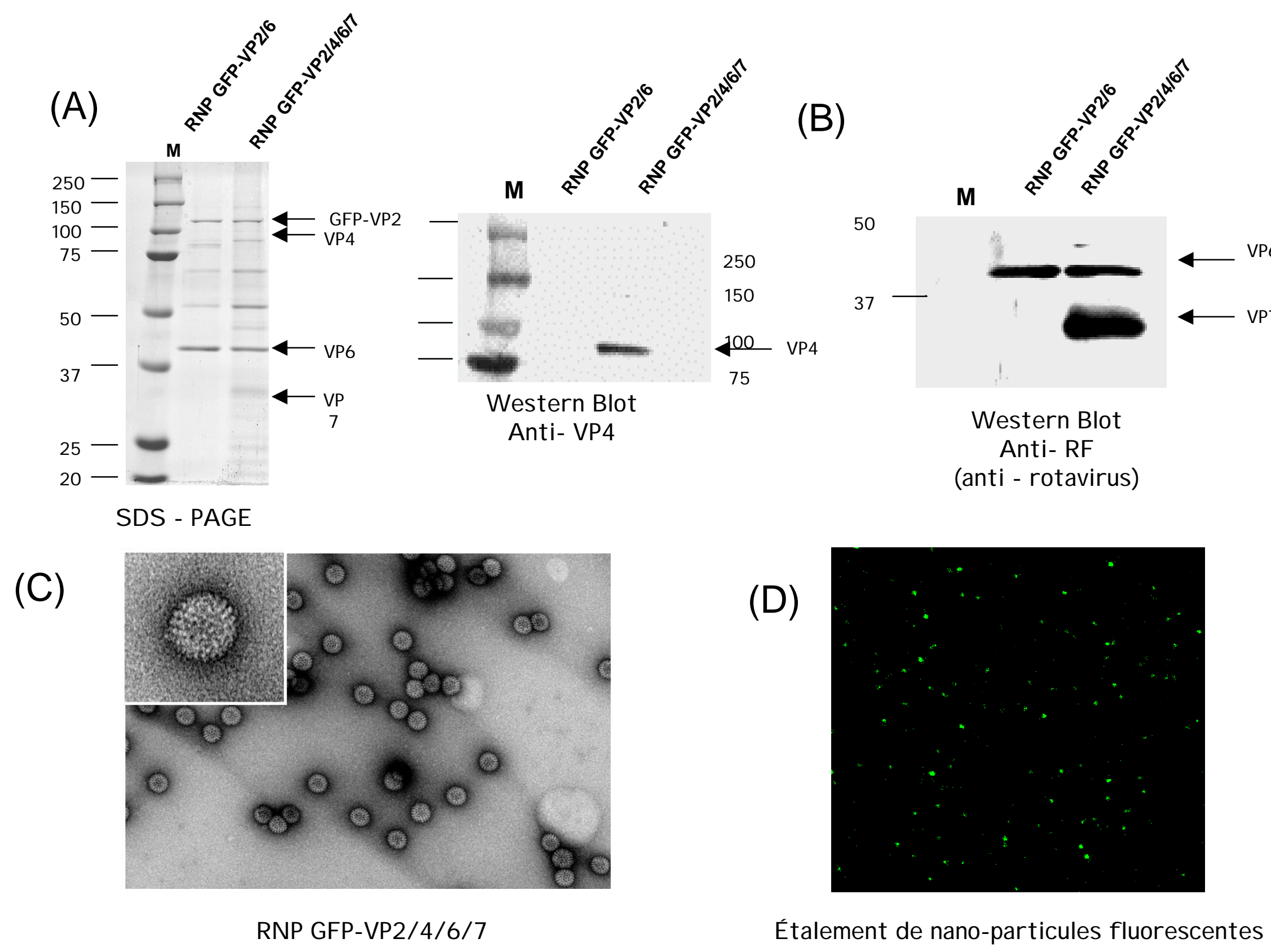


Nous développons un nouveau type de vecteur thérapeutique pour les cellules intestinales. Ce vecteur est basé sur l'utilisation de nano-particules dérivées d'un virus à tropisme intestinal : le rotavirus. Le rotavirus est caractérisé par une spécificité pour les entérocytes intestinaux et représente la principale cause de diarrhées aiguës virales des enfants. Les nano-particules sont caractérisées par une structure identique à la capsid virale. Ces particules sont composées de trois couches concentriques de protéines structurales entourant une cavité prévue pour recevoir le matériel génétique viral. Les nano-particules sont obtenues *in vitro* dans des cellules d'insecte en culture co-infectées par des vecteurs baculovirus codant pour les protéines de capsid du rotavirus. Elles correspondent à un auto-assemblage de protéine pures. Les nano-particules recombinantes sont dépourvues de caractère infectieux puisqu'elles sont dépourvues de matériel génétique viral, ce qui empêche leur réplication dans les cellules cibles. Nous avons développé, par génie génétique, la possibilité d'associer des molécules aux 120 exemplaires de la protéine VP2 présents dans chaque particule et qui en constituent la couche la plus interne. Ces nano-particules permettent ainsi l'introduction de molécules à l'intérieur des cellules intestinales.

Ce nano-vecteur se distingue des vecteurs viraux développés pour la thérapie génique et servant à introduire dans les cellules un matériel génétique nouveau qui s'intégrera dans les chromosomes afin de modifier définitivement le génome. De tels vecteurs viraux ont pour but de permettre l'expression d'une nouvelle protéine préalablement absente ou inopérante du fait de mutations. Le nano-vecteur que nous développons est non répliquatif, c'est à dire que, contrairement aux vecteurs viraux, il n'occasionne pas de persistance des effets biologiques au delà de l'arrêt du traitement.



Structure des nano-particules. Les protéines constituant les nano-particules ont été caractérisées (A) biochimiquement par SDS-PAGE, (B) immunologiquement par Western-Blot, (C) structurellement par microscopie électronique et (D) par microscopie à fluorescence après étalement des particules sur une lamelle en verre.

