



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 17457

**To cite this version :**

Laigle, Mathilde. *Mise au point d'un protocole de lentigenèse chez le chien et du suivi de l'expression par imagerie in vivo, le cellvizio®*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 61 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE LENTIGENÈSE CHEZ LE CHIEN ET DU SUIVI DE L'EXPRESSION PAR IMAGERIE IN VIVO, LE CELLVIZIO®

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**LAIGLE Mathilde**

Née, le 20 juillet 1990 à Amiens (80)

---

**Directeur de thèse : Mme Séverine BOULLIER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**Mme Bettina COUDERC**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Séverine BOULLIER**  
**M. Stéphane BERTAGNOLI**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**Mme Emmanuelle TOTAIN**

Ingénieur d'études à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 06/09/2016

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES- MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>



# REMERCIEMENTS

## **A Madame le Professeur Bettina Couderc**

Professeur des Universités de Toulouse  
*Biologie moléculaire et biotechnologies*  
Qui m'a fait l'honneur de présider cette thèse  
Hommages respectueux

## **A Madame le Docteur Séverine Boullier**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Immunologie générale et médicale*  
Pour m'avoir permis de participer à ce projet  
Pour son accompagnement, sa disponibilité  
Sincère reconnaissance

## **A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Pathologie infectieuse*  
Pour avoir accepté de participer au jury de thèse malgré un emploi du temps très chargé  
Sincères remerciements

## **A Madame Emmanuelle Totain**

Ingénieur d'études à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Infectiologie et vaccinologie*  
Pour son aide tout au long de la réalisation de ce travail,  
sa disponibilité et ses précieux conseils,  
Chaleureux remerciements



# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS .....	4
LISTE DES TABLEAUX .....	5
LISTE DES GRAPHIQUES .....	6
LISTE DES ABREVIATIONS .....	7
INTRODUCTION.....	8
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
I. Etude de la peau du chien.....	10
A. Histologie topographique de la peau .....	10
1. L'épiderme .....	10
2. La membrane basale.....	11
3. Le derme.....	12
4. L'hypoderme .....	12
5. La vascularisation de la peau.....	12
B. Structure histologique de l'épiderme.....	13
1. Les kératinocytes.....	14
2. Les mélanocytes .....	15
3. Les cellules de Langerhans.....	16
4. Les cellules de Merkel.....	16
C. Le système immunitaire cutané.....	16
1. Les cellules de l'immunité cutanée .....	16
2. Fonctionnement de l'immunité cutanée .....	18
II. Vecteurs de gènes et immunité.....	19
A. Vecteurs non viraux.....	19
1. Les plasmides / ADN nu .....	19
2. Liposomes .....	19
B. Vecteurs viraux.....	20
1. Vecteurs de gène rétroviraux.....	20
2. Virus associés aux adénovirus.....	21
3. Vecteurs adénoviraux .....	21
4. Bilan : les principales caractéristiques des vecteurs de gènes .....	22

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	23
I. Matériels et méthodes.....	23
A. Animaux .....	23
B. Vecteurs de gènes.....	24
1. Promoteurs .....	24
2. Fluorochromes.....	25
3. Autres éléments de construction des lentivecteurs.....	25
4. Niveau de pureté.....	25
5. Bilan : les différents lentivecteurs utilisés.....	26
C. Administration épidermique.....	27
1. Injection.....	27
2. Tape Stripping .....	27
3. Raclage .....	27
4. Application topique de la solution de lentivecteurs après Tape Stripping ou Raclage .....	28
D. Suivi non invasif de l'expression du transgène .....	28
1. Cellvizio® Dual Band .....	28
2. Méthode d'acquisition.....	29
E. Analyses .....	29
F. Contrôle de la fluorescence par biopsie.....	30
G. Bilan : liste des différents essais réalisés.....	30
II. Résultats .....	31
A. V0.1 : Administration du lentivecteur par injection.....	32
B. V0.2 : Administration topique des lentivecteurs après abrasion de l'épiderme .....	33
1. Raclage .....	33
2. Tape Stripping .....	34
C. V0.3 : essai d'un nouveau promoteur.....	35
D. V0.4.....	36
1. U : Comparaison de deux administrateurs différents .....	36
2. DK : essai d'un promoteur inductible .....	38
E. V0.5 : Comparaison de deux promoteurs avec le même fluorochrome .....	38
III. Discussion .....	41
A. Animaux .....	41
B. Vecteurs de gènes.....	42
1. Promoteurs .....	42
2. Fluorochromes.....	42
3. Niveau de pureté.....	45

C. Méthode d'administration .....	45
1. Injection intradermique .....	45
2. Abrasion de l'épiderme et administration topique des lentivecteurs.....	46
3. Nouvelle méthode d'administration .....	49
D. Suivi non invasif de l'expression du transgène .....	50
1. Influence de l'ordre de lecture des points.....	50
2. Temps de chauffage du laser .....	50
E. Analyse .....	51
F. Biopsies .....	53
CONCLUSION .....	54
BIBLIOGRAPHIE .....	55
Annexe 1 : Méthode d'analyse des vidéos .....	59
Annexe 2 : Analyse statistique des moyennes d'intensité des essais V0.2 à V0.5.....	60

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Coupe histologique de la peau du cou d'un chien sain (Vetagrosup)

Figure 2 : Coupe histologique d'épiderme de chien

Figure 3 : Eléments du derme (Miller, Griffin, Campbell 2013)

Figure 4 : Section schématique de peau de chien montrant la vascularisation sanguine (Evans, de Lahunta 2013)

Figure 5 : Symbole et classification de lentivecteurs utilisés

Figure 6 : Mécanisme du système inductible Tet-On 3G (document Vectalys)

Figure 7 : Spectres d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) ; (a) ZsGreen ; (b) TdTomato ; Source : [www.chroma.com](http://www.chroma.com)

Figure 8 : étapes de purification des lentivecteurs du laboratoire Vectalys ; d'après document Vectalys « Lentiviral vectors production »

Figure 9 : Schéma d'administration vue dorsale DH (V0.2 - juillet 2015) (d'après schéma d'E. Totain)

Figure 10 : Vue dorsale de la zone d'administration de DH (V0.2 - juillet 2015)

Figure 11 : Photographie du Cellvizio®

Figure 12 : Schéma de lecture d'un point

Figure 13 : Schématisation de l'objectif de l'administration (schéma d'épiderme obtenu sur [www.shutterstock.com](http://www.shutterstock.com))

Figure 14 : Schéma d'administration V0.1 (chiennes DA et DC), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain)

Figure 15 : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des points de DA à J14 : (a) et (b) : contrôle ; (c) et (d) : point transfecté

Figure 15 : Coupe transversale de peau d'un point transfecté (chienne DC) observée au microscope à épifluorescence (Laboratoire Vectalys)

Figure 16 : Schéma d'administration V0.2 (chienne DH), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain). Méthode d'administration : R = Raclage , TS = Tape Stripping ; Administrateur = C. Pressanti

Figure 17 : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des différents points (V0.2, DH, raclage, J28) : (a) contrôle ; (b) TdTomato-D ; (c) ZsGreen-C2

Figure 18 : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des différents points (V0.2, DH, Tape Stripping, J28) : (a) contrôle ; (b) TdTomato-D ; (c) ZsGreen-C2

Figure 19 : Schéma d'administration V0.3 (chienne DB), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain) Administrateur = S. Boullier ; Méthode d'administration = raclage

Figure 20 : Schéma d'administration V0.4 (chienne U), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain) Administrateurs : SBO = S. Boullier, CP = C.Pressanti ; Méthode d'administration = raclage

Figure 21 : : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des différents points (V0.4, U, CP, J29) (a) contrôle, (b) ZsGreen-C2 (point 5)

Figure 22 : Coupe histologique de peau du point 5 (CP, ZsGreenC2) de V0.4 U à J29 observée au microscope optique à épifluorescence à un même endroit - A gauche : sans filtre ; A droite : avec filtre vert

Figure 23 : Schéma d'administration V0.4 (chienne DK), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain) Administrateur = S. Boullier ; Méthode d'administration = raclage

Figure 24 : Schéma d'administration V0.5 (chienne EA), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain) Administrateur = S. Boullier ; Méthode d'administration = raclage

Figure 25 : Coupe histologique de peau du point 5 (V0.5) à J29 observée au microscope optique à épifluorescence à un même endroit - A gauche : sans filtre ; A droite : avec filtre vert

Figure 26 : Spectre d'absorption (courbe bleu) et d'émission (courbe rouge) de TdTomato, et plages d'excitation (flèches verte claire et rouge) et de réception (entre les lignes verte et rouge foncé) du Cellvizio®

Figure 27 : Spectre d'absorption (courbe bleu) et d'émission (courbe rouge) de ZsGreen, et plages d'excitation (flèches verte claire et rouge) et de réception (entre les lignes verte et rouge foncé) du Cellvizio®

Figure 28 : (a) Evolution de l'intensité maximale sur une acquisition (V0.5 ; point 1 contrôle ; J5 ; MEAN Max=957) avec le laser « vert » (488nm) - (b à k) Images correspondant aux pics d'intensité

Figure 29 : (a) Evolution de l'intensité maximale sur une acquisition (V0.5 ; point 1 contrôle ; J5 ; MEAN Max=488) avec le laser « rouge » (660nm) - (b à h) Images correspondant aux pics d'intensité

Figure 30 : Spectre d'absorption (ligne noire) et d'émission (ligne rouge) de iRFP (d'après Stepanenko et al. 2014) et longueur d'onde d'excitation (flèche rouge) et fenêtre de lecture (lignes rouge foncé) du laser « rouge » du Cellvizio®

Figure 31 : Coupe histologique de peau de chien (a) 1h après TS (b) 72h après TS (Vidémont et al. 2011)

Figure 32 : Schéma des zones de test des méthodes d'application

Figure 33 : Coupe histologique d'épiderme de chien (a) contrôle ; (b) après Tape Stripping ; (c) après raclage

Figure 34 : Exemple de dispositifs disponibles en Europe pour la réalisation des « prick tests » (d'après Masse et al. 2011)

Figure 35 : Images Cellvizio® obtenues 24h après administration intradermique d'anticorps anti-kératinocytes couplés à un fluorochrome vert dans l'épiderme de chiens

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Comparaison des principaux vecteurs de gènes

Tableau 2 : Caractéristiques des différents lentivecteurs utilisés

Tableau 3 : Bilan des essais réalisés

Tableau 4 : Coût moyen des animaux de laboratoire en Grande-Bretagne (Rashid et al. 2004)

Tableau 5 : p-value obtenu avec un test de Wilcoxon entre les intensités moyennes d'un point donné et du point contrôle correspondant pour V0.4 (chienne U) : vert = différence significative ; rouge = différence non significative ( $\alpha=5\%$ )

Tableau 6 : Maximum, minimum et différence entre ces deux valeurs, pour les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence des différents essais

# LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 1 : (a) Evolution de la moyenne des moyennes d'intensité de fluorescence des 3 points V0.2 R de J4 à J28 (b) Différence d'intensité de la moyenne des moyennes entre un point donné et le point contrôle

Graphique 2 : (a) Evolution de la moyenne des moyennes d'intensité des 3 points V0.2 TS de J4 à J28 (b) Différence d'intensité de la moyenne des moyennes entre un point donné et le point contrôle pour V0.2 TS

Graphique 3 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre un point donné et le point contrôle pour V0.2 TS

Graphique 4 : Moyenne des différences des « moyennes des moyennes » d'intensité de fluorescence entre ZsGreen et son contrôle tous jours confondus pour V0.2 R et V0.3

Graphique 5 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre un point donné et son point contrôle pour V0.3 (a) : administrateur = CP ; (b) : administrateur = SBO

Graphique 6 : Moyenne des différences des « moyennes des moyennes » d'intensité de fluorescence entre ZsGreen et son contrôle tous jours confondus pour V0.2 R et V0.4

Graphique 7 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre le point transfecté et le point contrôle pour V0.4 DK de J7 à J24

Graphique 8 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre un point donné et son point contrôle pour V0.5, points 1 à 3, de J5 à J22

Graphique 9 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre un point donné et son point contrôle pour V0.5, points 4 à 6, de J5 à J9

Graphique 10 : Evolution de la moyenne des maximums d'intensité (traits pleins) du point contrôle 1 de V0.5 et de leurs écarts-types respectifs (traits en pointillés) lors de la lecture avec le laser 488nm (vert) et 660nm (rouge)

Graphique 11 : Résultats tout administrateur confondu V0.4 chien U

Graphique 12 : Evolution de l'intensité de fluorescence Max (a) et Mean (b) sur un même point de 20 à 180min après allumage du laser

Graphique 13 : : Différence d'intensité de la moyenne des moyennes (MEAN Mean) entre un point donné et le point contrôle1 « début » (V0.5)

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

AAV : virus associés aux adénovirus  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNm : ARN messenger  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
EF-1 $\alpha$  : Facteur d'Elongation humain 1 $\alpha$   
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
HCB : Haut Conseil des Biotechnologies  
HPV : Papillomavirus Humains  
iRFP : infraRed Fluorescent Protein  
LB : lymphocytes B  
LPS : lipopolysaccharides  
LT : lymphocytes T  
NK : natural killer  
PAM : peptides antimicrobiens  
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PRR : Pattern Recognition Receptor  
TLR : récepteurs *Toll-like*  
TRE : Tetracycline Responsive Element  
TS : Tape Stripping  
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
VSV-G : protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse

# **INTRODUCTION**

L'**expérimentation animale** est utilisée depuis l'Antiquité, notamment par le célèbre philosophe grec Aristote au IV<sup>ème</sup> siècle avant J.C., qui étudiait les parties du corps humain à partir de celles observées lors de dissections chez des animaux (Maurin-Blanchet 2007). Cette expérimentation animale a permis de faire de nombreuses découvertes au fil du temps, comme le montrent les prix Nobel de médecine et de physiologie, dont plus de la moitié s'appuient sur des modèles animaux, comme par exemple les travaux d'I.P. Pavlov sur la physiologie digestive (1904), de R. Koch sur la tuberculose (1905), ou plus récemment de W.C. Campbell, S. Omura et T. Youyou sur les nouvelles thérapies contre les maladies parasitaires (2015) (Nobelprize.org 2016).

Pour continuer de progresser en recherche médicale, il est donc nécessaire de développer constamment de nouveaux modèles animaux. Ceci est l'objectif du **projet MAGenTA** (Modèles Animaux Gènes Thérapeutiques Applications) dont le but est de rechercher et de développer des **modèles animaux innovants** pour **valider des molécules thérapeutiques**, dans le domaine de la **santé uro-génitale humaine**. Ce projet est réalisé en collaboration avec différents organismes, dont le service de physiologie de l'ENVT et Vectalys pour l'étude ici présentée.

Le **chien** représente une très faible proportion des animaux de laboratoire (0,16% en France) (Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche 2014). C'est une espèce animale utilisée comme modèle naturel pour l'étude de maladies touchant l'Homme, comme par exemple la myopathie de Duchenne (Valentine et al. 1988; Willmann et al. 2009). Néanmoins dans la plupart des cas, le chien n'est pas naturellement atteint par une maladie ou un pathogène d'intérêt chez l'Homme. C'est notamment le cas pour les **Papillomavirus Humains (HPV)**, et plus particulièrement pour ceux responsables du **cancer du col de l'utérus chez la femme**. En effet, bien qu'il existe des Papillomavirus canins, les Papillomavirus sont généralement strictement spécifiques d'une espèce (Saveria Campo 2002).

Nous cherchons ici à faire du chien un **modèle** pour tester des **vaccins thérapeutiques**, notamment contre ces cellules cancéreuses suite à l'infection par certains HPV. Le principe est le suivant : le vaccin permet la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire contre un antigène donné exprimé par ces cellules infectées et transformées, conduisant à la destruction de ces cellules par le système immunitaire. Or le chien n'étant pas sensible aux HPV, ses cellules ne peuvent pas exprimer naturellement cet antigène cible du vaccin. Le but de cette étude est donc de **faire exprimer l'antigène cible** du vaccin par des **cellules de chien in vivo**. Pour cela, nous utiliserons le principe de la **thérapie génique**, qui consiste à transférer du matériel génétique dans les cellules d'un patient, dans un but thérapeutique. Nous avons ici choisi d'utiliser des **lentivecteurs** afin de réaliser ce transfert de gène aux cellules du chien.

Pour respecter la règle des « 3R » de Russell et Burch (1959) (réduction, raffinement, remplacement) qui s'appliquent à la recherche animale, nous avons ici choisi de suivre l'efficacité de ce transfert de gène par une méthode non invasive. Nous avons pour cela utilisé le **Cellvizio®**, un système d'imagerie microscopique laser utilisable in vivo et permettant de détecter la fluorescence au sein des tissus. En couplant l'antigène cible du vaccin à une **molécule fluorescente** nous pouvons ainsi visualiser les cellules porteuses du transgène. Pour pouvoir avoir facilement accès à ces cellules, nous avons ciblé les cellules de l'**épiderme** du chien.

Nous rappellerons donc dans un premier temps quelques données bibliographiques sur l'épiderme du chien et sur les différents vecteurs de gènes disponibles, puis nous présenterons le protocole utilisé, avant d'exposer nos résultats et de les commenter.

# **PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Etude de la peau du chien**

La peau est la barrière anatomique et physiologique entre l'animal et son environnement. Une de ses principales fonctions est de protéger l'animal des agents néfastes de l'environnement, dont les agents chimiques, physiques et microbiologiques. La peau a aussi un rôle d'immunosurveillance via les cellules de Langerhans, les kératinocytes et les lymphocytes. La peau possède également des propriétés antibactériennes et antifongiques grâce à différents lipides, acides organiques, lysozymes et peptides antimicrobiens.

La peau est constituée de 3 couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

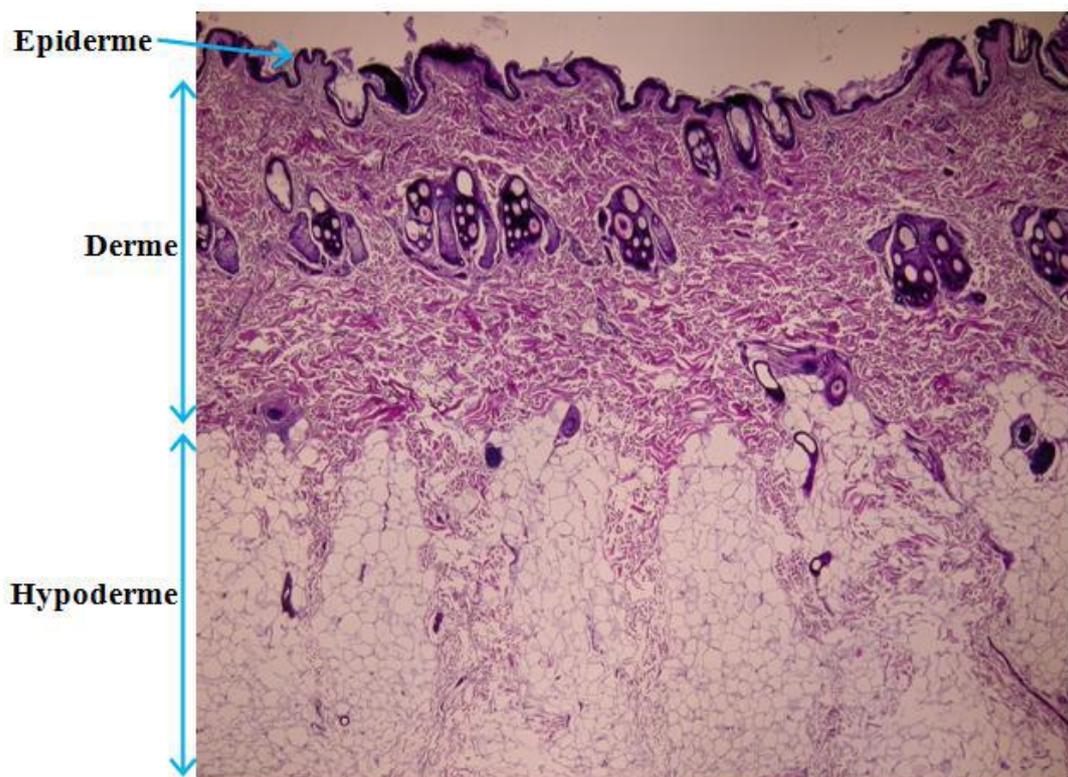


Figure 1 : Coupe histologique de la peau du cou d'un chien sain (source : Vetagrosup)

### **A. Histologie topographique de la peau**

#### **1. L'épiderme**

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau. C'est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé, dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques, mais présentant de nombreuses terminaisons nerveuses. La kératine est une protéine fibreuse très résistante qui donne à l'épiderme sa fonction particulière de protection.

L'épiderme est composé de cinq couches superposées :

- i. la **couche basale** ou *Stratum basale*, la plus profonde,
- ii. la **couche épineuse** ou *Stratum spinosum*,
- iii. la **couche granuleuse** ou *Stratum granulosum*,
- iv. la **couche claire** ou *Stratum lucidum*,
- v. la **couche cornée** ou *Stratum corneum*, couche la plus superficielle.

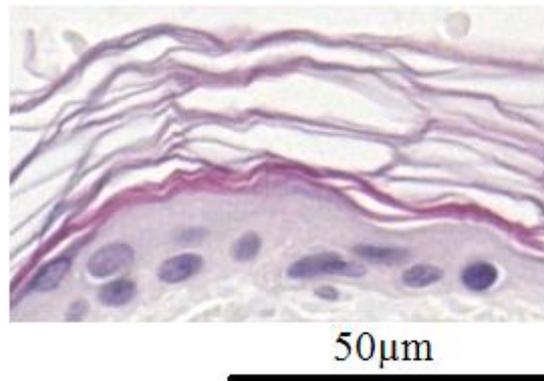


Figure 2 : Coupe histologique d'épiderme de chien (thorax dorsal) (source : ENVT)

En général, l'épiderme du chien est fin : 2 à 3 assises de cellules nucléées (sans compter la couche cornée) pour la peau recouverte de poils, soit 0,05 à 0,1mm d'épaisseur. L'épiderme est plus épais au niveau des coussinets et de la truffe, où il peut atteindre 1,5mm d'épaisseur. En effet, les couches cornées, granuleuses et épineuses sont constituées d'un nombre d'assises cellulaires plus important au niveau des coussinets et de la truffe qu'au niveau des zones poilues, et la couche claire est présente uniquement dans les coussinets. (Miller, Griffin, Campbell 2013)

## 2. La membrane basale

La membrane basale est une structure dynamique qui subit des remodelages constants, et qui sert d'interface entre l'épiderme et les autres constituants (nerveux, vasculaires, ...) de la peau, et le derme sous-jacent. Cette zone est importante dans l'ancrage de l'épiderme au derme, le maintien d'un épiderme fonctionnel et prolifératif, le maintien de l'architecture des tissus, la cicatrisation des plaies, et sa fonction de barrière. La zone de la membrane peut être divisée en 4 parties, en allant de l'épiderme au derme : la membrane plasmique des cellules basales, la lamina lucida (lamina rara), la lamina densa et la couche fibro-réticulaire (lamina fibroreticularis), qui inclue les microfibrilles d'ancrage et les faisceaux de microfibrilles dermiques.

### 3. Le derme

Le derme est une couche de tissu fibrocollagène et élastique contenant des vaisseaux sanguins, des nerfs et des récepteurs sensitifs. Son épaisseur varie de 800µm en région ventrale à 1500µm en région dorsale. Dans les zones présentant beaucoup de poils, le derme représente la plus grande proportion de l'épaisseur de la peau, alors que l'épiderme est fin. Dans les zones où la peau est fine, cette diminution de l'épaisseur vient de la diminution de l'épaisseur du derme.

