

Université de Montréal

*Nanoparticules Chitosane-PEG-FA-ADN pour la thérapie génique non virale
et application du gène de l'IL-1Ra dans un modèle expérimental d'arthrite
rhumatoïde*

Christian Jreysaty

Institut de Génie Biomédical
Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue d'obtention du grade de Maitrise en Sciences Appliquées (M.Sc.A.)
Programme de Génie Biomédical

Avril, 2009

©, Christian JREYSSATY, 2009

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

*Nanoparticules Chitosane-PEG-FA-ADN pour la thérapie génique non virale
et application du gène de l'IL-1Ra dans un modèle expérimental d'arthrite
rhumatoïde*

Présenté par :

Christian Jreysaty

A été évalué par un jury composé de personnes suivantes :

Président rapporteur : Dr. Giovanni (John) Dibattista (PhD)

Professeur accrédité

Département de pharmacologie et thérapeutiques

Faculté de médecine, Université McGill

Hôpital Royal Victoria

Directeur de recherche : Dr. Julio C. Fernandes (MD, MSc, MBA)

Professeur titulaire

Institut de génie biomédical, faculté de médecine, Université de Montréal

Laboratoire d'orthopédie, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

Membre du jury : Dr. Rénaud Gilbert (PhD)

Group Leader, Genomics & Gene Therapy Vectors

Conseil national de recherche

NRC-CNRC, Canada

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'autre à la réalisation de ce Mémoire.

Je commence par Dr. Julio Fernandes, mon directeur de recherche, qui a eu d'abord l'amabilité de m'accepter en tant qu'étudiant en maîtrise, et qui par son professionnalisme et son support exemplaire m'était un motivateur de premier ordre, et dont la contribution m'est très précieuse.

Ensuite toute l'équipe du laboratoire d'orthopédie du centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal surtout Dr. Qin Shi, qui m'a mis sur la bonne voie en me procurant une supervision adéquate et de qualité.

Je tiens à remercier Prof. Robert A. Le Blanc, directeur du programme de Génie Biomédical (Institut de Génie Biomédical de la faculté de Médecine) dont la présence accentue ma volonté de faire et de réussir et à Mme Louise Bélanger, qui par sa coopération, m'a facilité la tâche.

Un grand merci à Dr. Dibattista et Dr. Gilbert qui ont accepté de faire partie de ce jury honorable.

Finalement, je ne peux passer sans un mot aux donateurs qui ont investi dans mon avenir en m'offrant une bourse nommément la Fondation J.A. de Sève (Hôpital du Sacré-

Cœur de Montréal) et J. Armand Bombardier (Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales), surtout mes parents qui ne cessent de me donner le support moral et matériel ce qui a favorisé une ambiance convenable pour bien foncer dans ma recherche sans aucune distraction.

Résumé

La thérapie génique représente l'un des défis de la médecine des prochaines décennies dont la réussite dépend de la capacité d'acheminer l'ADN thérapeutique jusqu'à sa cible. Des structures non virales ont été envisagées, dont le chitosane, polymère cationique qui se combine facilement à l'ADN. Une fois le complexe formé, l'ADN est protégé des nucléases qui le dégradent.

Le premier objectif de l'étude est de synthétiser et ensuite évaluer différentes nanoparticules de chitosane et choisir la mieux adaptée pour une efficacité de transfection sélective *in vitro* dans les cellules carcinomes épidermoïdes (KB).

Le deuxième objectif de l'étude est d'examiner *in vivo* les effets protecteurs du gène de l'IL-1Ra (bloqueur naturel de la cytokine inflammatoire, l'Interleukine-1 β) complexé aux nanoparticules de chitosane sélectionnées dans un modèle d'arthrite induite par un adjuvant (AIA) chez le rat.

Les nanoparticules varient par le poids moléculaire du chitosane (5, 25 et 50 kDa), et la présence ou l'absence de l'acide folique (FA).

Des mesures macroscopiques de l'inflammation seront évaluées ainsi que des mesures de concentrations de l'Interleukine-1 β , Prostaglandine E2 et IL-1Ra humaine secrétés dans le sérum.

Les nanoparticules Chitosane-ADN en présence de l'acide folique et avec du chitosane de poids moléculaire de 25 kDa, permettent une meilleure transfection *in vitro*.

Les effets protecteurs des nanoparticules contenant le gène thérapeutique étaient évidents suite à la détection de l'IL-1Ra dans le sérum, la baisse d'expression des facteurs inflammatoires, l'Interleukine-1 β et la Prostaglandine-E2 ainsi que la diminution macroscopique de l'inflammation.

Le but de cette étude est de développer notre méthode de thérapie génique non virale pour des applications cliniques pour traiter l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies humaines.

Mots clés : *Thérapie génique non virale, nanoparticules, chitosane, acide folique, poids moléculaire, in vitro, in vivo, injection hydrodynamique, transfection, gène, rats Lewis, arthrite rhumatoïde, arthrite induite par un adjuvant (AIA), IL-1Ra, Interleukine-1 β , Prostaglandine-E2, inflammation.*

Subventions : *La Société d'arthrite du Canada - Instituts de recherche en santé du Canada - Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)*

Abstract

Considered to be one of the medical challenges of the coming decade, the success of gene therapy depends on the ability to deliver therapeutic DNA to target cells. Non-viral polymers, such as chitosan (Ch), a cationic polymer, can be easily combined with DNA. Once a complex is formed, DNA is protected from degradation by nucleases.

The first objective of this study was to define the characteristics of the best-suited Ch nanoparticle for maximum selective transfection in human epidermoid carcinoma (KB) cells *in vitro*. Nanoparticles varied by the presence or absence of folic acid (FA) and Ch's molecular weight (MW 5, 25 and 50 kDa). They were then selected and combined with interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene, a natural blocker of the inflammatory cytokine interleukin-1beta (IL-1 β). The second objective was to inject these carriers by the hydrodynamic method in a rat model of adjuvant-induced arthritis and to evaluate the inhibitory effects of IL-1Ra against inflammation *in vivo*.

Ch-DNA nanoparticles with FA and Ch25 demonstrated selective transfection and significantly increased it in KB cells *in vitro*. The inhibitory effects of IL-1Ra gene therapy *in vivo* were evident from lower expression levels of inflammatory factors (IL-1 β and prostaglandin E2) and decreased macroscopic limb inflammation. The results also revealed the presence of human recombinant IL-1Ra protein in rat sera. Non-viral gene therapy with Ch-PEG-FA-DNA nanoparticles containing the IL-1Ra gene appears to significantly decrease inflammation in this experimental model of arthritis.

Keywords:

Non-viral gene therapy, nanoparticle, chitosan, folic acid, molecular weight, in vitro, in vivo, hydrodynamic injection, transfection, gene, Lewis rats, rheumatoid arthritis, adjuvant-induced arthritis, interleukin-1 receptor antagonist IL-1Ra, interleukin-1beta, prostaglandin E2, inflammation.