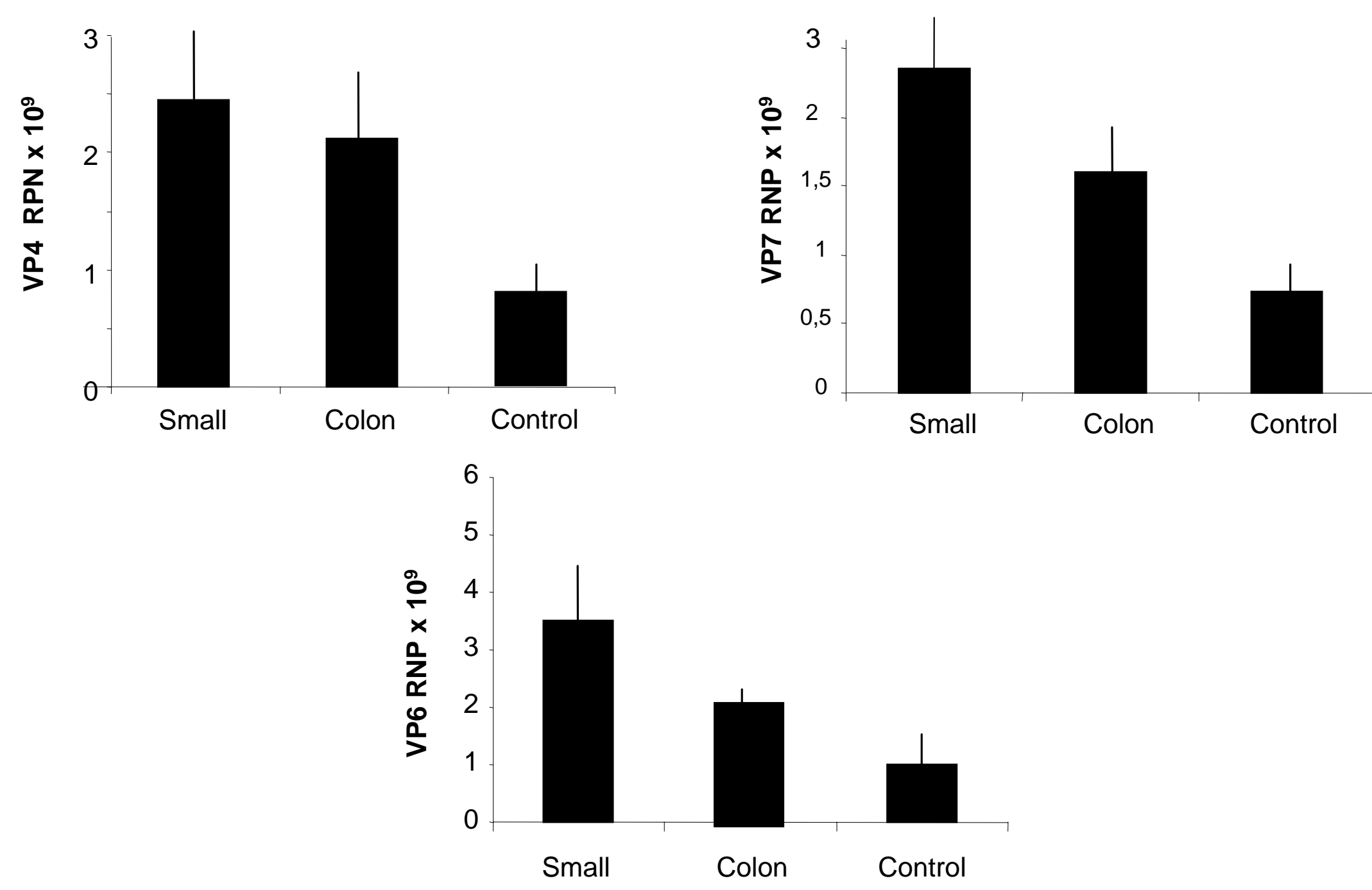
Structure des nano-particules

Deux types de nano-particules ont été utilisés dans cette étude. Il s'agit soit de particules formées de protéines de la couche la plus interne et de la couche intermédiaire, à savoir les protéines de structure VP2 à l'intérieur, entourées de multimères de la protéine VP6. Nous les avons nommées RNP 2/6. L'autre type de particules est formé des trois couches protéiques, puisqu'aux deux couches précédemment citées sont ajoutées les protéines VP7 et les protéines de spicules VP4, reconstituant ainsi la couche externe. Nous les avons nommées RNP 2/6/7/4. C'est la présence de la protéine de spicule VP4 qui détermine la reconnaissance spécifique des nano-particules par les entérocytes et qui conditionne ainsi leur entrée dans ces cellules.

Pour le développement et la mise au point de ces nano-vecteurs, nous avons associé 120 exemplaires par nano-particule d'une protéine fluorescente, la Green Fluorescent Protein ou GFP. Il devient dès lors possible de visualiser la présence de ces nano-particules et de leur contenu par microscopie à fluorescence.

L'assemblage des protéines constitutives de la capsid de ces nano-particules a été contrôlé par plusieurs approches :

- La composition biochimique en protéines a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un détergent anionique, le sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE). Cette approche permet non seulement de contrôler la présence de chacune des protéines constituant la capsid, mais en outre d'apprécier la stœchiométrie des protéines de structure des particules.
- Les protéines constitutives ont été d'autre part identifiées sur le plan immunologique par leur reconnaissance par des anticorps spécifiques (Western Blot).
- Enfin, nous avons caractérisé et contrôlé l'agencement macro-moléculaire de ces nano-particules par microscopie électronique.



Dosage, par immuno-essai, de protéines de structure des nano-particules dans les cellules intestinales. Des nano-particules RNP 2/6/7/4 ont été administrées à des souris. Les protéines VP6, VP7 et VP4 ont été quantifiées par ELISA dans les intestins.