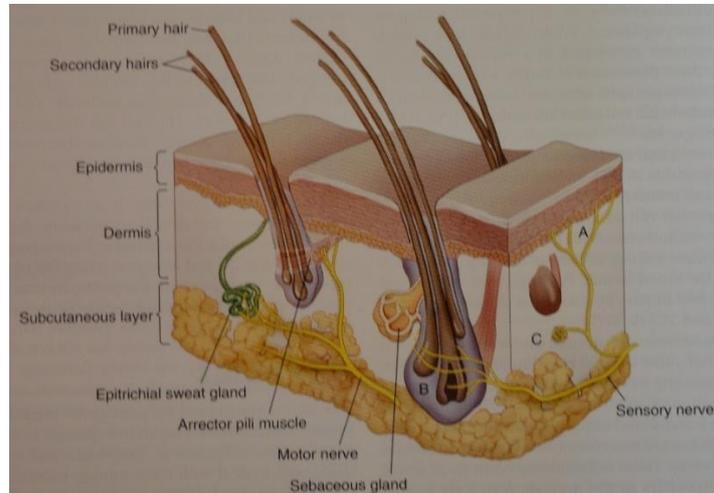


Figure 3 : Eléments du derme (Miller, Griffin, Campbell 2013)

Le derme est composé de fibres insolubles (collagène, élastine) et de polymères solubles (protéoglycanes, acide hyaluronique), dans une substance contenant de rares fibroblastes inactifs ayant synthétisé le collagène, l'élastine et la matrice. Il contient également les annexes de l'épiderme, les muscles arrecteurs des poils, des vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des nerfs. La plupart de la matrice extracellulaire est synthétisée par les fibroblastes, qui répondent à différents stimuli comme les facteurs de croissance des kératinocytes, des cellules inflammatoires et des fibroblastes eux-mêmes. (Miller, Griffin, Campbell 2013; Evans, de Lahunta 2013; Young et al. 2008)

### 4. L'hypoderme

L'hypoderme (ou tissu sous cutané) est principalement composé de tissu adipeux.

### 5. La vascularisation de la peau

La microcirculation de la peau est un système complexe jouant un rôle important pour le métabolisme et la thermorégulation de la peau.

Les artères nourricières de la peau sont situées en profondeur dans l'hypoderme, où elles donnent naissance à des ramifications qui remontent pour former trois plexus vasculaires anastomosés disposés parallèlement à la surface de la peau : le plexus profond ou sous-cutané, le plexus moyen ou cutané et le plexus superficiel ou sous-papillaire (cf figure 4).

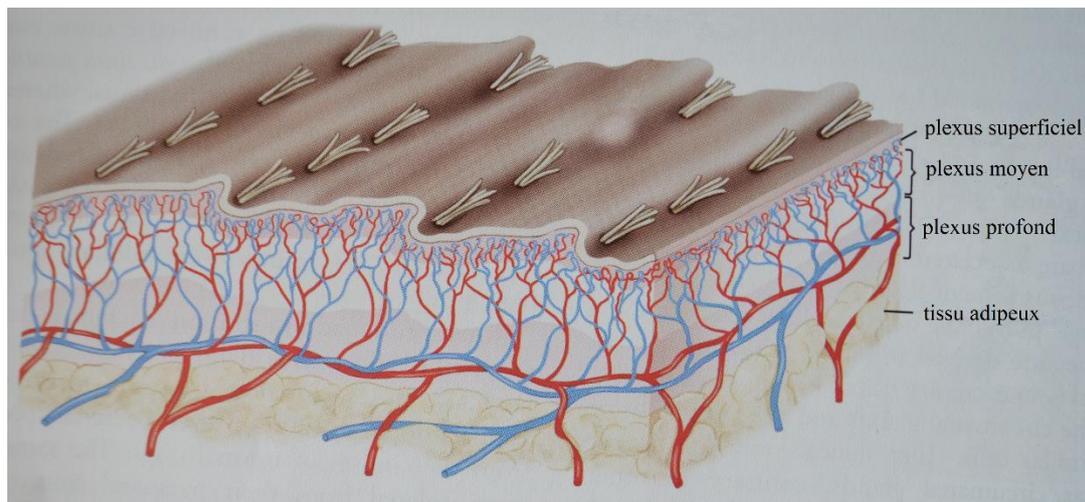


Figure 4 : Section schématique de peau de chien montrant la vascularisation sanguine (Evans, de Lahunta 2013)

Le plexus sous cutané provient des branches terminales des artères cutanées. Il irrigue la portion basse des follicules pileux et les glandes sudoripares eccrines. Les branches de ce plexus forment le plexus cutané, qui est associé à la portion moyenne des follicules pileux, aux muscles arecteurs des poils, et aux glandes présentes dans le derme. Le plexus sous papillaire est quant à lui formé des petits vaisseaux provenant du plexus cutané. Enfin, les papilles dermiques de la peau contiennent de nombreuses boucles capillaires provenant du plexus superficiel qui irriguent l'épiderme.

Le retour veineux s'effectue dans des réseaux correspondant globalement à ces réseaux artériels.

De nombreux shunt réalisent des communications artérioveineuses directes qui jouent un rôle important dans la thermorégulation en contrôlant le flux sanguin d'une région déterminée du derme.

La peau renferme une vascularisation lymphatique importante formant des réseaux correspondant globalement aux réseaux vasculaires sanguins. Ces vaisseaux lymphatiques relient la peau aux nœuds lymphatiques régionaux.

(Young et al. 2008; Evans, de Lahunta 2013; Miller, Griffin, Campbell 2013)

## **B. Structure histologique de l'épiderme**

L'épiderme est composé de différents types cellulaires : les kératinocytes (85% des cellules épidermiques), les mélanocytes (5%), les cellules de Langerhans (3-8%) et les cellules de Merkel (2%).

(Miller, Griffin, Campbell 2013; Evans, de Lahunta 2013)

## 1. Les kératinocytes

Les kératinocytes sont les cellules les plus importantes en nombre, et ce sont elles qui définissent les différentes couches ou stratum de l'épiderme selon leur état de différenciation.

### a. Stratum basale

La **couche basale** est composée d'une seule assise de cellules, parallélipédiques à cubiques, à fort rapport nucléo-cytoplasmique, reposant sur la membrane entre le derme et l'épiderme. Cette assise de cellules assure le **renouvellement de l'épiderme** : ce sont les seuls kératinocytes ayant la **capacité de se multiplier**. Les cellules filles résultant de leur multiplication se différencient et migrent vers la surface en acquérant progressivement les caractéristiques structurales et fonctionnelles des cornéocytes. Cette différenciation est appelée kératinisation.

### b. Stratum spinosum

La couche épineuse est composée des cellules filles de la couche basale. Dans la peau velue, cette couche a une épaisseur de 1 à 2 cellules (et beaucoup plus au niveau des coussinets, où elle peut atteindre 20 cellules). Les cellules de cette assise sont appelées acanthocytes car ils ont un aspect épineux. Ces cellules sont larges, polyédriques, légèrement basophiles à éosinophiles, et nucléées. C'est dans cette couche que les kératinocytes commencent la synthèse de kératine.

### c. Stratum granulosum

La couche granuleuse possède un nombre variable d'assises de cellules : une seule assise au niveau de la peau velue, et jusque 4 assises au niveau des coussinets et de la truffe. Elle est composée de kératinocytes en fin de différenciation, aplatis parallèlement à la surface de la peau, et dont le noyau commence à se rétracter.

On retrouve différents éléments dans leur cytoplasme :

- Des granules de kératohyaline, contenant essentiellement de la profillagrine, précurseur de la fillagrine qui sera présente dans la couche cornée et formera la matrice du cytoplasme des cornéocytes par agrégation des filaments intermédiaires de kératine.
- Des granules lamellaires contenant des lipides (céramides, cholestérol, acides gras) et des enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, glucosidases), qui sont libérés dans l'espace intercellulaire entre la couche granuleuse et la couche cornée.

### d. Stratum lucidum

La couche claire est une couche fine, entièrement kératinisée, compacte, composée de cellules mortes. Elle diffère histochimiquement du stratum corneum par sa richesse en lipoprotéines. Cette couche est très développée au niveau des coussinets, moins au niveau de la truffe, et est absente dans toute autre partie de la peau.

#### e. Stratum corneum

La **couche cornée** est la **couche externe**, composée d'une cinquantaine de strates de kératinocytes totalement différenciés, les cornéocytes. Ce sont des cellules plates, polyédriques, éosinophiles, sans noyau ni organite. Elles ne contiennent que des filaments de kératine reliés entre eux par des filaments de filaggrine et des ponts disulfures. Ces cellules sont entourées d'une enveloppe cornée, formée par l'agrégation de nombreuses protéines. L'espace intercellulaire est quant à lui composé d'une matrice lipidique provenant des granules lamellaires. Tout ceci participe à la **fonction de barrière du stratum corneum**.

Sa desquamation constante est normalement compensée par la prolifération des cellules basales, ce qui maintient une épaisseur épidermique constante. L'**épaisseur de la couche cornée** varie de **5 à 1500µm** chez le chien. La couche cornée contient des antigènes et super-antigènes, qui sont normalement tenus à l'écart du système immunitaire, et qui induisent une activation des lymphocytes-T lorsqu'ils sont libérés suite à une blessure ou maladie.

#### f. Epidermopoïèse et kératogenèse

L'homéostasie de l'épiderme nécessite une balance entre la croissance et la différenciation des kératinocytes. Lors de blessure, cet équilibre se déplace en faveur de la prolifération. Les kératinocytes sont des régulateurs de l'immunité cutanée et de l'inflammation. Le produit le plus important de l'épiderme est la **kératine**, qui constitue la principale **barrière** entre l'animal et son environnement. Il y a 4 événements cellulaires distincts dans le processus de formation des cornéocytes : la kératinisation (synthèse de la principale protéine fibreuse des kératinocytes), la synthèse de kératohyaline (comprenant la filaggrine, protéine riche en histidine), la formation de l'enveloppe cornée (comprenant la protéine de structure involucrine) et la génération de domaines intercellulaires neutres riches en lipides, résultant de la sécrétion de granules lamellaires distincts.

Des techniques de marquage à la thymidine tritiée ont montré que le **turn-over de l'épiderme** (du stratum basale au stratum granulosum) des **chiens** était d'environ **22 jours** (Baker et al. 1973). **Tondre les poils** réduit ce turn-over à environ **15j** (Baker, Maibach, Park 1974). Dans certains états pathologiques, ce turn-over peut être beaucoup plus court, allant jusqu'à 7 jours chez les chiens atteints de séborrhée (Baker, Maibach 1987).

## 2. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques produisant des pigments de mélanine. Ces derniers sont produits dans des organites particuliers, les mélanosomes, puis vont migrer à l'extrémité des dendrites et être transmis aux kératinocytes voisins. La plupart des pigments de mélanine de la peau sont localisés dans la couche basale de l'épiderme, mais chez les chiens dont la peau est sombre, la mélanine peut se retrouver dans tout l'épiderme. Ils permettent de protéger la peau des rayons ultraviolets.

En plus de cette protection contre les UV, les mélanocytes protègent également l'organisme en participant à la réaction inflammatoire. Les mélanocytes possèdent des récepteurs entre autres pour les interférons, les interleukines, des eicosanoïdes, et d'autres cytokines, et peuvent eux-mêmes produire certaines de ces molécules, qui vont ainsi agir de façon autocrine.

### 3. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont des cellules mononuclées, dendritiques, présentatrices d'antigènes, de localisation épidermique basale ou suprabasale. Elles jouent un rôle de sentinelles immunologiques : leurs dendrites s'insinuent entre les kératinocytes de façon à ce que tous les antigènes pénétrant l'épiderme soient captés par ce réseau. Elles captent les antigènes et les présentent aux lymphocytes T des nœuds lymphatiques voisins.

### 4. Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont des cellules appartenant au système neuro-endocrinien diffus, ayant un rôle de mécanorécepteurs à adaptation lente. Elles sont présentes dans la couche basale au niveau des coussinets tylotriches.

## C. Le système immunitaire cutané

(Schwarz 2003; Doutre 2009; CEDEF 2011)

En plus de sa fonction de barrière mécanique vue précédemment, la peau a également un rôle de barrière via le système immunitaire. Lorsqu'un pathogène réussit à passer la barrière mécanique que représente le *stratum corneum*, le système immunitaire cutané va développer une réponse immunitaire innée, rapide mais non spécifique, puis une réponse immunitaire acquise, plus lente mais pourvue d'une capacité de mémoire. Ces deux réponses sont liées, la seconde nécessitant la première pour se mettre en place. Dans la peau, le système immunitaire inné est prédominant.

### 1. Les cellules de l'immunité cutanée

Toutes les cellules de la peau jouent un rôle dans l'immunité cutanée. Les plus importantes sont les kératinocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes.

#### a. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont présentes dans l'épiderme (cellules de Langerhans) et dans le derme majoritairement autour des vaisseaux (cellules dendritiques dermiques). Elles ont un rôle de **sentinelle** grâce à leurs prolongements, les dendrites. Elles ont une **activité phagocytaire** et internalisent tout microorganisme, molécule ou cellule morte, entrant en contact avec leur membrane. Elles peuvent si besoin jouer un rôle de **cellule présentatrice d'antigène** (CPA) et activer les lymphocytes après migration dans le nœud lymphatique drainant.

#### b. Les kératinocytes

Les kératinocytes interviennent dans l'immunité cutanée en produisant des **peptides antimicrobiens** (PAM), qui ont principalement une action antibactérienne. Mais il existe également des PAM à action antivirale et antifongique.

Les kératinocytes contribuent aussi à l'initiation de la **réponse inflammatoire** via la sécrétion de cytokines et chémokines. Ils possèdent également des **molécules d'adhésion** jouant un rôle important dans le trafic lymphocytaire épidermique.

#### c. Les lymphocytes

Il existe une très grande diversité de lymphocytes. Les lymphocytes B et T sont des acteurs de l'immunité acquise. Ils possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques d'un motif antigénique unique appelé **épitope**.

Les **lymphocytes B** (LB) une fois activés se multiplient et se différencient en plasmocytes et produisent des **anticorps** spécifiques d'un antigène.

Les **lymphocytes T** (LT) produisent des **cytokines** et ont une **fonction cytotoxique**. Les LT naïfs, après leur première rencontre avec un antigène, deviennent des LT effecteurs, des LT mémoire ou des LT régulateurs.

Les **lymphocytes « natural killer »** (NK) sont des acteurs de l'immunité innée présents en faible quantité dans la peau. Ils éliminent toutes les cellules du soi présentant un défaut d'expression des molécules caractéristiques de l'individu, pouvant traduire une infection virale ou un processus tumoral.

#### d. Autres cellules de l'immunité cutanée

Les **cellules endothéliales** des **capillaires dermiques** sont à la fois cible et source de **cytokines pro-inflammatoires**. Elles participent à la réponse immunitaire en permettant le recrutement et la **migration des cellules immunitaires** du sang vers le derme superficiel via l'expression de différentes molécules d'adhésion.

Les **granulocytes** sont des acteurs de l'**inflammation aiguë**. Ils produisent des protéines antibactériennes et des dérivés du métabolisme oxydatif. Ils ont également une fonction **phagocytaire**.

Les **monocytes** et **macrophages** ont eux aussi une **fonction phagocytaire**. Ils ont également une **fonction de CPA** aux LT, mais contrairement aux cellules dendritiques, ils ne peuvent pas activer la réponse immunitaire primaire (réponse mise en place lors de la première rencontre du système immunitaire avec un antigène donné).

Enfin, certaines cellules du système immunitaire cutané (kératinocytes, cellules dendritiques, mastocytes, macrophages) possèdent à leur surface des récepteurs, les **PRR** (Pattern Recognition Receptor). Ces récepteurs reconnaissent des patterns moléculaires (**PAMPs** pour Pathogen-Associated Molecular Patterns), communs à différents pathogènes comme les LPS,

les acides nucléiques viraux, l'ARN double brin, ... Une fois activés, les PRR initient une série de voies intracellulaires qui aboutissent à la génération d'une réponse inflammatoire.

## 2. Fonctionnement de l'immunité cutanée

Si la barrière physique (couche cornée) et chimique (PAM) que représente l'épiderme est franchie, différentes réponses vont se mettre en place.

### a. Réponse inflammatoire précoce

Lorsqu'un pathogène pénètre dans la peau, les **PAMPs** vont interagir avec les **PRR** exprimés par les différentes cellules. Il va alors y avoir **activation** de certaines cellules (augmentation des capacités de **phagocytose** des cellules dendritiques et macrophages) et libération de **médiateurs vasodilatateurs** et de **cytokines pro-inflammatoires**, qui vont favoriser le recrutement des leucocytes du sang vers les tissus.

### b. Recrutement des cellules de l'immunité innée

Certaines cellules de l'immunité innée sont **résidentes** de la peau (kératinocytes, cellules dendritiques) et vont pouvoir agir dès qu'ils vont rencontrer un pathogène. D'autres cellules, comme les granulocytes, monocytes et macrophages, ne sont présentes qu'en faible quantité dans la peau dans des conditions physiologiques et vont devoir être recrutées lors de la présence d'un pathogène. Ce **recrutement** est possible grâce aux **cytokines** libérées lors de la réponse inflammatoire précoce : elles vont provoquer l'expression de molécules d'adhésion par les **cellules endothéliales** des vaisseaux, qui vont permettre la **migration** des **leucocytes sanguins** dans le derme. Le type de cellules recrutées dépend des cytokines produites, qui dépendent elles-mêmes du type de pathogène présent.

Si cette immunité innée ne suffit pas, les mécanismes de l'immunité acquise vont se mettre en place.

### c. Recrutement des cellules de l'immunité acquise

- **LT** : Les **cellules de Langerhans** vont subir un phénomène de **maturation**, puis migrer vers le nœud lymphatique de drainage. Elles vont alors apprêter les antigènes rencontrés puis les présenter à leur surface couplés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces **antigènes** ainsi **apprêtés** vont pouvoir interagir avec les **LT** porteurs de récepteurs spécifiques. En présence de signaux de costimulation complexes, il va alors y avoir production de clones de LT spécifiques de l'antigène, qui vont ensuite migrer vers le site infectieux cutané grâce à l'action de différentes cytokines. Le profil (cd4 ou cd8) des LT produits dépend de la classe des molécules du CMH présentant l'antigène, qui dépend elle-même de l'origine (endogène ou exogène) de l'antigène.

- **LB** : Des **antigènes** vont être drainés par la lymphe jusqu'au **nœud lymphatique**, où ils vont pouvoir interagir avec les LB porteurs de récepteurs spécifiques. Ces derniers vont alors être activés, se multiplier puis se différencier en **plasmocytes**, producteurs d'**anticorps spécifiques**.

## II. Vecteurs de gènes et immunité

Les vecteurs de gènes sont des entités très utilisées, notamment pour les nombreuses applications possibles en thérapie génique. La thérapie génique correspond au transfert de matériel génétique dans les cellules d'un patient, dans un but thérapeutique. Les maladies ainsi ciblées dans la recherche sont majoritairement les maladies génétiques et les cancers.

### A. Vecteurs non viraux

#### 1. Les plasmides / ADN nu

Les plasmides utilisés pour le transfert de gènes sont construits en intégrant le gène désiré et un promoteur dans une structure cyclique d'ADN double brin, qui va se placer en position extrachromosomique. Ce type de vecteur peut être utilisé sur la peau *in vivo*. Le premier rapport de transfert génétique cutané réussi date de 1991, et utilisait un « pistolet à gène » pour l'administration de cet ADN (Sanders Williams et al. 1991). Avec cette technique, les gènes s'arrêtent en général à l'épiderme. Le transfert d'ADN nu peut également être réalisé par injection directe dans la peau (Hengge, Walker, Vogel 1996). Étant donné la finesse de l'épiderme, la plupart de l'ADN est d'abord déposé dans le derme, mais il est ensuite absorbé par l'épiderme.

L'**avantage** de ces vecteurs non viraux est qu'ils permettent le transfert simple de matériel génétique à la peau, par des méthodes peu coûteuses. De plus, il permet le transport de gènes de grande taille. Enfin, ils sont beaucoup moins immunogènes que les vecteurs viraux.

Les **limites** de l'utilisation d'ADN nu est que *in vivo*, seul un faible nombre de kératinocytes peut être transfecté. Une étude a montré qu'après injection d'un plasmide GFP dans de la peau humaine, seul 4% de kératinocytes étaient transfectés (Meykadeh et al. 2005). Dans l'étude de Sanders Williams et al. Utilisant le pistolet à gène, ce chiffre est un peu plus élevé mais reste faible : 10 à 20% des cellules de la zone « bombardée » exprimaient le transgène.

Mais la principale limite de cette méthode reste que l'expression du transgène est transitoire. En effet, en général il n'y a pas intégration génomique du plasmide ; or l'ADN extrachromosomique se dégrade après environ 3 jours, possiblement par l'action d'exonucléases cellulaires. De plus, ce sont les kératinocytes suprabasaux qui sont transfectés, or ils sont éliminés en quelques semaines par le turn-over épidermique (Pfützner 2010).

#### 2. Liposomes

Ces vecteurs de gène sont composés de lipides cationiques entourant l'ADN plasmidique. Le transfert de gènes via ces vecteurs est appelé lipofection. Ils représentent environ 9% des essais cliniques approuvés.

Ces lipides cationiques favorisent l'entrée du plasmide dans la cellule (Cotrim, Baum 2008).

Les avantages (faible immunogénicité, taille de transgène élevée) et inconvénients (transfection peu efficace et expression transitoire du transgène) sont les mêmes que pour les plasmides (Breyer et al. 2001).

## B. Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont les plus utilisés dans la recherche sur la thérapie génique. En créant ces vecteurs, nous utilisons la capacité des virus à transférer une information génétique de façon très efficace dans des cellules cibles via l'infection. Mais les vecteurs de gènes viraux sont construits de façon à ne plus pouvoir se répliquer, on parle de transfection plutôt que d'infection.

Les vecteurs viraux les plus intéressants lorsqu'on cible la peau sont les rétrovirus (oncovirus et lentivirus), les adénovirus et les virus associés aux adénovirus.

### 1. Vecteurs de gène rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux sont les plus utilisés historiquement en thérapie génique. Les rétrovirus sont des virus enveloppés d'environ 120nm de diamètre, possédant un ARN diploïde de 7 à 11 kb. Leur nom vient de leur capacité à rétrotranscrire leur ARN génomique en ADN via une enzyme, la rétrotranscriptase, puis à intégrer l'ADN au génome des cellules hôtes infectées.

Les principales propriétés des rétrovirus sont leur haute efficacité de transfection dans en culture cellulaire (jusqu'à 100%), et leur capacité de code relativement grande (8-9kb).

(Pfützner 2010; Ciftci, Gupte 2006)

La famille des rétrovirus comprend deux principales sous-familles : les **oncovirus** (dont fait par exemple partie le virus de la leucémie féline, le FeLV) et les **lentivirus** (dont fait partie le Virus de l'Immunodéficience Humaine, le HIV).

La différence majeure entre ces deux sous-familles concerne leur capacité à infecter les cellules en fonction du cycle cellulaire. En effet, les oncovirus sont incapables de pénétrer la membrane nucléaire, ils ne peuvent donc infecter que les cellules en division, contrairement aux lentivirus qui peuvent infecter les cellules en division ou non (Naldini et al. 1996). Or les cellules souche épidermique ici ciblées comme nous le verrons par la suite, ont un faible taux d'activité mitotique in vivo, de l'ordre de 5% (Morris, Argyris 1983). La capacité des **lentivirus à infecter les cellules quiescentes** est donc ici un avantage majeur.

Le principal **risque** lié à l'utilisation de rétrovirus est la **mutagenèse insertionnelle** : le promoteur du transgène peut, en s'intégrant au génome hôte, modifier l'expression des gènes avoisinant le site d'intégration et par exemple activer des proto-oncogènes. Ce risque est particulièrement élevé avec les oncovirus, qui s'intègrent préférentiellement au niveau des régions promotrices. Ce risque est plus faible avec les **lentivecteurs**, qui **s'intègrent préférentiellement au niveau des unités transcriptionnelles actives** (Wu et al. 2003).

Un autre risque est le **développement de virus répliatifs**. Ce risque est aujourd'hui limité grâce à l'utilisation de lentivecteurs de 3<sup>ème</sup> génération (Dull et al. 1998).

L'**immunogénicité** des rétrovecteurs est relativement faible comparée à celle des adénovirus et virus associés. Elle dépend du design du vecteur, de la voie d'administration et du dosage (Nayak, Herzog 2010). Par exemple, pour les lentivecteurs ici utilisés, qui sont basés sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), la protéine d'enveloppe gp ENV a été remplacée par la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) afin d'élargir son tropisme. Cette protéine d'enveloppe permet par exemple, lors d'une administration cutanée, une

transfection efficace des kératinocytes, des fibroblastes et des macrophages (Baek et al. 2001). Mais cet élargissement du tropisme, en permettant la transfection de certaines cellules du système immunitaire, augmente l'immunogénicité du lentivecteur. Pour contrer cet effet, un micro-ARN régulateur, miR142t, a été utilisé. Ce micro-ARN régulateur non codant cible les ARNm hématopoiétiques et inhibe l'expression de gènes dans les lignées cellulaires hématopoiétiques (Brown et al. 2006). Cet élément empêche ainsi l'expression du transgène notamment dans les cellules dendritiques, ce qui diminue l'immunogénicité de notre vecteur.