Grants:

*The Arthritis Society of Canada
Canadian Institutes of Health Research
Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)*

Table des matières

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	15
1.1. Historique De la thérapie génique.....	15
1.2. Nanoparticules Chitosane-ADN	19
1.3. L'arthrite rhumatoïde	19
1.4. Objectifs.....	20
1.5. Stratégie de recherche.....	21
1.5.1. Devis de recherche retenu.....	21
1.5.2. Biais touchant la validité du devis	21
 CHAPITRE 2: REVUE DE LITTÉRATURE	 22
2.1. Transfection de gène	22
2.2. Transfert de gène par injection de l'ADN nu.....	23
2.3. La thérapie génique virale.....	25
2.4. La thérapie génique non virale.....	26
2.4.1. Transfert de gène par les méthodes physiques.....	26
a) Le gène gun.....	26
b) L'électroporation	27
c) Les ultrasons	27
d) La méthode hydrodynamique	28
2.4.2. Transfert de gène par les méthodes chimiques	31
a) Les lipides cationiques.....	31
b) Les polymères cationiques.....	33
2.5. Le chitosane	34
2.6. L'acide folique (FA)	36
2.7. Les récepteurs de l'acide folique (FR).....	37
2.8. Le polyéthylène glycol (PEG)	38
2.9. L'arthrite rhumatoïde	38
2.9.1. Caractéristiques et incidence de la maladie	38
2.9.2. Modèles expérimentaux d'arthrite	40
2.9.3. Dépendance aux cellules T et CD4+.....	42
2.9.4. Les cytokines inflammatoires	43
2.9.5. L'IL-1Ra, antagoniste au récepteur de l'IL-1 β	45
2.9.6. Diagnostic de l'arthrite rhumatoïde (Signes biologiques et immunologiques)	46
2.9.7. Les traitements.....	46
a) Traitements antalgiques et anti-inflammatoires.....	47
b) Traitements de fond	47
c) Les agents biologiques inhibiteurs.....	47
d) L'arthroplastie	48

CHAPITRE 3: ARTICLE 1.....	49
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....	103
4.1. Etude <i>in vitro</i>	104
4.1.1. Caractéristiques de nanoparticules.....	104
a) Electrophorèse sur gel d'agarose.....	104
b) Taille de nanoparticules.....	104
c) La cytotoxicité.....	106
4.1.2. Efficacité de transfection dans les cellules KB.....	106
a) Effet du poids moléculaire (PM).....	107
b) Effet de la présence de PEG-FA.....	108
4.1.3. Limitations.....	109
4.2. Etude <i>in vivo</i>	109
4.2.1. Mécanisme d'action de l'arthrite rhumatoïde.....	109
4.2.1. Choix du modèle animal.....	113
4.2.2. Évaluation de l'inflammation.....	113
4.2.3. Évaluation des marqueurs inflammatoires.....	114
4.2.5. Mesure standard de l'ACR.....	115
4.2.6. Nanoparticules Ch-PEG-FA-IL-1Ra, une nouvelle approche prometteuse.....	116
4.2.7. Limitations.....	117
CHAPITRE 5: CONCLUSION.....	118
REFERENCES.....	120

Liste des figures

Figure 1 : Le développement de la thérapie génique au cours des années .	17
Figure 2 : Les vecteurs dans les essais cliniques de thérapies géniques.	18
Figure 3 : Mécanisme de thérapie génique simplifié	22
Figure 4 : Cibles de la méthode d'injection hydrodynamique	30
Figure 5 : Structure chimique du chitosane	35
Figure 6 : Structure chimique de l'acide folique	37
Figure 7 : Articulation saine et articulation atteinte.....	40
Figure 8 : Différents modèles d'arthrite induits chez les rongeurs.....	42
Figure 9 : IL-1 β et TNF- α : cytokines pro-inflammatoires majeures dans le cas RA.....	44
Figure 10 : Affinité de l'IL-1Ra aux récepteurs de l'IL-1 β	45
Figure 11 : Réseau détaillé de cytokines dans le cas RA.....	111

Liste des abréviations

AAK : Antikératine

ACR : American College of Rheumatology

AIA : Arthrite induite par un adjuvant

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

ALP : Phosphatase alcaline

APN : Antipérimucléaires

β -gal : β -galactosidase

Ch : Chitosane

Ch5 : Chitosane de poids moléculaire 5 Kilodaltons

Ch25 : Chitosane de poids moléculaire 25 Kilodaltons

Ch-50 : Chitosane de poids moléculaire 50 Kilodaltons

COX : Cyclo-oxygénase

CRP : C-reactive protein

CSF : Colony stimulating factors

DCC : *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide

DDA : Degré de désacétylation

DOPE : Dioleoylphosphatidyl-éthanolamine

ECR : Essais cliniques contrôlés et randomisés

EEA-1 : Anti-early endosome maker

ESR: Erythrocyte sedimentation rate

FA : Acide folique

FR : Récepteur de l'acide folique

GFP : Green fluorescent protein

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HMW : High molecular weight

IL : Interleukine

IL-1R : Récepteur de l'IL-1

IL-1Ra : Antagoniste aux récepteurs IL-1

iNOS : Inducible nitric oxide synthase

KB : Cellules carcinomes épidermoïdes

kDa : Kilodalton

L : Litre

LBP : Lipopolysaccharide Binding Protein

LF : LipofectAMINE™2000

LMW : Low molecular weight

mg : Milligramme

mL : Millilitre

mm : Millimètre

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole

MW : molecular weight

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

nm : Nanomètre

NO : Oxyde nitrique

OA: Ostéoarthrite

OC : Ostéocalcine

PCR : Polymerase chain reaction

PEG : Polyéthylène glycol

PGE2 : Prostaglandines E2

PEI : Polyethylenimine

pg : Picogramme

PI : Propidium Iodide

PM : Poids moléculaire

RA : Arthrite rhumatoïde

RhF : Facteur rhumatoïde

sIL-1Ra : Protéine IL-1Ra sécrétée

TGase1 : Transglutaminase 1

TGF : Transforming growth factors

TNF : Tumor necrosis factor

TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase

UV: Ultra-violet

Vis : Visible

VS : Vitesse de sédimentation

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Historique de la thérapie génique

Le terme "thérapie génique" dérive du terme "génie génétique" qui a été utilisé pour la première fois au sixième Congrès international de génétique en 1932, intitulé "Application des principes génétiques pour la reproduction d'animaux et des plantes" [1].

Une fois les bases de la génétique moléculaire et le transfert de gènes dans les bactéries ont été étudiés dans les années 1960, la communauté scientifique anticipait que les virus peuvent être utilisés efficacement chez l'homme. Des concepts optimistes supportaient la synthèse et l'introduction de nouveaux gènes dans des cellules de certains organes [1 ; 2].

Dans les années 1980, l'amélioration des connaissances concernant les liens entre certains gènes mutés et certaines pathologies, la création de système de transfert de gènes à partir de virus sécurisés, l'amélioration des technologies de manipulation de l'ADN (surtout avec la technologie de l'ADN recombinant) et autres techniques qu'on appelle aujourd'hui la biotechnologie permettent à cette idée théorique de voir le jour sous la forme d'essais cliniques [1 ; 3].

A la fin des années 1980, le génie génétique est remis en question par trois organisations religieuses majeures aux Etats-Unis, demandant au président Carter de créer un forum pour traiter les questions d'éthiques fondamentales y relatives. Ils ont écrit dans une lettre datée

du 20 juin 1980: *“History has shown us that there will always be those who believe it appropriate to “correct” our mental and social structures by genetic means, so as to fit their vision of humanity. This becomes more dangerous when the basic tools to do so are finally at hand. Those who would play God will be tempted as never before”* [4].

Les années 1990 voient éclore plusieurs essais cliniques dans des pathologies très diverses : cancer, maladies cardiaques et vasculaires, infections virales, immunodéficiences héréditaires. Plusieurs types cellulaires ont été ciblés tels que les fibroblastes, hépatocytes, keratinocytes, myoblastes de muscles squelettiques, cellules endothéliales vasculaires, et autres [5].

Early milestones in the development of gene therapy

Year	Result
1960–1970	Isolation of genetically marked mammalian cells and first evidence for uptake and expression of exogenous DNA in mammalian cells
1960s	Role of papovaviruses in cell transformation-integration stable expression
1966–1970	Discussions of public policy, ethical issues in potential applications of genetics to human disease
early 1970s	Mechanisms of infection and reverse transcription by RNA tumour viruses
1972	Suggestion that transforming viruses be used for therapeutic gene transfer, public policy and ethical issues
1973	Calcium phosphate cell transformation
1980	Cline human study
1980	Renewed public policy discussion- "Gene therapy in human beings: When is it ethical to begin?"
1981	Stable in vitro correction of HPRT deficiency by calcium phosphate-mediated transfection
1981–1982	Development of retroviral vectors
1983	Banbury gene therapy meeting
1983	Complementation of genetic defect and correction of disease phenotype <i>in vitro</i>
1989–1990	First approved human clinical marking and potentially therapeutic studies

Figure 1 : La succession d'événements et le développement de la thérapie génique au cours des années. [5]

Aujourd'hui, de nombreuses équipes internationales continuent à travailler pour faire de la thérapie génique, un outil de traitement de toutes les affections héréditaires ou non, que ce soit par une stratégie de restauration d'une activité génétique défailante ou par la production d'une activité supplémentaire [3].

