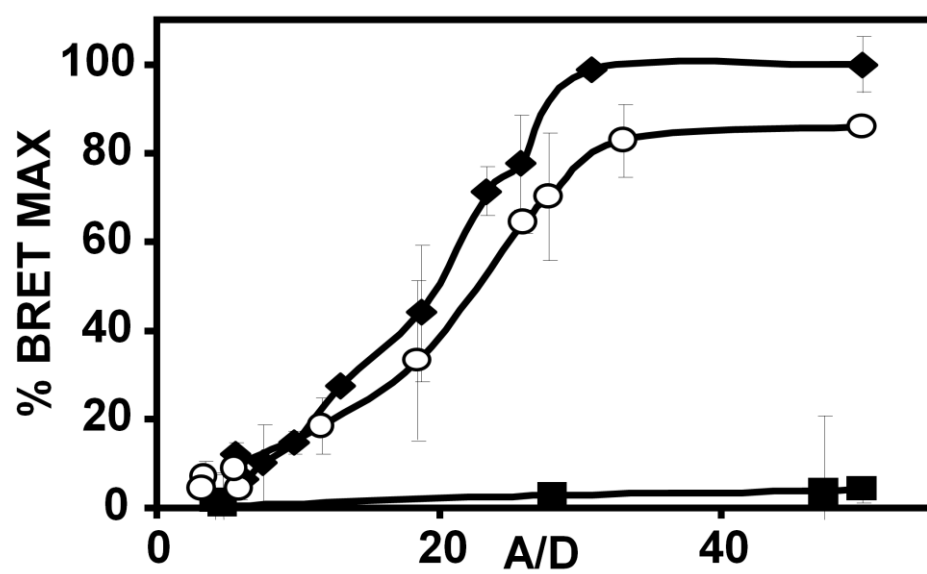


Figure 2

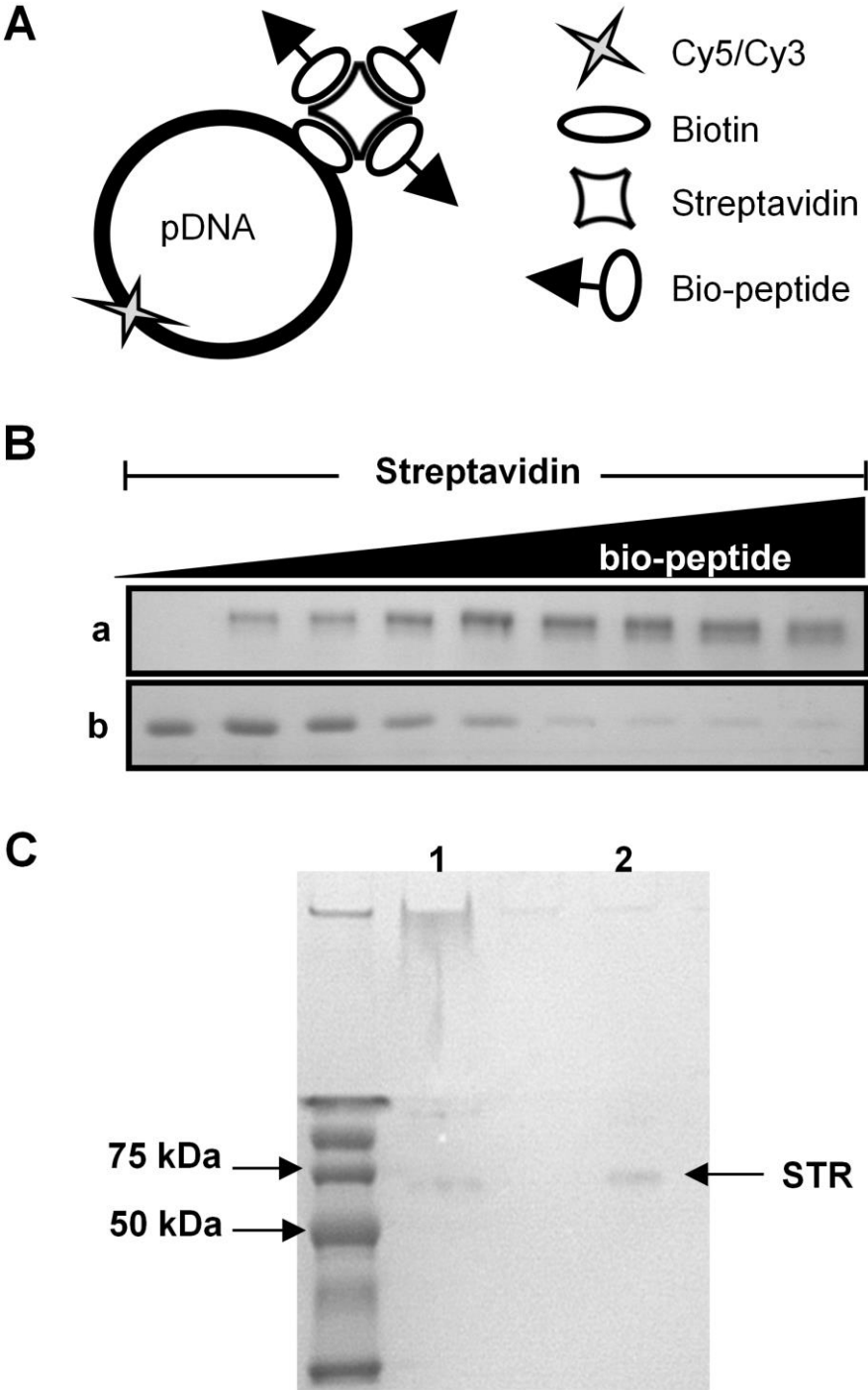


Figure 6

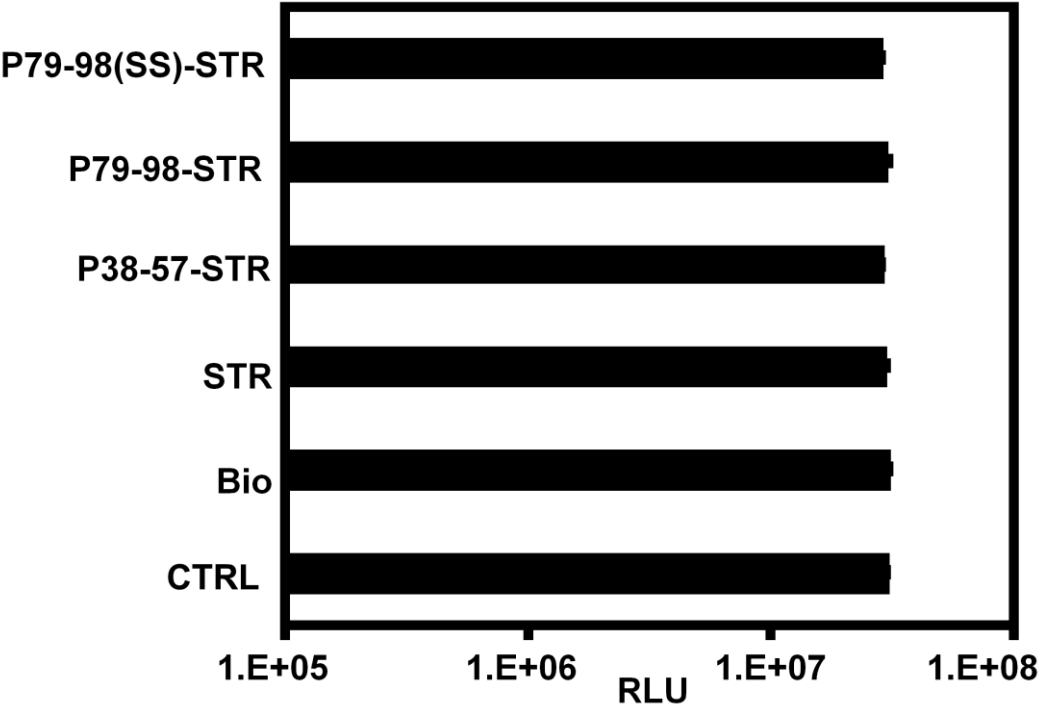
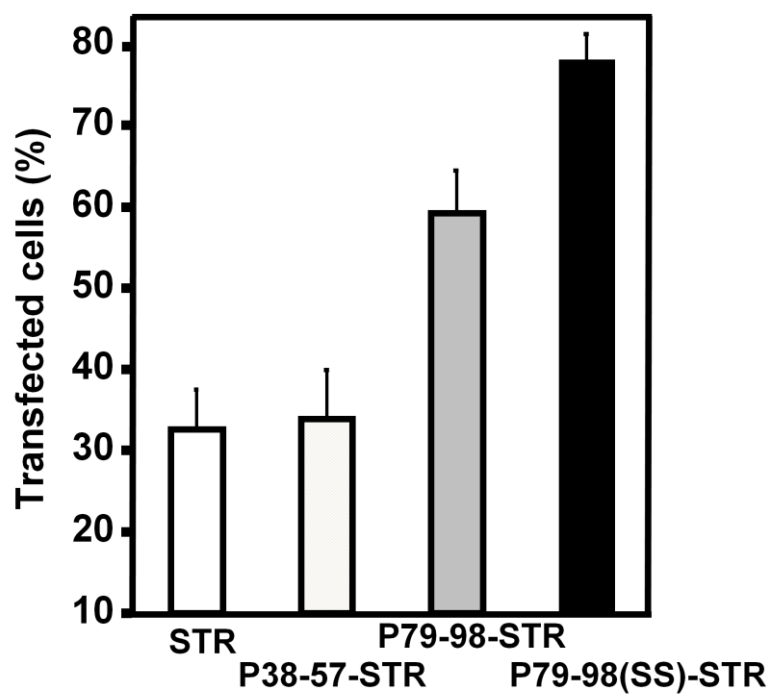
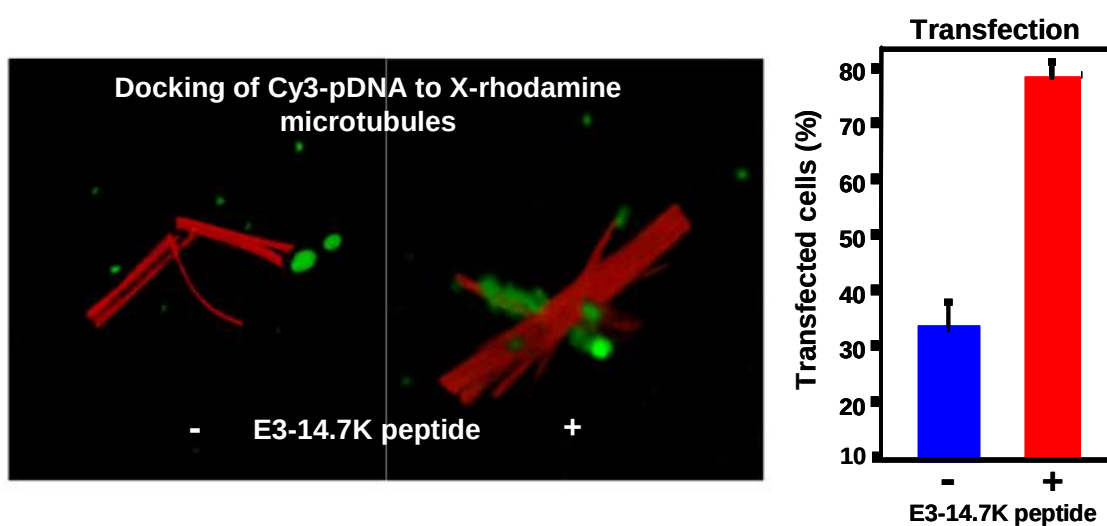