Quantification de l'entrée dans les cellules des nano-particules

La première méthode consiste à identifier ces objets par microscopie à fluorescence.

En présence de cellules en culture, l'adsorption des nano-particules a été suivie par microscopie confocale. Les nano-particules ayant subi une protéolyse limitée par la trypsine sont caractérisées par un fort pouvoir d'adsorption sur les cellules cibles.

Leur adsorption a également pu être quantifiée *in vivo*, après administration à des animaux (souris). Sur des coupes d'intestin, la protéine GFP produit une fluorescence spécifiquement localisée à l'intérieur des entérocytes des villosités intestinales.

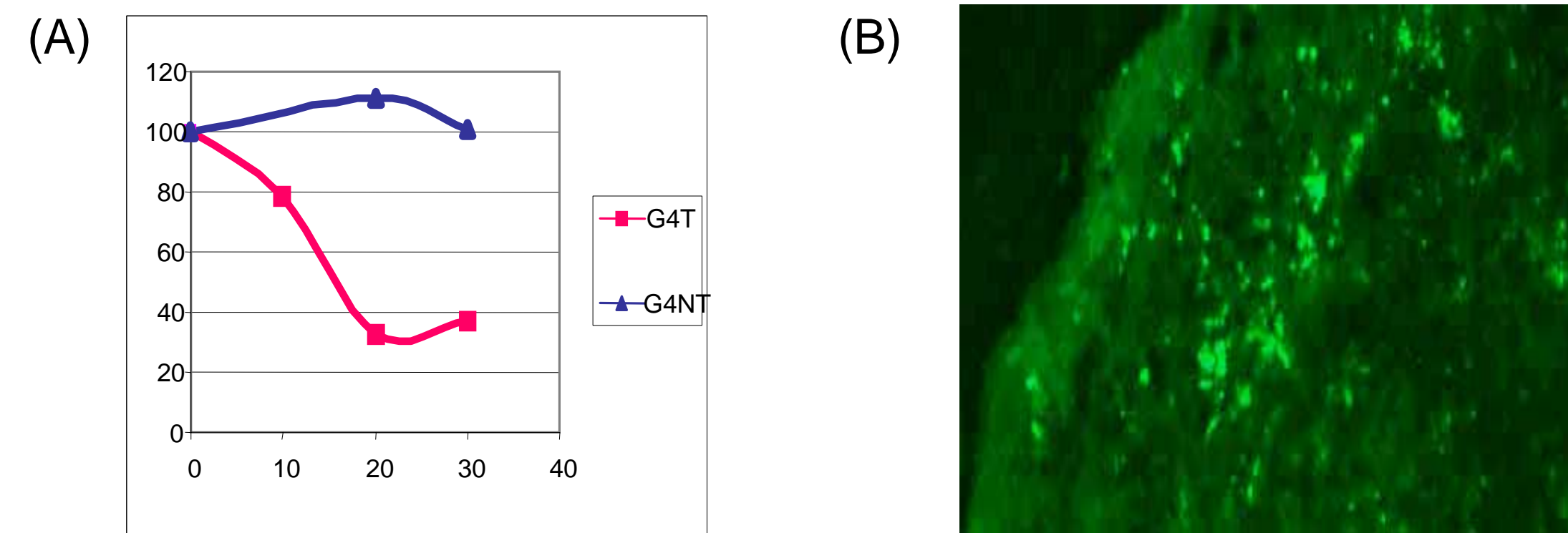
La seconde méthode pour quantifier l'entrée des nano-particules consiste à identifier les protéines introduites dans les cellules intestinales grâce à leur reconnaissance par des anticorps spécifiques. Il s'agit de mesures quantitatives par des immuno-essais (test ELISA). Les protéines VP6, VP7 et VP4, c'est à dire les différentes protéines de structures ont ainsi pu être détectées dans des préparations de l'ensemble des cellules intestinales alors que seuls les entérocytes constituant la simple couche cellulaire la plus externe des villosités intestinales renferment ces protéines de nano-particules.