Pratiquement, depuis le premier essai clinique, on observe qu'environ 70% des essais se sont focalisés sur le traitement du cancer [6]. De même, environ 70% des essais cliniques de thérapies géniques ont eu recours aux vecteurs viraux, alors que les vecteurs non viraux font partie d'une catégorie à part qui ne constitue que 4.1% environ. [6]

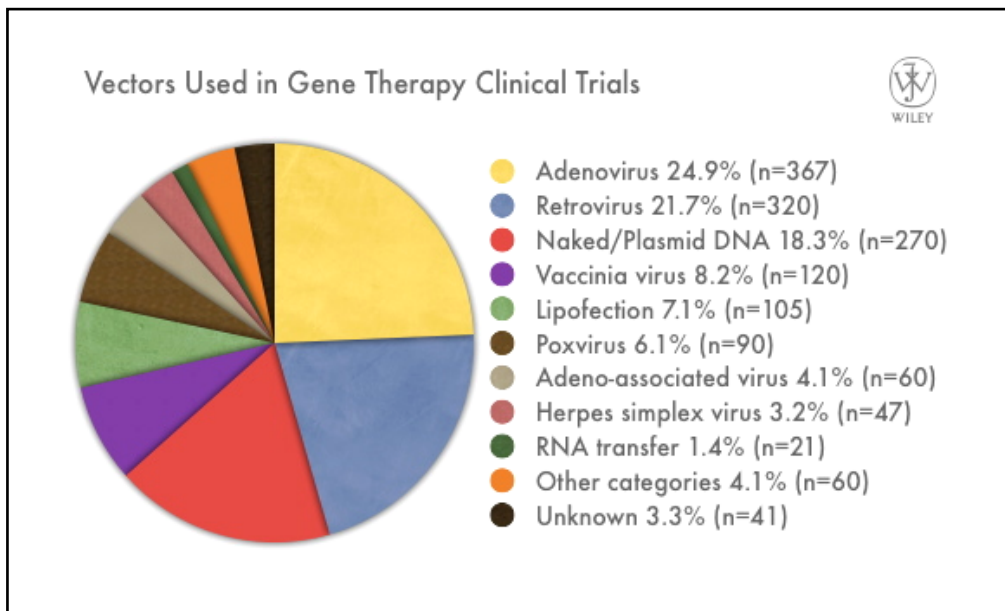


Figure 2: Différents types de vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapies géniques. [6]

1.2. Nanoparticules Chitosane-ADN

En tenant compte des différentes limitations suite à l'utilisation de vecteurs viraux, différentes stratégies ont été élaborées pour le développement de la thérapie génique non virale. Une des approches chimiques de cette dernière, repose sur la combinaison de polymères cationiques tels que le chitosane (chargé positivement) avec la molécule d'ADN (chargée négativement). On forme ainsi une nanoparticule Chitosane-ADN afin de faciliter la traversée de la membrane des cellules et l'entrée de l'ADN [7]. La nanotechnologie consiste en la conception et l'application de structures par le contrôle de la taille à une échelle nanométrique. Cette technologie peut être parfaitement adaptée à certaines stratégies thérapeutiques. Pour parvenir à une administration efficace d'un agent thérapeutique, il est important de comprendre les interactions des nanomatériaux avec le milieu biologique [8].

1.3. L'arthrite rhumatoïde (RA) et IL-1Ra

L'arthrite rhumatoïde (RA) est une atteinte articulaire inflammatoire souvent bilatérale et symétrique (les mêmes articulations des deux côtés du corps sont touchées simultanément), évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations (os et cartilage) [9].

L'antagoniste du récepteur IL-1 β est l'IL-1Ra, appelé auparavant l'inhibiteur de l'IL-1 β .

L'IL-1Ra est un agent qui se fixe sur le même récepteur de l'IL-1 β sur la surface des cellules et bloque le signal de ce dernier. L'IL-1Ra est utilisé comme un traitement indirect de l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes où l'IL-1 β joue un rôle clé [10].

1.4. Objectifs

1- Le premier objectif de l'étude est de synthétiser et ensuite évaluer différentes nanoparticules de chitosane et choisir la mieux adaptée pour une efficacité de transfection sélective *in vitro* dans les cellules KB.

2- Le deuxième objectif de l'étude est d'examiner *in vivo* les effets protecteurs du gène de l'IL-1Ra complexé aux nanoparticules de chitosane sélectionnées dans un modèle d'arthrite induite par un adjuvant (AIA) chez le rat.

1.5. Stratégie de recherche

1.5.1. Devis de recherche retenu

C'est une recherche expérimentale, à groupes indépendants et groupes contrôles positifs et négatifs.

1.5.2. Biais touchant la validité du devis

Les attributs de mesures souhaitables sont la fiabilité et la validité. La fiabilité est la capacité d'un instrument de classer les objets ou les individus de la même façon à chaque mesure et à reproduire des résultats de façon constante dans le temps ou dans l'espace. La validité est définie en fonction des objectifs de l'utilisation d'une échelle et le degré de confiance envers les inférences que l'on fait à partir de cette échelle. On parle de validité de critère lorsque dans l'étude on associe une échelle avec une mesure qui sert d'étalon-or (Gold Standard) [11].

Le biais le plus concerné dans cette étude, est celui associé à la mesure, à l'exécution et à la gérance de nos expériences.

Chapitre 2 : Revue de littérature

2.1. Transfection de gène

Dans le domaine de la génétique, on appelle transfection le processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction de l'ADN exogène dans des cellules eucaryotes. La transfection de gène nu étant possible mais peu efficace et très variable selon les cellules cibles, rend l'utilisation de systèmes vecteurs indispensable. Le système doit être suffisamment petit pour permettre l'internalisation dans les cellules et le passage dans le noyau. Il faut qu'il ait un tropisme flexible pour être applicable dans une gamme de maladies. Aussi, échapper aux lysosomes et être capable de suivre le chemin de l'endocytose sont des critères importants.

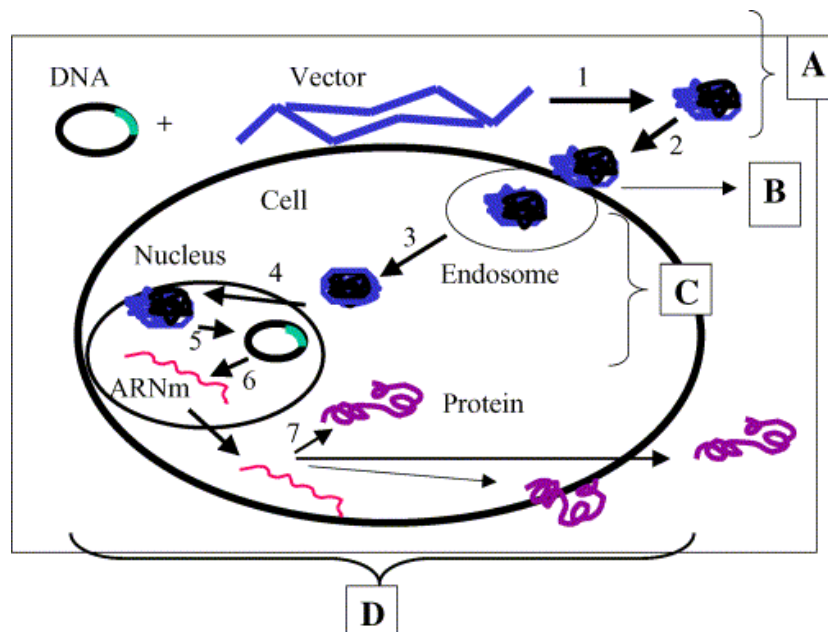


Figure 3 : Mécanisme de thérapie génique simplifié. (A) Transport extracellulaire ; (1) Insertion du gène dans le vecteur ; (B) Internalisation ; (C) Transport intracellulaire ; (2) fusionnement dans les vésicules d'endocytose ; (3) Le complexe libéré de l'endosome vers le cytoplasme ; (4) Absorption dans le noyau ; (D) Expression du gène ; (5) Dissociation de l'ADN du vecteur ; (6) Transcription du gène (7) Traduction de l'ARNm. La protéine peut être sécrétée hors de la cellule, libérée dans le cytoplasme ou fixée sur la membrane cellulaire. [7]

2.2. Transfert du gène par injection de l'ADN nu

L'ADN peut être directement injecté dans le tissu sans aucune intervention chimique ou physique. De nos jours, les injections intramusculaires bénéficient le plus des injections de l'ADN nu et les résultats confirment l'efficacité de transfection du gène en une durée restreinte. Certains récepteurs spécifiques ou non spécifiques sur la surface des cellules se lient à l'ADN et permettent son internalisation. Quelques uns de ces mécanismes ont été étudiés de nos jours alors que d'autres restent inconnus [12].