Figure 7



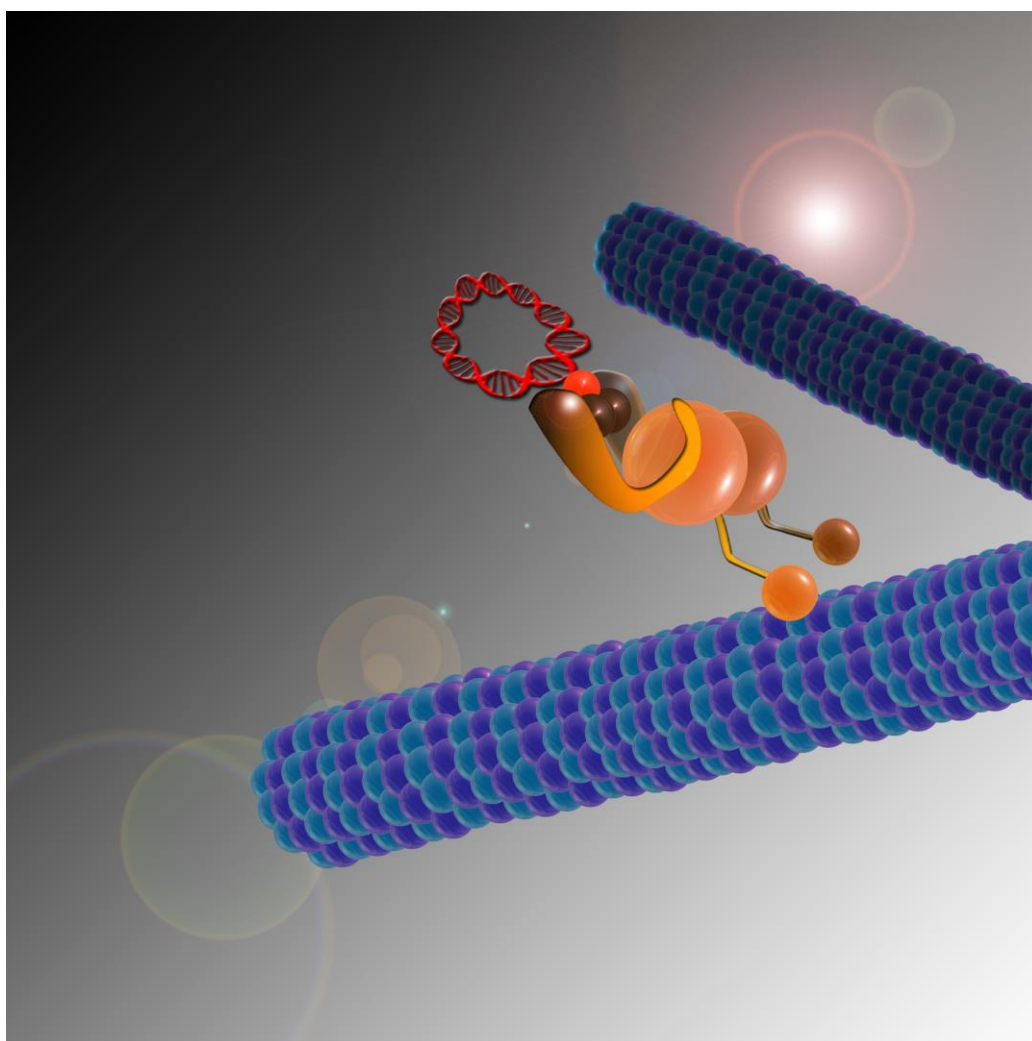
The table of contents entry

P79-98 peptide responsible of the E3-14.7K/FIP-1 interaction with microtubules is linked to a plasmid DNA to favor its cytosolic migration during cell transfection with a cationic polymer. P79-98 allows docking and transport of DNA along microtubules. P79-98/peGFP polyplexes enhance drastically the number of transfected cells. This is a real breakthrough in the non viral gene delivery field.



Cover proposition

A breakthrough in the field of gene transfer by non viral vectors is described on page -- by L. Pigeon and co-workers. For the first time, it is shown that improved cytosolic migration of plasmid DNA along microtubule greatly enhances the transfection efficiency. The proposed design consists of a plasmid DNA conjugated with a peptide (P79-98) from adenoviral early protein E3-14.7K. This peptide mediates plasmid DNA binding on microtubules via FIP-1 and the TCTEL₁ light chain of dynein. Large amplitude linear transport of the plasmid DNA along microtubules toward the nuclear envelop is evidenced by video-microscopy experiments. This facilitating microtubule transport improves remarkably the number of cells expressing transgene. Cover illustration by Benjamin Laurent.



Conclusion

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse se divisent en deux parties :

- Tout d'abord une étude des interactions *in cellulo* entre les protéines E3-14.7K, FIP-1, TCTEL1 et les microtubules.
- Ensuite une exploitation des connaissances obtenues pour l'amélioration du trafic cytosolique d'ADNp dans le cadre du transfert non viral de gènes.

I- ETUDE DES INTERACTIONS E3-14.7K / FIP-1 ET LES MICROTUBULES

Nous avons étudié les interactions *in cellulo* entre la protéine anti-apoptotique E3-14.7K d'Adénovirus, la protéine cytosolique FIP-1, la chaîne légère de la dynéine TCTEL1 et les microtubules. Ces études d'interaction nous ont permis d'identifier un peptide d'E3-14.7K de 20 acides aminés, nommé P79-98, responsable de son interaction directe avec la protéine cytosolique FIP-1. Par cette interaction directe, le peptide P79-98 seul est capable d'interagir avec les microtubules *in vitro* et *in cellulo* par l'intermédiaire de la chaîne légère de la dynéine. De façon intéressante, P79-98 provoque une perturbation du cycle cellulaire avec une perte des cellules en G2/M au profit des cellules en phase S. Cette nouvelle propriété permet d'attribuer une spécificité au peptide P79-98 d'E3-14.7K dans son interaction avec FIP-1, protéine impliquée dans le transport de macromolécules au noyau et dans le contrôle du cycle cellulaire.

En s'intéressant au rôle de FIP-1 dans le trafic de macromolécules, nous proposons un mécanisme nouveau permettant de relier l'interaction d'E3-14.7K et FIP-1 dans le rôle anti-apoptotique d'E3-14.7K (Figure 31). Par son interaction avec FIP-1, le peptide P79-98 bloquerait l'internalisation des récepteurs TNF- α (TNFR) au sein des vésicules clathrine appelées TNF réceptosomes qui nécessiteraient un transport exploitant les microtubules au cours de leur trafic intracellulaire pour permettre l'activation de l'apoptose. Ce nouveau mécanisme place l'interaction entre E3-14.7K et FIP-1 dans la stratégie mise en œuvre par l'Adénovirus pour contrecarrer l'apoptose des cellules infectées. Ainsi, en interagissant avec ses partenaires intracellulaires (FIPs), E3-14.7K agirait comme un leurre (Decoy) protéique permettant d'inhiber l'apoptose (figure 31).

Cependant, cette hypothèse doit être validée en vérifiant l'intervention de FIP1-dans ce trafic intracellulaire des TNF receptosomes, non décrit jusqu'à présent. Pour cela, nous envisageons :

-de mettre en évidence la localisation de FIP-1 au niveau des vésicules recouvertes de clathrine, des endosomes précoces ou simplement les TNF réceptosomes pour répondre à la question suivante : l'intervention de FIP-1 en tant que petites GTPases est elle spécifique des TNF réceptosomes ou des vésicules à clathrine en général ?

-quel est l'effet de l'interaction de E3 14.7K avec FIP-1 sur cette supposée intervention de FIP-1 dans le trafic des TNF receptosomes;

-une évaluation de l'effet de la déstabilisation des microtubules sur l'induction de l'apoptose par TNF-a

Si cette hypothèse est vérifiée, le P79_98 ou des analogues pourrait être proposé comme un agent permettant de lutter contre les infections par les adénovirus.

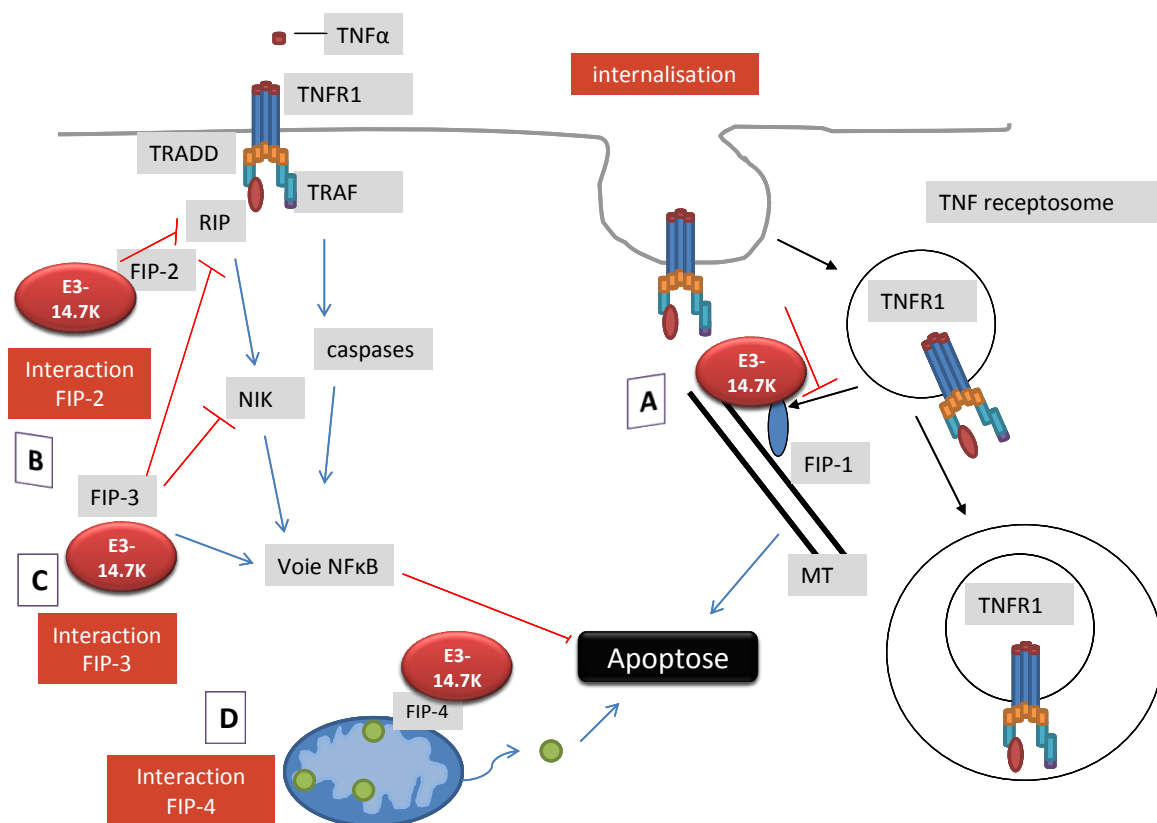


Figure 31 : Nouveau schéma d'interaction de E3-14.7K avec ses partenaires intracellulaires (FIPs) en incluant l'implication d'E3-14.7K sur l'inhibition de l'internalisation du TNFR. (A) E3-14.7K bloque l'internalisation du récepteur TNFα via FIP-1 (B) E3-14.7K active la voie NFκB protectrice de l'apoptose par son interaction avec FIP-3 (ou NEMO), (C) FIP-2 et (D) E3-14.7K interagit avec FIP-4 (aussi appelé AIF)

Outre son grand intérêt pour cibler les microtubules et induire un transport rétrograde vers le noyau de molécules cargo incluant des ADN plasmidiques, le peptide P79-98 d'E3-14.7K présente la particularité intéressante de perturber le cycle cellulaire en inhibant le passage des cellules de la phase S à G₂/M. Sachant que FIP-1 est impliqué dans la réorganisation du cytosquelette lors de la division cellulaire, le

peptide P79-98 pourrait être une molécule intéressante pour développer de nouveaux agents capables d'inhiber la croissance tumorale. Une étude mécanistique serait mener pour mieux définir cette hypothèse.