## 2. Virus associés aux adénovirus

Les virus associés aux adénovirus (AAV) sont des virus à ADN simple brin non pathogènes, dont la prolifération dépend d'une co-infection avec des adénovirus. Les vecteurs produits à partir de ces virus peuvent véhiculer un génome de maximum 5kb. Ils ont l'avantage de pouvoir transfecter des cellules en division ou non. Ces vecteurs déclenchent une faible réponse immunitaire innée, mais conduisent au développement d'anticorps neutralisant dirigés contre la capsid du vecteur, ce qui empêche l'administration successive de vecteurs AAV du même sérotype (Zaiss, Muruve 2008).

Des études ont montré que ces virus étaient efficaces pour le transfert de gène ex et in vivo. Une étude a par exemple montré une efficacité de transfection allant jusqu'à 70% sur des kératinocytes humains ex vivo (Braun-Falco et al. 1999). De plus, une injection intradermique permet une expression dans l'épiderme. Mais cette expression diminue avec le temps : même avec des injections répétées, on assiste à une perte progressive d'expression du transgène et à la formation d'un infiltrat inflammatoire cutané, signe de développement d'une réaction immunitaire (Hengge, Mirmohammadsadegh 2000).

(Pfützner 2010)

## 3. Vecteurs adénoviraux

Ce sont des vecteurs construits sur la base d'un virus à ADN double brin. Ces vecteurs peuvent transfecter de nombreuses cellules somatiques de façon efficace, qu'elles soient en prolifération ou quiescentes. Ce sont les vecteurs les plus utilisés avec les rétrovirus.

Ces vecteurs ont l'**avantage** de pouvoir transporter des transgènes de grande taille (jusque 37kb).

Leur **inconvénient** majeur est leur forte immunogénicité. De plus, l'expression du transgène est transitoire (de 2 semaines à quelques mois) car il n'y a pas d'intégration génomique.

(Pfützner 2010; Breyer et al. 2001)

Lors d'injection intradermique, le transgène s'exprime dans les fibroblastes et les cellules endothéliales, mais il n'y a pas de passage de la membrane basale de l'épiderme, et seul un faible nombre de kératinocytes est transfecté (Crombleholme 2000).

#### 4. Bilan : les principales caractéristiques des vecteurs de gènes

	<b>ADN nu / plasmides</b>	<b>Oncovirus</b>	<b>Lentivirus</b>	<b>Virus associés aux adénovirus</b>	<b>Adénovirus</b>
<b>Taille du transgène</b>	Non limitée	Relativement grande : 7-8kb	Relativement grande : 7-8kb	Faible : 4-5kb	Grande : jusque 37kb
<b>Intégration au génomme des cellules hôte</b>	NON	OUI	OUI	Possible	NON
<b>Transfection des cellules quiescentes</b>	OUI	NON	OUI	OUI	OUI
<b>Immunogénicité</b>	Faible	Modérée	Modérée	Innée : faible Acquise : forte	Forte

Tableau 1 : Comparaison des principaux vecteurs de gènes

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

L'objectif est de mettre au point une méthode *in vivo* de transgénèse chez le chien.

Le but est *in fine* d'utiliser cette méthode pour tester un vaccin thérapeutique : on réalise une transgénèse permettant à certaines cellules du chien d'exprimer la protéine cible d'un vaccin thérapeutique, puis on vaccine ces mêmes chiens. La disparition du transgène si elle a lieu participera alors à montrer l'efficacité d'un tel vaccin.

Pour cette utilisation, notre méthode de transgénèse devra avoir plusieurs caractéristiques :

- Cette méthode devra permettre une **expression du transgène** qui soit **durable** dans le temps ; en effet, il faut que la durée d'expression du transgène soit supérieure au temps nécessaire au vaccin pour stimuler le système immunitaire et induire une réponse, de façon à ce que le temps d'expression puisse être significativement supérieur chez les animaux témoins par rapport aux animaux vaccinés
- Cette méthode doit permettre de **suivre l'expression du transgène de façon non invasive**. En effet, une méthode invasive, comme la réalisation de biopsies sur le tissu cible, engendrerait une réponse immunitaire de la part de l'organisme, qui pourrait détruire la cellule exprimant le transgène plus rapidement donc empêcher l'expression durable de ce dernier, et elle modifierait le contexte immunologique.

Pour cela, nous avons cherché à faire exprimer par des cellules facilement accessibles, les kératinocytes de chiens, un transgène pouvant être suivi de façon non invasive, qui est un transgène codant pour une protéine fluorescente.

### **I. Matériels et méthodes**

#### **A. Animaux**

Sept chienne Beagle non stérilisées âgées de 1 à 2,5 ans ont été utilisées dans cette étude.

Ces animaux sont hébergés dans le chenil de physiologie de l'ENVT par boxes de deux chiennes, nettoyés quotidiennement. Elles reçoivent une ration d'alimentation sèche une fois par jour, et de l'eau *ad libitum*.

Ces essais bénéficient de l'agrément du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) n°317 (intitulé « Validation d'un modèle de lentiginose - expression de protéines fluorescentes chez le chien »).

Les chiens ont ensuite été déclassés sous accord du HCB pour adoption (Avis HCB n°D2016-731).

## B. Vecteurs de gènes

Les lentivecteurs utilisés ont été fournis par le Laboratoire Vectalys. Avant utilisation, ils sont stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ces lentivecteurs sont classés « biorisque de classe 2 » et doivent être utilisés dans un laboratoire de niveau de sécurité biologique 2 minimum d'après les documents fournis par Vectalys. Ce niveau de sécurité biologique impose entre autres le respect des bonnes pratiques microbiologiques, le port de vêtements protecteurs, un accès restreint au laboratoire, ... (Organisation mondiale de la Santé 2005).

SYMBOL : 

CLASSIFICATION :  
Biorisk class 2  
and BSL 2 for use

Figure 5 : Symbole et classification de lentivecteurs utilisés

Les lentivecteurs sont des lentivirus non réplicatifs : ils ne contiennent pas l'information génétique codant pour les protéines virales nécessaires à la réplication, ils ne peuvent donc réaliser qu'un seul cycle infectieux. Les lentivecteurs ici utilisés, basés sur le VIH, sont intégratifs : leur information génétique s'intègre au génome de la cellule hôte. Ils véhiculent un génome artificiellement modifié sous forme d'ARN codant dans notre cas pour une protéine fluorescente (tdTomato ou ZsGreen), dont l'expression va permettre de détecter les cellules effectivement transfectées. L'expression de ce gène est sous le contrôle de différents promoteurs selon les lentivecteurs testés.

### 1. Promoteurs

Un promoteur est une séquence d'ADN courte en général placée en amont (extrémité 5') du gène d'intérêt, à laquelle se lie l'ARN polymérase pour **initier la transcription**. La nature du promoteur détermine le taux de synthèse de l'ARN. Nous avons ici testé 3 types de promoteurs différents.

Le premier est le promoteur **EF-1 $\alpha$**  (Facteur d'Elongation humain 1 $\alpha$ ). C'est un promoteur **constitutif fort**, c'est-à-dire qu'il permet la transcription continue du gène, à un niveau élevé. C'est également un promoteur **ubiquitaire**, il permet l'expression du transgène dans toutes les lignées cellulaires.

Le deuxième promoteur est **K14**, qui est lui aussi **constitutif**, mais qui ne permet l'expression du transgène que dans un type cellulaire précis : les **kératinocytes**.

Enfin, le dernier promoteur est **TRE** (Tetracycline Responsive Element), qui est **ubiquitaire** mais non constitutif. En effet, le transactivateur Tet-On 3G ne peut se fixer au promoteur et ainsi initier la transcription qu'en présence d'un inducteur, la doxycycline (promoteur **inductible**) (cf fig. 6). Le niveau d'expression maximal avec le promoteur TRE dans tous les types cellulaires est comparable ou légèrement inférieur à un promoteur constitutif fort comme EF-1 $\alpha$  (Qin et al. 2010).

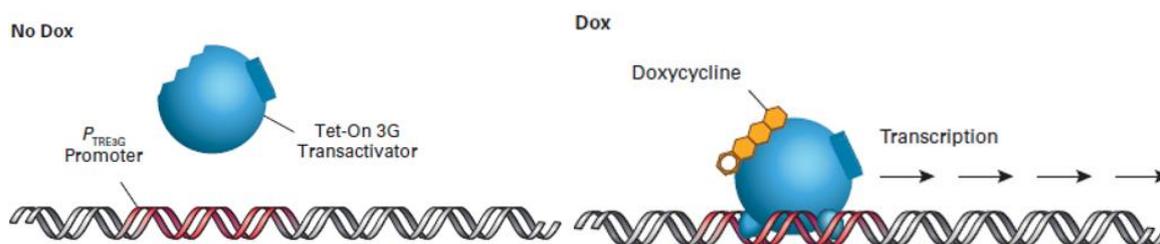


Figure 6 : Mécanisme du système inductible Tet-On 3G (document Vectalys)

## 2. Fluorochromes

Les lentivecteurs qui nous ont été fournis par le laboratoire Vectalys contiennent un transgène codant soit pour le fluorochrome ZsGreen, soit pour TdTomato. Les spectres d'excitation et d'émission de ces deux molécules sont présentés en figure 7.

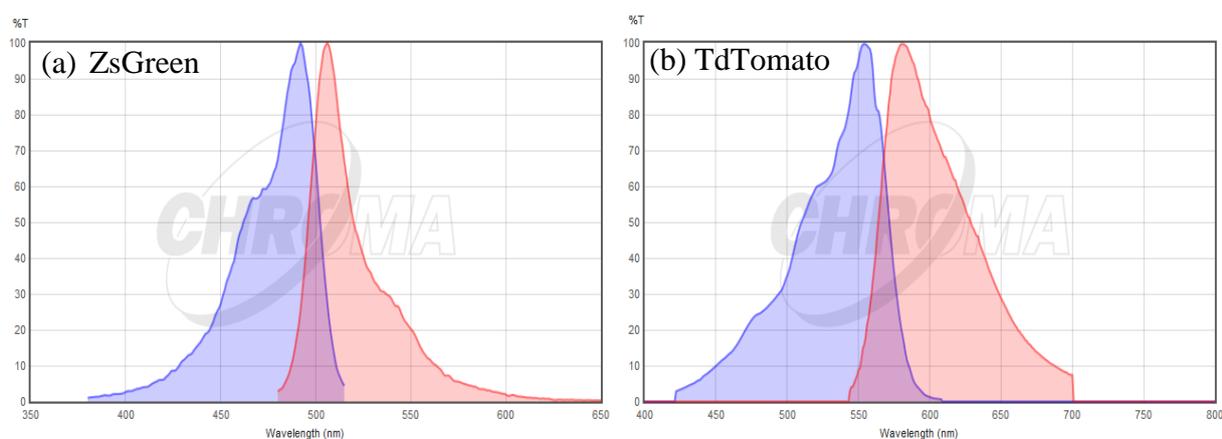


Figure 7 : Spectres d'excitation (bleu) et d'émission (rouge)

(a) ZsGreen

(b) TdTomato

Source : [www.chroma.com](http://www.chroma.com)

Le fluorochrome ZsGreen possède une forte intensité de fluorescence et une haute photostabilité. Une étude a par exemple montré qu'une exposition de 30min à une lumière à épifluorescence ne diminuait l'intensité de fluorescence que de 20 à 40% (Jenny A.K. Ekberg et al. 2011). Cette même étude a également montré que la fluorescence de ZsGreen n'était pas altérée par la fixation au paraformaldéhyde. Ainsi, ce fluorochrome est adapté à une utilisation *in vivo* comme recherché ici, mais également pour la réalisation de biopsies, nécessaires aux étapes de mise au point de notre protocole.

## 3. Autres éléments de construction des lentivecteurs

Deux autres éléments d'intérêt sont présents dans les lentivecteurs ici utilisés.

Le premier est **miR142t**. Cet élément est un micro-ARN régulateur non codant ciblant les ARNm hématopoiétiques, qui peuvent inhiber l'expression de gènes dans les lignées cellulaires hématopoiétiques (Brown et al. 2006).

Le second est **WPRE** (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element), qui permet d'améliorer l'expression de gènes viraux en modifiant la polyadénylation, l'export et la translation de l'ARN (Donello, Loeb, Hope 1998).

## 4. Niveau de pureté

Une fois les lentivecteurs produits, différentes étapes de purification/concentration sont nécessaires. La purification permet de retirer les principaux contaminants tels que les protéines sériques et cellulaires et les ADN plasmidiques et génomiques.

Le laboratoire Vectalys utilise successivement la filtration par centrifugation, l'ultrafiltration et la chromatographie. Pour les solutions de lentivecteurs de niveau de pureté C, la dernière étape de chromatographie n'est pas réalisée, alors qu'elle l'est pour le niveau D.

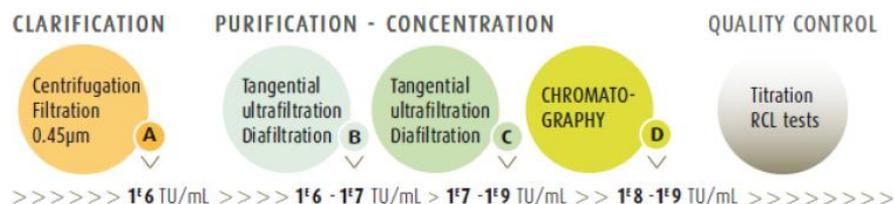


Figure 8 : étapes de purification des lentivecteurs du laboratoire Vectalys (TU = Unités de Transduction) d'après document Vectalys « Lentiviral vectors production »

## 5. Bilan : les différents lentivecteurs utilisés

Au cours des différents essais, les lentivecteurs suivants ont été utilisés :

- rLV-EF1-tdTOMATO-WPRE-miR142t (batch rV2.1A1.2968 D) : noté **tdTomato-D** par la suite
- rLV-EF1a-ZsGreen-IRES-Puro-WPRE (batch rV2.1A1.2136 C2) : noté **ZsGreen-C2**
- rLV-phK14v2-tdTOMATO-WPRE-miR142t (batch rV2.1A1.2310 D) : noté **K-tdTomato-D**
- rLV-EF1-ZsGreen1-WPRE-miR142t (batch rV2.1A1.3250 D) : noté **ZsGreen-D**
- rLV-TRE3G-ZsGreen1 (batch rV2.1A1.3071 D) + rLV-EF1-TetOn3G-IRES-Neo (rV2.1A1.2154 D) : notés **TRE-ZsGreen-D + TetOn-D**

Les caractéristiques de ces lentivecteurs sont résumées dans le tableau ci-dessous.

	<b>Promoteur</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Niveau de pureté</b>
<b>tdTomato-D</b>	EF-1 $\alpha$ Constitutif / Ubiquitaire	tdTomato	D
<b>ZsGreen-C2</b>	EF-1 $\alpha$ Constitutif / Ubiquitaire	ZsGreen	C2
<b>K-tdTomato-D</b>	K14 Constitutif / Kératinocytes	tdTomato	D
<b>ZsGreen-D</b>	EF-1 $\alpha$ Constitutif / Ubiquitaire	ZsGreen	D
<b>K-ZsGreen</b>	K14 Constitutif / Kératinocytes	ZsGreen	C2
<b>TRE-ZsGreen-D + TetOn-D</b>	TRE Inductible / Ubiquitaire	ZsGreen	D

Tableau 2 : Caractéristiques des différents lentivecteurs utilisés

## C. Administration épidermique

La peau des chiens est tondue 24h avant l'administration, et les différentes zones d'application sont dessinées à l'aide d'un marqueur (cercle de 20mm de diamètre). Chaque zone ne sert à tester qu'une méthode d'application donnée. Un exemple de schéma et de photo d'administration est présenté en figure 9 et 10.

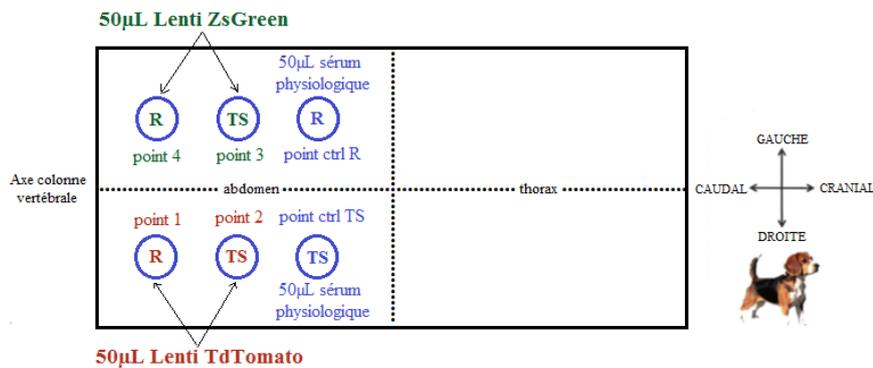


Figure 9 : Schéma d'administration vue dorsale DH (V0.2 - juillet 2015) (d'après schéma d'E. Totain)

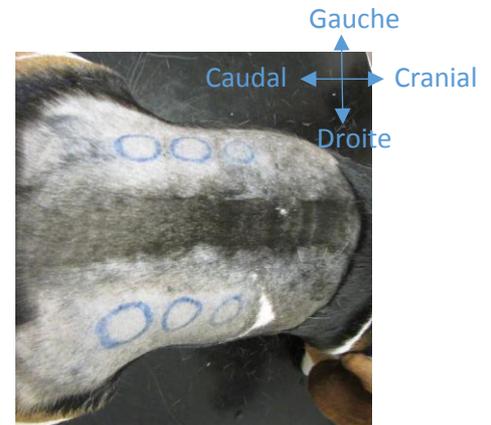


Figure 10 : Vue dorsale de la zone d'administration de DH (V0.2 - juillet 2015)

### 1. Injection

La première méthode qui a été testée est l'**injection** : à l'aide d'une seringue à insuline, 50µL d'une préparation de lentivecteurs sont injectés dans la peau du chien, en essayant d'injecter la solution le plus superficiellement possible pour cibler la couche basale de l'épiderme. Cette technique permet de passer la barrière de la couche cornée.

### 2. Tape Stripping

Le **Tape Stripping (TS)** est une méthode permettant une altération mécanique de la barrière cutanée : l'application répétée puis le retrait de ruban adhésif sur la peau permet de retirer successivement les différentes couches de l'épiderme.

Méthode de réalisation du TS : les couches superficielles de l'épiderme sont retirées à l'aide de ruban adhésif (Ruban Scotch® Crystal 19mm). Un morceau de ruban adhésif est posé sur la zone que l'on souhaite transfecter, en appuyant pendant quelques secondes, puis il est retiré. Cette opération est renouvelée 20 fois, avec un nouveau morceau de ruban adhésif chaque fois.

### 3. Raclage

Sur la zone que l'on désire transfecter, les assises superficielles de l'épiderme sont retirées à l'aide d'une lame de scalpel n°23. Pour cela, la peau est maintenue tendue entre deux doigts, et la lame de scalpel est passée plusieurs fois sur la peau perpendiculairement à son grand axe et avec un angle de 45° environ, jusqu'à la rosée sanguine, signe d'atteinte du derme par endroits.

#### **4. Application topique de la solution de lentivecteurs après Tape Stripping ou Raclage**

L'application des lentivecteurs après abrasion de l'épiderme par TS ou raclage a ensuite été réalisée de la même façon dans les deux cas : 50µL de la solution de lentivecteurs (ou de sérum physiologique pour les points contrôle) sont déposés au centre de la zone à l'aide d'une micropipette puis étalés sur l'ensemble de la surface définie. La peau du chien est maintenue en position la plus horizontale possible le temps que la solution sèche (de façon à ce que la solution ne coule pas en dehors de la zone). L'opération est ensuite réalisée successivement à l'identique pour les autres zones d'administration, puis le chien est isolé dans une cage à métabolisme pendant 2h.

### **D. Suivi non invasif de l'expression du transgène**

#### **1. Cellvizio® Dual Band**

Le Cellvizio® Dual Band est un système d'imagerie microscopique laser permettant de réaliser des « biopsies optiques » microscopiques, en temps réel, in vivo et in situ, de manière non invasive.

Ce laser peut générer deux longueurs d'onde d'excitation (488 nm et 660 nm), et détecter deux bandes de fluorescence (502-633 nm et 673-800 nm), en temps réel et à un même endroit, via une unique sonde de fibres optiques. Le cellvizio est composé de trois éléments (cf photo figure 11) :

- 1 : L'unité laser, qui génère les rayons laser à 488 et 660 nm, et collecte en retour les signaux de fluorescence induits par l'excitation par le laser
- 2 : Un logiciel d'acquisition des données sur pc, qui contrôle l'unité laser et génère une vidéo en temps réel
- 3 : Une sonde en fibres optiques, qui agit comme un objectif de microscope lorsqu'elle est en contact avec un tissu. Selon les caractéristiques de la microsonde, le cellvizio permet de voir la surface, ou les tissus plus en profondeur



Figure 11 : Photographie du Cellvizio®

(Mauna Kea Technologies 2014a)

Plusieurs microsondes peuvent être utilisées avec le Cellvizio®. Nous avons choisi d'utiliser la sonde Mini-Z, qui permet de voir à une profondeur de 50/70µm respectivement pour les lasers de 488/660nm (épiderme du chien : 100 à 500µm d'épaisseur) avec un champ de 325µm de diamètre et une résolution de 3,5µm.

Avant chaque utilisation, le Cellvizio est calibré selon le protocole donné par le fabricant (Mauna Kea Technologies 2014b):

- Chauffage de la sonde 15min
- Enregistrement de l'environnement (sonde placée dans l'air)
- Calibrage des paramètres de transmission des fibres optiques : la sonde est plongée dans une solution de fluorophore 488 puis 660 (« Quantikit 488/660 ») ; le but est de normaliser les valeurs de signal provenant des différentes fibres optiques de la sonde.

Le Cellvizio est alors prêt pour réaliser les acquisitions.

Entre chaque solution de calibrage puis entre la lecture de chaque point, la sonde est nettoyée en la plongeant dans une solution de peroxyde d'hydrogène 6% puis dans de l'eau distillée.

## 2. Méthode d'acquisition

La fluorescence de chaque point d'administration est contrôlée 1 fois par jour, 5 jours par semaine. Pour cela, la sonde du Cellvizio® est posée au contact de la peau, puis est déplacée sur l'ensemble du point (en gardant toujours le contact avec la peau) comme schématisé ci-dessous (fig. 12). Un film est réalisé pendant la lecture de chaque point, d'une durée de 2min environ.

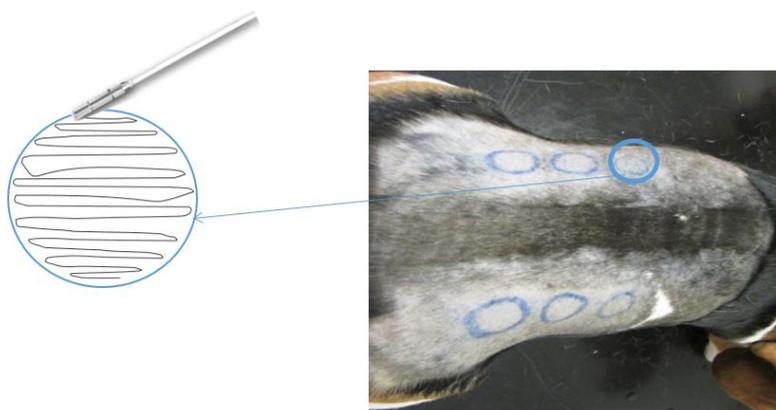


Figure 12 : Schéma de lecture d'un point

## E. Analyses

Nous avons utilisé un logiciel, l'IC-viewer, afin d'analyser les vidéos réalisées image par image (12 images par seconde) selon le procédé présenté en annexe 1. Pour chaque image, nous avons ainsi extrait les données suivantes :

- Moyenne d'intensité (Mean)
- Médiane d'intensité (Median)

- Maximum d'intensité (Max)
- Minimum d'intensité (Min)

Ces données ont ensuite été exploitées sous Excel.

Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement à l'aide du logiciel R (version 3.2.3 (2015-12-10) "Wooden Christmas-Tree") en réalisant des tests de Mann & Whitney.

## F. Contrôle de la fluorescence par biopsie

Pour certains chiens, une biopsie des zones transfectées a été réalisée, afin de contrôler les résultats obtenus avec le cellvizio. Les coupes histologiques réalisées à partir des biopsies ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence permettant de mettre en évidence la présence des différents fluorochromes utilisés.