Le transfert de gène par simple injection de l'ADN nu porte intérêt aux chercheurs pour sa simplicité. Une injection cutanée directe chez le patient souffrant d'une ichtyose lamellaire, une maladie génétique de la peau causée par une perte d'expression de la transglutaminase 1 (TGase1), a montré que la régénération de la peau était possible suite à des injections répétées de l'ADN codant la TGase1. D'autres études qui ont suivi, ont

montré que le modèle d'expression n'était pas uniforme et n'a pas pu corriger les anomalies histologiques et fonctionnelles de la maladie [13].

Cette méthode n'est pas la plus convenable puisque l'ADN est hydrophile et a une taille relativement large, le rendant donc incapable de franchir plusieurs barrières physiques comme l'endothélium, les matrices intestinales et les membranes plasmiques de toutes cellules. De plus, l'ADN est immuno-génique à cause des motifs CpG non méthylés.

La dégradation de l'ADN par les nucléases intracellulaires et extracellulaires l'empêche de pénétrer dans le noyau et d'être intact et fonctionnel. Suite à une injection directe de l'ADN nu, il a été prouvé que le taux d'expression génique est plus faible qu'en ayant recours à un vecteur viral [7].

Plusieurs stratégies cherchent à améliorer l'internalisation de l'ADN dans la cellule cible. On peut citer par exemple la transferrine qui améliore la transfection *in vitro*, ainsi que l'addition de polymères non-ioniques, surfactants ou de solutions hypotoniques qui améliorent le transfert du gène [14 ; 15]. De même plusieurs inhibiteurs de nucléase ont montré une meilleure transfection dans les muscles et les poumons. L'utilisation de système vecteur semble donc être essentielle [16 ; 17].

2.3. La thérapie génique virale

Les virus, compte tenu de leurs structures et de leurs mécanismes d'action, sont de bons modèles pour véhiculer les gènes thérapeutiques efficacement et à long terme. Un virus naturel libère ses gènes dans la cellule qu'il infecte [18].

De nos jours, les vecteurs viraux les plus utilisés sont les rétrovirus, herpes virus, lentivirus, virus associés à l'adénovirus (AAV) et adénovirus, chacun ayant des caractéristiques spécifiques [19].

Toutefois plusieurs limites sont liées à leur utilisation. Les séquences régulatrices contrôlant l'expression du gène thérapeutique sont souvent reconnues comme étrangères et sont inactivées par la cellule qui les reçoit. De plus, la taille du gène que peut contenir le virus ne peut excéder certaines normes, ce qui limite la production à grande échelle. Les formes virales peuvent induire chez le patient, des effets toxiques, oncogéniques et des réponses immunitaires et inflammatoires [20].

Pour des questions de limitation et de sécurité, l'évaluation et le développement d'une autre stratégie a lieu: la thérapie génique non virale.

2.4. La thérapie génique non virale

Des méthodes de thérapies géniques non virales ont été explorées utilisant des approches physiques ou chimiques.

Les approches physiques utilisent des forces physiques qui rendent la membrane cellulaire perméable, facilitant le transfert intracellulaire. Les approches chimiques utilisent des éléments synthétiques ou naturels pour transférer le gène dans les cellules.

2.4.1. Transfert du gène par les méthodes physiques

a) Transfert de gène par la méthode « Gene Gun »

Le bombardement de particules est la méthode idéale pour transférer un gène à travers la peau et la muqueuse. L'ADN est déposé sur la surface de particules d'or qui seront expulsées par un gaz sous pression vers le tissu. Les particules d'or permettent une pénétration de quelques millimètres dans le tissu et puis la libération de l'ADN suivant le parcours. Les chercheurs essaient de modifier chimiquement la surface de particules d'or pour une meilleure pénétration dans les cellules [21 ; 22].

b) Transfert de gène par Electroporation

C'est une méthode utilisée et testée sur différents types de tissus *in vivo*. Elle consiste à insérer deux électrodes et puis exercer un champ électrique sur un type de tissu pour augmenter l'expression du gène. Les études ont montré une expression de gène une dizaine de fois plus élevée en comparant la technique à celle de l'injection directe de l'ADN nu. Une expression à long terme a été observée suite à un traitement par électroporation [23]. Cette technique présente plusieurs inconvénients surtout lorsqu'il s'agit d'une application *in vivo*. Suivant les normes exactes, les électrodes se déposent à une distance ne dépassant pas 1 cm, d'où la difficulté de transférer une grande surface du tissu. Ensuite, c'est une méthode invasive puisqu'une procédure chirurgicale doit avoir lieu pour placer les électrodes. Aussi, des dommages irréversibles du tissu seront la cause du champ électrique (voltage dépendant) appliqué sur le tissu. Nous citons par exemple, l'activation de protéases des canaux Ca^{2+} , le changement de conformation de l'ADN et sa stabilité. Les études en cours essaient de trouver une solution à ces problèmes en changeant le design des électrodes ou en modifiant la durée et la fréquence des pulsations électriques [24 ; 25].

c) Transfert de gène facilité par les ultrasons

Suite à l'utilisation de cette méthode, l'expression du gène est 10 à 20 fois plus importante que celle de l'injection directe de l'ADN nu. L'efficacité de transfection dépend de plusieurs facteurs comme la fréquence, la durée de traitement, et la quantité de plasmides utilisée [26]. A la différence de l'électroporation qui fait migrer l'ADN suivant un champ

électrique, les ultrasons créent des pores et facilitent le transfert intracellulaire du gène par diffusion passive. La taille de l'ADN et sa concentration jouent un rôle essentiel dans l'efficacité de transfection [27]. C'est une méthode idéale pour un transfert non invasif de gène dans les organes et tissus mais dont l'efficacité de transfection est toujours considérée insuffisante.

d) Transfert de gène par la méthode hydrodynamique

Une force hydrodynamique est générée par injection d'un large volume d'ADN rendant perméable l'endothélium du capillaire et générant ainsi des pores sur la membrane plasmique. Ceux-ci vont permettre la pénétration de l'ADN et des macromolécules d'intérêt à l'intérieur des cellules. Avec le temps, les pores se ferment, et piègent les molécules à l'intérieur [28].

Les facteurs qui déterminent l'efficacité de cette méthode sont : l'anatomie de l'organe (l'architecture des cellules entourant le capillaire), le volume injecté (solution hypertonique) et la vitesse d'injection [29 ; 30].

Pour une transfection efficace chez le rat, la solution doit représenter 8 à 9% du poids total de l'animal qui sera injectée en une durée de 5 secondes au niveau de la veine de la queue. Si le même ratio est appliqué chez l'humain, on aura à injecter un volume d'environ 7,5 L qui est non tolérable par le corps humain [12]. L'application clinique de la méthode hydrodynamique a été mise en question. Or, il a été prouvé que le volume nécessaire pour

une bonne transfection peut être réduite à 3 mL chez un rat de 200-250g ($<1,5\%$ du poids du corps), en ciblant le foie directement par la veine hépatique [31].

Une telle méthode reproductible, efficace, simple et rapide a été utilisée pour exprimer des protéines de valeurs thérapeutiques telles que les cytokines dans un modèle de rat [32].