II- UTILISATION DU PEPTIDE P79-98 DANS LE TRANSFERT DE GENES

Après avoir identifié le peptide P79-98, nous avons mis au point une méthode standardisée de greffage ce peptide sur l'ADNp grâce à un pont streptavidine-biotine. Après couplage avec le peptide P79-98, les particules d'ADNp sont capables d'interagir avec les microtubules *in vitro* et *in cellulo*. Des expériences de vidéomicroscopie, nous ont permis d'étudier l'influence du peptide P79-98 sur le trafic de l'ADNp au cours du processus de transfection. Les particules d'ADNp couplées au peptide P79-98 montre un transport linéaire de grande amplitude le long des microtubules après transfection des cellules avec les polyplexes. De façon remarquable, le couplage du peptide P79-98 sur l'ADNp augmente drastiquement, jusqu'à 77%, l'efficacité transfection des cellules HeLa par des polyplexes. Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour l'élaboration de virus artificiels.

Une recherche de la taille minimale efficace de ce peptide de 20 acides aminés sera effectuée afin de réduire la taille de celui-ci. Un peptide plus court pourrait également prévenir une éventuelle immunogénicité.

L'amélioration du trafic cytosolique d'ADNp grâce à son couplage avec le peptide P79-98 apparaît très prometteuse pour le transfert de gènes. Ces résultats représentent une très grande avancée dans le domaine du transfert non viral de gènes et nous incitent à poursuivre le développement de cette stratégie. Pour cela plusieurs voies de développement peuvent être envisagées.

Optimisation de la méthode de couplage ADNp/peptide

Dans un premier temps, il sera nécessaire de changer la méthode de greffage entre l'ADNp et le peptide P79-98. En effet, la streptavidine n'est pas utilisable en thérapie humaine. Pour cela, il est envisagé d'utiliser le plasmide Genegrip (Gene Therapy Systems), qui présente un site GeneGrip composé de huit séquences oligopurine et oligopyrimidine répétées en tandem sur lesquelles pourront se fixer des bis-PNA couplés au peptide P79-98 après formation de triple-hélices (Figure 32) [Zelphati *et al.*, 1999]. Les PNA (pour Peptide Nucleic Acids) sont des analogues peptidiques d'oligonucléotides [Nielsen *et al.* 1991]. L'avantage de cette stratégie est que le greffage peptidique ne sera plus aléatoire et se fera uniquement au niveau de cette séquence placée à distance des séquences indispensables à la transcription.

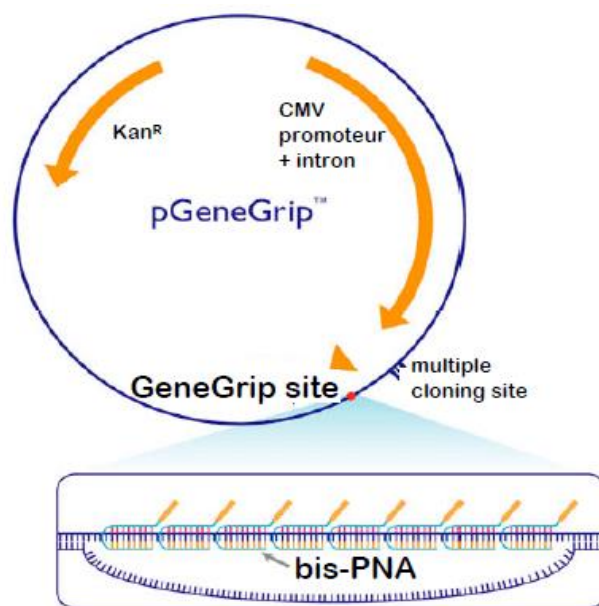


Figure 32 : Plasmide pGeneGripTM. Le plasmide Genegrip contient un site constitué de séquences oligopurine et oligopyrimidine de 8bp répétées en tandem, chacune est capable de lier un bis-PNA couplé à un peptide. (d'après GeneTherapy Systems).

Synergie avec signal d'importation nucléaire 3NF

Il est envisagé de combiner le signal de transport cytosolique P79-98 avec le signal 3NF d'importation nucléaire d'ADNp développé au laboratoire [Gonçalves *et al.*, 2009]. Il a en effet été montré que l'utilisation de deux séquences 3NF contenant des motifs κB encadrant la cassette d'expression permet l'interaction avec le facteur de transcription NF κB dans le cytosol. Ceci favorise l'importation nucléaire du plasmide par un mécanisme faisant intervenir des importines pour le passage au travers du pore nucléaire (Généralités – Chapitre I- III.5). Comme il est montré dans la figure 33, l'insertion de deux séquences 3NF dans d'un plasmide (3NF-CMV-Luc3NF) induit une augmentation de plus de 80 fois de l'expression du transgène *in vitro* en présence de TNF- α (cytokine activatrice de la voie NF κB) comparativement au même plasmide dépourvu de ces séquences 3NF.

Par l'action combinée des séquences 3NF avec le peptide P79-98, il peut être attendu un effet synergique et par conséquent une augmentation de l'efficacité de transfert de gènes. Sachant que Mesika *et al.* ont évoqué la possibilité que NF κB se déplace le long des microtubules en empruntant la dynéine (Généralités – Chapitre II -III.2), la combinaison des deux signaux pourrait n'avoir aucun effet bénéfique supplémentaire sur la transfection [Mesika *et al.*, 2001]. Pour évaluer cet effet synergique, j'ai réalisé les constructions plasmidiques suivantes : p3NF-CMV-luc-3NF-Genegrip et p3NF-CMV-eGFP-3NF-Genegrip. Dans ces deux plasmides les cassettes d'expression luciférase (luc) ou eGFP, sous le contrôle d'un promoteur CMV, sont encadrées par deux séquences 3NF. Un site Genegrip, en dehors de la cassette d'expression permet l'accrochage du peptide P79-98.

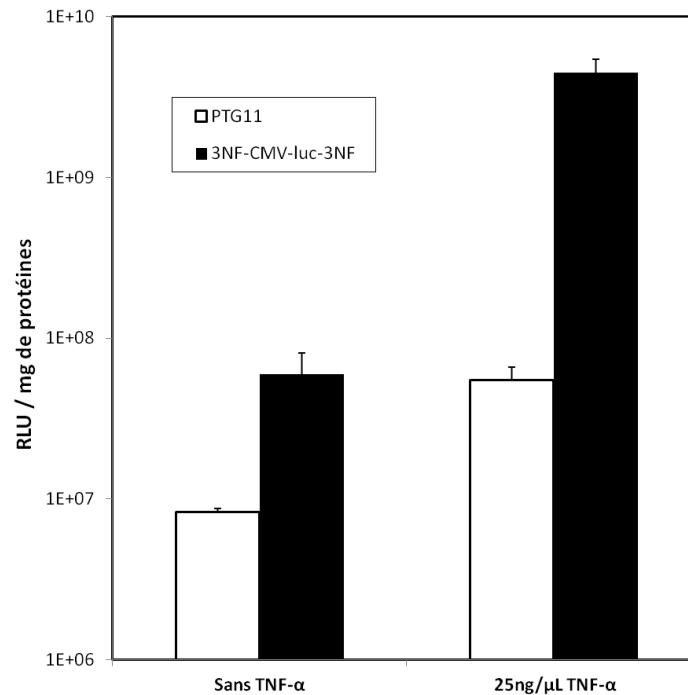


Figure 33 : Comparaison de l'expression des plasmides PTG11033 et 3NF-CMV-luc-3NF. Les cellules HeLa sont transfectées avec le plasmide PTG11033 (blanc) ou le plasmide 3NF-CMV-luc-3NF (noir) en présence ou en absence de TNF- α . Quarante-huit heures après transfection l'activité luciférase est mesurée.

Applications dans les méthodes physiques de transfert de gènes

Outre l'utilisation avec des vecteurs chimiques de transfert de gènes, le P79-98 pourrait être utilisé dans le cadre du transfert de gènes par des méthodes physiques. Il faut toutefois noter que pour cela, la méthode de transfert de gènes utilisée ne déstabilise pas le réseau de microtubules. Des expériences préliminaires réalisées sur des cellules HeLa en utilisant la technique de sonoporation, montrent un effet bénéfique du peptide P79-98 sur la transfection (**Figure 34**).

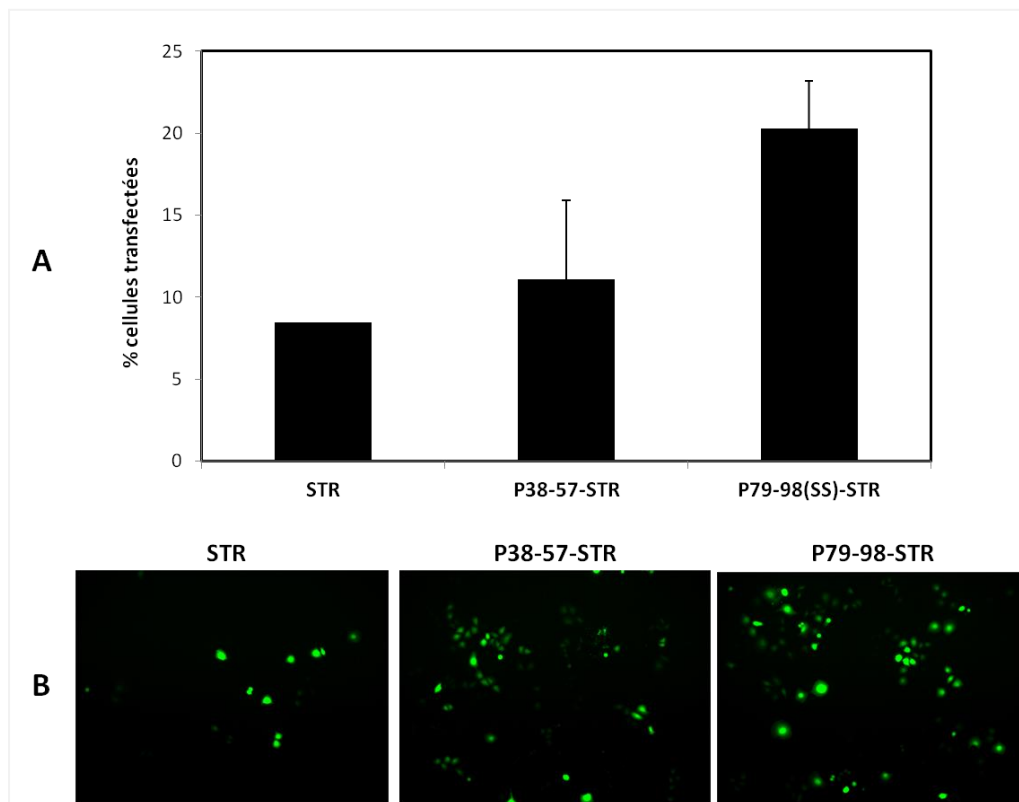


Figure 34 : Utilisation du P79-98 pour l'amélioration du trafic cytosolique d'ADNp dans le cadre de la sonoporation. Les cellules HeLa sont transfectées par sonoporation avec le plasmide 3NF-CMV-eGFP-3NF couplé à la streptavidine (STR), au peptide contrôle P38-57-STR, au peptide P79-98-STR. 48H après l'efficacité de transfection est contrôlée par cytométrie en flux (A) et par microscopie à fluorescence (B).