Potentiel thérapeutique des nano-particules

La nécessité de vecteurs thérapeutiques non répliquatifs pour des traitements locaux ciblés est évidente. Elle est aujourd'hui rendue possible par l'ingénierie de nano-particules protéiques permettant d'exploiter le tropisme cellulaire spécifique que seuls les virus ont su développer. Nos résultats montrent qu'il est possible d'utiliser ces nano-particules en temps que vecteurs. Ces nano-particules sont administrables par voie orale et, comme le virus dont elles sont dérivées, elles protègent leur contenu des sucs digestifs. Il faut remarquer que la capsid protéique constituant ces nano-particules protège leur contenu des enzymes protéolytiques intestinales mais que réciproquement, la maturation protéolytique par la trypsine pancréatique de la protéine la plus externe de la capsid est indispensable à l'efficacité et la spécificité de l'interaction de ces particules avec les cellules intestinales.

Dans le cas des particules développées dans cette étude, les pathologies intestinales sont prioritairement visées. D'autres cibles pourront donc être développées à partir d'autres virus.

Par contre nous avons mis en évidence des limites d'utilisation de ces vecteurs. En effet, l'induction chimique d'une altération du tissu cible peut empêcher l'usage de ces nano-particules. Ce résultat à priori décevant pour des perspectives thérapeutiques nous conduit actuellement à développer une thématique d'étude des relations entre l'hôte et les microorganismes, en particulier la microflore intestinale locale, au cours des poussées inflammatoires aiguës localisées caractéristiques de ces pathologies.



Entrée des nano-particules dans les cellules cibles. (A) Adsorption cellulaire des nano-particules quantifiée par fluorescence des particules natives non traitées par la trypsine (G4NT) ou maturées par la trypsine (G4T). (B) Images en microscopie à fluorescence de l'épithélium intestinal de souris ayant ingéré 4 heures auparavant 10^{12} nano-particules fluorescentes.

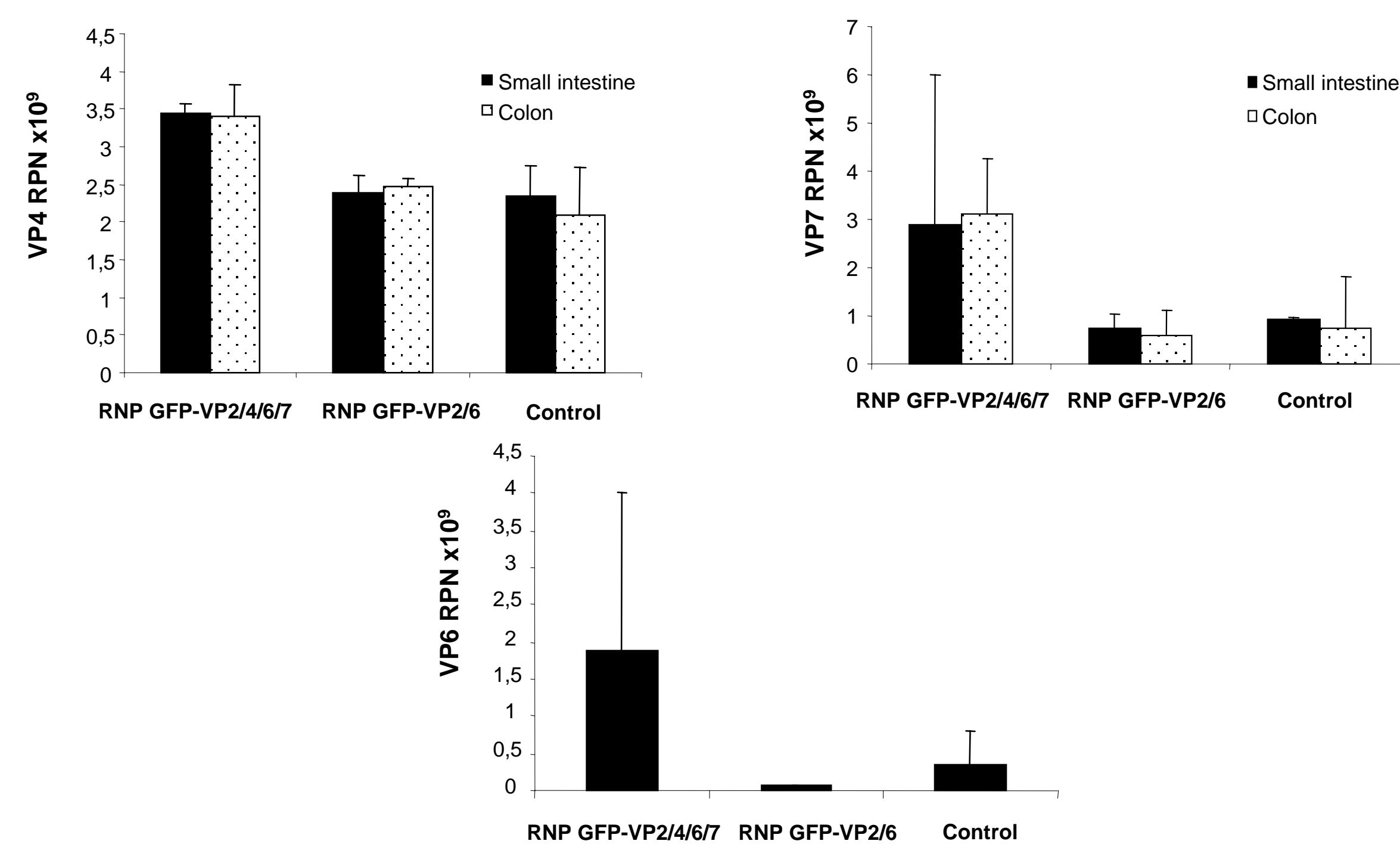
Administration per os à des souris et analyse de la distribution du contenu des nano-particules