Le transfert de gène dans les hépatocytes de rongeurs par injection hydrodynamique au niveau de la queue est l'application de la méthode la plus réussie jusqu'à lors. Une injection d'un large volume d'ADN qui pénètre directement dans la veine cave inférieure, étire les fibres du myocarde, induit une congestion cardiaque et éjecte la solution injectée vers le foie [33].

Dernièrement, les chercheurs ont centré leurs études sur la réduction du volume à injecter et sur la modification de la pression nécessaire pour le transfert de gène.

Une stratégie cherchant à réduire le volume, consiste en une injection directe dans la circulation des tissus ciblés [28].

Les expériences ont montré la sécurité de la procédure et l'application dans le cas de traitement répété. Quand le modèle animal est le rat, l'injection a lieu au niveau de la veine fémorale lorsque le tissu ciblé est le muscle [34].

Target tissue	Injection site	Animal species
Liver (<i>in vivo</i>)	Tail vein	Mouse, rat
	Jugular vein	Chicken
	Inferior vena cava	Mouse, rat, rabbit
	Hepatic vein	Rabbit, swine, human
	Portal vein	Mouse, rat, rabbit
	Bile duct	Rat
Liver (<i>ex vivo</i>)	Inferior vena cava	Rat
Hepatocellular carcinoma	Hepatic artery	Rat
Muscle	Tail vein, tail artery	Mouse
	Saphenous vein	Mouse, rat, rabbit, canine
	Femoral vein	Rat
	Cephalic vein	Canine
	Saphenous, cephalic, and median veins	Monkey
	Brachial and popliteal arteries	Monkey
	Femoral artery	Rat, swine
	Iliac artery	Mouse, rat, rabbit
Myocardium (<i>ex vivo</i>)	Aorta	Rat
	Superior and inferior vena cava	Rat
Kidney	Tail vein	Mouse
	Renal vein	Rat
	Tail vein	Fish
Spleen	Tail vein	Fish
Pancreas	Tail vein	Mouse
Brain	Tail vein	Mouse
	Carotid artery	Rat

Figure 4 : Site d'injection par la méthode hydrodynamique pour cibler les cellules d'un organe spécifique pour une espèce animale donnée. [34]

La grande efficacité et la simplicité de la méthode hydrodynamique a ajouté l'intérêt de la communauté de thérapie génique vers la possibilité de l'application chez l'humain.

L'outil d'injection est un dispositif manuel conçu spécialement pour l'injection sous pression de quelques centaines de millilitres. L'idéal sera de concevoir un dispositif assisté par un ordinateur qui tiendra compte non seulement de la pression mais aussi de la variabilité du poids corporel et de la structure vasculaire.

2.4.2. Transfert du gène par les méthodes chimiques

a) Transfert du gène par les lipides cationiques

Les lipides cationiques ont été utilisés pour le transfert des médicaments encapsulés et des vecteurs pour la thérapie génique. On parle d'une association rapide du liposome polycationique et de l'ADN polyanionique suivant une interaction électrostatique suivie d'un lent réarrangement de lipides [35]. Les lipides interagissent spontanément avec l'ADN pour former des grappes de vésicules le long de l'acide nucléique [36].

A une certaine densité du liposome, l'ADN sera condensé et encapsulé au sein de la bicouche lipidique. Cependant, des études montrent que les liposomes cationiques n'encapsulent pas l'ADN mais se lient avec le long de la surface de l'ADN, maintenant ainsi sa taille. Les liposomes cationiques interagissent aussi avec la membrane cellulaire chargée négativement. Comme résultat de cette fusion, l'ADN est transféré directement à travers la membrane plasmique [37]. Il a été prouvé et bien documenté que les complexes liposome-ADN sont cytotoxiques *in vitro* [38].

Le mélange de liposomes cationiques et l'ADN permet la condensation de ce dernier en de petites particules quasi-stables. On obtient des structures organisées appelées lipoplexes. Ceux-ci facilitent la libération de l'ADN des vésicules sans être détruit par les compartiments lysosomaux. La structure chimique du lipide cationique joue un effet majeur sur l'efficacité de transfection. La structure du lipoplexe est influencée par plusieurs facteurs comme le ratio de charge, les concentrations de l'ADN et du lipide, la structure et l'état physique du lipide (liposomes multilamellaires ou unilamellaires, micelles ...etc.), la salinité et la méthode de préparation [12]. Les chercheurs incorporent dans la formulation des liposomes cationiques, des lipides naturels (p.ex. le dioleoylphosphatidyl-éthanolamine (DOPE)), dans le but de faciliter la fusion membranaire [39 ; 40].

Dans les études *in vivo*, l'utilisation de lipoplexes a montré une interaction avec les composants du sang chargé négativement et une formation d'agrégats empêchant le gène de parvenir aux cellules à distance [41].

Le recours à un complexe polyéthylène glycol- Lipide (PEG-Lipide) permet de minimiser les interactions non-spécifiques le long de la circulation sanguine et de cibler spécifiquement des maladies [42].

La lipofectAMINETM2000 (LF), est un vecteur lipidique permettant une grande efficacité de transfection mais considéré comme toxique lorsqu'il est utilisé *in vivo* [7].

Bien que les phospholipides sont moins immunogènes et plus faciles à préparer que les systèmes viraux, cependant le succès de leur application reste limité. Les désavantages de l'utilisation des lipides cationiques sont la toxicité et la faible efficacité de transfection (en

comparaison avec les vecteurs viraux) [19]. La seule explication existante sur la faible efficacité de transfection est la perturbation des complexes par les protéines sanguines [39].

b) Transfert du gène par des polymères cationiques

Les polymères cationiques naturels ou synthétiques constituent une autre catégorie de transfert de gènes utilisée largement. Les complexes ADN-polymère appelés polyplexes, sont plus stables et sont capables de plus condenser l'ADN que les lipides cationiques [43]. Le premier groupe de polymère cationique utilisé dans les études *in vivo* est le poly-L-lysine [44]. Au fil des années, un grand nombre de ces polymères a été exploré et puis appliqué dans les études, tels que: Le polyéthylèneimine (PEI), les dendrimères polyamidoamines et polypropylamines, la polyallylamine, le chitosane, les protéines cationiques (polylysines, protamines et histones), ainsi que les peptides cationiques [7].

Les polymères cationiques permettent la condensation de l'ADN en de petites particules facilitant ainsi l'endocytose : interactions (charge-charge) avec les sites anioniques présents sur la surface des cellules. Le plus étudié des polymères est le PEI, qui est massivement chargé : le tiers de ces atomes sont des atomes nitrogènes, dont un sixième portent une charge positive [45].

Le PEI est non-biodégradable, sa toxicité et son activité de transfection dépendent de son poids moléculaire. Le taux de transfection avec le PEI est dépendant du poids moléculaire. Un PEI de poids moléculaire plus grand que 25 kDa est très actif mais considéré comme toxique. Pour une transfection abordable et une moindre toxicité, il est préférable d'utiliser un PEI de 5 à 10 kDa [46].

D'autres polymères cationiques biodégradables ont été étudiés pour réduire la toxicité que certains présentent (cas du PEI et du poly-L-lysine). En général, les polymères cationiques ont des avantages sur les vecteurs viraux. Ils sont moins immunogènes et facilement fabriqués. Leur utilisation est encore limitée puisque certains ne satisfaisaient à un ou plusieurs facteurs tels que la faible toxicité, la biocompatibilité, la biodégradabilité et surtout l'efficacité de transfection favorable [47].

2.5. Le chitosane

Le chitosane a été décrit comme un vecteur de plasmides pour la première fois par Mumper et al. [48]. De nos jours, le chitosane est devenu un polymère très étudié dans le domaine des thérapies géniques non virales grâce à ses propriétés uniques. C'est un polycation prouvé non toxique et sécuritaire chez les animaux ainsi que chez les humains. Les lysozymes dégradent le chitosane en CO₂ et H₂O dans le corps vivant [49 ; 50]. Biodégradable et très peu immunogène, le chitosane est un bon candidat pour transférer le gène, puisqu'il est chargé positivement et peu être complexé avec l'ADN chargé négativement. Il se lie facilement à l'ADN et le protège contre la dégradation des nucléases [7 ; 51].