Cellules différenciées – Taille des plasmides

Certains paramètres déterminants restent à renseigner :

- Il sera important de vérifier l'effet du peptide P79-98 sur des cellules primaires ou quiescentes. Lorsque les cellules procèdent à leur division par la mitose, l'enveloppe nucléaire est rompue, les plasmides présents dans le cytoplasme peuvent donc entrer dans le noyau à ce stade du cycle cellulaire. En absence de division cellulaire, les particules d'ADNp doivent pénétrer le noyau par le pore nucléaire [Dowty *et al.*, 1995]. L'amélioration trafic cytosolique et du passage nucléaire de l'ADNp trouve ainsi tout son sens dans la transfection des cellules primaires ou quiescentes.
- L'effet le peptide P79-98 devrait fortement augmenter le transport de plasmides de très grande taille, immobiles dans le cytosol, et en particulier devrait permettre

d'augmenter de façon remarquable la transfection de plasmides codant de grands gènes tel ceux codant pour le gène CFTR, dans le cas de la mucoviscidose et pour le gène de la dystrophine dans le cas de la DMD.

Références bibliographiques

Aartsma-Rus, A. & van Ommen, G.-J. B. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* **13**, 1609–1624 (2007).

Adam, S. A., Marr, R. S. & Gerace, L. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* **111**, 807–816 (1990).

Aiuti, A. *et al.* Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **360**, 447–458 (2009).

Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 309–322 (2008).

Alcor, D., Calleja, V. & Larijani, B. Revealing signaling in single cells by single- and two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. *Methods Mol. Biol.* **462**, 307–343 (2009).

Al-Dosari, M. S. & Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J* **11**, 671–681 (2009).

Allan, V. J. Cytoplasmic dynein. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1169–1178 (2011).

Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A. & Ringe, D. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704–708 (1994).

Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci.* **68**, 2243–2250 (2001).

Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. & Gruenberg, J. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**, 1373–1387 (1993).

Aradhya, S. *et al.* Physical and genetic characterization reveals a pseudogene, an evolutionary junction, and unstable loci in distal Xq28. *Genomics* **79**, 31–40 (2002).

Asai, D. J. & Koonce, M. P. The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol.* **11**, 196–202 (2001).

Babiss, L. E., Ginsberg, H. S. & Darnell, J. E., Jr. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2552–2558 (1985).

Bainbridge, J. W. & Ali, R. R. Success in sight: The eyes have it! Ocular gene therapy trials for LCA look promising. *Gene Ther.* **15**, 1191–1192 (2008).

Bakkouri, M. E., Fabry, C. M., Fender, P. & Schoehn, G. Structure des adénovirus. *Virologie* **12**, 275–292 (2008).

Barker, S. E. *et al.* Subretinal delivery of adeno-associated virus serotype 2 results in minimal immune responses that allow repeat vector administration in immunocompetent mice. *J Gene Med* **11**, 486–497 (2009).

Barnett, B. G., Crews, C. J. & Douglas, J. T. Targeted adenoviral vectors. *Biochim. Biophys. Acta* **1575**, 1–14 (2002).

Baumgartner, I. & Isner, J. M. Somatic gene therapy in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 427–450 (2001).

Beggs, A. H. *et al.* Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 54–67 (1991).

Beggs, A. H., Koenig, M., Boyce, F. M. & Kunkel, L. M. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* **86**, 45–48 (1990).

Bennett, E. M., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. & Brodsky, F. M. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J. Immunol.* **162**, 5049–5052 (1999).

Bergelson, J. M. *et al.* Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320–1323 (1997).

Bergen, J. M. & Pun, S. H. Evaluation of an LC8-binding peptide for the attachment of artificial cargo to dynein. *Mol. Pharm.* **4**, 119–128 (2007).

Bertrand, E. *et al.* Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun. (Camb.)* **47**, 12547–12549 (2011).

Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A. & Elsasser, H.-P. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release* **82**, 441–454 (2002).

Boguski, M. S. & McCormick, F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643–654 (1993).

Bordignon, C. *et al.* Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science* **270**, 470–475 (1995).

Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7297–7301 (1995).

Boylan, K., Serr, M. & Hays, T. A molecular genetic analysis of the interaction between the cytoplasmic dynein intermediate chain and the glued (dynactin) complex. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3791–3803 (2000).

Bremner, K. H. *et al.* Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* **6**, 523–535 (2009).

Breuzard, G. *et al.* Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res.* **36**, e71 (2008).

Buchschacher, G. L., Jr & Wong-Staal, F. Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1013–1019 (2001).

Bureau, M. F. *et al.* Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. *Biochim. Biophys. Acta* **1676**, 138–148 (2004).

Burgert, H. G. Subversion of the MHC class I antigen-presentation pathway by adenoviruses and herpes simplex viruses. *Trends Microbiol.* **4**, 107–112 (1996).

Burgert, H. G. & Blusch, J. H. Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* **21**, 13–25 (2000).

Burgert, H. G. *et al.* Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **269**, 273–318 (2002).

Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J. & Oiwa, K. Dynein structure and power stroke. *Nature* **421**, 715–718 (2003).

Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T. & Vallee, R. B. Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* **139**, 469–484 (1997).

Burkin, D. J., Wallace, G. Q., Nicol, K. J., Kaufman, D. J. & Kaufman, S. J. Enhanced expression of the alpha 7 beta 1 integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *J. Cell Biol.* **152**, 1207–1218 (2001).

Caracciolo, G. *et al.* Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-Chol-DOPE/DNA lipoplexes in serum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1798**, 536–543 (2010).

Carlisle, R. C. *et al.* Adenovirus hexon protein enhances nuclear delivery and increases transgene expression of polyethylenimine/plasmid DNA vectors. *Mol. Ther.* **4**, 473–483 (2001).

Carmody, R. J., Maguschak, K. & Chen, Y. H. A novel mechanism of nuclear factor-kappaB regulation by adenoviral protein 14.7K. *Immunology* **117**, 188–195 (2006).

Carter, A. P., Cho, C., Jin, L. & Vale, R. D. Crystal structure of the dynein motor domain. *Science* **331**, 1159–1165 (2011).

Carter, A. P. *et al.* Structure and functional role of dynein's microtubule-binding domain. *Science* **322**, 1691–1695 (2008).

Carter, A. P. & Vale, R. D. Communication between the AAA+ ring and microtubule-binding domain of dynein. *Biochem. Cell Biol.* **88**, 15–21 (2010).

Cartier, N. *et al.* Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Meth. Enzymol.* **507**, 187–198 (2012).

Cartier, N. *et al.* Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* **326**, 818–823 (2009).

Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669–672 (2000).

Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* **467**, 318–322 (2010).

Chalasani, M. L. *et al.* A glaucoma-associated mutant of optineurin selectively induces death of retinal ganglion cells which is inhibited by antioxidants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 1607–1614 (2007).

Chen, P., Tian, J., Kovesdi, I. & Bruder, J. T. Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 5815–5820 (1998).

Chen, Y., Mills, J. D. & Periasamy, A. Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation* **71**, 528–541 (2003).

Chen, Y.-Z., Yao, X.-L., Tabata, Y., Nakagawa, S. & Gao, J.-Q. Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, 565643 (2010).

Chevalier-Larsen, E. & Holzbaur, E. L. F. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 1094–1108 (2006).

Cho, C., Reck-Peterson, S. L. & Vale, R. D. Regulatory ATPase sites of cytoplasmic dynein affect processivity and force generation. *J. Biol. Chem.* **283**, 25839–25845 (2008).

Choate, K. A. & Khavari, P. A. Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1659–1665 (1997).

Choi, Y. *et al.* MIDGE/hNIS vaccination generates antigen-associated CD8+IFN- γ T cells and enhances protective antitumor immunity. *Int. J. Cancer* **120**, 1942–1950 (2007).

Cideciyan, A. V. *et al.* Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15112–15117 (2008).

Cideciyan, A. V. *et al.* Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* **361**, 725–727 (2009).

Cirak, S. *et al.* Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* **378**, 595–605 (2011).

Cohen, R. N., van der Aa, M. A. E. M., Macaraeg, N., Lee, A. P. & Szoka, F. C., Jr. Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *J Control Release* **135**, 166–174 (2009).

Coquelle, F. M. *et al.* LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol.*

Cell. Biol. **22**, 3089–3102 (2002).

Corthésy-Theulaz, I., Pauloin, A. & Pfeffer, S. R. Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **118**, 1333–1345 (1992).

Cress, W. D. & Nevins, J. R. A role for a bent DNA structure in E2F-mediated transcription activation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2119–2127 (1996).

Culver-Hanlon, T. L., Lex, S. A., Stephens, A. D., Quintyne, N. J. & King, S. J. A microtubule-binding domain in dynactin increases dynein processivity by skating along microtubules. *Nat. Cell Biol.* **8**, 264–270 (2006).

Curiel, D. T., Gerritsen, W. R. & Krul, M. R. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1197–1199 (2000).

Dauty, E. & Verkman, A. S. Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J. Biol. Chem.* **280**, 7823–7828 (2005).

Day, C. L. *et al.* Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. *Biochem. J.* **377**, 597–605 (2004).

De Bruin, K. *et al.* Cellular dynamics of EGF receptor-targeted synthetic viruses. *Mol. Ther.* **15**, 1297–1305 (2007).

De Marco, N., Buono, M., Troise, F. & Diez-Roux, G. Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *J. Biol. Chem.* **281**, 16147–16156 (2006).

Dean, D. A., Strong, D. D. & Zimmer, W. E. Nuclear entry of nonviral vectors. *Gene Ther* **12**, 881–890 (2005).

Dean, D. A., Barravecchia, M., Danziger, B. & Lin, X. Use of Electroporation for Efficacious Gene Delivery to the Lungs. *ECS Trans.* **35**, 167–177 (2011).

Delalande, A. *et al.* Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery in Achilles tendons: long lasting gene expression and restoration of fibromodulin KO phenotype. *J Control Release* **156**, 223–230 (2011).

Deryckere, F., Ebenau-Jehle, C., Wold, W. S. & Burgert, H. G. Tumor necrosis factor alpha increases expression of adenovirus E3 proteins. *Immunobiology* **193**, 186–192 (1995).

Devred, F. *et al.* Microtubule and MAPs: thermodynamics of complex formation by AUC, ITC, fluorescence, and NMR. *Methods Cell Biol.* **95**, 449–480 (2010).

DiBella, L. M. *et al.* The Tctex1/Tctex2 class of dynein light chains. Dimerization, differential expression, and interaction with the LC8 protein family. *J. Biol. Chem.* **276**, 14366–14373 (2001).

Diefenbach, R. J., Miranda-Saksena, M., Douglas, M. W. & Cunningham, A. L. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev. Med. Virol.* **18**, 35–51

(2008).

Dimitrov, A. *et al.* Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* **322**, 1353–1356 (2008).

Dimitrov, T. *et al.* Adenovirus E3-10.4K/14.5K protein complex inhibits tumor necrosis factor-induced translocation of cytosolic phospholipase A2 to membranes. *J. Virol.* **71**, 2830–2837 (1997).

Dodding, M. P. & Way, M. Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO J.* **30**, 3527–3539 (2011).

Döhner, K. & Sodeik, B. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**, 67–108 (2005).

Douglas, K. L., Piccirillo, C. A. & Tabrizian, M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur J Pharm Biopharm* **68**, 676–687 (2008).

Douglas, M. W. *et al.* Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J. Biol. Chem.* **279**, 28522–28530 (2004).

Dow, S. W. *et al.* Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J. Immunol.* **163**, 1552–1561 (1999).

Dowty, M. E., Williams, P., Zhang, G., Hagstrom, J. E. & Wolff, J. A. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4572–4576 (1995).

Duan, D. Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? *Res Rep Biol* **2011**, 31–42 (2011).

Dujardin, D. *et al.* Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **141**, 849–862 (1998).

During, M. J. & Ashenden, L. M. Towards gene therapy for the central nervous system. *Mol Med Today* **4**, 485–493 (1998).

El Ouahabi, A. *et al.* Intracellular visualization of BrdU-labeled plasmid DNA/cationic liposome complexes. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1159–1166 (1999).

Engelke, M. F., Burckhardt, C. J., Morf, M. K. & Greber, U. F. The dynactin complex enhances the speed of microtubule-dependent motions of adenovirus both towards and away from the nucleus. *Viruses* **3**, 233–253 (2011).