Les biopsies ont été réalisées à l'aide d'un biopsie punch de 6mm après anesthésie locale (lidocaïne SC : 4 fois 0,5mL Lurocaïne® autour de chaque point à biopser soit 4x10mg de lidocaïne par point) et nettoyage chirurgical de la zone (chlorhexidine savon et rinçage au versol, 5 fois 1min).

Les biopsies de derme ainsi réalisées ont été plongées dans une solution de formol puis envoyées au laboratoire Vectalys pour analyse.

## G. Bilan : liste des différents essais réalisés

	<b>Chien</b>	<b>Lentivecteurs</b>	<b>Administration épidermique</b>	<b>Suivi Cellvizio</b>	<b>Biopsie</b>
<b>V0.1 - Juin 2015</b>	DA/DC	tdTomato-D	Injection	J4 à J14	OUI (J14)
<b>V0.2 - Juillet 2015</b>	DH	tdTomato-D ZsGreen-C2	TS + R (CP)	J4 à J26	NON
<b>V0.3 - Octobre 2015</b>	DB	K-tdTomato-D ZsGreen-C2	R (SBO)	J4 à J28	NON
<b>V0.4 - Novembre 2015</b>	U	ZsGreen-C2 ZsGreen-D	R (CP/SBO)	J5 à J29	OUI (J29)
<b>V0.4 - Novembre 2015</b>	DK	TRE-ZsGreen-D + TetOn-D	R (SBO)	J7 à J24	OUI (J24)
<b>V0.5 - Janvier 2016</b>	EA	EF1-ZsGreen K14-ZsGreen	R (SBO)	J5 à J23	OUI (J9 + J22)

Tableau 3 : Bilan des essais réalisés

Méthode d'administration : TS = Tape Stripping, R = Raclage ;  
(Administrateur : CP = C. Pressanti , SBO = S. Boullier)

## II. Résultats

Nous avons ici cherché à transférer des cellules auxquelles nous aurions ensuite accès facilement afin de suivre de façon non invasive leur fluorescence. Or la méthode choisie ici ne permet d'avoir accès qu'aux cellules de l'épiderme, c'est pour cela que nous avons ciblé les kératinocytes de l'épiderme.

Suite à cette administration, nous souhaitons obtenir une expression durable du transgène. Or comme nous l'avons vu en première partie, l'épiderme est formé à partir des cellules souches de la couche basale qui se multiplient pour donner naissance à d'autres cellules souches ou à des cellules filles qui n'ont plus la capacité de se multiplier, qui vont se différencier puis desquamer. Ainsi, le transfert de gènes à des cellules autres que les cellules du *stratum basale* ne permettra qu'une expression transitoire du transgène du fait de la desquamation des cellules transfectées. Nous allons donc ici **cibler le stratum basale**. Une fois ces cellules porteuses du transgène, ce dernier s'intégrant au génome de l'hôte grâce à l'utilisation de lentivecteurs, il sera transmis à toutes les cellules filles donc *in fine* aux cellules de toutes les couches de l'épiderme.

De plus, nous avons également vu précédemment que la couche cornée est la principale couche de protection de l'épiderme, particulièrement efficace contre la pénétration des microorganismes lorsqu'elle est intacte. Nous avons donc cherché une méthode permettant de **déposer les lentivecteurs sous le stratum corneum, ou déposer les vecteurs sur la peau une fois le stratum corneum retiré.**

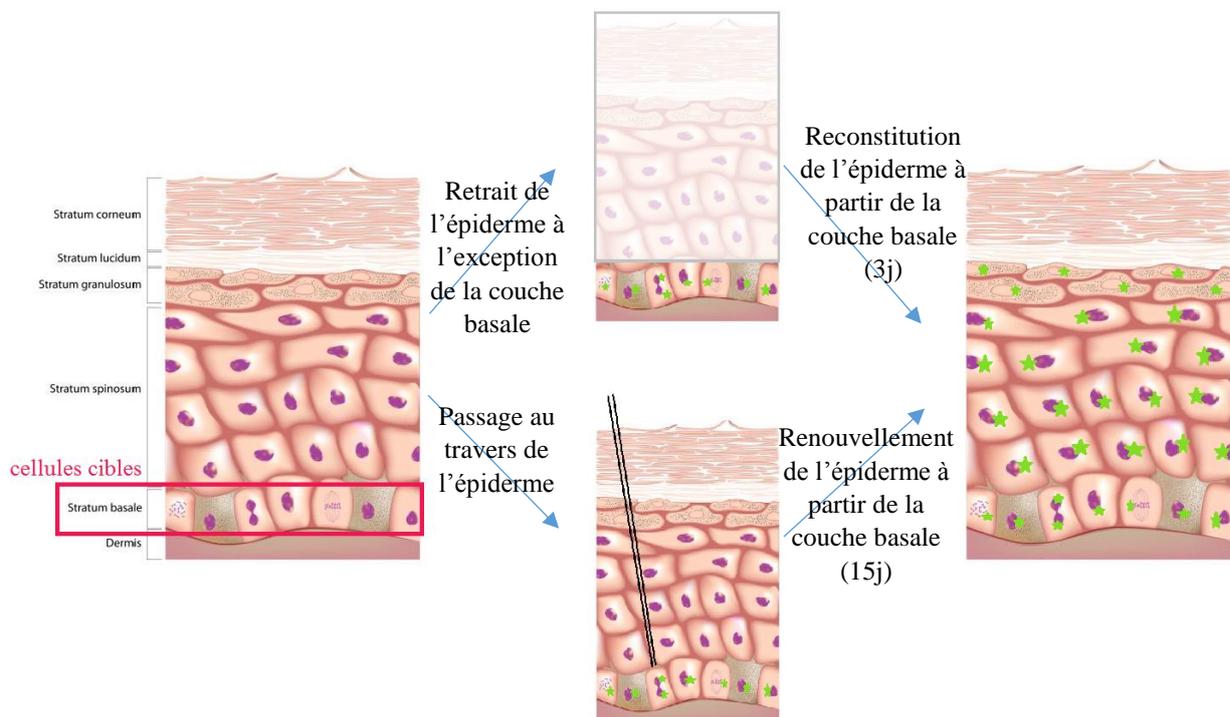


Figure 13 : Schématisation de l'objectif de l'administration (schéma d'épiderme obtenu sur [www.shutterstock.com](http://www.shutterstock.com))

## A. V0.1 : Administration du lentivecteur par injection

Pour le premier essai, 50µL de solution de lentivecteurs ont été injectés dans la peau d'un chien le plus superficiellement possible à l'aide d'une seringue à insuline. Le lentivecteur utilisé était tdTomato-D. L'administration a été réalisée selon le schéma suivant :

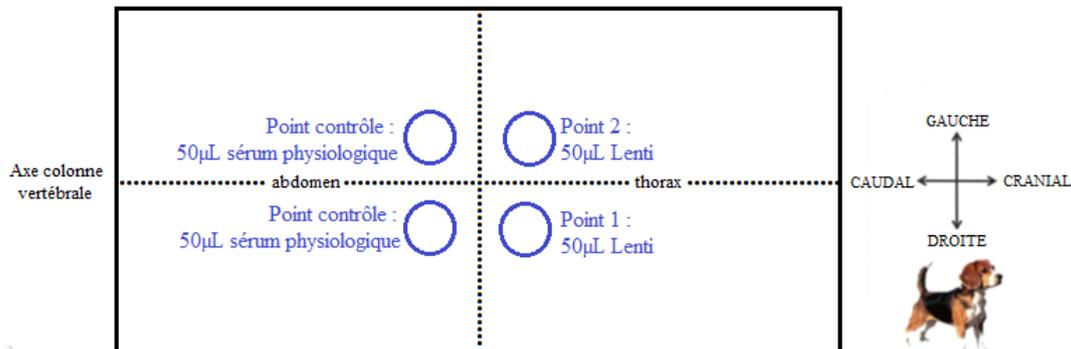


Figure 14 : Schéma d'administration V0.1 (chiennes DA et DC), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain)

Le suivi quotidien de la fluorescence à l'aide du Cellvizio® de J4 à J14 n'a montré aucune image compatible avec des cellules exprimant le fluorochrome. On obtient globalement le même type d'image pour les points contrôle et les points transfectés comme le montre la figure 15 : soit une absence de structure identifiable (images a et c), soit des poils (images b et d).

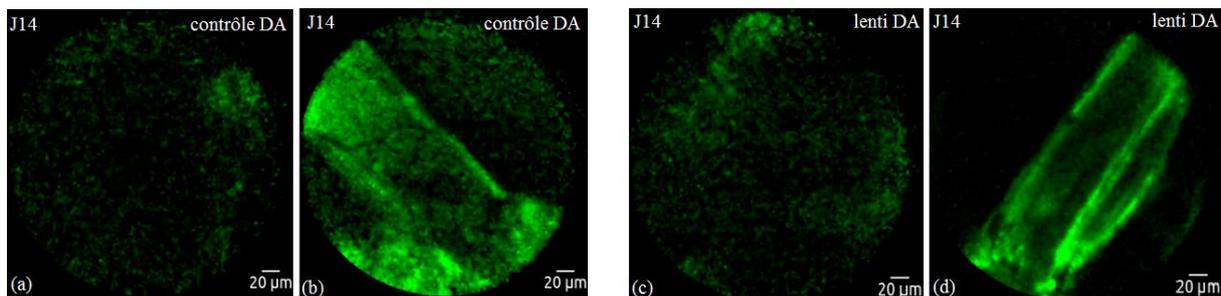


Figure 15 : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des points de DA à J14 : (a) et (b) : contrôle ; (c) et (d) : point transfecté

Une biopsie des points transfectés a été réalisée le dernier jour de lecture (J14). Les coupes histologiques ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence :

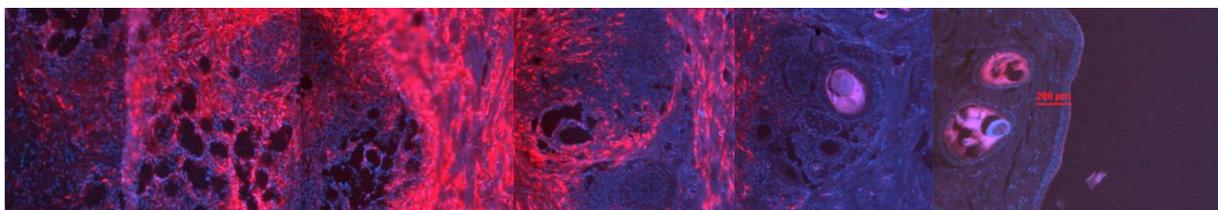


Figure 15 : Coupe transversale de peau d'un point transfecté (chiène DC) observée au microscope à épifluorescence (Laboratoire Vectalys)

On remarque ici une fluorescence, traduisant la présence de cellules transfectées de façon efficace, uniquement dans l'hypoderme, à plus de 200µm de profondeur, donc hors de portée du Cellvizio®. Cette méthode d'administration n'a donc pas permis de transfecter les cellules de l'épiderme, ni les cellules superficielles du derme.

## B. V0.2 : Administration topique des lentivecteurs après abrasion de l'épiderme

La première méthode d'application des lentivecteurs n'ayant pas été concluante, lors du deuxième essai deux méthodes d'application différentes ont été testées sur une même chienne : le raclage et le tape stripping. De plus, un second lentivecteur (ZsGreen-C2) a également été testé en parallèle du premier (TdTomato-D). Pour cet essai, aucun contrôle par biopsie n'a été réalisé.

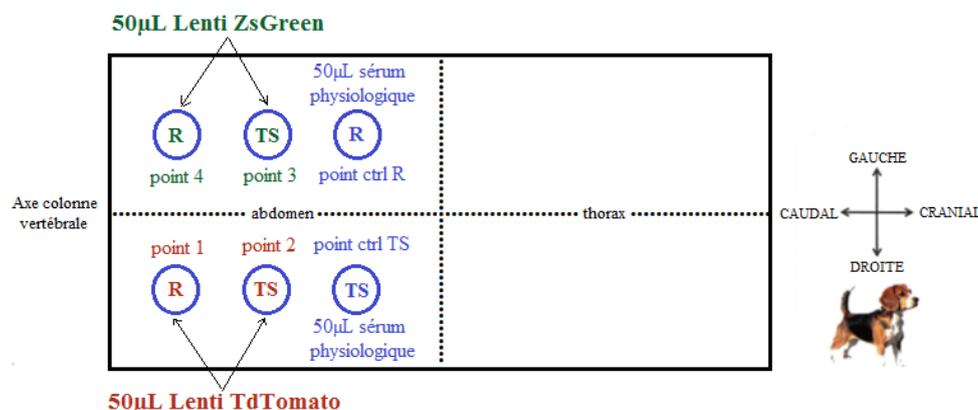


Figure 16 : Schéma d'administration V0.2 (chienne DH), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain)  
Méthode d'administration : R = Raclage , TS = Tape Stripping ; Administrateur = C. Pressanti

### 1. Raclage

Visuellement aucune différence évidente n'est remarquable entre les vidéos des différents points « raclage » (contrôle/TdTomato-D/ZsGreen-C2).

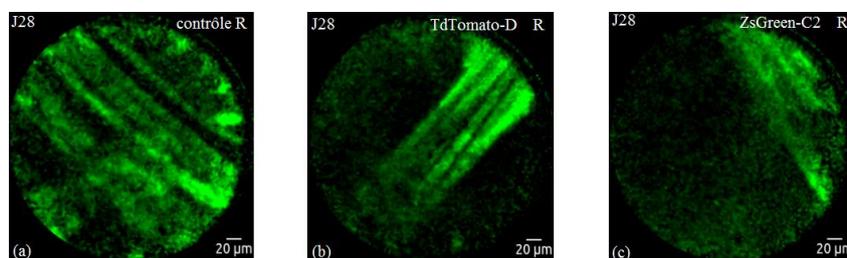
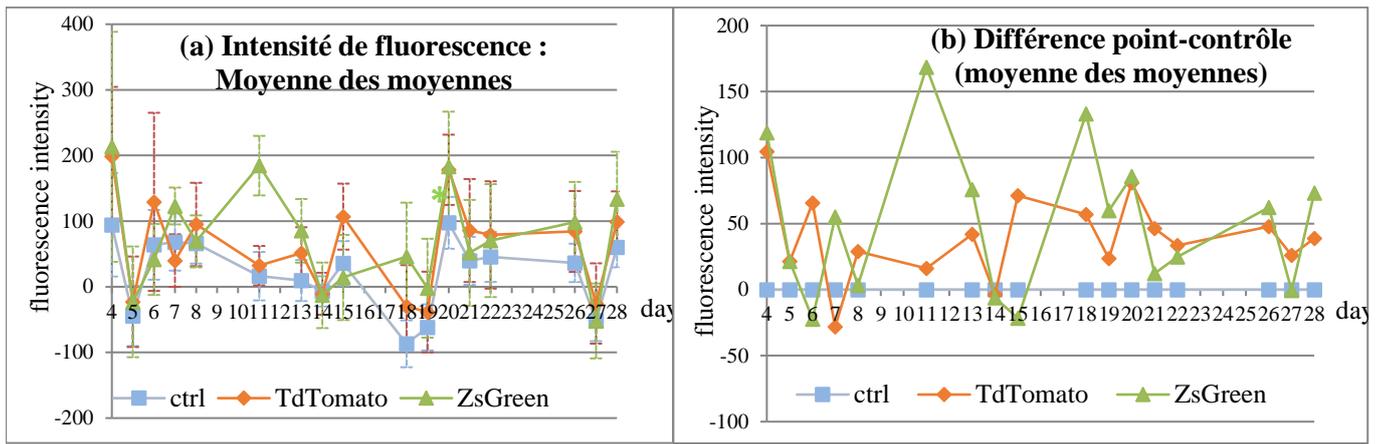


Figure 17 : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des différents points (V0.2, DH, raclage, J28) :  
(a) contrôle ; (b) TdTomato-D ; (c) ZsGreen-C2

En ce qui concerne l'intensité moyenne de fluorescence, elle est globalement supérieure pour les points transfectés par rapport au point contrôle, et ce de façon légèrement plus marquée pour ZsGreen que pour TdTomato comme le montre le graphique 1 ci-dessous.

La réalisation de tests statistiques (test de Wilcoxon) montre que la différence entre un point donné et le contrôle est significative dans tous les cas à l'exception de ZsGreen à J21 (cf annexe 2). Toutefois, la différence est significative même lorsque le point transfecté a une intensité inférieure au point contrôle, ce qui n'a pas d'explication biologique. Ainsi, même les différences apparemment dues aux variations physiologiques sont statistiquement significatives, l'analyse statistique n'est donc pas pertinente.

Ceci est le cas pour tous les essais suivants, les résultats de ces tests statistiques ne seront donc plus donnés mais sont consultables en annexe 2.



Graphique 1 : (a) Evolution de la moyenne des moyennes d'intensité de fluorescence des 3 points V0.2 R de J4 à J28 (b) Différence d'intensité de la moyenne des moyennes entre un point donné et le point contrôle

L'absence d'image compatible avec l'observation de cellules transfectées et l'absence de test statistique pertinent ne nous permet néanmoins pas d'affirmer que les différences observées ne sont pas simplement dues aux variations physiologiques.

## 2. Tape Stripping

De la même façon que pour le raclage, pour les points dont l'administration a été réalisée après TS, aucune différence n'est remarquée entre les vidéos des différents points.

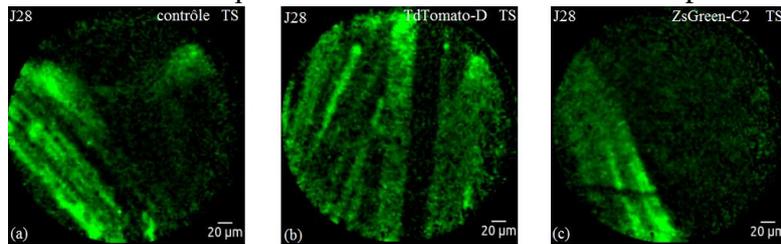
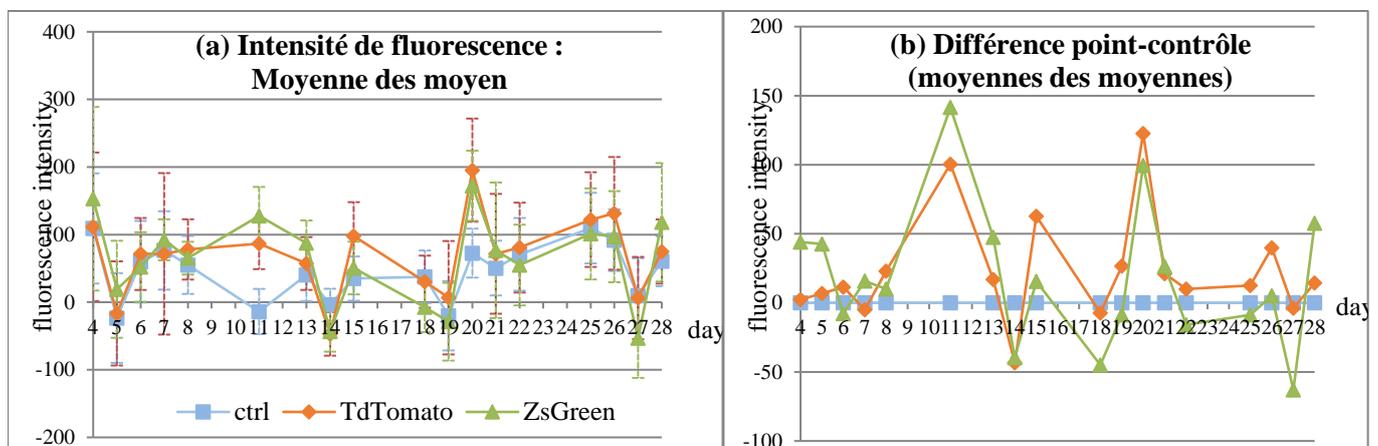


Figure 18 : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des différents points (V0.2, DH, Tape Stripping, J28) : (a) contrôle ; (b) TdTomato-D ; (c) ZsGreen-C2

Pour les intensités de fluorescence moyenne, les résultats obtenus pour le Tape Stripping sont moins marqués que pour le raclage avec des valeurs d'intensité pour les points transfectés fréquemment inférieures au point contrôle (9/36 soit une valeur sur 4).



Graphique 2 : (a) Evolution de la moyenne des moyennes d'intensité des 3 points V0.2 TS de J4 à J28 (b) Différence d'intensité de la moyenne des moyennes entre un point donné et le point contrôle pour V0.2 TS

### C. V0.3 : essai d'un nouveau promoteur

Le raclage étant la méthode d'administration donnant les meilleurs résultats pour le test précédent, nous avons cherché à valider ce protocole en le répétant une seconde fois. De plus, le promoteur constitutif du lentivecteur codant pour TdTomato a été remplacé par un promoteur ne permettant l'expression du transgène que dans les kératinocytes. Le protocole utilisé est résumé sur la figure ci-dessous :

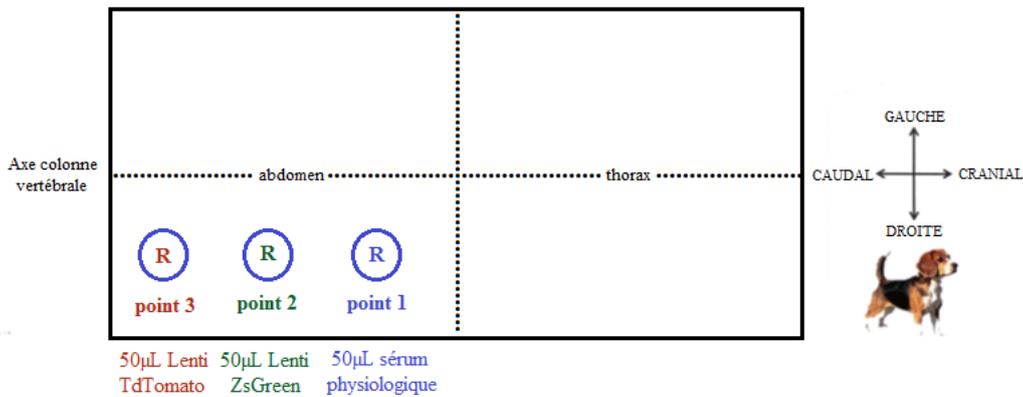
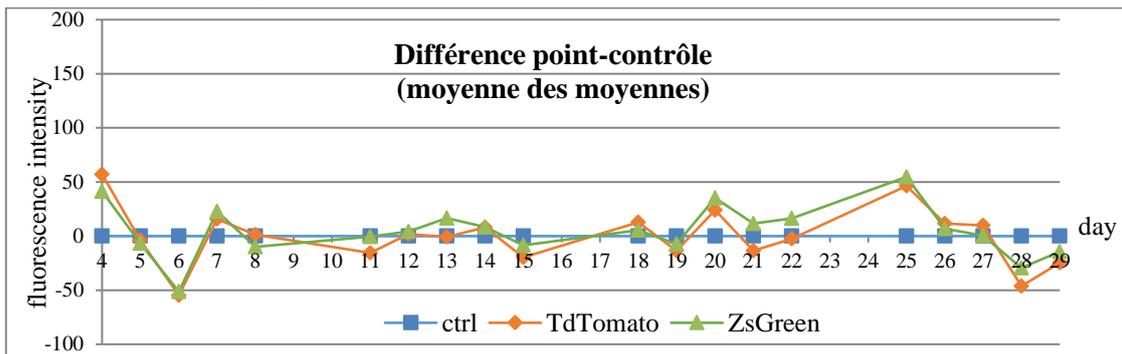


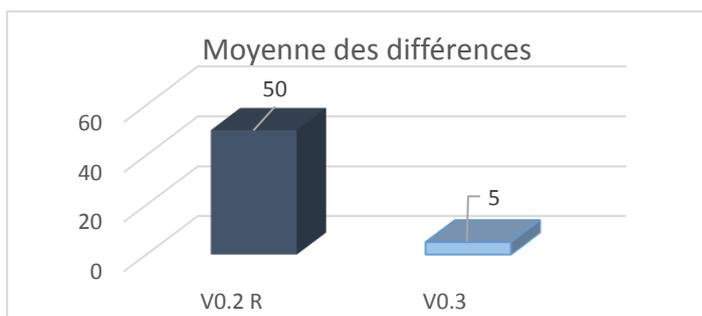
Figure 19 : Schéma d'administration V0.3 (chienne DB), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain)  
Administrateur = S. Boullier ; Méthode d'administration = raclage

Les images obtenues avec le Cellvizio® sont semblables à celles des essais précédents. Nous avons obtenu les résultats chiffrés suivants :



Graphique 3 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre un point donné et le point contrôle pour V0.2 TS

On remarque ici que les points transfectés ont une intensité moyenne oscillant autour du point contrôle à l'exception de ZsGreen de J20 à J25. De plus, les différences d'intensité sont bien moins importantes que pour le raclage de V0.2 comme le montre le graphique ci-dessous (valeurs des points ZsGreen, pour lequel le lentivecteur utilisé est exactement le même pour V0.2 et V0.3, contrairement à TdTomato) :



Graphique 4 : Moyenne des différences des « moyennes des moyennes » d'intensité de fluorescence entre ZsGreen et son contrôle tous jours confondus pour V0.2 R et V0.3

Les résultats obtenus ne correspondent donc pas à ceux obtenus lors de l'essai précédent, la transfection semble ici ne pas avoir été efficace, bien qu'aucun contrôle par biopsie n'ait été réalisé pour le vérifier.