Le chitosane ((1→4) 2-amino-2-desoxy-β-D-glucane) est un polysaccharide (copolymère) composé de deux sous-unités, la D-glucosamine liée (unité désacétylée) et la N-acétyl-D-

glucosamine (unité acétylée), liées ensemble par des liaisons $\beta(1,4)$. Il est produit par la désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine, composant de l'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamars). La chitine est le second biopolymère naturel le plus abondant trouvé dans la nature après la cellulose. Le chitosane diffère par le degré de désacétylation (40 à 98 %) et le poids moléculaire (50 à 2000 kDa) [20].

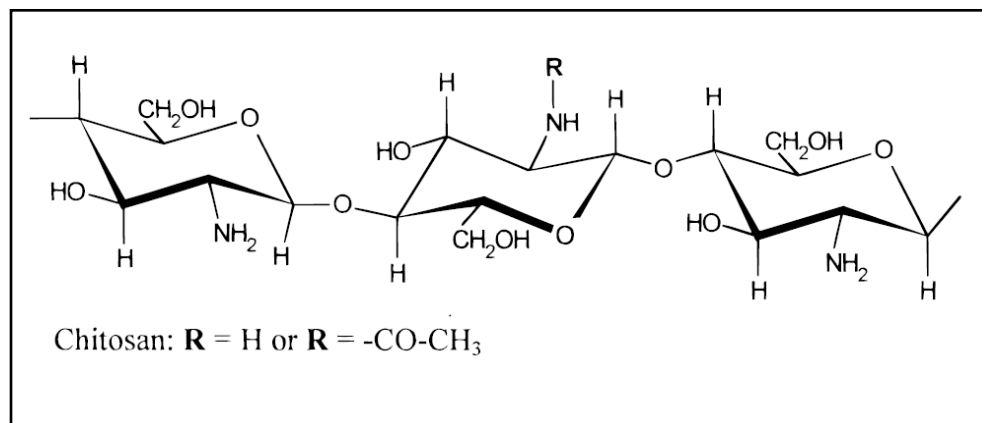


Figure 5 : Illustration schématique de la structure chimique du chitosane [52].

En général, l'isolation de la chitine de l'exosquelette des crustacés se fait en trois étapes standards: la déminéralisation (séparation de carbonate de calcium et du phosphate de calcium), la séparation de protéines, et la dépigmentation [53]. Une des caractéristiques du chitosane est le degré de désacétylation élevé ($DA \geq 99\%$). On a donc recours à plusieurs hydrolyses successives avec une base forte (KOH ou NaOH) puisque le degré de désacétylation est dépendant de la concentration alcaline et de la température [54 ; 55].

Le chitosane est une base faible (PKa du groupe amine = 6,5), insoluble à un PH neutre ou alcalin. Dans des milieux acides, les groupes amines seront chargés positivement, rendant la densité de charge du polysaccharide élevée. La nature cationique du chitosane permet une forte interaction électrostatique avec les muqueuses chargées négativement et les macromolécules telles que l'ADN [56].

Le majeur avantage suite à l'utilisation du chitosane est qu'il ne nécessite ni sonication, ni de solvants organiques pour sa préparation. De cette façon, on minimise les possibilités d'endommager l'ADN. Aussi, les nanoparticules de chitosane restent stables même après une certaine durée de conservation [55 ; 57].

2.6. L'acide folique (FA)

L'acide folique (FA) (la vitamine hydrosoluble B9) est une coenzyme (de formule chimique $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$) participant à la synthèse des purines et des pyrimidines, constituant les acides nucléiques (ADN et ARN). La vitamine B9 intervient également dans la synthèse d'acides aminés (méthionine, histidine et sérine) [58].

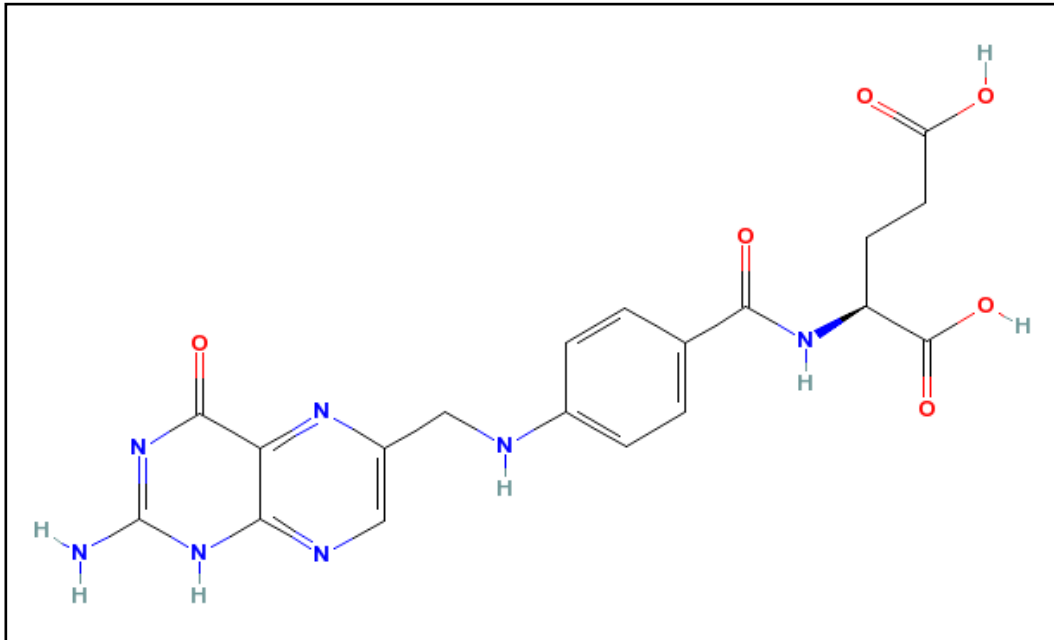


Figure 6 : Illustration schématique de la structure chimique de l'acide folique [59].

2.7. Les récepteurs de l'acide folique (FR)

Pour certaines maladies, il y a surexpression de récepteurs FA ($FR\alpha$ et $FR\beta$), d'où le fait d'ajouter le groupement FA à la nanoparticule Chitosane-ADN pour un ciblage spécifique de cellules affectées, évitant ainsi les cellules normales. Cette technique est utilisée pour une variété de médicaments et maladies [60]. Dans la littérature, cette stratégie est décrite comme efficace pour transférer plusieurs types de cellules cancéreuses (cancer du sein et de l'ovaire) [61]. Les macrophages actifs sont responsables de la progression des maladies auto-immunes (l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la colite et le lupus érythémateux disséminé) [7]. Les macrophages actifs dans le cas de l'arthrite rhumatoïde sur-expriment

les FRs [62 ; 63]. Ces informations contribuent largement dans les études de thérapies géniques ciblées par les FRs.

Des études ont aussi prouvé que les cellules carcinomes épidermoïdes (KB) sur-expriment les récepteurs FRs [64 ; 65 ; 66].

2.8. Le polyéthylène glycol (PEG)

Dans les nanoparticules Chitosane-ADN l'ajout de l'acide folique se fait par une liaison avec le chitosane à travers un bras polyéthylène glycol (PEG). En conjuguant les complexes avec du PEG et des ligands sur leurs surfaces, on rend notre ciblage de gène plus spécifique [67].

Le PEG est couramment utilisé dans les biopharmaceutiques pour améliorer les propriétés de biodisponibilité et de demi-vie *in vivo*. Les PEG les plus impliqués ont des poids moléculaires entre 3 et 4 kDa. [68]

2.9. L'arthrite rhumatoïde (RA)

2.9.1. Caractéristiques et incidence de la maladie

La forme la plus fréquente d'arthrite est l'ostéoarthrite (OA), maladie locale et incurable caractérisée par une dégénérescence d'un nombre limité d'articulations soumises au poids corporel tel que la hanche et le genou. [69]

C'est la plus fréquente des maladies rhumatismales chroniques inflammatoires de l'adulte. Elle concerne 1 à 3 % de la population mondiale. Les femmes sont plus susceptibles d'être atteintes que les hommes (3 fois plus). Elle peut se manifester à tout âge mais apparaît généralement entre 25 et 50 ans. [70] Dans les années récentes, plusieurs informations ont été apportées sur l'arthrite rhumatoïde, mais les causes de la maladie restent majoritairement inconnues. L'arthrite rhumatoïde est considérée comme une maladie auto-immune, car des cellules du système immunitaire s'attaquent aux articulations, notamment en produisant des anticorps. Il est même question d'auto-anticorps, car ceux-ci ne combattent pas des substances étrangères au corps, mais plutôt le corps lui-même (les articulations).