England, S. B. *et al.* Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* **343**, 180–182 (1990).

Erbacher, P., Roche, A. C., Monsigny, M. & Midoux, P. The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection

efficiency of polylysine/DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**, 27–36 (1997).

Escriou, V., Carrière, M., Bussone, F., Wils, P. & Scherman, D. Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J Gene Med* **3**, 179–187 (2001).

Evans, C. H., Ghivizzani, S. C., Oligino, T. J. & Robbins, P. D. Gene therapy for autoimmune disorders. *J. Clin. Immunol.* **20**, 334–346 (2000).

Fabre, J. W. *et al.* Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene Ther.* **15**, 452–462 (2008).

Fan, J., Zhang, Q., Tochio, H., Li, M. & Zhang, M. Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *J. Mol. Biol.* **306**, 97–108 (2001).

Farhood, H., Serbina, N. & Huang, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 289–295 (1995).

Faulkner, N. E. *et al.* A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat. Cell Biol.* **2**, 784–791 (2000).

Favaloro, L. *et al.* High-dose plasmid-mediated VEGF gene transfer is safe in patients with severe ischemic heart disease (GENESIS-I). A phase I, open-label, two years follow-up trial. *Catheterization and cardiovascular interventions: official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* (2012). doi:10.1002/ccd.24555

Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7413–7417 (1987).

Fessler, S. P., Delgado-Lopez, F. & Horwitz, M. S. Mechanisms of E3 modulation of immune and inflammatory responses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **273**, 113–135 (2004).

Flanigan, K. M. *et al.* Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum. Mutat.* **30**, 1657–1666 (2009).

Florin, L. *et al.* Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2. *J. Virol.* **80**, 6691–6696 (2006).

Funk, A., Mhamdi, M., Lin, L., Will, H. & Sirma, H. Itinerary of hepatitis B viruses: delineation of restriction points critical for infectious entry. *J. Virol.* **78**, 8289–8300 (2004).

Gaglio, T., Dionne, M. A. & Compton, D. A. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J. Cell Biol.* **138**, 1055–1066 (1997).

Galés, C. *et al.* Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **2**, 177–184 (2005).

Gao, X. & Huang, L. Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* **35**, 1027–1036 (1996).

Gao, X., Kim, K.-S. & Liu, D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J* **9**, E92–104 (2007).

García, L., Buñuales, M., Düzgüneş, N. & Tros de Ilarduya, C. Serum-resistant lipopolyplexes for gene delivery to liver tumour cells. *Eur J Pharm Biopharm* **67**, 58–66 (2007).

García-Mayoral, M. F., Martínez-Moreno, M., Albar, J. P., Rodríguez-Crespo, I. & Bruix, M. Structural basis for the interaction between dynein light chain 1 and the glutamate channel homolog GRINL1A. *FEBS J.* **277**, 2340–2350 (2010).

Gennerich, A., Carter, A. P., Reck-Peterson, S. L. & Vale, R. D. Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell* **131**, 952–965 (2007).

Gerhard, D. S. *et al.* The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res.* **14**, 2121–2127 (2004).

Gibbons, I. R. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* **32**, 136–144 (1995).

Gibbons, I. R. *et al.* The affinity of the dynein microtubule-binding domain is modulated by the conformation of its coiled-coil stalk. *J. Biol. Chem.* **280**, 23960–23965 (2005).

Gilboa, E. & Vieweg, J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol. Rev.* **199**, 251–263 (2004).

Gill, S. R. *et al.* Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* **115**, 1639–1650 (1991).

Gillard, E. F. *et al.* Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 507–520 (1989).

Ginsberg, H. S. *et al.* Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3823–3827 (1989).

Giordano, C. *et al.* Gene delivery systems for gene therapy in tissue engineering and central nervous system applications. *Int J Artif Organs* **31**, 1017–1026 (2008).

Godbey, W. T., Wu, K. K. & Mikos, A. G. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release* **60**, 149–160 (1999).

Goemans, N. M. *et al.* Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1513–1522 (2011).

Gonçalves, C. *et al.* Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via

the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells. *Mol. Ther.* **10**, 373–385 (2004).

Gonçalves, C. *et al.* An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med* **11**, 401–411 (2009).

Gooding, L. R., Elmore, L. W., Tollefson, A. E., Brady, H. A. & Wold, W. S. A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**, 341–346 (1988).

Gooding, L. R., Sofola, I. O., Tollefson, A. E., Duerksen-Hughes, P. & Wold, W. S. The adenovirus E3-14.7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytolysis. *J. Immunol.* **145**, 3080–3086 (1990).

Goodrum, F. D. & Ornelles, D. A. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J. Virol.* **73**, 7474–7488 (1999).

Green, D. R. & Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626–629 (2004).

Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415–419 (2003).

Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* **118**, 3132–3142 (2008).

Häcker, G., Redecke, V. & Häcker, H. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology* **105**, 245–251 (2002).

Hall, J., Song, Y., Karplus, P. A. & Barbar, E. The crystal structure of dynein intermediate chain-light chain roadblock complex gives new insights into dynein assembly. *J. Biol. Chem.* **285**, 22566–22575 (2010).

Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Breton, B. & Bouvier, M. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**, Unit 5.23 (2006).

Hattula, K. & Peränen, J. FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr. Biol.* **10**, 1603–1606 (2000).

Hawkins, L. K. & Wold, W. S. A 12,500 MW protein is coded by region E3 of adenovirus. *Virology* **188**, 486–494 (1992).

He, P. *et al.* pcDNA3.1(-)-mediated ribozyme targeting of HER-2 suppresses breast cancer tumor growth. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 1597–1604 (2010).

Heller, L. C., Ugen, K. & Heller, R. Electroporation for targeted gene transfer. *Expert Opin Drug Deliv* **2**, 255–268 (2005).

Herweijer, H. & Wolff, J. A. Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther.* **14**, 99–107 (2007).

Hickman, M. A. *et al.* Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.* **5**, 1477–1483 (1994).

High, K. A. Gene transfer as an approach to treating hemophilia. *Semin. Thromb. Hemost.* **29**, 107–120 (2003).

Hildebrandt, I. J., Iyer, M., Wagner, E. & Gambhir, S. S. Optical imaging of transferrin targeted PEI/DNA complexes in living subjects. *Gene Ther.* **10**, 758–764 (2003).

Hill, H. & Straka, J. Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analytical biochemistry* **1**, 203–8 (1988).

Hirose, E., Nakashima, N., Sekiguchi, T. & Nishimoto, T. RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtrp involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *J. Cell. Sci.* **111** (Pt 1), 11–21 (1998).

Hódi, Z. *et al.* Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein. *Biochemistry* **45**, 12582–12595 (2006).

Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr & Kunkel, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919–928 (1987).

Holleran, E. A. *et al.* beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J. Biol. Chem.* **276**, 36598–36605 (2001).

Hong, K., Zheng, W., Baker, A. & Papahadjopoulos, D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Lett.* **400**, 233–237 (1997).

Horgan, C. P. & McCaffrey, M. W. Rab GTPases and microtubule motors. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1202–1206 (2011).

Horton, T. M. *et al.* Adenovirus E3 14.7K protein functions in the absence of other adenovirus proteins to protect transfected cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Virol.* **65**, 2629–2639 (1991).

Horton, T. M., Tollefson, A. E., Wold, W. S. & Gooding, L. R. A protein serologically and functionally related to the group C E3 14,700-kilodalton protein is found in multiple adenovirus serotypes. *J. Virol.* **64**, 1250–1255 (1990).

Horwitz, M. S. Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* **279**, 1–8 (2001).

Horwitz, M. S. Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S172–183 (2004).

Houdusse, A. & Carter, A. P. Dynein swings into action. *Cell* **136**, 395–396 (2009).

Humphray, S. J. *et al.* DNA sequence and analysis of human chromosome 9.

Nature **429**, 369–374 (2004).

Huth, S. *et al.* Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* **6**, 923–936 (2004).

Imamula, K., Kon, T., Ohkura, R. & Sutoh, K. The coordination of cyclic microtubule association/dissociation and tail swing of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 16134–16139 (2007).

Janke, C. & Bulinski, J. C. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 773–786 (2011).

Johnson, K. A. Pathway of the microtubule-dynein ATPase and the structure of dynein: a comparison with actomyosin. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **14**, 161–188 (1985).

Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).

Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M. & Wileman, T. Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. *J. Virol.* **78**, 7990–8001 (2004).

Joza, N. *et al.* AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 2–11 (2009).

Kafri, T. *et al.* Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 11377–11382 (1998).

Kaiser, J. Gene therapy. Beta-thalassemia treatment succeeds, with a caveat. *Science* **326**, 1468–1469 (2009).

Kardon, J. R. & Vale, R. D. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 854–865 (2009).

Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621–663 (2000).

Karki, S. & Holzbaur, E. L. Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 28806–28811 (1995).

Karki, S. & Holzbaur, E. L. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 45–53 (1999).

Kawano, H. *et al.* Improved anti-cancer effect of interferon gene transfer by sustained expression using CpG-reduced plasmid DNA. *Int. J. Cancer* **121**, 401–406 (2007).

Kay, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 316–328 (2011).

Kelkar, S. A., Pfister, K. K., Crystal, R. G. & Leopold, P. L. Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules. *J. Virol.* **78**, 10122–10132 (2004).

Kim, H.-J. & Foster, M. P. Characterization of Ad5 E3-14.7K, an adenoviral inhibitor of apoptosis: Structure, oligomeric state, and metal binding. *Protein Science* **11**, 1117–1128 (2002).

King, S. J. & Schroer, T. A. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Cell Biol.* **2**, 20–24 (2000).

King, S. M. The dynein microtubule motor. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 60–75 (2000).

King, S. M. *et al.* Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J. Biol. Chem.* **271**, 19358–19366 (1996).

Klein, R. M., Wolf, E. D., Wu, R. & Sanford, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* **24**, 384–386 (1992).

Klingseisen, L. *et al.* E3-14.7K Is Recruited to TNF-Receptor 1 and Blocks TNF Cytolysis Independent from Interaction with Optineurin. *PLoS One* **7**, (2012).

Kobayashi, T., Shioguchi, K., Edamatsu, M. & Toyoshima, Y. Y. Microtubule-binding properties of dynactin p150 expedient for dynein motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 23–28 (2006).

Koenig, M. *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 498–506 (1989).

Koenig, M. *et al.* Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509–517 (1987).

Koltover, I., Salditt, T., Rädler, J. O. & Safinya, C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **281**, 78–81 (1998).

Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y. & Sutoh, K. Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry* **43**, 11266–11274 (2004).

Koom, W. S. *et al.* Combination of radiotherapy and adenovirus-mediated p53 gene therapy for MDM2-overexpressing hepatocellular carcinoma. *J. Radiat. Res.* **53**, 202–210 (2012).

Koonce, M. P. Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J. Biol. Chem.* **272**, 19714–19718 (1997).

Koonce, M. P. & Tikhonenko, I. Functional elements within the dynein microtubule-binding domain. *Mol. Biol. Cell* **11**, 523–529 (2000).

Kota, J. *et al.* Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates. *Sci Transl Med* **1**, 6ra15 (2009).

Koynova, R. Analysis of lipoplex structure and lipid phase changes. *Methods Mol. Biol.* **606**, 399–423 (2010).

Krajcsi, P. *et al.* The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J. Virol.* **70**, 4904–4913 (1996).

Krieg, A. M. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* **19**, 618–622 (2000).

Krieg, A. M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 471–484 (2006).

Krötz, F., Sohn, H.-Y., Gloe, T., Plank, C. & Pohl, U. Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J. Vasc. Res.* **40**, 425–434 (2003).

Kubota, T. *et al.* Ebolavirus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8. *J. Virol.* **83**, 6952–6956 (2009).

Kulkarni, R. P., Castelino, K., Majumdar, A. & Fraser, S. E. Intracellular transport dynamics of endosomes containing DNA polyplexes along the microtubule network. *Biophys. J.* **90**, L42–44 (2006).