## D. V0.4

### 1. U : Comparaison de deux administrateurs différents

Entre l'essai V0.2 pour lequel l'administration par raclage semble avoir été efficace et l'essai V0.3, la seule différence pour ZsGreen a été l'administrateur : C. Pressanti (chargée de consultation en dermatologie à l'ENVT) a réalisé les raclages pour V0.2 et S. Boullier (maître de conférences en immunologie à l'ENVT) pour V0.3. Pour vérifier si les différences de résultats obtenus viennent de ces différents administrateurs, nous avons donc réalisé un essai avec les deux administrateurs en parallèle. Pour ce 4<sup>ème</sup> essai, seul le fluorochrome ZsGreen a été utilisé, avec un promoteur constitutif, et à deux niveaux de pureté différents (C2 et D). L'administration a été réalisée selon le schéma ci-dessous :

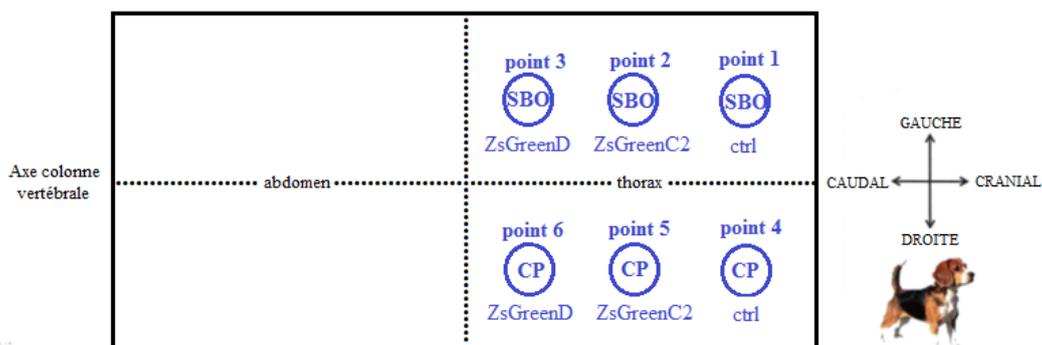
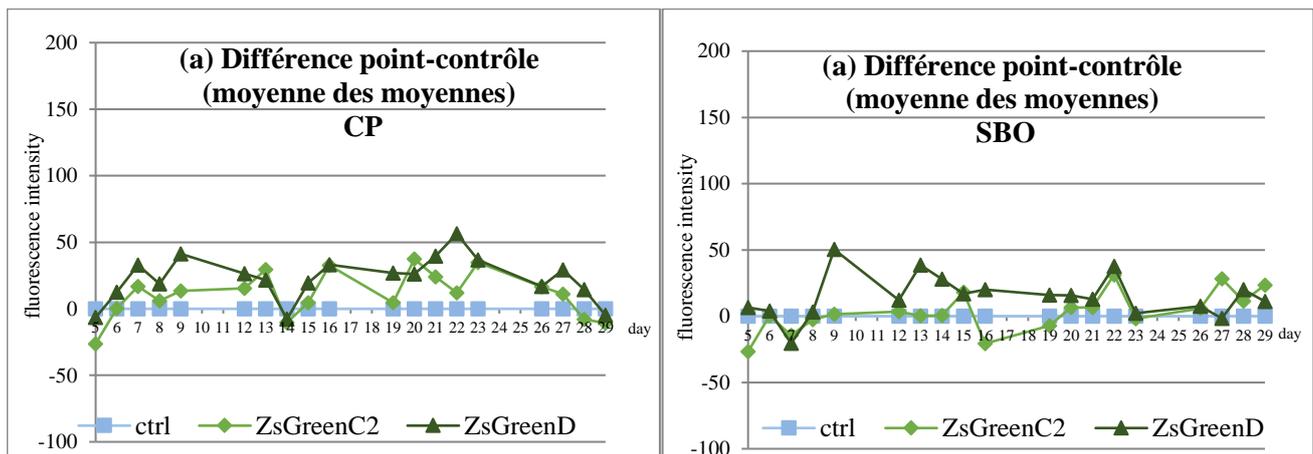


Figure 20 : Schéma d'administration V0.4 (chienne U), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain)  
Administrateurs : SBO = S. Boullier, CP = C.Pressanti ; Méthode d'administration = raclage

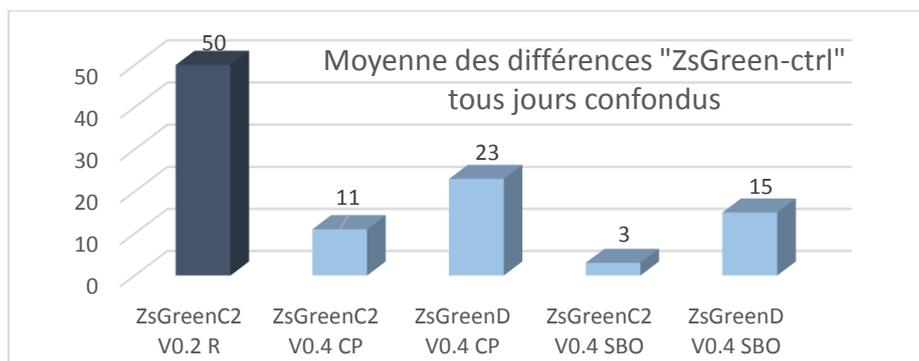
Nous avons obtenu les résultats suivants :



Graphique 5 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence  
entre un point donné et son point contrôle pour V0.3  
(a) : administrateur = CP ; (b) : administrateur = SBO

L'intensité de fluorescence des points transfectés est globalement supérieure au point contrôle, et ce de façon plus marquée pour ZsGreenD que pour ZsGreenC2, et plus pour l'administrateur CP que pour SBO.

Néanmoins, les différences d'intensité entre les points transfectés et le point contrôle sont beaucoup plus faibles que celles obtenues lors de V0.2 comme le montre le graphique ci-dessous.



Graphique 6 : Moyenne des différences des « moyennes des moyennes » d'intensité de fluorescence entre ZsGreen et son contrôle tous jours confondus pour V0.2 R et V0.4

Les vidéos réalisées le dernier jour ne montraient pas de différence évidente par rapport aux jours précédents : on retrouve de façon aléatoire de rares images pouvant être compatible avec des cellules transfectées (« taches » vertes), sur les points transfectés mais aussi sur les points contrôle :

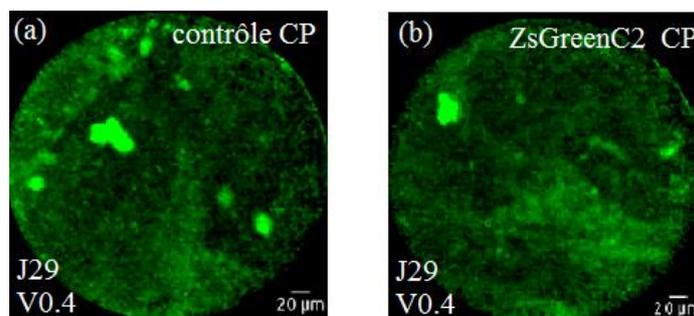


Figure 21 : : Exemple d'images obtenues lors de la lecture des différents points (V0.4, U, CP, J29)  
(a) contrôle, (b) ZsGreen-C2 (point 5)

Des biopsies réalisées après la dernière lecture (J29) sur les points 5 et 6 n'ont toutes deux montré aucune cellule fluorescente, seule l'autofluorescence des poils est visible comme le montre la figure 22 :

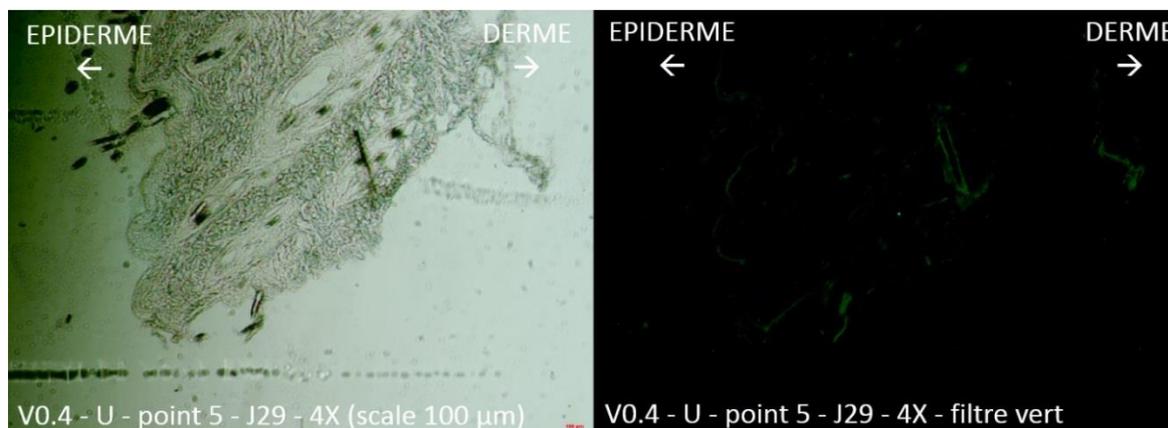


Figure 22 : Coupe histologique de peau du point 5 (CP, ZsGreenC2) de V0.4 U à J29 observée au microscope optique à épifluorescence à un même endroit - A gauche : sans filtre ; A droite : avec filtre vert

Il semble donc que nous n'ayons pas réussi à transfecter les cellules, que cette transfection ait été trop courte dans le temps, ou que les rares images pouvant être compatibles avec des cellules transfectées au Cellvizio® soient en nombre trop faible pour être visible au microscope à épifluorescence.

## 2. DK : essai d'un promoteur inductible

En parallèle de la comparaison des deux administrateurs, nous avons testé un promoteur inductible : TRE (Tetracycline Responsive Element), afin de stimuler l'expression du transgène. Pour cela, après l'administration du lentivecteur (cf figure 23), la chienne DK a reçu quotidiennement de la doxycycline (10mg/kg).

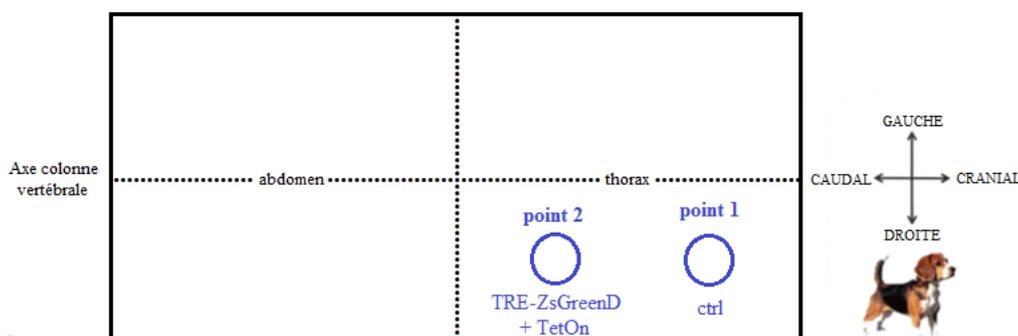
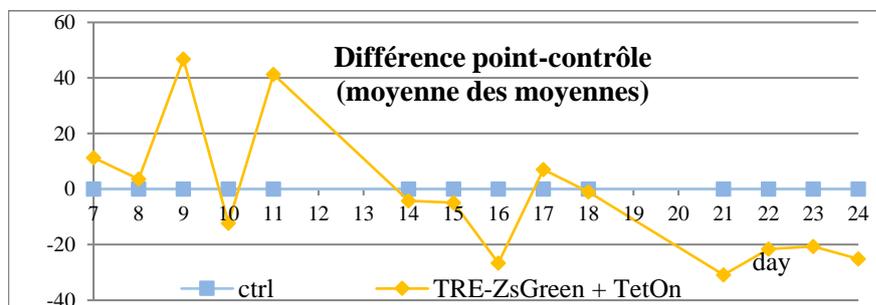


Figure 23 : Schéma d'administration V0.4 (chienne DK), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain)  
Administrateur = S. Boullier ; Méthode d'administration = raclage

Nous avons obtenu les résultats suivants :



Graphique 7 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre le point transfecté et le point contrôle pour V0.4 DK de J7 à J24

L'intensité moyenne du point transfecté est majoritairement inférieure à celle du point contrôle, avec de faibles différences d'intensité.

Les biopsies réalisées à J24 n'ont pas révélé la présence de cellules transfectées.

## E. V0.5 : Comparaison de deux promoteurs avec le même fluorochrome

Enfin, un dernier essai a été réalisé pour comparer les deux promoteurs EF1 (ubiquitaire) et K14 (kératinocytes).

Les biopsies des points réalisés le dernier jour de chaque lecture (V0.3 à J24 et V0.4 à J29) ayant toutes deux révélé une absence d'expression du transgène, nous avons ici réalisé chaque administration en double, de façon à pouvoir réaliser une biopsie intermédiaire avant la fin de l'essai. Les points 1 à 6 ont été lus jusque J9, à J9 les points 5 et 6 ont été biopsés puis jusque J22 seuls les points 1 à 3 ont été lus. Enfin, une biopsie des points 2 et 3 a été réalisée à J22.

Une possible **influence** de l'**ordre de lecture** et du **temps de chauffage du laser** ayant été mise en évidence pour le chien U (V0.4) (cf discussion), pour cet essai le laser a été allumé systématiquement plus de 2h avant l'acquisition des données (contre 15min avant pour les essais précédents). De plus, la lecture du point contrôle a été réalisée 2 fois : avant puis après la lecture des points transfectés. Les points ont donc été lus chaque jour dans l'ordre suivant : 1 – 2 – 3 – 1 puis 4 – 5 – 6 – 4 (cf schéma d'administration figure 24).

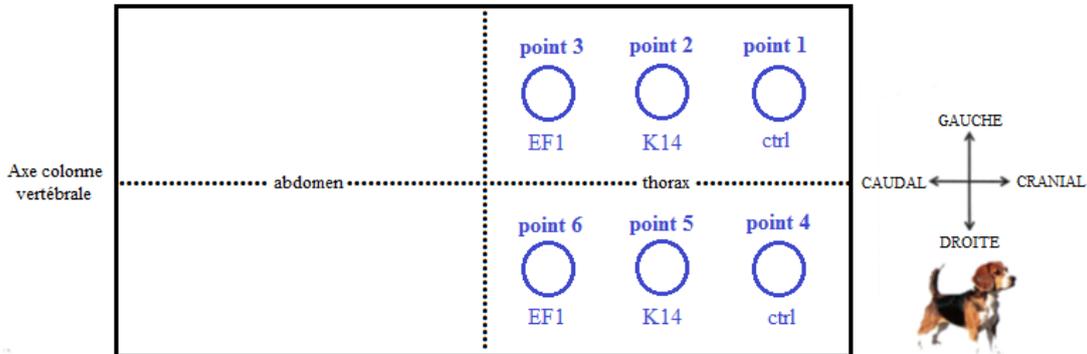
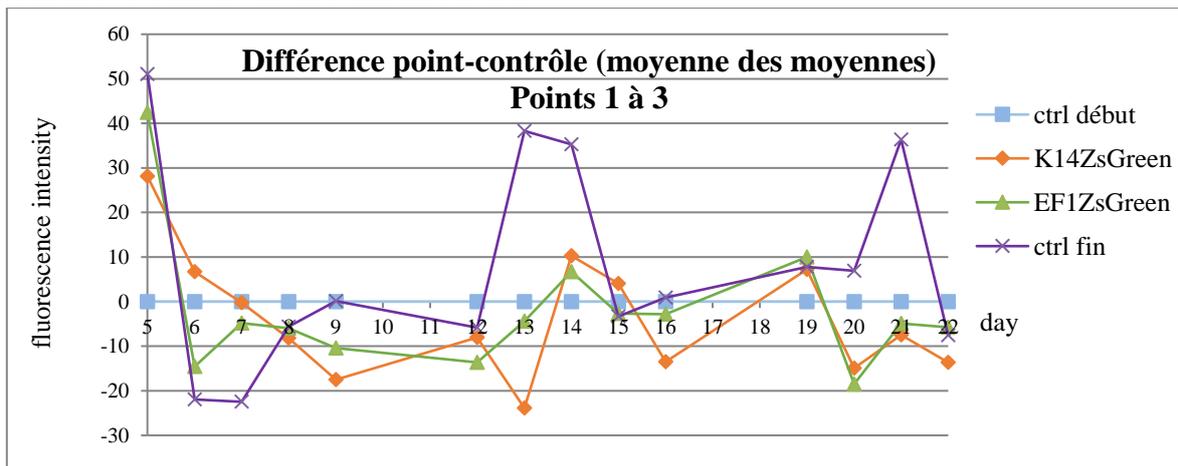
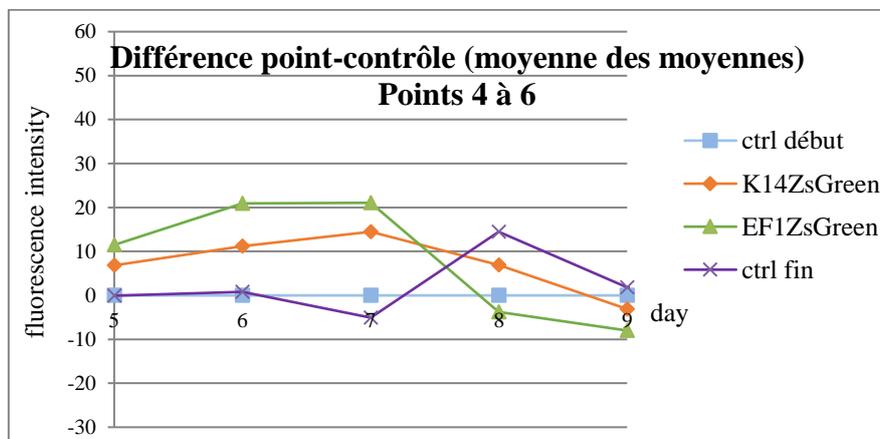


Figure 24 : Schéma d'administration V0.5 (chienne EA), vue dorsale (d'après schéma d'E. Totain)  
Administrateur = S. Boullier ; Méthode d'administration = raclage

Nous avons obtenu les résultats suivants :



Graphique 8 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre un point donné et son point contrôle pour V0.5, points 1 à 3, de J5 à J22



Graphique 9 : Différence entre les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence entre un point donné et son point contrôle pour V0.5, points 4 à 6, de J5 à J9

On remarque ici que l'ordre de grandeur de la différence entre les points transfectés et le point contrôle est globalement le même qu'entre le point contrôle lu 2 fois à quelques minutes d'intervalle. Il semble donc que les différences observées correspondent aux variations physiologiques.

Les biopsies réalisées à J9 ne montrent pas non plus de fluorescence autre que l'autofluorescence des poils :

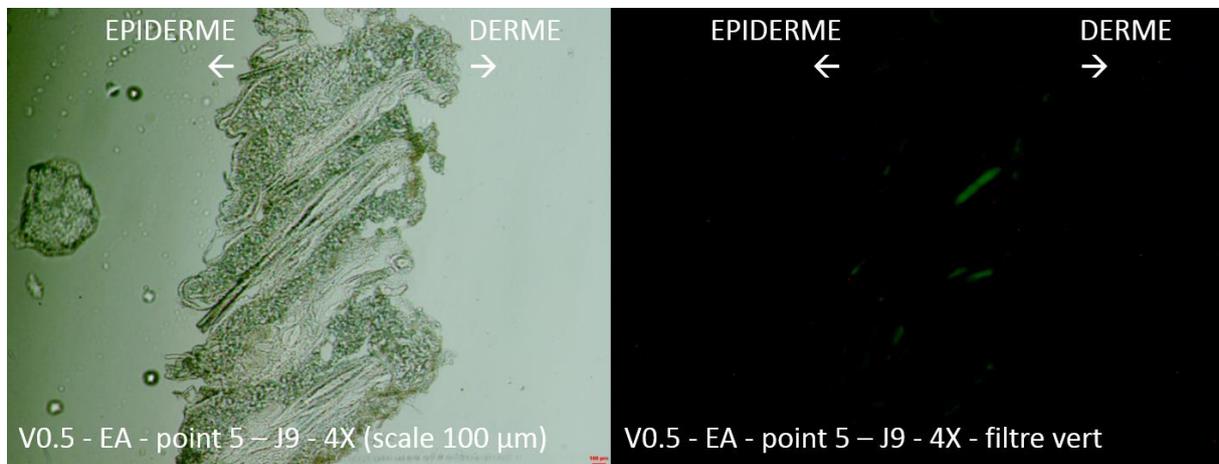


Figure 25 : Coupe histologique de peau du point 5 (V0.5) à J9 observée au microscope optique à épifluorescence à un même endroit - A gauche : sans filtre ; A droite : avec filtre vert

L'analyse des intensités de fluorescence et des biopsies semble montrer une absence de transfection efficace des kératinocytes.

### III. Discussion

Cette étude traitant de la mise au point d'un protocole avec de nombreux choix réalisés, nous allons ici revoir chacun des choix de matériels et méthodes les uns après les autres.

#### A. Animaux

Nous avons ici choisi de mettre au point une méthode permettant de tester un vaccin à visée humaine sur le chien, et non sur des rongeurs, animaux les plus utilisés en expérimentation animale, notamment en immunologie (Baumans 2004; Hein, Griebel 2002). Le choix de cette espèce présente de nombreux avantages mais aussi certains inconvénients.

Tout d'abord, le chien est un animal pouvant être manipulé aisément **sans anesthésie** contrairement aux rongeurs sur lesquels les manipulations vigiles sont limitées. Le projet au sein duquel s'insère ce travail nécessite par exemple l'administration d'un vaccin par injection intradermique en 10 points et à 3 reprises, ce qui ne peut pas être réalisé sans anesthésie sur des rongeurs. Or l'anesthésie influence le système immunitaire. Bien que de nombreuses études aient montré que l'anesthésie n'entraîne pas d'échec vaccinal chez les carnivores domestiques (Fischer et al. 2007), d'autres études ont montré que les molécules utilisées lors de l'anesthésie influencent la réponse immunitaire (Kona-Boun, Silim, Troncy 2005). C'est le cas entre autres de la kétamine, molécule très utilisée pour l'anesthésie des rongeurs. En effet, la kétamine diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (Kawasaki et al. 1999) et perturbe l'expression des molécules d'adhésion des neutrophiles (Weigand et al. 2000).

Le **grand gabarit** d'un chien comparé aux rongeurs est un autre avantage. En effet, cela permet de réaliser des **prélèvements sanguins** de plus grands volumes et de façon répétée sans sacrifier les animaux. Ceci est par exemple nécessaire pour réaliser le suivi de la réponse immunitaire cellulaire dans le cadre des phases de test d'un vaccin thérapeutique comme c'est ici le cas.

Enfin, les chiens de laboratoire présentent une plus grande diversité génétique que les rongeurs de laboratoire, ce qui se rapproche plus des conditions réelles d'utilisation d'un vaccin chez la femme.

L'inconvénient principal du chien par rapport aux rongeurs est son prix d'achat et d'entretien :

Cost (£ sterling) of	Purchase	Weekly upkeep
Mouse	1.5–25	1
Rat	5–40	2.33
Rabbit	48–90	15
Pig	250	70
Sheep	250	50
Goat	380	50
Dog	600–900	40–70
Primate	300–2000	80–200

Tableau 4 : Coût moyen des animaux de laboratoire en Grande-Bretagne (Rashid et al. 2004)

## B. Vecteurs de gènes

### 1. Promoteurs

Les essais ici réalisés ne permettent pas de montrer la supériorité d'un promoteur par rapport aux autres. Néanmoins, l'utilisation d'un promoteur spécifique des kératinocytes ou d'un promoteur inductible permet d'augmenter la sécurité d'utilisation des lentivecteurs. En effet, ceci restreint dans le temps ou l'espace l'expression du transgène et limite donc les conséquences d'une possible mutagenèse insertionnelle.