C'est une maladie systémique chronique caractérisée par une inflammation articulaire souvent bilatérale et symétrique évoluant par poussées, se traduisant par des douleurs, des gonflements, de la rougeur et une sensation de chaleur. [68] L'arthrite rhumatoïde non traitée se traduit par une déformation ou même une destruction sérieuse d'une ou plusieurs articulations menant à une incapacité permanente. La maladie peut être soignée de façon efficace mais ne peut être guérie actuellement. Selon la Société de l'arthrite du Canada, « l'arthrite rhumatoïde est incurable. Par contre, si elle est diagnostiquée rapidement et bien traitée, on peut la maîtriser et éviter les lésions articulaires graves » [70].

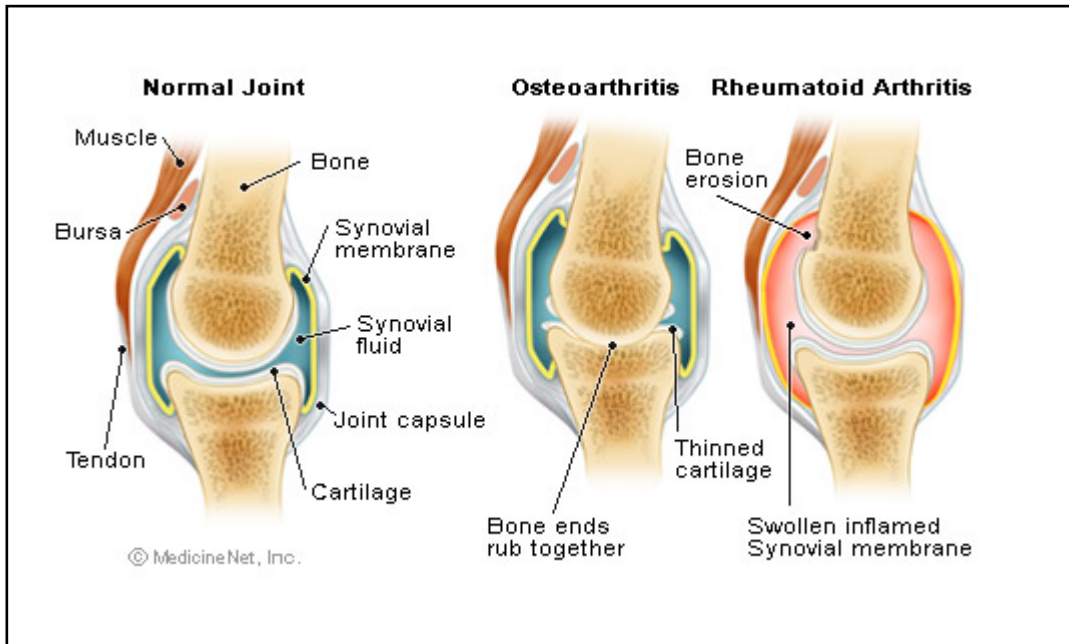


Figure 7: Articulation saine et articulations atteintes d'ostéoarthrite et d'arthrite rhumatoïde. Dans le cas d'arthrite rhumatoïde le synoviale s'enflamme et produit un excès de fluide suivi d'une érosion osseuse et dommages du cartilage. [71]

2.9.2. Modèles expérimentaux d'arthrite

Une grande variété de modèles expérimentaux d'arthrite a été créée chez les rongeurs pour divers axes d'études y compris les nouvelles thérapies, l'identification de médiateurs pro-inflammatoires et la recherche de marqueurs de progression de la maladie.

Le premier modèle RA décrit est le modèle d'arthrite induit par un adjuvant contenant du *Mycobacterium tuberculosis* [72]. L'arthrite se développe ainsi entre le 10^{ème} et 45^{ème} jour post injection. Le modèle d'arthrite créé se caractérise par un œdème, une infiltration au niveau des cellules mononucléaires et polynucléaires des articulations, une périostite et une

érosion de l'os et du cartilage. Des études récentes ont montré que l'arthrite peut être induite chez des rats RA par exposition percutanée avec des huiles d'adjuvant ou même des huiles minérales contenant des produits cosmétiques [73].

Une autre technique décrite est celle de l'arthrite induite par un antigène. Elle est appliquée chez les souris, rats et lapins suite à une injection de protéine antigène (p.ex. sérum méthyle bovine albumine) au niveau de l'articulation de la patte de l'animal [74]. Les caractéristiques histopathologiques de l'arthrite induite par un antigène sont similaires à celles induites par un adjuvant sauf que la première est mono-articulaire, affectant seule l'articulation injectée [75].

Aussi, une simple injection d'une solution aqueuse de paroi cellulaire de streptocoque, cause une arthrite chronique chez les rats et souris. Dans ce cas, la sévérité de la maladie varie selon les souches. Par exemple, les rats Lewis développent une maladie chronique et sévère alors que les rats Fischer développent une faible arthrite qui subsiste rapidement. La différence entre les deux souches est due à un dysfonctionnement dans la synthèse de facteurs libérant la corticotropine menant à une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien [76 ; 77].

Enfin, l'arthrite induite par le collagène a été décrite chez les rats, souris et primates suite à une injection de collagène du type II [78]. Ce modèle d'arthrite est largement étudié puisqu'il présente les caractéristiques pathologiques et immunologiques de l'RA humaine [79].

Rat models
Streptococcal cell wall (SCW)
Antigen induced arthritis (AIA)
Adjuvant arthritis (AA)
Pristane-induced arthritis (PIA)
Mouse models
Induced
Collagen-induced arthritis (CIA)
Pristane-induced Arthritis
Proteoglycan-induced arthritis
Zymosan-induced arthritis
Immune complex arthritis
Serum transfer models
Genetic
K/BxN
NZB/NZW
HuTNF Tg
TNF gene mutation in AUUUA motif
Tristetraprolin $-/-$
IL-1RA $-/-$

Figure 8: Différents modèles d'arthrite rhumatoïde induits chez les rongeurs [80].

2.9.3. Dépendance aux cellules T et CD4+

Le nombre excessif de cellules T dans l'arthrite rhumatoïde confirme la théorie que RA est dépendante des cellules T. Ces cellules permettent la conversion d'une arthrite aiguë à une maladie inflammatoire chronique. Des expériences ont démontré que dans un modèle d'arthrite chronique (et non aiguë), il y a dépendance aux cellules CD4+ [81].

2.9.4. Les cytokines inflammatoires

Les cytokines sont des substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Ces molécules sont essentielles à la communication de nos cellules, sans les confondre avec les hormones et les neuromédiateurs. Il existe plusieurs types de cytokines comme les "Interleukines", les "Chimiokines", la famille du "Tumor necrosis factor" (TNF), les "Colony stimulating factors" (CSF) et les "Transforming growth factors" (TGF) [82].

L'Interleukine 1 ou IL-1 est une cytokine sécrétée par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Les deux formes d'IL-1 les plus étudiées sont l'IL-1 α et l'IL-1 β [83].

Les cytokines pro-inflammatoires (telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-15 et IL-18 ... etc.) régulent les réponses immunitaires et inflammatoires chez les patients RA [84]. Même les chimiokines permettent des signaux intracellulaires et trafic cellulaires direct dans le cas de RA [85].

De même, d'autres médiateurs solubles tels que l'oxyde nitrique ont été observés. iNOS (inducible nitric oxide synthase) permet la production d'oxyde nitrique (NO) qui permet la production de prostaglandines E2 (PGE2) par la voie cyclo-oxygénase (COX) causant l'inflammation [86]. D'autres études ont confirmé la présence d'un lien entre la PGE2 et l'aspect inflammatoire observé dans le cas de l'arthrite rhumatoïde [87].