Kulkarni, R. P., Mishra, S., Fraser, S. E. & Davis, M. E. Single cell kinetics of intracellular, nonviral, nucleic acid delivery vehicle acidification and trafficking. *Bioconjug. Chem.* **16**, 986–994 (2005).

Kunkel, L. M. 2004 William Allan Award address. Cloning of the DMD gene. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 205–214 (2005).

Kwon, E. J., Bergen, J. M., Park, I. K. & Pun, S. H. Peptide-modified vectors for nucleic acid delivery to neurons. *J Control Release* **132**, 230–235 (2008).

Kwon, I. & Schaffer, D. V. Designer Gene Delivery Vectors: Molecular Engineering and Evolution of Adeno-Associated Viral Vectors for Enhanced Gene Transfer. *Pharm Res* **25**, 489–499 (2008).

Labat-Moleur, F. *et al.* An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.* **3**, 1010–1017 (1996).

Lakadamyali, M., Rust, M. J., Babcock, H. P. & Zhuang, X. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9280–9285 (2003).

Lakowicz, J. R. *et al.* Plasmon-controlled fluorescence: A new detection technology. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng* **6099**, 609909 (2006).

Lam, A. P. & Dean, D. A. Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther.* **17**, 439–447 (2010).

Lechardeur, D. *et al.* Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* **6**, 482–497 (1999).

Lehrman, S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* **401**, 517–518 (1999).

Leopold, P. L. *et al.* Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum. Gene Ther.* **11**, 151–165 (2000).

Leopold, P. L. & Crystal, R. G. Intracellular trafficking of adenovirus: many means to many ends. *Adv. Drug Deliv. Rev* **59**, 810–821 (2007).

Leopold, P. L. & Pfister, K. K. Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. *Traffic* **7**, 516–523 (2006).

Lewis, J. B. & Mathews, M. B. Control of adenovirus early gene expression: a class of immediate early products. *Cell* **21**, 303–313 (1980).

Li, D., Long, C., Yue, Y. & Duan, D. Sub-physiological sarcoglycan expression contributes to compensatory muscle protection in mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1209–1220 (2009).

Li, R. & Gundersen, G. G. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 860–873 (2008).

Li, S. & Huang, L. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther.* **4**, 891–900 (1997).

Li, S., Tan, Y., Viroonchatapan, E., Pitt, B. R. & Huang, L. Targeted gene delivery to pulmonary endothelium by anti-PECAM antibody. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **278**, L504–511 (2000).

Li, Y. *et al.* Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1042–1047 (1999).

Li, Y. *et al.* Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1042–1047 (1999).

Li, Y. *et al.* Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1042–1047 (1999).

Li, Y., Kang, J. & Horwitz, M. S. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1601–1610 (1998).

Li, Y. & Horwitz, M. S. *Identification and Characterization of Cellular Proteins which Interact with Adenovirus E3-14.7KDA Protein an Antagonist of TNF-[alpha]*. (The College, 1996).

Lichtenstein, D. L., Toth, K., Doronin, K., Tollefson, A. E. & Wold, W. S. M. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol.* **23**, 75–111 (2004).

Lim, Y., Choi, Y. H. & Park, J. A Self-Destroying Polycationic Polymer: Biodegradable Poly(4-hydroxy-L-proline ester). *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5633–5639 (1999).

Lin, S. X. & Collins, C. A. Immunolocalization of cytoplasmic dynein to lysosomes in cultured cells. *J. Cell. Sci.* **101** (Pt 1), 125–137 (1992).

Liu, D., Ren, T. & Gao, X. Cationic transfection lipids. *Curr. Med. Chem.* **10**, 1307–1315 (2003).

Liu, F., Song, Y. & Liu, D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1258–1266 (1999).

Liu, Y. *et al.* Factors influencing the efficiency of cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *Nat. Biotechnol.* **15**, 167–173 (1997).

Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D. G. & Lamond, A. I. Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J. Cell Biol.* **187**, 481–496 (2009).

Lo, K. W.-H. *et al.* The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* **280**, 8172–8179 (2005).

LoDuca, P. A., Hoffman, B. E. & Herzog, R. W. Hepatic gene transfer as a means of tolerance induction to transgene products. *Curr Gene Ther* **9**, 104–114 (2009).

Lostal, W. *et al.* Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1897–1907 (2010).

Lu, L. *et al.* AAV2-mediated gene transfer of VEGF-Trap with potent suppression of primary breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastases by long-term expression. *Oncology reports* (2012). doi:10.3892/or.2012.1915

Lu, Q.-L. *et al.* The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **19**, 9–15 (2011).

Lukacs, G. L. *et al.* Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* **275**, 1625–1629 (2000).

Lukashok, S. A., Tarassishin, L., Li, Y. & Horwitz, M. S. An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and a small GTPase. *J. Virol.* **74**, 4705–4709 (2000).

Mabit, H. *et al.* Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J. Virol.* **76**, 9962–9971 (2002).

Maguire, A. M. *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2240–2248 (2008).

Mahr, J. A. & Gooding, L. R. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol. Rev.* **168**, 121–130 (1999).

Mahr, J. A., Boss, J. M. & Gooding, L. R. The adenovirus e3 promoter is sensitive to activation signals in human T cells. *J. Virol.* **77**, 1112–1119 (2003).

Makokha, M., Hare, M., Li, M., Hays, T. & Barbar, E. Interactions of cytoplasmic dynein light chains Tctex-1 and LC8 with the intermediate chain IC74. *Biochemistry* **41**, 4302–4311 (2002).

Mallik, R., Carter, B. C., Lex, S. A., King, S. J. & Gross, S. P. Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* **427**, 649–652 (2004).

Mandelkow, E. M., Lange, G., Jagla, A., Spann, U. & Mandelkow, E. Dynamics of the microtubule oscillator: role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. *EMBO J.* **7**, 357–365 (1988).

Manno, C. S. *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**, 342–347 (2006).

Martínez-Moreno, M. *et al.* Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Lett.* **544**, 262–267 (2003).

Martini, S. V., Rocco, P. R. M. & Morales, M. M. Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44**, 1097–1104 (2011).

Matanis, T. *et al.* Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat. Cell Biol.* **4**, 986–992 (2002).

Matsubara, K. & Tokino, T. Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol. Biol. Med.* **7**, 243–260 (1990).

May, C. *et al.* Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* **406**, 82–86 (2000).

McDonald, D. *et al.* Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* **159**, 441–452 (2002).

McDonald, D. *et al.* Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* **159**, 441–452 (2002).

McNees, A. L. & Gooding, L. R. Adenoviral inhibitors of apoptotic cell death. *Virus Res.* **88**, 87–101 (2002).

Medina-Kauwe, L. K., Xie, J. & Hamm-Alvarez, S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.* **12**, 1734–1751 (2005).

Mercier, J.-F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. & Bouvier, M. Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 44925–44931 (2002).

Merino-Gracia, J., García-Mayoral, M. F. & Rodríguez-Crespo, I. The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection. *FEBS J.* **278**, 2997–3011 (2011).

Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M. & Reich, Z. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol. Ther.* **3**, 653–657 (2001).

Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M. & Reich, Z. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol. Ther.* **3**, 653–657 (2001).

Mesika, A., Kiss, V., Brumfeld, V., Ghosh, G. & Reich, Z. Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Hum. Gene Ther.* **16**, 200–208 (2005).

Meyer, K. B., Thompson, M. M., Levy, M. Y., Barron, L. G. & Szoka, F. C., Jr. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther.* **2**, 450–460 (1995).

Midoux, P. & Monsigny, M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem.* **10**, 406–411 (1999).

Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J. P. & Pichon, C. Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr Gene Ther* **8**, 335–352 (2008).

Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J. & Jaffrès, P.-A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 166–178 (2009).

Mikenberg, I., Widera, D., Kaus, A., Kaltschmidt, B. & Kaltschmidt, C. Transcription factor NF-kappaB is transported to the nucleus via cytoplasmic dynein/dynactin motor complex in hippocampal neurons. *PLoS ONE* **2**, e589 (2007).

Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. & Tsukita, S. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.* **10**, 865–868 (2000).

Mingozzi, F. *et al.* CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* **13**, 419–422 (2007).

Mintzer, M. A. & Simanek, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **109**, 259–302 (2009).

Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242 (1984).

Mitchison, T. J. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044–1047 (1993).

Mockey, M. *et al.* mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther.* **14**, 802–814 (2007).

Mok, Y. K., Lo, K. W. & Zhang, M. Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain. *J. Biol. Chem.* **276**, 14067–14074 (2001).

Moseley, G. W. *et al.* Dynein light chain association sequences can facilitate nuclear protein import. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3204–3213 (2007).

Muangmoonchai, R., Wong, S. C., Smirlis, D., Phillips, I. R. & Shephard, E. A. Transfection of liver in vivo by biolistic particle delivery: its use in the investigation of cytochrome P450 gene regulation. *Mol. Biotechnol.* **20**, 145–151 (2002).

Mueller, S., Cao, X., Welker, R. & Wimmer, E. Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 7897–7904 (2002).

Nagano, F. *et al.* Interaction of Doc2 with tctex-1, a light chain of cytoplasmic dynein. Implication in dynein-dependent vesicle transport. *J. Biol. Chem.* **273**, 30065–30068 (1998).

Nakashima, N., Hayashi, N., Noguchi, E. & Nishimoto, T. Putative GTPase Gtr1p genetically interacts with the RanGTPase cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **109** (Pt 9), 2311–2318 (1996).

Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2357–2365 (2011).

Nayak, S. & Herzog, R. W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther.* **17**, 295–304 (2010).

Nemerow, G. R. Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology* **274**, 1–4 (2000).

Nevins, J. R., Ginsberg, H. S., Blanchard, J. M., Wilson, M. C. & Darnell, J. E., Jr. Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units. *J. Virol.* **32**, 727–733 (1979).

Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. & Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**, 1497–1500 (1991).

Niemeyer, G. P. *et al.* Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* **113**, 797–806 (2009).

Ogawa-Goto, K. *et al.* Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* **77**, 8541–8547 (2003).

Ogris, M., Steinlein, P., Carotta, S., Brunner, S. & Wagner, E. DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression. *AAPS PharmSci* **3**, E21 (2001).

Ota, T. *et al.* Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat. Genet.* **36**, 40–45 (2004).

Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. & Stayton, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 581–593 (2005).

Pai, E. F. *et al.* Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351–2359 (1990).

Pandha, H. S., Martin, L. A., Rigg, A. S., Ross, P. & Dalglish, A. G. Gene therapy: recent progress in the clinical oncology arena. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2**, 362–375 (2000).

Pantaloni, D. & Carlier, M. F. Involvement of guanosine triphosphate (GTP) hydrolysis in the mechanism of tubulin polymerization: regulation of microtubule dynamics at steady state by a GTP cap. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **466**, 496–509 (1986).

Park, T. G., Jeong, J. H. & Kim, S. W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 467–486 (2006).

Paschal, B. M., Shpetner, H. S. & Vallee, R. B. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* **105**, 1273–1282 (1987).

Paschal, B. M. & Vallee, R. B. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* **330**, 181–183 (1987).

Pawliuk, R. *et al.* Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* **294**, 2368–2371 (2001).

Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Pires, P., Faneca, H. & Düzgüneş, N. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 277–294 (2001).

Pelkmans, L., Püntener, D. & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535–539 (2002).

Pennisi, E. Nuclear transport protein does double duty in mitosis. *Science* **284**, 1260–1261 (1999).

Perche, F. *et al.* Gene transfer by histidylated lipopolyplexes: A dehydration method allowing preservation of their physicochemical parameters and transfection efficiency. *Int J Pharm* **423**, 144–150 (2012).

Persson, H., Jörnvall, H. & Zabielski, J. Multiple mRNA species for the precursor to an adenovirus-encoded glycoprotein: identification and structure of the signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6349–6353 (1980).