### 2. Fluorochromes

Nous avons utilisé deux fluorochromes différents pour marquer les cellules transfectées.

Le premier fluorochrome est TdTomato, dont les spectres d'absorption et d'émission sont présentés ci-dessous :

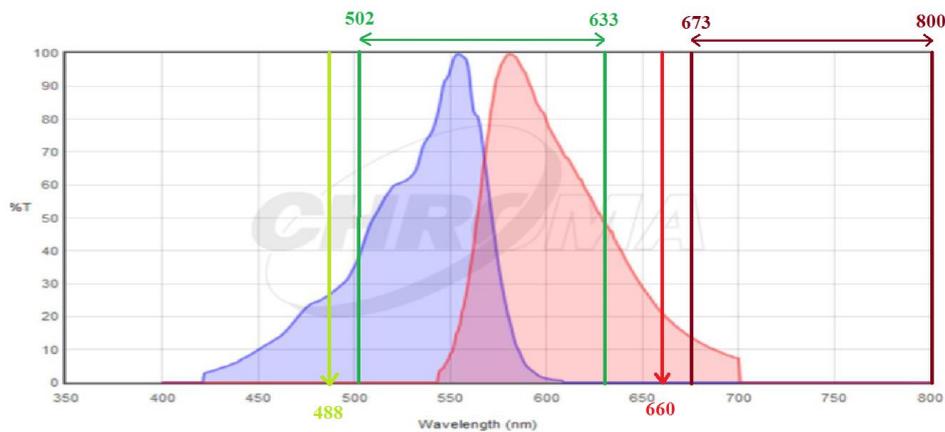


Figure 26 : Spectre d'absorption (courbe bleue) et d'émission (courbe rouge) de TdTomato, et plages d'excitation (flèches verte claire et rouge) et de réception (entre les lignes verte et rouge foncé) du Cellvizio®

On remarque ici que ce premier fluorochrome n'est pas le plus adapté à notre méthode de lecture de la fluorescence. En effet, le pic d'excitation de TdTomato est à 554nm, ce qui est relativement éloigné des deux longueurs d'ondes d'excitation du Cellvizio® (488 et 660nm). On remarque également que seule la plage de réception du laser « vert » est utilisable. En effet, l'émission de TdTomato dans la plage de lecture du laser « rouge » est très limitée.

Le second fluorochrome est ZsGreen :

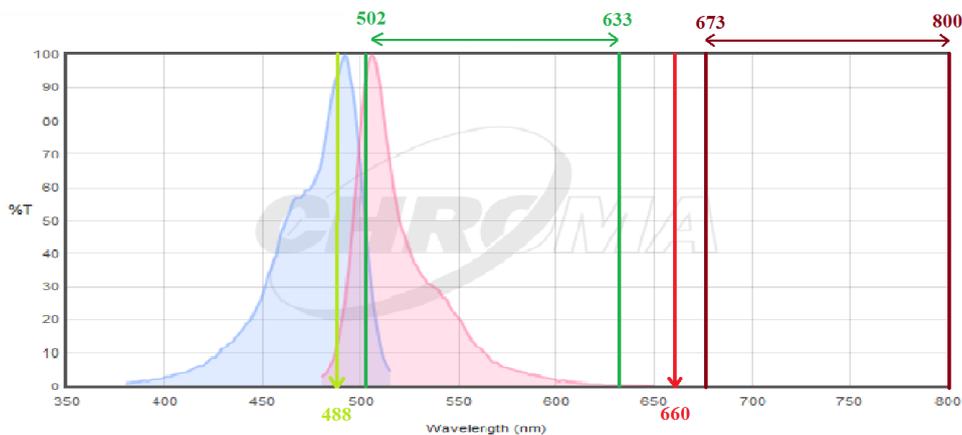


Figure 27 : Spectre d'absorption (courbe bleue) et d'émission (courbe rouge) de ZsGreen, et plages d'excitation (flèches verte claire et rouge) et de réception (entre les lignes verte et rouge foncé) du Cellvizio®

On remarque que ce dernier est beaucoup plus adapté pour une lecture au Cellvizio®. En effet, le pic d'excitation de ZsGreen (493nm) est très proche de la longueur d'onde d'excitation du laser « vert » (488nm). De plus, la majeure partie du spectre d'émission de cette molécule, est comprise dans la plage de réception du laser « vert ». Par contre le laser « rouge » ne peut pas être exploité avec cette molécule. En effet, la longueur d'onde d'excitation du laser « rouge » n'est pas comprise dans le spectre d'excitation de ZsGreen.

Nous avons donc avec ZsGreen un fluorochrome adéquat pour une lecture avec le laser « vert » du Cellvizio®. Or l'utilisation de ce laser sur la peau des chiens s'est avérée ne pas être idéale. En effet, avec les longueurs d'ondes correspondant au laser « vert », nous mettons en évidence un **phénomène majeur d'autofluorescence** de la peau : même sur les points contrôle (non transfectés), de nombreux éléments sont visibles lors des acquisitions avec le Cellvizio®, notamment les poils, et sont d'une intensité élevée, comme le montre la figure 28 ci-dessous.

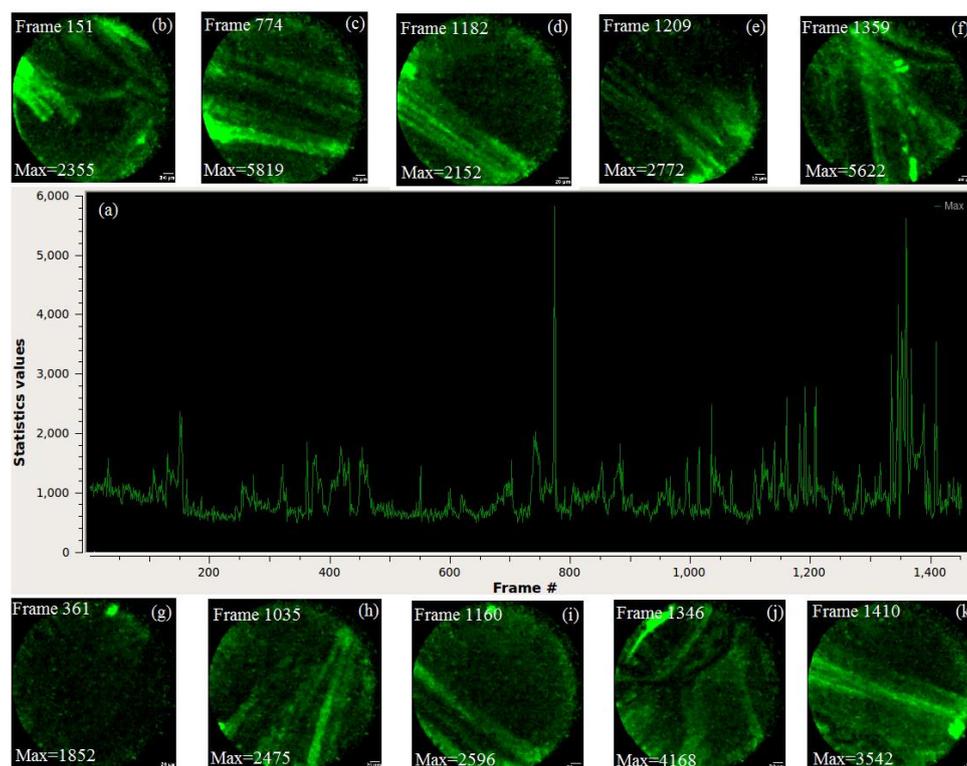


Figure 28 : (a) Evolution de l'intensité maximale sur une acquisition (V0.5 : point 1 contrôle ; J5 : MEAN Max=957) avec le laser « vert » (488nm) - (b à k) Images correspondant aux pics d'intensité.

On remarque ici que pour une grande majorité, les pics de la courbe de maximum d'intensité correspondent à des poils, avec une intensité de 2 à 5 fois supérieure à la moyenne (Mean Max). L'autofluorescence notamment due aux poils est donc importante dans la plage de lecture du laser « vert » ici imposée par notre fluorochrome.

Cette autofluorescence est en théorie réduite dans la fenêtre « proche infra-rouge » comprise entre 650 et 900nm (Shcherbakova, Verkhusha 2013). En pratique on retrouve également des pics d'intensité sur la courbe d'évolution des valeurs d'intensité maximum comme le montre la figure 29, mais ils sont en moyenne moins élevés et moins nombreux que dans la fenêtre de lecture du laser « vert ».

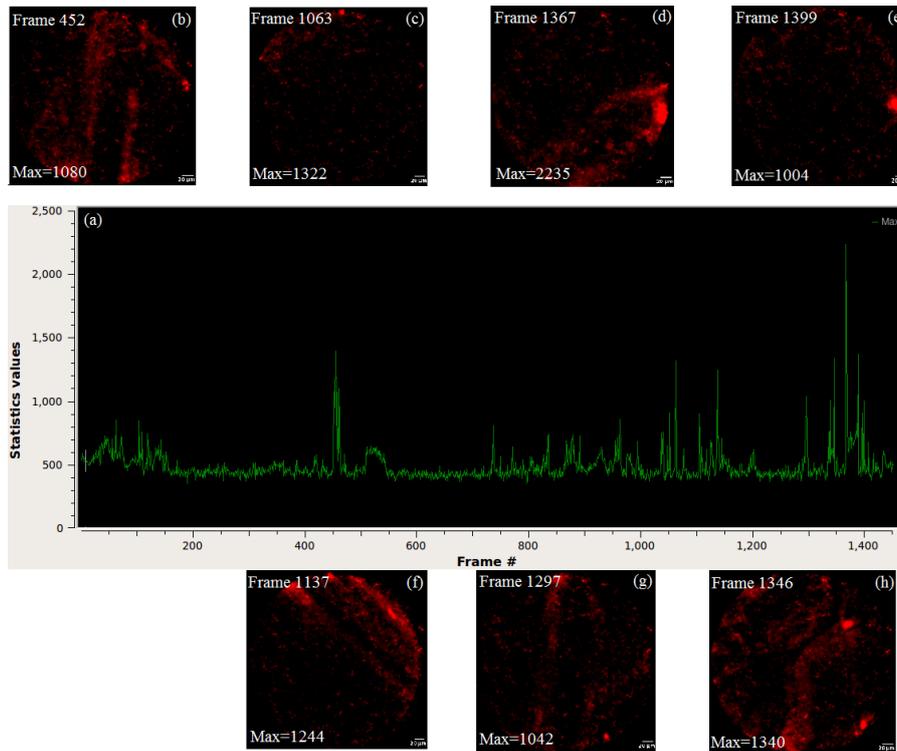
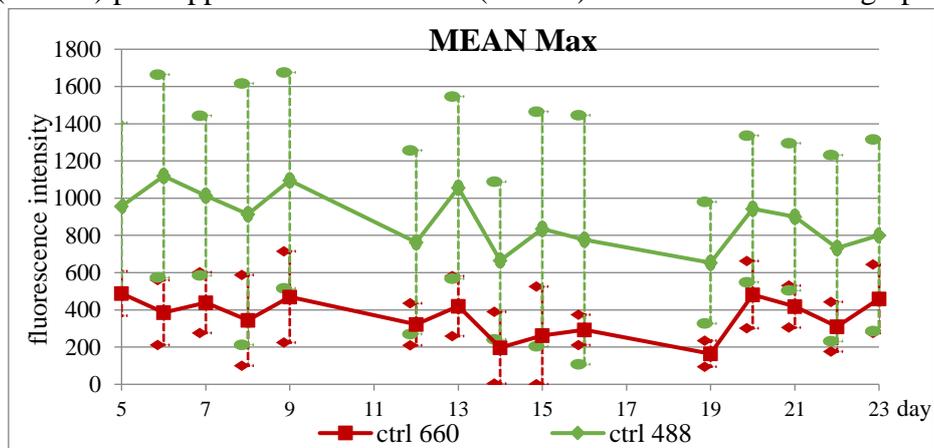


Figure 29 : (a) Evolution de l'intensité maximale sur une acquisition (V0.5 ; point 1 contrôle ; J5 ; MEAN Max=488) avec le laser « rouge » (660nm) - (b à h) Images correspondant aux pics d'intensité.

Ainsi, les écarts-types sont bien moins importants sur les données obtenues avec le laser « rouge » (660nm) par rapport au laser « vert » (488nm) comme le montre le graphique 10 :



Graphique 10 : Evolution de la moyenne des maximums d'intensité (traits pleins) du point contrôle 1 de V0.5 et de leurs écarts-types respectifs (traits en pointillés) lors de la lecture avec le laser 488nm (vert) et 660nm (rouge).

Ainsi, les fluorochromes iRFP (infraRed Fluorescent Protein) dont les spectres sont présentés ci-dessous (cf figure 30) sont plus adaptés.

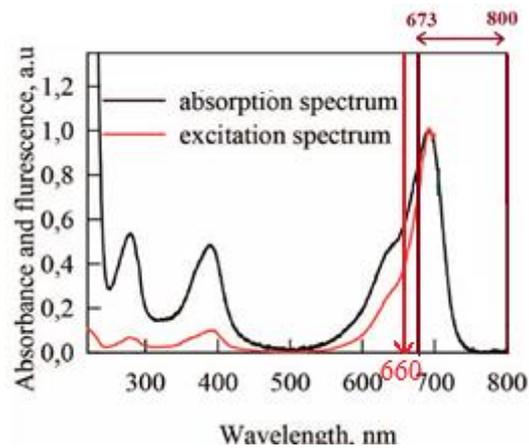


Figure 30 : Spectre d'absorption (ligne noire) et d'émission (ligne rouge) de iRFP (d'après Stepanenko et al. 2014) et longueur d'onde d'excitation (flèche rouge) et fenêtre de lecture (lignes rouge foncé) du laser « rouge » du Cellvizio®

### 3. Niveau de pureté

Deux niveaux de pureté différents ont ici été utilisés. Les solutions de niveau de pureté D ont un titre viral plus élevé, qui leur permet d'avoir une efficacité de transduction supérieure à celle du niveau C. Mais le processus de chromatographie permettant de passer d'un niveau de pureté C à D rend la solution finale plus aqueuse. Ainsi, les solutions C, plus lipophiles, devraient mieux diffuser dans la peau.

L'avancée de nos essais ne nous permet pas pour l'instant de montrer la supériorité de l'un des deux sur l'autre.

## C. Méthode d'administration

Trois méthodes d'administration des lentivecteurs ont ici été testées : l'injection intradermique d'une solution de lentivecteurs dans la peau et le dépôt de cette même solution sur la peau après abrasion de l'épiderme par raclage ou par tape stripping.

### 1. Injection intradermique

L'injection intradermique de vecteurs de gènes s'est déjà montrée efficace pour la transfection de kératinocytes *in vivo*, avec de l'ADN nu chez le porc (Hengge et al. 1995) ou encore avec des adenovirus chez la souris (Setoguchi et al. 1994). L'expression du transgène ( $\beta$ -galactosidase, détecté par coloration histochimique) s'est montrée transitoire dans les deux cas, ce qui s'explique par l'utilisation de vecteur de gènes ne permettant pas l'intégration du transgène au génome de l'hôte.

Néanmoins dans notre cas, le contrôle par biopsie et analyse histologique a montré que l'on n'atteint pas les cellules cibles que sont les kératinocytes. En effet, la fluorescence n'est retrouvée que dans le derme profond et l'hypoderme.

## 2. Abrasion de l'épiderme et administration topique des lentivecteurs

Les résultats d'analyse des intensités moyenne et maximale sont équivoques. Par contre, tous les contrôles par biopsie réalisés après abrasion de l'épiderme et administration topique des lentivecteurs (à J9, J22, J24 ou J29) sont négatifs. Ceci montre donc que cette méthode d'administration n'a pas fonctionné, ou que cette administration n'a permis qu'une expression transitoire du transgène non visible le jour de la réalisation de la biopsie. Or l'objectif est ici d'avoir une expression du transgène durable dans le temps, ce qui n'est donc ici pas le cas. Cette méthode d'administration ne semble donc pas convenir à notre objectif.

L'inefficacité de cette méthode peut être due soit à une abrasion de la peau insuffisante pour atteindre la membrane basale, soit d'une administration topique non adaptée.

### a. Administration topique

Lors de l'administration topique, la solution de lentivecteurs est tout simplement déposée sur la peau à l'aide d'une micropipette et étalée sur la zone voulue avec le bout du cône, la peau est maintenue horizontale quelques minutes le temps que la solution sèche, puis la chienne est isolée 2h dans une cage à métabolisme pour qu'aucun autre chien ne puisse par exemple lécher la zone d'administration et retirer la solution déposée à la superficie de la peau.

Tout d'abord, lors des premiers essais, les zones transfectées étaient situées sur l'abdomen dorsal des chiennes, zone que les chiennes pouvaient donc lécher elles-mêmes. L'isolement en cage à métabolisme n'était donc pas suffisant pour garantir que la solution de lentivecteurs ne soit pas retirée rapidement après application. Pour améliorer ce point, nous avons donc décidé de placer les zones transfectées dans une zone moins accessible par les chiens, sur le thorax dorsal. Ceci permet de limiter le léchage mais ne l'empêche pas totalement.

Un autre inconvénient de notre méthode d'application topique est le faible temps de contact entre la solution de lentivecteurs et la peau. En effet, la solution sèche en 5 à 10 minutes, puis lorsque la chienne est isolée elle peut potentiellement lécher les zones d'application et ainsi éliminer les lentivecteurs présents en surface, et à la fin de ces 2h les lentivecteurs peuvent être éliminés de la même façon par léchage par les autres chiens du chenil. Notre méthode ne nous permet donc pas de garantir un temps de contact entre la solution de lentivecteurs et la peau de plus de 10min. Pour augmenter ce temps de contact, lors d'une étude sur des souris le protocole suivant a été utilisé : après 3-4 TS, un bouchon de tube d'Ependorf de 8mm de diamètre a été collé sur la peau de souris, puis la solution de vecteurs viraux a été injectée entre la peau et le bouchon. Cette méthode permet un temps de contact entre la peau et les vecteurs de gènes viraux de 1 à 2 jours (Lu et al. 1997). Néanmoins garder un bouchon collé à la peau de nos chiens pendant 1 à 2 jours pourrait s'avérer compliqué, comme le montrent les biopsies de peau réalisées : certaines chiennes se sont arrachées rapidement les points, et pourraient arracher les bouchons de la même façon.

## b. Abrasion de l'épiderme

Nous avons ici utilisé 2 méthodes différentes pour abraser l'épiderme.

La première est le **Tape Stripping (TS)**, une méthode permettant une altération mécanique de la barrière cutanée : l'application répétée puis le retrait de ruban adhésif sur la peau permet de retirer successivement les différentes couches de l'épiderme.

La réalisation de 30 TS successifs en région dorsale permet le retrait complet de l'épiderme du chien, à l'exception de la couche basale, comme nous le montre la figure 31 ci-dessous. Suite à cette altération de l'épiderme, les cornéocytes réapparaissent après 48h, et la couche cornée se reconstitue en 72h (Vidémont et al. 2011).

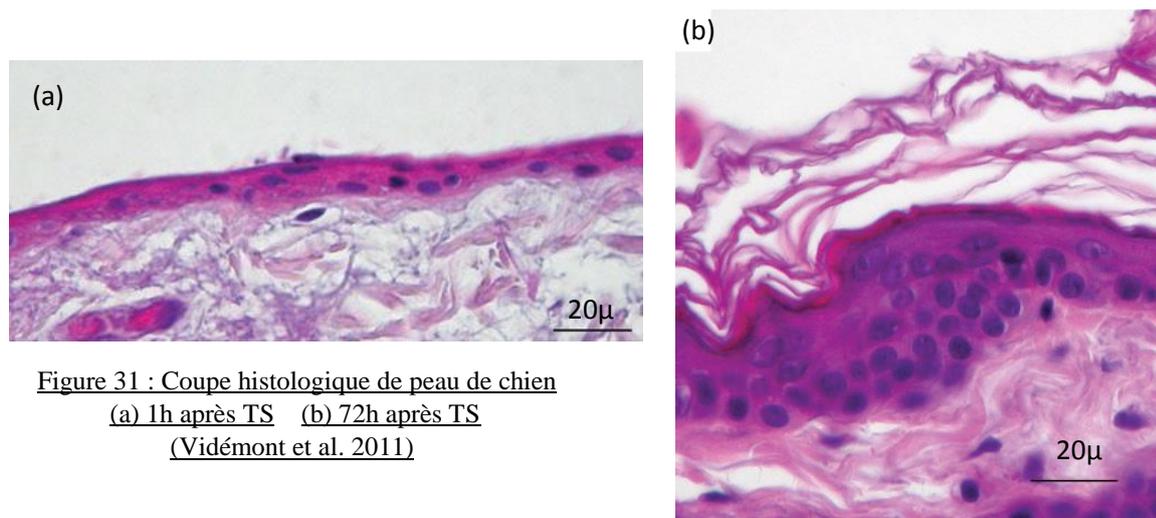


Figure 31 : Coupe histologique de peau de chien  
(a) 1h après TS (b) 72h après TS  
(Vidémont et al. 2011)

D'autres études ont montré que la réalisation de 10 TS successifs suffisent à un retrait presque complet du stratum corneum chez le chien (Olivry et al. 2010).

La réalisation d'une abrasion de la peau par Tape Stripping permet d'améliorer le transfert et l'expression cutanée de gènes (Yu et al. 1999).

La seconde méthode est le **raclage**, pour lequel l'atteinte de la rosée sanguine montre bien le retrait d'une partie de l'épiderme (dépourvu de vaisseaux sanguins), pour atteindre le derme (qui lui en contient).

Après abrasion de l'épiderme par une de ces deux méthodes, les lentivecteurs ont été administrés en topique. Cette méthode d'application topique de vecteurs de gènes après abrasion de l'épiderme s'est révélée efficace dans une précédente étude (Yu et al. 1999).

Or pour l'ensemble des biopsies de points transfectés après abrasion de la peau par TS ou raclage, à divers moments (J9, J22, J24 ou J29), aucune fluorescence n'a été détectée.

Pour comprendre l'inefficacité de notre méthode d'application des lentivecteurs, nous avons voulu vérifier que notre protocole permettait une abrasion correcte de l'épiderme. Nous avons pour cela réalisé 3 zones d'application comme schématisé ci-dessous (cf fig 32) en utilisant le même protocole de TS et de raclage que dans tous les essais précédents. Immédiatement après, nous avons réalisé des biopsies de ces zones.