Nous avons comparé plusieurs voies d'administration chez les souris. La voie orale (gavage) s'est avérée être la plus facile et la plus efficace. Elle permet d'administrer 500 μ l puis à nouveau 500 μ l une heure plus tard. Comparativement, les voies d'administration intra-intestinale ou intra-rectale sont plus difficiles à réaliser et permettent d'administrer des volumes moindres.

10^{12} particules ont été administrées par souris, en deux fois ($2 \times 5 \times 10^{11}$ particules) à une heure d'intervalle. Les souris ont été analysées 4 heures après la seconde prise.

L'examen microscopique par immunofluorescence de coupes d'intestin montre la présence de la protéine GFP fluorescente véhiculée par les nano-particules à l'intérieur des cellules intestinales.

Du point de vue immuno-chimique, les tests ELISA permettent une comparaison de la distribution dans l'intestin ou le colon des protéines constitutives des nano-particules et ainsi de leur entrée préférentielle dans les cellules de l'intestin grêle.



Dosage, par immuno-essai, de protéines de structure des nano-particules dans les cellules après induction chimique d'une inflammation intestinale. L'inflammation est consécutive à l'administration d'acide trinitrobenzène sulfonique. Des nano-particules complètes RNP 2/6/7/4 ou incomplètes RNP 2/6 ont été administrées à des souris. Les protéines VP6, VP7 et VP4 ont été quantifiées par ELISA.

Administration de nano-particules à des souris atteintes de colite expérimentale

Des modèles animaux d'inflammation intestinale permettent d'appréhender les mécanismes qui interviennent au cours des maladies inflammatoires intestinales comme la maladie de Crohn ou la recto-colite ulcéro-hémorragique. Dans le modèle de souris que nous avons expérimenté, l'administration d'un agent chimique, l'acide trinitrobenzène sulfonique, provoque des lésions inflammatoires au niveau du côlon et de l'intestin grêle. Il apparaît clairement que ce modèle d'inflammation interfère avec l'usage des nano-particules et empêche leur adsorption au cours des épisodes d'inflammation aiguë.