Persson, H., Oberg, B. & Philipson, L. Purification and characterization of an early protein (E14K) from adenovirus type 2-infected cells. *J. Virol.* **28**, 119–139 (1978).

Peter, A. K., Marshall, J. L. & Crosbie, R. H. Sarcospan reduces dystrophic pathology: stabilization of the utrophin-glycoprotein complex. *J. Cell Biol.* **183**, 419–427 (2008).

Pfarr, C. M. *et al.* Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature* **345**, 263–265 (1990).

Pfleger, K. D. G. & Eidne, K. A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods* **3**, 165–174 (2006).

Pfleger, K. D. G., Seeber, R. M. & Eidne, K. A. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc* **1**, 337–345 (2006).

Philipson, L. Structure and assembly of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**, 1–52 (1984).

Pichon, C., Billiet, L. & Midoux, P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 640–645 (2010).

Pichon, C. *et al.* Poly[Lys-(AEDTP)]: a cationic polymer that allows dissociation of pDNA/cationic polymer complexes in a reductive medium and enhances polyfection. *Bioconjug. Chem.* **13**, 76–82 (2002).

Pigeon, L. *et al.* Interaction of adenoviral E3-14.7K with microtubules network: identification of P79-98 peptide derived from E3-14.7K which interacts with FIP-1 and mediates cell cycle arrest. *J. Cell. Sci.* (2012).

Poisson, N. *et al.* Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J. Gen. Virol.* **82**, 2691–2696 (2001).

Pollard, H. *et al.* Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 7507–7511 (1998).

Pospisilik, J. A. *et al.* Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* **131**, 476–491 (2007).

Pringle, I. A. *et al.* CpG-free plasmid expression cassettes for cystic fibrosis gene therapy. *Biomaterials* **33**, 6833–6842 (2012).

Qiao, C. *et al.* Hydrodynamic Limb Vein Injection of Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vector Carrying Canine Myostatin Propeptide Gene into Normal Dogs Enhances Muscle Growth. *Hum Gene Ther* **20**, 1–10 (2009).

Radtke, K., Döhner, K. & Sodeik, B. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell. Microbiol* **8**, 387–400 (2006).

Ranheim, T. S. *et al.* Characterization of mutants within the gene for the adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which prevents cytolysis by tumor necrosis factor. *J. Virol.* **67**, 2159–2167 (1993).

Rao, K. N., Nagireddy, S. & Chakrabarti, S. Complex genetic mechanisms in glaucoma: an overview. *Indian J Ophthalmol* **59 Suppl**, S31–42 (2011).

Rapali, P. *et al.* DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J.* **278**, 2980–2996 (2011).

Rejman, J., Bragonzi, A. & Conese, M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.* **12**, 468–474 (2005).

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–169 (2004).

Reyes-Sandoval, A. & Ertl, H. C. J. CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses. *Mol. Ther.* **9**, 249–261 (2004).

Rezaie, T. *et al.* Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* **295**, 1077–1079 (2002).

Rezaie, T., Waitzman, D. M., Seeman, J. L., Kaufman, P. L. & Sarfarazi, M. Molecular cloning and expression profiling of optineurin in the rhesus monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 2404–2410 (2005).

Rice, S. E., Purcell, T. J. & Spudich, J. A. Building and using optical traps to study properties of molecular motors. *Meth. Enzymol.* **361**, 112–133 (2003).

Rochard, A., Scherman, D. & Bigey, P. Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer. *Hum. Gene Ther.* **22**, 789–798 (2011).

Rodríguez-Crespo, I. *et al.* Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepsan technique. *FEBS Lett.* **503**, 135–141 (2001).

Rooney, J. E., Gurpur, P. B. & Burkin, D. J. Laminin-111 protein therapy prevents muscle disease in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 7991–7996 (2009).

Ross, G. F. *et al.* Enhanced reporter gene expression in cells transfected in the presence of DMI-2, an acid nuclease inhibitor. *Gene Ther.* **5**, 1244–1250 (1998).

Ross, J. L., Shuman, H., Holzbaur, E. L. F. & Goldman, Y. E. Kinesin and dynein-dynactin at intersecting microtubules: motor density affects dynein function. *Biophys. J.* **94**, 3115–3125 (2008).

Ross, P. C. & Hui, S. W. Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. *Gene Ther.* **6**, 651–659 (1999).

Rozners, E. Recent Advances in Chemical Modification of Peptide Nucleic Acids. *Journal of Nucleic Acids* **2012**, 1–8 (2012).

Russell, W. C. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**, 2573–2604 (2000).

Sahlender, D. A. *et al.* Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is

involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* **169**, 285–295 (2005).

Sakuma, T., Barry, M. A. & Ikeda, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**, 603–618 (2012).

Sällberg, M. *et al.* Genetic immunization of chimpanzees chronically infected with the hepatitis B virus, using a recombinant retroviral vector encoding the hepatitis B virus core antigen. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1719–1729 (1998).

Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290–303 (2010).

Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–1501 (2008).

Sapp, M. & Bienkowska-Haba, M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J* **276**, 7206–7216 (2009).

Sato, Y. *et al.* In vivo gene delivery to tumor cells by transferrin-streptavidin-DNA conjugate. *FASEB J.* **14**, 2108–2118 (2000).

Schaffer, D. V., Fidelman, N. A., Dan, N. & Lauffenburger, D. A. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 598–606 (2000).

Scherer, F. *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **9**, 102–109 (2002).

Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

Schneider, M. A., Spoden, G. A., Florin, L. & Lambert, C. Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell. Microbiol.* **13**, 32–46 (2011).

Schneider-Brachert, W. *et al.* Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *J. Clin. Invest.* **116**, 2901–2913 (2006).

Schneider-Brachert, W. *et al.* Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity* **21**, 415–428 (2004).

Schröder, A. R. W. *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521–529 (2002).

Schroer, T. A. & Sheetz, M. P. Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J. Cell Biol.* **115**, 1309–1318 (1991).

Schroer, T. A. Dynactin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 759–779 (2004).

Schughart, K. *et al.* Effect of liposome-encapsulated clodronate pretreatment on synthetic vector-mediated gene expression in mice. *Gene Ther.* **6**, 448–453 (1999).

Schürmann, A., Brauers, A., Massmann, S., Becker, W. & Joost, H. G. Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases. *J. Biol. Chem.* **270**, 28982–28988 (1995).

Schwamborn, K., Weil, R., Courtois, G., Whiteside, S. T. & Israël, A. Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 22780–22789 (2000).

Schwerdt, J. I. *et al.* Magnetic field-assisted gene delivery: achievements and therapeutic potential. *Curr Gene Ther* **12**, 116–126 (2012).

Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M. & Nishimoto, T. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J. Biol. Chem.* **276**, 7246–7257 (2001).

Sekiguchi, T. *et al.* A novel human nucleolar protein, Nop132, binds to the G proteins, RRAG A/C/D. *J. Biol. Chem.* **279**, 8343–8350 (2004).

Semple, S. C., Chonn, A. & Cullis, P. R. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry* **35**, 2521–2525 (1996).

Seroogy, C. M. & Fathman, C. G. The application of gene therapy in autoimmune diseases. *Gene Ther.* **7**, 9–13 (2000).

Simonelli, F. *et al.* Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol. Ther.* **18**, 643–650 (2010).

Smahi, A. *et al.* Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* **405**, 466–472 (2000).

Smisterová, J. *et al.* Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 47615–47622 (2001).

Sodeik, B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* **8**, 465–472 (2000).

Sodeik, B., Ebersold, M. W. & Helenius, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**, 1007–1021 (1997).

Solé, A., Mas, J. & Esteve, I. A new method based on image analysis for determining cyanobacterial biomass by CLSM in stratified benthic sediments. *Ultramicroscopy* **107**, 669–673 (2007).

Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr & Verkman, A. S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol.*

Chem. **278**, 44826–44831 (2003).

Song, Y. K., Liu, F., Chu, S. & Liu, D. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1585–1594 (1997).

Sorgi, F. L., Bhattacharya, S. & Huang, L. Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **4**, 961–968 (1997).

Sparer, T. E. *et al.* The role of human adenovirus early region 3 proteins (gp19K, 10.4K, 14.5K, and 14.7K) in a murine pneumonia model. *J. Virol.* **70**, 2431–2439 (1996).

Steffen, W. *et al.* The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2077–2088 (1997).

Stocking, C. *et al.* Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors* **8**, 197–209 (1993).

Su, G.-Q., Su, G. & Huang, Z.-H. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of the CDglyTk gene for the treatment of breast cancer. *Mol Med Report* **6**, 321–329 (2012).

Sudhakar, C., Nagabhushana, A., Jain, N. & Swarup, G. NF- κ B Mediates Tumor Necrosis Factor α -Induced Expression of Optineurin, a Negative Regulator of NF- κ B. *PLoS ONE* **4**, e5114 (2009).

Sugai, M. *et al.* PTH/PTH-related protein receptor interacts directly with Tctex-1 through its COOH terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 24–31 (2003).

Suh, J., Wirtz, D. & Hanes, J. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3878–3882 (2003).

Suikkanen, S. *et al.* Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J. Virol.* **77**, 10270–10279 (2003).

Sun, Y. *et al.* Involvement of the p38 MAPK signaling pathway in S-phase cell-cycle arrest induced by Furazolidone in human hepatoma G2 cells. *Journal of Applied Toxicology* n/a–n/a (2012). doi:10.1002/jat.2829

Suomalainen, M. *et al.* Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* **144**, 657–672 (1999).

Susin, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441–446 (1999).

Tai, A. W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U. & Sung, C. H. Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* **97**, 877–887 (1999).

Tai, D. I. *et al.* Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **31**, 656–664 (2000).

Takeshita, F. *et al.* Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin. Immunol.* **16**, 17–22 (2004).

Tanaka, K. *et al.* A novel, bio-reducible gene vector containing arginine and histidine enhances gene transfection and expression of plasmid DNA. *Chem. Pharm. Bull.* **59**, 202–207 (2011).

Tanaka, K. *et al.* A cytoplasm-sensitive peptide vector cross-linked with dynein light chain association sequence (DLCAS) enhances gene expression. *Int J Pharm* **419**, 231–234 (2011).

Tatum, E. L. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect. Biol. Med.* **10**, 19–32 (1966).

Templeton, N. S. *et al.* Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat. Biotechnol.* **15**, 647–652 (1997).

Thomas, C. E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M. G. & Lowenstein, P. R. Preexisting antiadenoviral immunity is not a barrier to efficient and stable transduction of the brain, mediated by novel high-capacity adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **12**, 839–846 (2001).

Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003).

Thomas, M. & Klivanov, A. M. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14640–14645 (2002).

Tinsley, J. M. *et al.* Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* **360**, 591–593 (1992).

Tollefson, A. E. *et al.* Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* **392**, 726–730 (1998).

Tollefson, A. E., Krajcsi, P., Pursley, M. H., Gooding, L. R. & Wold, W. S. A 14,500 MW protein is coded by region E3 of group C human adenoviruses. *Virology* **175**, 19–29 (1990).

Tollefson, A. E., Krajcsi, P., Yei, S. P., Carlin, C. R. & Wold, W. S. A 10,400-molecular-weight membrane protein is coded by region E3 of adenovirus. *J. Virol.* **64**, 794–801 (1990).

Tollefson, A. E. *et al.* Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins. *J. Virol.* **75**, 8875–8887 (2001).

Tollefson, A. E. & Wold, W. S. Identification and gene mapping of a 14,700-

molecular-weight protein encoded by region E3 of group C adenoviruses. *J. Virol.* **62**, 33–39 (1988).

Tousignant, J. D. *et al.* DNA sequences in cationic lipid:pDNA-mediated systemic toxicities. *Hum. Gene Ther.* **14**, 203–214 (2003).

Tranchant, I., Thompson, B., Nicolazzi, C., Mignet, N. & Scherman, D. Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S24–35 (2004).