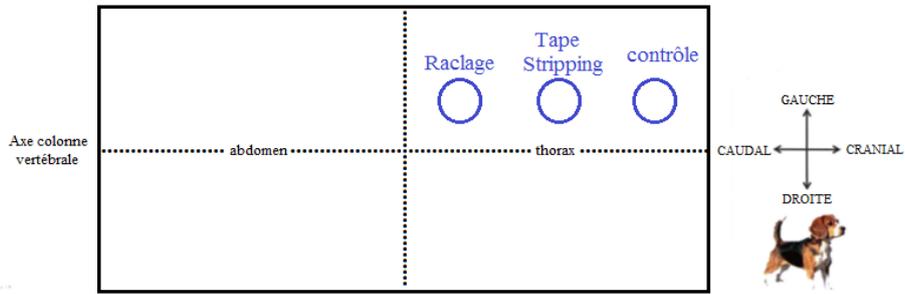


Figure 32 : Schéma des zones de test des méthodes d'application

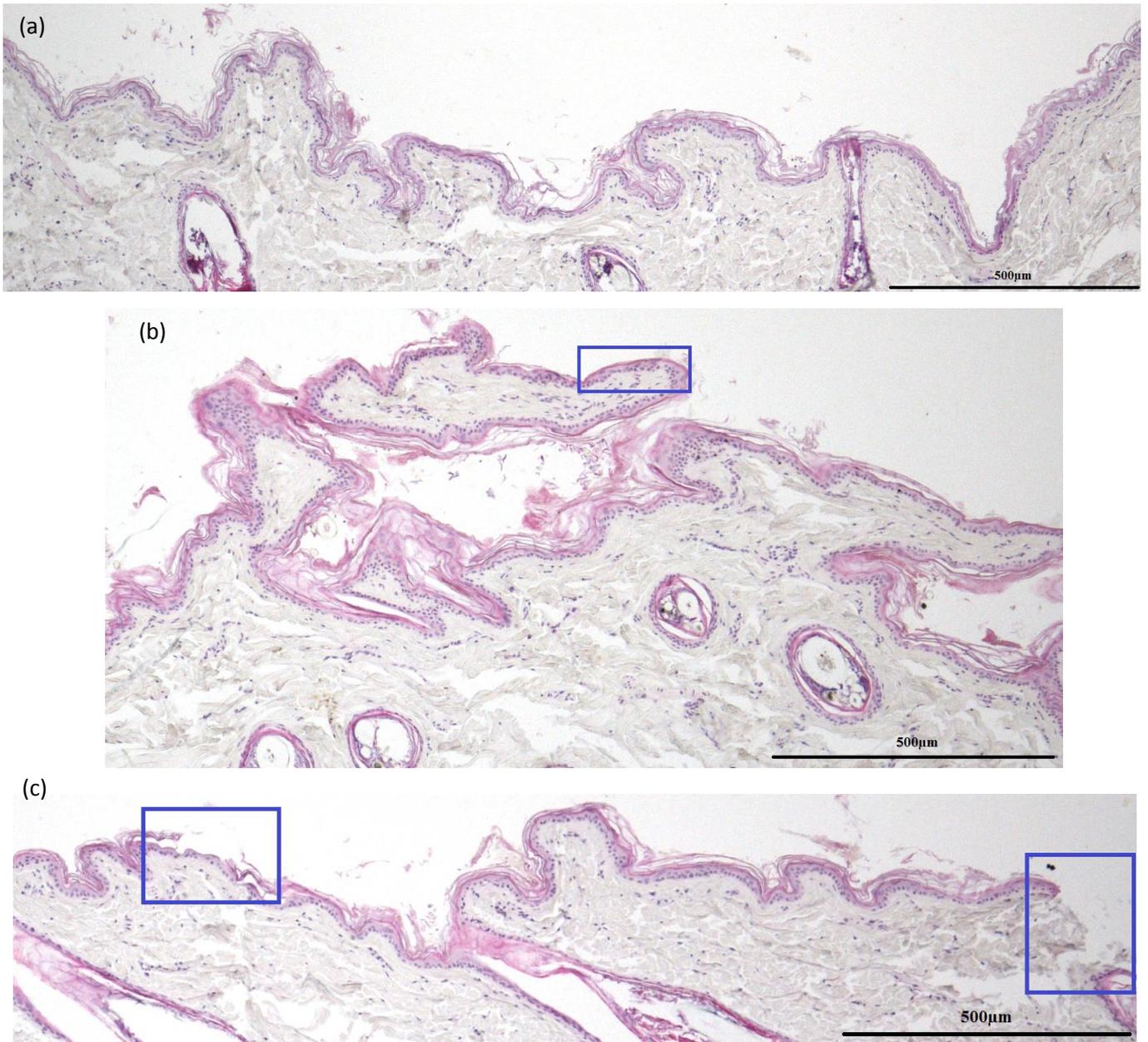


Figure 33 : Coupe histologique d'épiderme de chien (a) contrôle ; (b) après Tape Stripping ; (c) après raclage

La coupe histologique réalisée à partir de la biopsie réalisée après Tape Stripping ne montre aucune zone où la totalité de la couche cornée a été retirée (fig. 33b), nous avons au mieux réussi à retirer quelques assises de cellules (cf zone encadrée).

Après raclage (fig. 33c), on remarque une zone où la couche cornée a été retirée avec préservation des autres couches de l'épiderme (cadre bleu de gauche), ainsi qu'une zone où la totalité de l'épiderme a été retirée, y compris la couche basale (cadre bleu de droite). Ainsi cette méthode permet difficilement d'atteindre notre objectif qui est de retirer la couche protectrice (couche cornée) tout en conservant la couche basale.

La limite de ce contrôle est le manipulateur : j'ai réalisé moi-même le raclage et le TS pour ces biopsies, alors que lors des essais V0.2 à V0.5 ils étaient réalisés par des manipulateurs plus expérimentés.

Néanmoins, ceci semble montrer que nos méthodes d'abrasion (raclage ou Tape Stripping) ne permette pas ou peu d'atteindre notre objectif.

### 3. Nouvelle méthode d'administration

Devant l'échec de notre méthode d'administration, il a été décidé d'en tester une nouvelle. La méthode choisie se base sur le principe des tests allergologiques cutanés aussi appelé « **prick test** » : une goutte de solution d'allergène est déposée à la surface de la peau, puis une aiguille est piquée au travers de cette goutte. Cette aiguille très courte est placée à l'extrémité d'une tige épaisse, de façon à ne pénétrer la peau que de la longueur voulue, pour ne pas atteindre le derme mais uniquement l'épiderme, il n'y a donc pas de saignement (Morrow-Brown 1980).

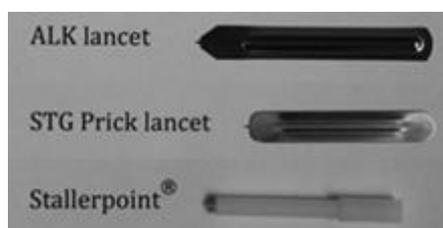
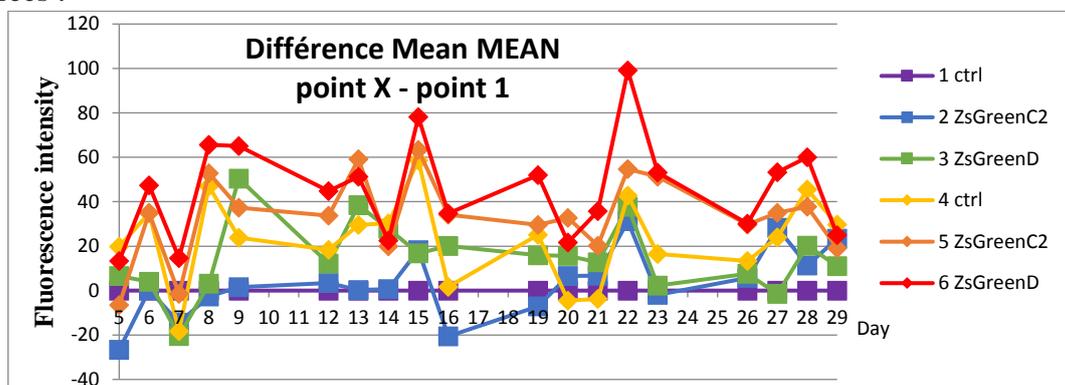


Figure 34 : Exemple de dispositifs disponibles en Europe pour la réalisation des « prick tests » (d'après Masse et al. 2011)

## D. Suivi non invasif de l'expression du transgène

### 1. Influence de l'ordre de lecture des points

Lors de l'acquisition des vidéos de V0.4 U, où le nombre de points à lire était plus important que pour les essais précédents, nous avons remarqué que l'intensité de fluorescence semblait augmenter au fur et à mesure des lectures. Ceci a été confirmé par l'analyse des données chiffrées :



Graphique 11 : Résultats tout administrateur confondu V0.4 chien U

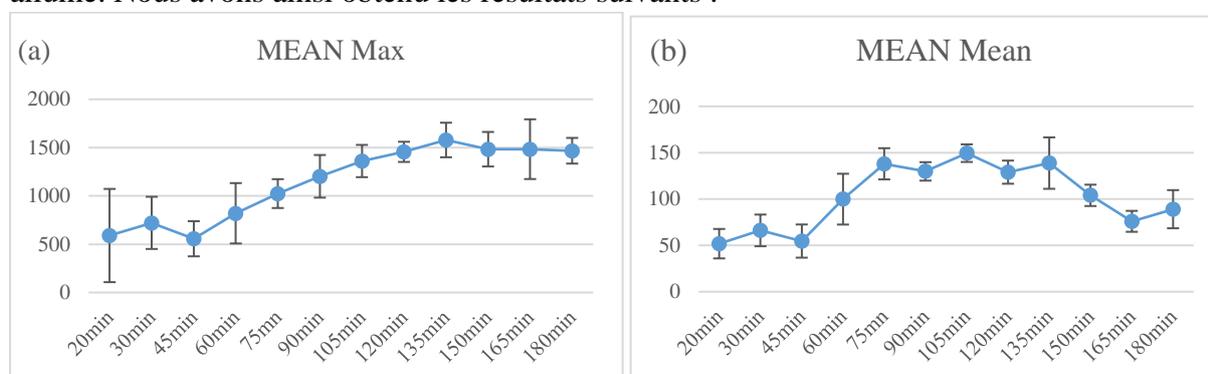
On remarque que globalement, l'intensité de fluorescence croît du 1<sup>er</sup> point lu au dernier en suivant l'ordre de lecture, indépendamment de la nature (transfecté ou non) des points.

Ceci n'a pas d'explication biologique : il n'y a aucune raison pour que le second point contrôle soit d'intensité de fluorescence supérieure à celle des points transfectés 2 et 3. Ceci semble donc mettre en évidence des variations physiologiques du niveau d'autofluorescence, ou un biais lié à notre méthode d'acquisition.

### 2. Temps de chauffage du laser

Suite à cette observation d'intensité augmentant au cours des lectures, nous avons réalisé un test pour voir si cette intensité se stabilisait dans le temps, et au bout de combien de temps, de façon à pouvoir s'affranchir de ce biais si possible.

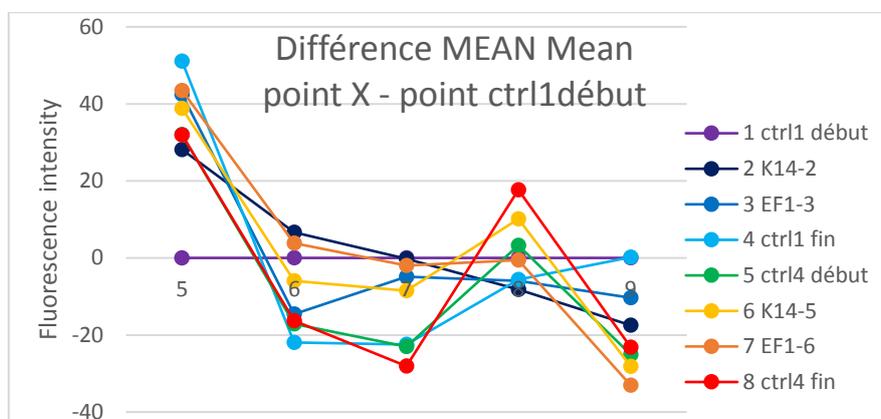
Pour cela, une même zone de lecture « contrôle » a été lue toutes les 15 minutes pendant 180 minutes. Entre chaque lecture, la sonde de lecture était posée sur son support en gardant le laser allumé. Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants :



Graphique 12 : Evolution de l'intensité de fluorescence Max (a) et Mean (b) sur un même point de 20 à 180min après allumage du laser

On remarque que la moyenne d'intensité maximale triple quasiment entre la première lecture et la lecture à 120min, puis se stabilise. Pour la moyenne des intensités moyennes, on observe également des variations, mais sans stabilisation des valeurs.

Suite à ceci, nous avons décidé de laisser le laser chauffer 2h avant chaque lecture pour l'essai V0.5.



Graphique 13 : Différence d'intensité de la moyenne des moyennes (MEAN Mean) entre un point donné et le point contrôle1 « début » (V0.5)

Nous avons ainsi obtenu des résultats semblant être beaucoup moins liés à l'ordre de lecture des points que ce que nous avons observé pour V0.4 U. Ainsi, nos différents tests nous ont permis d'affiner notre méthode : en laissant chauffer le laser 2h (contre uniquement 15min conseillées par le constructeur), il semble que nous parvenions ainsi à limiter un biais de lecture.

## E. Analyse

Pour la quasi-totalité des jours de chaque essai, il y a une différence statistiquement significative entre les intensités (maximales ou moyennes) d'un point donné et le point contrôle correspondant, comme l'illustre l'exemple montré en tableau 5 (ainsi que l'annexe 2).

Jour	ZsGreenC2 CP	ZsGreenD CP	ZsGreenC2 SBO	ZsGreenD SBO
5	< 2.2e-16	6.668e-06	< 2.2e-16	1.011e-06
6	0.003416	< 2.2e-16	0.8806	0.06588
7	6.235e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
8	0.03125	0.008137	1.024e-05	9.928e-13
9	3.453e-10	< 2.2e-16	1.914e-05	< 2.2e-16
12	8.718e-16	< 2.2e-16	0.06409	2.572e-09
13	< 2.2e-16	< 2.2e-16	0.06336	< 2.2e-16
14	< 2.2e-16	4.887e-11	0.007705	< 2.2e-16
15	0.009408	5.419e-07	< 2.2e-16	< 2.2e-16
16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
19	3.618e-05	< 2.2e-16	4.172e-11	< 2.2e-16
20	< 2.2e-16	< 2.2e-16	1.625e-14	< 2.2e-16
21	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
22	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
23	< 2.2e-16	< 2.2e-16	2.745e-11	0.02864
26	< 2.2e-16	< 2.2e-16	5.763e-12	< 2.2e-16
27	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	0.785
28	0.2664	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
29	6.905e-10	0.6879	< 2.2e-16	< 2.2e-16

Tableau 5 : p-value obtenu avec un test de Wilcoxon entre les intensités moyennes d'un point donné et du point contrôle correspondant pour V0.4 (chienne U) : vert = différence significative ; rouge = différence non significative ( $\alpha=5\%$ )

Ces résultats sont significatifs alors même que les points n'ont apparemment pas été transfectés. Ceci s'explique par le grand nombre de données traitées (environ 1500 valeurs par vidéo). Ainsi, cette méthode d'analyse statistique n'est pas fiable pour analyser nos données.

Néanmoins, les essais réalisés avec une absence de transfection très probable au moins pour les essais V0.3 à V0.5 nous ont montré que les différences d'intensité de l'ordre de 50 pour la moyenne des moyennes (laser vert) sont non significatives, ceci nous permet donc d'avoir un repère pour les prochains essais si cette méthode d'analyse est conservée.

Toutefois, l'utilisation de ces valeurs chiffrées reste délicate. En effet, en plus de ces variations pour un jour donné, les variations d'intensité de fluorescence sont également importantes d'un essai à l'autre (écart de 305 entre la plus haute valeur de moyenne des moyennes d'intensité et la plus basse, tous essais confondus), et pour un même essai d'un jour à l'autre (écart allant jusque 196 par exemple pour V0.2), comme le montre le tableau ci-dessous :

	<b>MAX (MEAN Mean)</b>	<b>MIN (MEAN Mean)</b>	<b>Différence MAX-MIN</b>
V0.2	110	<b>-87</b>	<b>196</b>
V0.3	82	-2	84
V0.4 U	208	22	185
V0.4 DK	<b>218</b>	108	110
V0.5	168	41	127

Tableau 6 : Maximum, minimum et différence entre ces deux valeurs, pour les moyennes des moyennes d'intensité de fluorescence des différents essais

Une autre possibilité serait de changer la méthode d'analyse. En effet, nous avons ici exploité uniquement les données chiffrées, et non les images des vidéos réalisées avec le Cellvizio®. A partir de ces images, il serait possible de travailler en densité cellulaire par champs, sur des champs sélectionnés. Il serait également possible d'utiliser une méthode de co-localisation en comparant deux images obtenues simultanément avec les lasers vert et rouge en utilisant un fluorochrome vert pour marquer les kératinocytes (anticorps anti-kératinocytes) afin de choisir les champs d'intérêt, et un fluorochrome rouge pour marquer les kératinocytes transfectés.

Un essai ultérieur au travail ici présenté a montré que ce marquage des kératinocytes par des anticorps couplés à une molécule fluorescente est réalisable et permet une bonne visualisation des kératinocytes au Cellvizio® :

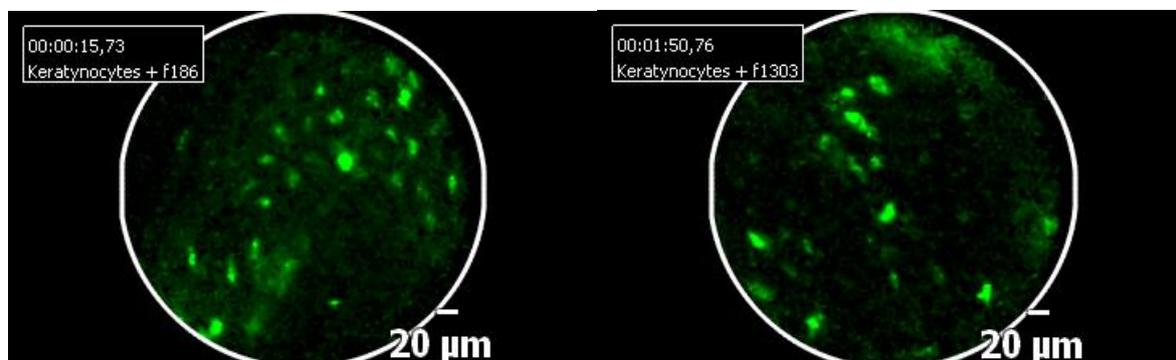


Figure 35 : Images Cellvizio® obtenues 24h après administration intradermique d'anticorps anti-kératinocytes couplés à un fluorochrome vert dans l'épiderme de chiens

## **F. Biopsies**

La réalisation de biopsies cutanées des points en fin d'essais nous a permis de confronter les données obtenues par notre méthode en cours de mise au point, avec des résultats dont la fiabilité est déjà prouvée. Ils nous ont ainsi permis de voir qu'en fin d'essais pour V0.3, V0.4 et V0.5 (J22, J24 ou J29) il n'y avait pas ou plus de cellules épidermiques transfectées. Néanmoins, cela ne nous permet pas de savoir si la transfection a été réalisée de façon efficace ou non en début d'essai. En effet, cette absence de cellule transfectée peut être due à un échec de transfection des cellules, ou à une élimination des cellules transfectées. Pour avoir une réponse à cette question, nous avons réalisé des biopsies plus tôt (J9) lors de l'essai V0.5, qui se sont elles aussi révélées être négatives. Ainsi, ceci tend à montrer que nous ne sommes pas face à une élimination des cellules transfectées mais plutôt face à un échec de transfection des cellules.

Ainsi, les biopsies nous ont permis d'avancer dans la mise en place du protocole de transgénèse. En effet, elles nous ont permis de différencier un échec de transduction d'une mauvaise méthode de lecture par le Cellvizio®. Néanmoins, ces biopsies restent ponctuelles et ne permettent pas d'effectuer un suivi dans le temps comme nous le permet le Cellvizio®.

## CONCLUSION

Nous avons ici réalisé six essais successifs visant à mettre au point un protocole de **lentigenèse** chez le chien et du suivi de l'expression par imagerie in vivo, le **Cellvizio®**. Le but est ici de faire du chien un modèle expérimental pour valider des molécules thérapeutiques dans le domaine de la santé uro-génitale humaine, et plus particulièrement pour tester un vaccin thérapeutique contre les Papillomavirus humains responsables du cancer du col de l'utérus chez la femme.

Bien qu'aucun résultat positif n'ait été obtenu, ces essais nous ont permis d'avancer dans la mise au point de ce protocole.

Tout d'abord, l'observation de l'importante **autofluorescence de la peau**, due principalement aux poils, dans la fenêtre de lecture du laser « vert » du Cellvizio® nous a permis de mettre en évidence la nécessité de trouver un fluorochrome fluorescent dans la fenêtre de lecture du laser « rouge ».

De plus, ces essais nous ont montré que les trois **méthodes d'administration** choisies ne sont pas efficaces. L'administration par injection intradermique ne permet une transfection que des cellules profondes de la peau, mais pas des kératinocytes. L'administration topique de la solution de lentivecteurs après abrasion de l'épiderme ne s'est pas non plus révélée efficace, probablement à cause de mauvaises méthodes d'abrasion (raclage et tape stripping).

Enfin, ces différents essais nous ont également permis de mettre en évidence la **difficulté d'analyser les données chiffrées d'intensité de fluorescence** obtenues à partir des vidéos réalisées avec le Cellvizio®. En effet, ces données varient beaucoup d'un jour sur l'autre en fonction de notre calibrage, mais également un même jour en fonction de l'ordre de lecture. Il semble que cette variation pour un même jour soit limitée par un temps de chauffe du laser avant calibrage plus long, mais les variations d'un jour sur l'autre persistent. Ainsi, il semble préférable de travailler sur les images obtenues avec le Cellvizio® plutôt que sur les valeurs chiffrées, trop variables.

Les **perspectives** actuelles sont donc de tester un nouveau lentivecteur fournis par le laboratoire Vectalys, dont le transgène code pour un **fluorochrome** visible dans le **proche infra-rouge, iRFP**, ainsi que de tester une **nouvelle méthode d'application**, le « prick ». Une fois que les deux fonctionneront, il sera alors possible d'avoir des images de kératinocytes fluorescent dans la fenêtre « rouge » du Cellvizio® dans laquelle il y a peu d'autofluorescence de la peau, et ainsi de mettre au point une méthode d'analyse basée sur les images obtenues (densité cellulaire).

## **BIBLIOGRAPHIE**

- BAEK, SC, LIN, Q, ROBBINS, PB, FAN, H et KHAVARI, PA, 2001. Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue. *Human Gene Therapy*. 12(12). 2001. pp. 1551 -1558.
- BAKER, BB, MAIBACH, HI, PARK, RD, MCFARLAND, LZ et O'BRIEN, TR, 1973. Epidermal cell renewal in the dogs. *Am J Vet Res*. 34(1):93-4. 1973.
- BAKER, BB, MAIBACH, HI et PARK, RD, 1974. Epidermal cell renewal in dogs after clipping of the hair. *Am J Vet Res*. 35(3):445-6. 1974.
- BAKER, BB et MAIBACH, HI, 1987. Epidermal cell renewal in seborrheic skin of dogs. *Am J Vet Res*. 48(4):726-8. 1987.
- BAUMANS, V, 2004. Use of animal in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Therapy*. 11. 2004. pp. S64-S66.
- BRAUN-FALCO, M., DOENECKE, A., SMOLA, H. et HALLEK, M., 1999. Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Therapy (1999)* 6, 432-441. 1999.
- BREYER, Benjamin, JIANG, Wei, CHENG, Hongwei, PAUL, Ronjon et HE, Tong-Chuan, 2001. Adenoviral Vector-Mediated Gene Transfer for Human Gene Therapy. *Current Gene Therapy*. Vol. 1, No. 2. 2001.
- BROWN, Brian D, VENNERI, Mary Anna, ZINGALE, Anna, SERGI, Lucia et NALDINI, Luigi, 2006. Endogenous microRNA regulation supresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nature medicine*. Volume 12 Number 5. mai 2006. pp. 585-591.
- CEDEF, 2011. Le système immunitaire cutané : les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire et la réponse allergique. *Collège des Enseignants en Dermatologie de France*. Mai 2011.
- CIFTCI, Kadriye et GUPTE, Anshul, 2006. Gene Therapy: An Overview of the Current Viral and Nonviral Vectors. *Taylor & Francis Group, LLC*. 2006.
- COTRIM, Ana P. et BAUM, Bruce J., 2008. Gene Therapy: Some History, Applications, Problems, and Prospects. *Toxicologic Pathology*, 36:97-103,. 2008.
- CROMBLEHOLME, Thimoty M., 2000. Adenoviral-mediated gene transfer in wound healing. . The Wound Healing Society. 2000.
- DONELLO, John E., LOEB, Jonathan E. et HOPE, Thomas J., 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *Journal of virology*. Vol. 72, No. 6. juin 1998. pp. 5085-5092.
- DOUTRE, M.-S., 2009. Le système immunitaire cutané. *Annales de dermatologie, Elsevier Masson*. volume 136, supplément 6. 2009. pp. 257-262.
- DULL, Tom, ZUFFEREY, Romain, KELLY, Mickael, MANDEL, R. J., NGUYEN, Minh, TRONO, Didier et NALDINI, Luigi, 1998. A Third-Generation Lentivirus Vector with Conditional Packaging System. *J. Virol.-1998-Dull-8463-71*. 1998.

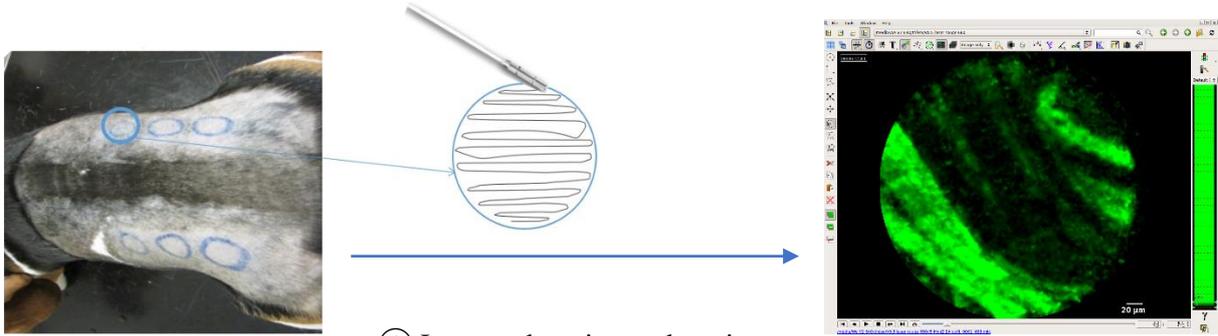
- EVANS, H. E. et DE LAHUNTA, A., 2013. The integument. In : *Miller's anatomy of the dog*. 4th edition. Elsevier. pp. 61-79.
- FISCHER, Sarah M., QUEST, Cassie M., DUBOVI, Edward J., DAVIS, Rolan D., TUCKER, Sylvia J., FRIARY, John A., CRAWFORD, P. Cynda, RICKE, Teri A. et LEVY, Julie K., 2007. Response of feral cats to vaccination at the time of neutering. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol 230, No. 1. 2007. pp. 52-58.
- HEIN, Wayne R. et GRIEBEL, Philip J., 2002. A road less travelled: large animal models in immunological research. *Nature reviews*. Vol. 3. 2002. pp. 79-85.
- HENGGE, Ulrich R., CHAN, Edward F., FOSTER, Ruth A., WALKER, Patricia S. et VOGEL, Jonathan C., 1995. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nature Genetics* 10, 161-166. 1995.
- HENGGE, Ulrich R. et MIRMOHAMMADSADEGH, Alireza, 2000. Adeno-Associated Virus Expresses Transgenes in Hair Follicles and Epidermis. *MOLECULAR THERAPY* Vol. 2, No. 3. The American Society of Gene Therapy. septembre 2000.
- HENGGE, Ulrich R., WALKER, Patricia S. et VOGEL, Jonathan C., 1996. Expression of Naked DNA in Human, Pig, and Mouse Skin. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 97, Number 12. juin 1996.
- JENNY A.K. EKBERG, AMAYA, Daniel, CHEHREHASA, Fatemeh, LINEBURG, Katie, CLAXTON, Christina, WINDUS, Louisa C.E, KEY, Brian, MACKAY-SIM, Alan et ST JOHN, James A., 2011. OMP-ZsGreen fluorescent protein transgenic mice for visualisation of olfactory sensory neurons in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience Methods* 196 (2011) 88-98. Elsevier B.V. 2011.
- KAWASAKI, Takashi, OGATA, Masanori, KAWASAKI, Chika, OGATA, Jun-ichi, INOUE, Yoshitaka et SHIGEMATSU, Akio, 1999. Ketamine Suppresses Proinflammatory Cytokine Production in Human Whole Blood In Vitro. *Anesth Analg*. 89:665-9. 1999.
- KONA-BOUN, Jean-Jacques, SILIM, Amer et TRONCY, Eric, 2005. Immunological aspects of veterinary anesthesia and analgesia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol 226, No. 3. 2005. pp. 355-363.
- LU, Bo, FEDEROFF, Howard J., WANG, Yibin, GOLDSMITH, Lowell A. et SCOTT, Glynis, 1997. Topical Application of Viral Vectors for Epidermal Gene Transfer. *J Invest Dermatol* 108:803-808. 1997.
- MASSE, M. S., GRENGER VALLÉE, A., CHIRIAC, A., DHIVERT-DONNADIEU, H., BOUSQUET-ROUANET, L., BOUSQUET, P.-J. et DEMOLY, P., 2011. Comparison of five techniques of skin prick tests used routinely in Europe. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 66. 2011. pp. 1415-1419.
- MAUNA KEA TECHNOLOGIES, 2014a. part A : general information. In : *Cellvizio user guide for use*.
- MAUNA KEA TECHNOLOGIES, 2014b. part C : operation. In : *User guide instructions for use*.
- MEYKADEH, Nuschin, MIRMOHAMMADSADEGH, Alireza, WANG, Zhijun, BASNER-TSCHAKARJAN, Etiena et HENGGE, Ulrich R., 2005. Topical application of plasmid DNA to mouse and human skin. *Journal of Molecular Medicine*. 19 mai 2005.
- MILLER, William, GRIFFIN, Craig et CAMPBELL, Karen, 2013. *Small Animal Dermatology*. 7th edition. Muller&Kirk's.

- MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE, 2014. Utilisation des animaux à des fins scientifiques dans les établissements utilisateurs français – Enquête statistique 2014 –. [http://cache.media.enseignementsup-recherche.gouv.fr/file/utilisation\\_des\\_animaux\\_fins\\_scientifiques/84/2/Enquete\\_2014\\_-\\_utilisation\\_des\\_animaux\\_a\\_des\\_fins\\_scientifiques\\_591842.pdf](http://cache.media.enseignementsup-recherche.gouv.fr/file/utilisation_des_animaux_fins_scientifiques/84/2/Enquete_2014_-_utilisation_des_animaux_a_des_fins_scientifiques_591842.pdf). 2014.
- MORRIS, Rebecca et ARGYRIS, Thomas S., 1983. Epidermal Cell Cycle and Transit Times during Hyperplastic Growth Induced by Abrasion or Treatment with 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Research*. 43. 1983. pp. 4935-4942.
- MORROW-BROWN, H., 1980. Standardisation de la méthode du « Prick » à l'aide d'une aiguille de précision. *Revue Française d'Allergologie*. 20 (n°4-5). 1980. pp. 185-187.
- NALDINI, Luigi, BLÖMER, Ulrike, GALLAY, Philippe, ORY, Daniel, MULLIGAN, Richard, GAGE, Fred H., VERMA, Inder M. et TRONO, Didier, 1996. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*. VOL. 272. 1996. pp. 263-267.
- NAYAK, Sushrusa et HERZOG, Roland W., 2010. Progress and Prospects : Immune Responses to Viral Vectors. *Gene Ther*. 2010 March ; 17(3): 295–304. doi:10.1038/gt.2009.148. 2010.
- NOBELPRIZE.ORG, 2016. All Nobel Prizes in Physiology or Medicine. *Nobel Media AB 2014*. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/index.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/index.html). 3 octobre 2016.
- OLIVRY, Thierry, WOFFORD, Jessica, PAPS, Judy S. et DUNSTON, Stanley M., 2010. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, 22, 188–196. 2010.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ, 2005. *Manuel de sécurité biologique en laboratoire*.
- PFÜTZNER, W., 2010. Vectors for gene therapy of skin diseases. *Journal of the German Society of Dermatology*. 2010.
- QIN, Jane Yuxia, ZHANG, Li, CLIFT, Kayla L., HULUR, Imge, XIANG, Andy Peng, REN, Bing-Zhong et LAHN, Bruce T., 2010. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE* 5(5): e10611. doi:10.1371/journal.pone.0010611. 2010.
- RASHID, S. Tawqeer, SALACINSKI, Henryk J., HAMILTON, George et SEIFALIAN, Alexander M., 2004. The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering : a review. *Biomaterial*. 25. 2004. pp. 1627-1637.
- SANDERS WILLIAMS, R., JOHNSTON, Stephen A., RIEDY, Mark, DEVIT, Michael J., MCELLIGOTT, Sandra G. et SANFORDI, John C., 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, No. 7. 1 avril 1991. pp. 2726-2730.
- SAVERIA CAMPO, M., 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. . *Virus reserch* 89. 2002. pp. 249-261.
- SCHWARZ, T., 2003. Skin immunity. *British Journal of Dermatology*. volume 149, supplément 66. 2003. pp. 2-4.
- SETOGUCHI, Yasuhiro, ARI, H. Jaffe, DANIEL, Claire et CRYSTAL, Ronald G., 1994. Ex vivo and in vivo gene transfer to the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. . The Society for Investigative Dermatology, Inc. 1994.

- SHCHERBAKOVA, Daria M. et VERKHUSHA, Vladislav V., 2013. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nat Methods*. 10(8). 2013. pp. 751-754.
- STEPANENKO, Olesya V., BUBLIKOV, Gregory S., STEPANENKO, Olga V., SHCHERBAKOVA, Daria M., VERKHUSHA, Vladislav V., TUROVEROV, Konstantin K. et KUZNETSOVA, Irina M., 2014. A knot in the protein structure : probing the near-infrared fluorescent protein iRFP designed from bacterial phytochrome. *FEBS J*. 281(9). 2014. pp. 2284-2298.
- VALENTINE, Beth A., COOPER, Barry J., DE LAHUNTA, Alexander, O'QUINN, Rebecca et BLUE, Julia T., 1988. Canine X-linked muscular dystrophy: An animal model of Duchenne muscular dystrophy: Clinical studies. . *Journal of Neurological Sciences*. 1988. pp. 69-81.
- VIDÉMONT, Emilie, MARIANI, Claire, VIDAL, Stéphanie et PIN, Didier, 2011. Characterization of the canine skin barrier restoration following acute disruption by tape stripping. *Veterinary Dermatology*, 23, 103–e23. 2011.
- WEIGAND, Markus A., SCHMIDT, Heinfried, ZHAO, Qingyu, PLASCHKE, Konstanze, MARTIN, Eike et BARDENHEUER, Hubert J., 2000. Ketamine Modulates the Stimulated Adhesion Molecule Expression on Human Neutrophils In Vitro. *Anesth Analg*. 90:206-12. 2000.
- WILLMANN, Raffaella, POSSEKEL, Stefanie, DUBACH-POWELL, Judith, MEIER, Thomas et RUEGG, Markus A., 2009. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. . *Neuromuscular disorders* 19. 2009. pp. 241-249.
- WU, Xiaolin, LI, Yuan, CRISE, Bruce et BURGESS, Shawn M., 2003. Transcription Start Regions in the Human Genome Are Favored Targets for MLV Integration. *Science* 300, 1749. 2003.
- YOUNG, B., LOWE, J.S., STEVENS, A. et HEATH, J.W., 2008. *Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather*. 2ème édition. de boeck.
- YU, Wei Hong, KASHANI-SABET, Mohammed, LIGGITT, Denny, MOORE, Dan, HEATH, Timothy D. et DEBS, Robert J., 1999. Topical Gene Delivery to Murine Skin. . *J Invest Dermatol* 112:370-375. 1999.
- ZAISS, AK et MURUVE, DA, 2008. Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans : a continued challenge. *Gene Therapy (2008)* 15,808-816. 2008.

# Annexe 1 : Méthode d'analyse des vidéos

## Exemple de V0.5 J5 point contrôle 1



① Lecture du point et obtention d'une vidéo à l'aide du Cellvizio®

② Extraction des données relatives à l'intensité de fluorescence à l'aide du logiciel IC-viewer : Mean, Max, Median, Min

③ Pour chaque donnée d'intensité (Mean, Max, Median, Min), calcul de la moyenne et de l'écart-type sur l'ensemble de la vidéo à l'aide de formules Excel

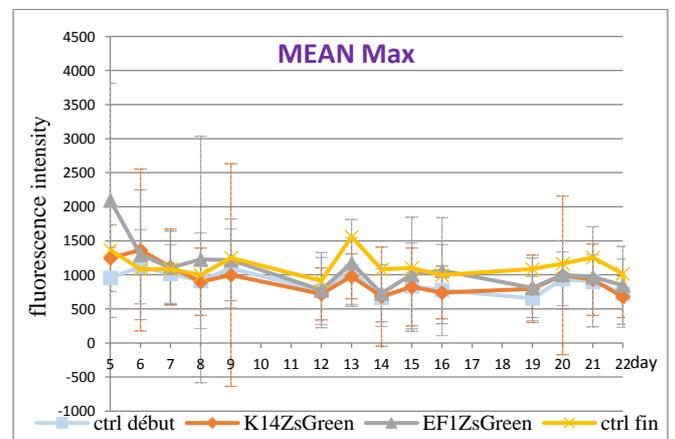
	A	B	C	D	E	F
1	Frame #	Time (seconds)	Mean	Max	Median	Min
2	1	0	189	1078	145	-255
3	2	0,085	166	1105	125	-360
4	3	0,17	147	1039	107	-283
5	4	0,255	163	1089	121	-288
6	5	0,34	165	1046	129	-292
7	6	0,425	150	1160	108	-273
8	7	0,51	132	917	93	-366
9	8	0,596	179	1044	139	-274
10	9	0,681	168	1101	129	-290
11	10	0,766	167	1086	127	-277
	...	...	...	...	...	...
1448	1447	123,119	69	1097	61	-319
1449	1448	123,204	37	629	30	-366
1450	1449	123,289	90	1036	76	-290
1451	1450	123,374	129	1137	116	-343
1452	1451	123,459	70	729	58	-294

	Mean	Max	Median	Min
MOYENNE	120	957	102	-329
ECART TYPE (SD)	48	448	39	67

$f_x$  =MOYENNE(C2:C1452)  
 $f_x$  =ECARTYPE(C2:C1452)

④ Rassemblement des données de chaque jour de lecture

DAY	MEAN Mean	SD Mean	MEAN Mediane	SD Mediane	MEAN Max	SD Max
5	120	48	102	39	957	448
6	99	62	74	53	1119	545
7	103	51	78	37	1014	429
8	70	44	51	34	914	702
9	103	51	76	41	1096	580
12	41	40	29	32	763	493
13	168	69	142	62	1057	489
14	46	42	34	33	665	423
15	48	49	31	38	835	630
16	67	46	50	35	777	669
19	41	42	31	32	654	327
20	111	52	91	45	942	394
21	121	50	102	44	900	395
22	77	55	63	48	732	500



⑤ Réalisation d'un graphique bilan sur Excel (ex : Max)

## Annexe 2 : Analyse statistique des moyennes d'intensité des essais V0.2 à V0.5

différence significative ?

p-value <0,01	oui
p-value >0,01	non

V0.2 R	tdTomato		ZsGreen	
	W	p-value	W	p-value
J4	286930	< 2.2e-16	437480	< 2.2e-16
J5	2123100	3.232e-16	791920	1.379e-05
J6	2521800	< 2.2e-16	7970300	< 2.2e-16
J7	4461300	< 2.2e-16	773350	< 2.2e-16
J8	3188300	< 2.2e-16	4467500	0.0004994
J11	3193900	< 2.2e-16	515.5	< 2.2e-16
J13	1999800	< 2.2e-16	601090	< 2.2e-16
J14	5336000	1.034e-13	4417600	< 2.2e-16
J15	570810	< 2.2e-16	5065800	< 2.2e-16
J18	8191000	< 2.2e-16	1253900	< 2.2e-16
J19	2068700	< 2.2e-16	1451700	< 2.2e-16
J20	1254100	< 2.2e-16	1175700	< 2.2e-16
J21	3151900	< 2.2e-16	4997000	0.1357
J22	2042600	< 2.2e-16	2002800	4.344e-14
J26	985840	< 2.2e-16	367250	< 2.2e-16
J27	2313300	< 2.2e-16	3848100	0.0005137
J28	1248500	< 2.2e-16	774570	< 2.2e-16

V0.2 TS	tdTomato		ZsGreen	
	W	p-value	W	p-value
J4	335830	< 2.2e-16	154040	< 2.2e-16
J5	1069800	0.05381	898970	< 2.2e-16
J6	2427900	< 2.2e-16	4556100	1.558e-07
J7	3227000	< 2.2e-16	1712800	< 2.2e-16
J8	1296000	< 2.2e-16	2286400	< 2.2e-16
J11	77918	< 2.2e-16	53905	< 2.2e-16
J13	1801300	< 2.2e-16	759700	< 2.2e-16
J14	4362100	< 2.2e-16	3462300	< 2.2e-16
J15	498540	< 2.2e-16	107330	< 2.2e-16
J18	2374600	6.283e-16	7619900	< 2.2e-16
J19	2891800	< 2.2e-16	2446200	1.365e-08
J20	1184300	< 2.2e-16	912970	< 2.2e-16
J21	3726100	2.118e-05	3539600	0.6111
J22	3153600	1.211e-08	2657400	< 2.2e-16
J25	2143900	9.621e-07	1236000	9.822e-09
J26	2606800	< 2.2e-16	2223000	0.9517
J27	2815400	3.15e-05	4325400	< 2.2e-16
J28	1845500	3.74e-16	757420	< 2.2e-16

V0.3	tdTomato		ZsGreen	
	W	p-value	W	p-value
J4	273090	< 2.2e-16	260440	< 2.2e-16
J5	1160700	0.02295	1073700	0.0002222
J6	2118800	< 2.2e-16	2333100	< 2.2e-16
J7	717120	< 2.2e-16	515950	< 2.2e-16
J8	954680	0.08101	1267800	< 2.2e-16
J11	1590200	< 2.2e-16	1167300	0.8342
J12	1049000	0.08929	988730	3.21e-07
J13	1132800	0.9084	606110	< 2.2e-16
J14	867390	< 2.2e-16	929950	< 2.2e-16
J15	1862800	< 2.2e-16	1440800	< 2.2e-16
J18	773170	< 2.2e-16	953450	3.025e-10
J19	2840900	< 2.2e-16	1213100	1.602e-10
J20	527500	< 2.2e-16	987540	< 2.2e-16
J21	1554800	< 2.2e-16	838860	< 2.2e-16
J22	1405900	2.417e-15	804680	< 2.2e-16
J25	285440	< 2.2e-16	256820	< 2.2e-16
J26	1028100	2.049e-11	1139000	0.06457
J27	971320	6.463e-07	1106800	0.639
J28	1754700	< 2.2e-16	1507500	< 2.2e-16
J29	1367900	< 2.2e-16	1243600	1.566e-08

V0.4 DK	TRE-ZsGreen	
	W	p-value
J7	1895200	9.506e-13
J8	2593000	0.3466
J9	1197700	< 2.2e-16
J10	2437700	3.141e-07
J11	850440	< 2.2e-16
J14	2265800	0.0003161
J15	2214800	0.8035
J16	2727300	< 2.2e-16
J17	2006700	0.02092
J18	2041600	0.1231
J21	2819200	< 2.2e-16
J22	1962000	< 2.2e-16
J23	1945000	9.545e-13
J24	1899900	< 2.2e-16

## Annexe 2 : Analyse statistique des moyennes d'intensité des essais V0.2 à V0.5 (suite)

V0.4 U	p-value			
	ZsGreenC2 CP	ZsGreenD CP	ZsGreenC2 SBO	ZsGreenD SBO
5	< 2.2e-16	6.668e-06	< 2.2e-16	1.011e-06
6	0.003416	< 2.2e-16	0.8806	0.06588
7	6.235e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
8	0.03125	0.008137	1.024e-05	9.928e-13
9	3.453e-10	< 2.2e-16	1.914e-05	< 2.2e-16
12	8.718e-16	< 2.2e-16	0.06409	2.572e-09
13	< 2.2e-16	< 2.2e-16	0.06336	< 2.2e-16
14	< 2.2e-16	4.887e-11	0.007705	< 2.2e-16
15	0.009408	5.419e-07	< 2.2e-16	< 2.2e-16
16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
19	3.618e-05	< 2.2e-16	4.172e-11	< 2.2e-16
20	< 2.2e-16	< 2.2e-16	1.625e-14	< 2.2e-16
21	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
22	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
23	< 2.2e-16	< 2.2e-16	2.745e-11	0.02864
26	< 2.2e-16	< 2.2e-16	5.763e-12	< 2.2e-16
27	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16	0.785
28	0.2664	< 2.2e-16	< 2.2e-16	< 2.2e-16
29	6.905e-10	0.6879	< 2.2e-16	< 2.2e-16

V0.5	K14		EF1		Ctrl fin	
	W	p-value	W	p-value	W	p-value
5	765230	< 2.2e-16	640330	< 2.2e-16	562450	< 2.2e-16
6	920400	0.0006589	1166700	1.514e-12	1230700	< 2.2e-16
7	1050100	0.2819	1135000	0.000107	1226000	< 2.2e-16
8	1054300	1.625e-05	1056200	6.836e-05	1028300	0.002603
9	1272400	< 2.2e-16	1120400	8.606e-08	1012600	0.7376
12	1234000	9.099e-15	1348800	< 2.2e-16	1213700	2.54e-12
13	1132400	< 2.2e-16	1061000	0.2635	713780	< 2.2e-16
14	777630	2.322e-13	812640	1.159e-10	637310	< 2.2e-16
15	948310	0.2336	974950	0.2621	1005400	0.1637
16	1088000	4.296e-12	985280	0.02153	955380	0.7009
19	836950	7.27e-15	710890	< 2.2e-16	859240	1.204e-06
20	1110300	2.857e-13	1237700	< 2.2e-16	877430	0.02461
21	1040500	0.0001281	1002500	0.02787	644220	< 2.2e-16
22	999250	0.0001184	950360	0.1459	1066500	9.816e-07
23	806940	0.0009463	674560	< 2.2e-16	548350	< 2.2e-16

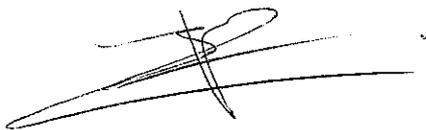


**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Séverine BOULLIER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Mathilde LAIGLE** intitulée « **Mise au point d'un protocole de lentigénèse chez le chien et du suivi de l'expression par imagerie in vivo, le cellvizio®** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

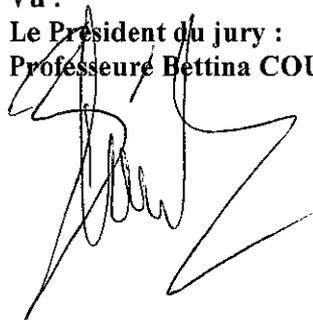
Fait à Toulouse, le 4 novembre 2016  
Docteur Séverine BOULLIER  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeure Bettina COUDERC



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

NOM/SURNAME : LAIGLE

Prénom/Name : Mathilde

TITRE : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE LENTIGENESE CHEZ LE CHIEN ET DU SUIVI DE L'EXPRESSION PAR IMAGERIE IN VIVO, LE CELLVIZIO®

RESUME : Nous avons ici cherché à faire du chien un modèle pour le test de vaccins thérapeutiques contre des pathogènes humains dont il n'est pas une espèce sensible. Pour cela le but final est de faire exprimer la protéine cible du vaccin par les kératinocytes de chien in vivo à l'aide d'un lentivecteur. Afin de réaliser le suivi, le transgène exprime une protéine fluorescente. Cette fluorescence est suivie in vivo par imagerie microscopique laser non invasive grâce au Cellvisio®. Les essais jusqu'ici réalisés n'ont pas permis d'obtenir les résultats souhaités mais nous ont appris de nombreuses choses. A cause de l'importante autofluorescence de la peau dans les longueurs d'onde vertes, il est primordial de trouver un lentivecteur exprimant une protéine fluoresçant dans le proche infra-rouge. Les méthodes d'administration des lentivecteurs testées (injection ID, raclage, Tape Stripping) ne sont pas efficace pour une transfection des kératinocytes. L'analyse des données numériques obtenues à partir des vidéos du Cellvizio® n'est pas pertinente, il faudrait travailler sur les images.

MOTS-CLES : modèle animal, vaccin thérapeutique, lentivecteur, Cellvizio®

---

TITLE : DEVELOPMENT OF TRANSGENESIS METHOD BY LENTIVIRAL VECTORS IN DOGS AND OF EXPRESSION'S MONITORING BY IN VIVO IMAGING : THE CELLVIZIO®

ABSTRACT : We tried to develop a dog model to test therapeutic vaccines against human pathogens for which the dog is not a susceptible species. The aim is to make dog's keratinocytes express in vivo the targeted protein of the vaccine thanks to a lentiviral vector. In order to monitor the transgene expression, the transgene encodes for a fluorescent protein. The fluorescence is monitored thanks to the Cellvizio®, an in vivo non invasive microscopic imaging method. Our attempts were not successful but were enlighting. Because of the skin autofluorescence in green wavelenghts, we have to find a lentiviral vector which encodes for a near-infrared fluorescent protein. The lentiviral vector administration methods which were tested (intra dermal injection, skin scalping, Tape Stripping) are not efficient to transduce keratinocytes. Analyzing the numeric data from the Cellvizio® videos is not relevant, we should rather analyse the images.

KEYWORDS : Animal models, therapeutic vaccination, lentiviral vector, Cellvizio®