Trapani, J. A., Davis, J., Sutton, V. R. & Smyth, M. J. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 323–329 (2000).

Tros de Ilarduya, C., Sun, Y. & Düzgüneş, N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci* **40**, 159–170 (2010).

Tsygankov, A. Y. Current developments in anti-HIV/AIDS gene therapy. *Curr Opin Investig Drugs* **10**, 137–149 (2009).

Tufariello, J., Cho, S. & Horwitz, M. S. The adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which inhibits cytolysis by tumor necrosis factor increases the virulence of vaccinia virus in a murine pneumonia model. *J. Virol.* **68**, 453–462 (1994).

Uchida, M., Natsume, H., Kobayashi, D., Sugibayashi, K. & Morimoto, Y. Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-L-lactic acid microspheres using a Helios gun system. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 690–693 (2002).

Unger, E. C., Hersh, E., Vannan, M., Matsunaga, T. O. & McCreery, T. Local drug and gene delivery through microbubbles. *Prog Cardiovasc Dis* **44**, 45–54 (2001).

Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. & Sander, C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**, 4637–4648 (1991).

Vallee, R. B. & Gee, M. A. Make room for dynein. *Trends Cell Biol.* **8**, 490–494 (1998).

Vaughan, E. E. & Dean, D. A. Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol. Ther.* **13**, 422–428 (2006).

Vaughan, K. T. & Vallee, R. B. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J. Cell Biol.* **131**, 1507–1516 (1995).

Veldhoen, S., Laufer, S. D. & Restle, T. Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery. *Int J Mol Sci* **9**, 1276–1320 (2008).

Verkman, A. S. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 27–33 (2002).

Villunger, A. *et al.* p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036–1038 (2003).

Von Gersdorff, K. *et al.* The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Mol. Ther.* **14**, 745–753 (2006).

Wagner, K. R., McPherron, A. C., Winik, N. & Lee, S.-J. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann. Neurol.* **52**, 832–836 (2002).

Wajant, H. & Scheurich, P. TNFR₁-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS J.* **278**, 862–876 (2011).

Wallrabe, H. & Periasamy, A. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 19–27 (2005).

Walther, W., Stein, U., Siegel, R., Fichtner, I. & Schlag, P. M. Use of the nuclease inhibitor aurintricarboxylic acid (ATA) for improved non-viral intratumoral in vivo gene transfer by jet-injection. *J Gene Med* **7**, 477–485 (2005).

Wang, B., Li, J. & Xiao, X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13714–13719 (2000).

Wasungu, L. & Hoekstra, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J Control Release* **116**, 255–264 (2006).

Watanabe, T. K. *et al.* Cloning, expression, and mapping of TCTEL₁, a putative human homologue of murine Tcte1, to 6q. *Cytogenet. Cell Genet.* **73**, 153–156 (1996).

Waterman-Storer, C. M., Karki, S. & Holzbaur, E. L. The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein cofilin (Arp-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1634–1638 (1995).

Waterman-Storer, C. M. *et al.* The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12180–12185 (1997).

Watson, P., Forster, R., Palmer, K. J., Pepperkok, R. & Stephens, D. J. Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nat. Cell Biol.* **7**, 48–55 (2005).

Wehling, M., Spencer, M. J. & Tidball, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell Biol.* **155**, 123–131 (2001).

Wei, C. M., Gibson, M., Spear, P. G. & Scolnick, E. M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **39**, 935–944 (1981).

Weigel, S. & Dobbelstein, M. The nuclear export signal within the E4orf6

protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J. Virol.* **74**, 764–772 (2000).

Wells, A. L. *et al.* Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**, 505–508 (1999).

Welsh, M. J. Gene transfer for cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **104**, 1165–1166 (1999).

Welte, M. A. Bidirectional transport along microtubules. *Curr. Biol* **14**, R525–537 (2004).

Westermann, S. & Weber, K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 938–947 (2003).

White, S. R. & Lauring, B. AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* **8**, 1657–1667 (2007).

Whitmore, M., Li, S. & Huang, L. LPD lipopolyplex initiates a potent cytokine response and inhibits tumor growth. *Gene Ther.* **6**, 1867–1875 (1999).

Whittaker, G. R., Kann, M. & Helenius, A. Viral entry into the nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 627–651 (2000).

Wilde, A. & Zheng, Y. Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* **284**, 1359–1362 (1999).

Wilson, J. M. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **96**, 151–157 (2009).

Wissing, D., Mouritzen, H., Egeblad, M., Poirier, G. G. & Jäättelä, M. Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A₂ in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5073–5077 (1997).

Wloga, D. & Gaertig, J. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell. Sci.* **123**, 3447–3455 (2010).

Wold, W. S. *et al.* Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 380–386 (1999).

Wold, W. S., Hermiston, T. W. & Tollefson, A. E. Adenovirus proteins that subvert host defenses. *Trends Microbiol.* **2**, 437–443 (1994).

Wold, W. S., Tollefson, A. E. & Hermiston, T. W. E₃ transcription unit of adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199** (Pt 1), 237–274 (1995).

Wolff, J. A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465–1468 (1990).

Wooddell, C. I. *et al.* Muscle damage after delivery of naked plasmid DNA into skeletal muscles is batch dependent. *Hum. Gene Ther.* **22**, 225–235 (2011).

Wu, G. Y. & Wu, C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4429–4432 (1987).

Wu, H., Maciejewski, M. W., Takebe, S. & King, S. M. Solution structure of the Tctex1 dimer reveals a mechanism for dynein-cargo interactions. *Structure* **13**, 213–223 (2005).

Xenariou, S. *et al.* Using magnetic forces to enhance non-viral gene transfer to airway epithelium in vivo. *Gene Ther.* **13**, 1545–1552 (2006).

Xu, Y., Piston, D. W. & Johnson, C. H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 151–156 (1999).

Yamaoka, S. *et al.* Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 1231–1240 (1998).

Ye, J., Xie, X., Tarassishin, L. & Horwitz, M. S. Regulation of the NF-kappaB activation pathway by isolated domains of FIP3/IKKgamma, a component of the IkappaB-alpha kinase complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 9882–9889 (2000).

Yew, N. S. *et al.* Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol. Ther.* **1**, 255–262 (2000).

Ying, H. & Yue, B. Y. J. T. Cellular and molecular biology of optineurin. *Int Rev Cell Mol Biol* **294**, 223–258 (2012).

Yu, M., Chen, W. & Zhang, J. p53 gene therapy for pulmonary metastasis tumor from hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs* **21**, 882–884 (2010).

Zelphati, O., Liang, X., Hobart, P. & Felgner, P. L. Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **10**, 15–24 (1999).

Zhang, G., Budker, V. & Wolff, J. A. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1735–1737 (1999).

Zhang, G. *et al.* Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1763–1772 (1997).

Zhang, J.-S., Liu, F. & Huang, L. Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 689–698 (2005).

Zhang, Y. & Duan, D. Novel mini-dystrophin gene dual adeno-associated virus vectors restore neuronal nitric oxide synthase expression at the sarcolemma. *Hum. Gene Ther.* **23**, 98–103 (2012).

Zhang, Y., Satterlee, A. & Huang, L. In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? *Mol. Ther.* **20**, 1298–1304 (2012).

Zhou, H., Liu, D. & Liang, C. Challenges and strategies: the immune responses in gene therapy. *Med Res Rev* **24**, 748–761 (2004).

Zhu, G., Wu, C.-J., Zhao, Y. & Ashwell, J. D. Optineurin negatively regulates TNF α -induced NF- κ B activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr. Biol.* **17**, 1438–1443 (2007).

Zuhorn, I. S., Kalicharan, R. & Hoekstra, D. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 18021–18028 (2002).

Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. *Hum. Gene Ther.* **13**, 3–13 (2002).

Thérapie génique de l'adrénoleucodystrophie : des nouvelles des quatre enfants traités - Association ELA. *Association ELA* (2012). at <<http://ela-asso.com/recherche/therapie-genique-de-ladrenoleucodystrophie-des-nouvelles-des-quatre-enfants-traites/>>

Viral entry into the nucleus. [Annu Rev Cell Dev Biol. 2000] - PubMed - NCBI. (2012). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/11031249>>

Lucie PIGEON

Interactions moléculaires et cellulaires entre les protéines E3-14.7K FIP-1 et les microtubules : Application dans le transfert de gènes

L'objectif de la thérapie génique est de guérir des déficiences génétiques et de nombreuses maladies acquises par l'introduction d'acides nucléiques dans les cellules mammifères. Les vecteurs chimiques sont une alternative aux vecteurs viraux pour le transfert de gène, leur immunogénicité est réduite, en plus de leur faible coût et de la facilité de leur production. Jusqu'à présent, les liposomes et les polymères cationiques sont les vecteurs chimiques les plus étudiés et utilisés pour le transfert d'ADN plasmidique (ADNp) thérapeutique. Parmi les multiples barrières biologiques, la diffusion cytosolique limitée de l'ADNp est critique pour le niveau d'expression du transgène. Le but de ce travail de thèse était d'identifier un peptide de liaison à la dynéine, qui serait capable de recruter la protéine motrice dynéine et de faciliter le transport d'ADNp vers le noyau le long des microtubules. Nous avons donc étudié le réseau d'interaction de la protéine adénovirale E3-14.7K. E3-14.7K est indirectement en interaction avec la chaîne légère de la dynéine TCTEL1 par l'intermédiaire de FIP-1. Différentes techniques ont été utilisées pour analyser les interactions de ces différentes protéines telles que Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), Förster Resonance Energy Transfer (FRET), Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM), immunoprécipitation et Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM). La technique de BRET nous a permis d'identifier un peptide de 20 acides aminés d'E3-14.7K (P79-98) responsable de son interaction avec FIP-1. Associé à des Quantum Dots P79-98 (P79-98-Qdot) colocalise avec les microtubules isolés et dans les cellules HeLa. Nous avons mis au point une méthode de greffage du peptide directement sur l'ADNp. Une fois greffé avec P79-98 l'ADNp est capable d'interagir avec les microtubules dans les cellules HeLa et de migrer activement jusqu'au noyau. P79-98 améliore l'efficacité de la transfection des HeLa jusqu'à 77%.

Mots clés : Thérapie génique – trafic – microtubule – dynéine – E3-14.7K

Molecular and cellular interactions between proteins E3-14.7K, FIP-1 and microtubules: Application in gene transfer

Gene therapy aims to cure genetic deficiencies and a large variety of acquired diseases by the introduction of nucleic acids into mammalian cells. As an alternative to viral gene delivery vectors, chemical vectors have been developed with reduced immunogenicity, in addition to low cost and ease of production. So far, cationic liposomes and cationic polymers are the most studied and used chemical vectors to transfer therapeutic plasmid DNA (pDNA). Among multiple biological barriers, the limited cytosolic diffusion of pDNA is critical for level of transgene expression. The goal of this work was to identify a dynein-binding peptide which would facilitate the transport of pDNA to the nucleus along microtubules. To this end, we have investigated interaction network of adenoviral protein E3 14.7K. E314.7K is indirectly interacting with Dynein Light Chain TCTEL1 through FIP-1. Different techniques have been used to analyze the protein interactions such as Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), Förster Resonance Energy Transfer (FRET), Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM), immunoprecipitation and Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM). BRET technique allow us to identify a 20 amino acids peptide of E3 14.7K (P79-98) responsible for its interaction with FIP-1. Associated with Quantum Dots P79-98 (P79-98-Qdot) gave colocalizations with isolated microtubules and microtubules in HeLa cells. We have developed the grafting of the peptide directly on the pDNA. Once grafted with P79-98 pDNA is able to interact with microtubules in HeLa cells and traffick along them toward nucleus. Remarkably transfection efficiency of polyplexes is increased up to 77% in HeLa cells.

Keywords: gene therapy – traffic – microtubule – dynein – E3-14.7K



Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 02