TNF- α et IL-1 β favorisent une destruction de l'os et du cartilage alors que d'autres facteurs tels que l'IL-4, IL-10, IL-13 et IL-1Ra ont des actions immuno-régulatrices et anti-inflammatoires. Ceci a permis le développement de thérapies anti-cytokine telles que les traitements anti-TNF et anti-IL-1 [84].

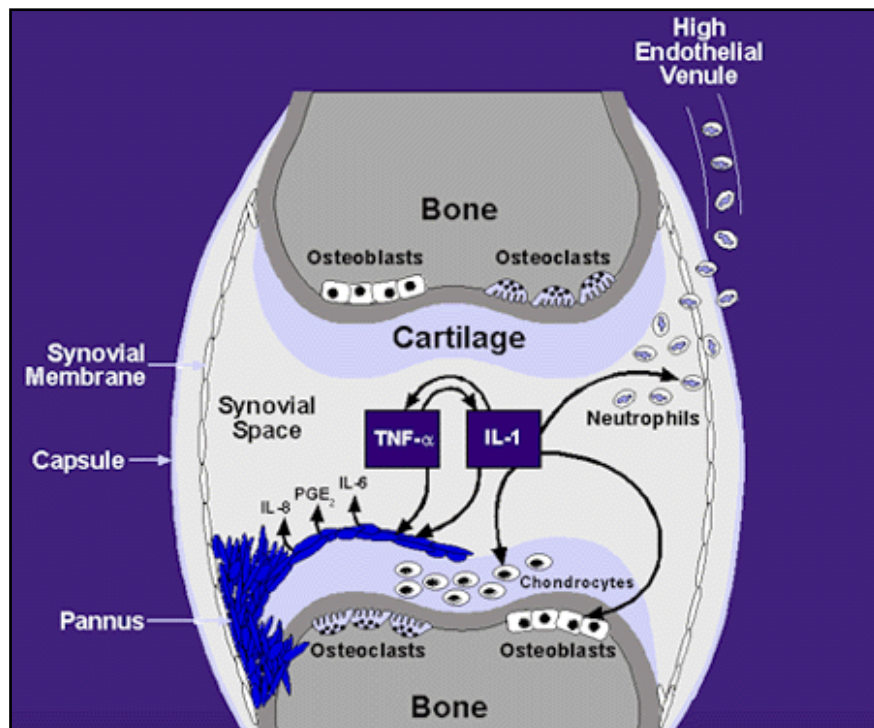


Figure 9: Inflammation, détérioration de l'os et du cartilage dans le cas RA causées par les médiateurs pro inflammatoires dont les plus connus l'IL-1 et la TNF- α illustrées ci-dessus).

[88]

2.9.5. L'IL-1Ra, antagoniste au récepteur de l'IL-1 β

L'IL-1Ra (antagoniste au récepteur de l'IL-1), se lie au même récepteur membranaire de l'IL-1 (IL-1RI et IL-1RII), et empêche celle-ci d'envoyer son signal à la cellule [83]. C'est donc un bloqueur naturel des cytokines inflammatoire IL-1 β . Il est utilisé comme un traitement indirect de l'arthrite rhumatoïde, maladie auto-immune dans laquelle l'IL-1 β joue un rôle-clé [89]. Il a été démontré que dans une réaction inflammatoire dans les conditions physiologiques, une augmentation de la concentration de l'IL-1 β est suivie d'une forte augmentation (jusqu'à 100 fois de plus) de la concentration de l'IL-1Ra [90]. Dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, un déséquilibre a été observé dû à une production excessive de l'IL-1 β ou une insuffisance dans la concentration de l'IL-1Ra causant l'inflammation au niveau de la synoviale [83].

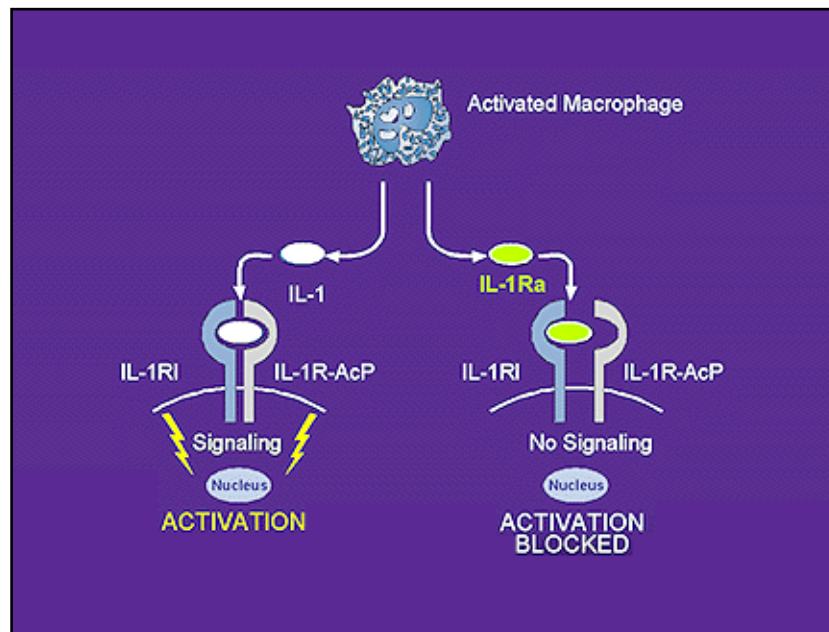


Figure 10: Affinité spécifique de l'IL-1Ra aux récepteurs IL-1RI prévenant la liaison et puis la signalisation de l'IL-1. [88]

2.9.6. Diagnostic de l'arthrite rhumatoïde (Signes biologiques et immunologiques)

Le diagnostic de l'arthrite rhumatoïde est avant tout clinique suivi par des observations radiographiques. Différents tests sanguins seront un moyen efficace pour diagnostiquer la maladie. L'arthrite rhumatoïde s'accompagne d'un syndrome biologique inflammatoire avec une accélération de la VS, une anémie inflammatoire et une augmentation des concentrations de CRP (C-reactive protein), d'alpha-2 globuline et de gammaglobulines. On nomme aussi comme marqueurs de la maladie, la LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein) et le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [86 ; 91].

La présence du facteur rhumatoïde (RhF) est un élément essentiel du diagnostic. C'est un auto-anticorps qui se lie au fragment Fc de l'IgG pour former un complexe immun.

D'autres auto-anticorps sont actuellement reconnus comme de bons marqueurs de la maladie tels que les anticorps antipérimucléaires (APN), l'antikératine (AAK), anti peptide citrique citrulliné ou anti-CCP. [92]

2.9.7. Les traitements

Il existe trois types de traitements dans le cas de l'arthrite rhumatoïde :

- a) Traitements symptomatique : antalgiques et anti-inflammatoires.
- b) Traitements "de fond", destinés à ralentir l'évolution générale de la maladie.
- c) Les agents biologiques inhibiteurs.
- d) Chirurgie orthopédique.

a) Traitements antalgiques et anti-inflammatoires

Il existe les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) tels que les Coxibs, cox-2 sélectifs (Celebrex, Vioxx) [93] et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou on inclut les corticoïdes (médicaments contenant de la cortisone) [94]. Ils ont une action rapide mais éphémère. Comme tous les anti-inflammatoires, ils sont actifs sur l'inflammation, mais pas sur les destructions ostéo-articulaires et ligamentaires. Les effets secondaires sont nombreux dont l'ostéoporose cortisonique [95].

b) Traitements "de fond"

Les médicaments de cette catégorie sont prescrits en plus des AINS. Ils ralentissent le processus biologique à l'origine de l'inflammation chronique. Parmi une liste de traitements de fond, on sélectionne le méthotrexate qui est actuellement un des traitements les plus efficaces et les mieux tolérés de cette maladie [96].

c) Les agents biologiques inhibiteurs

L'étanercept et l'infliximab ciblent une cytokine, le "tumor necrosis factor alpha" (TNF- α), impliquée dans l'inflammation systémique et dans la réaction de phase aiguë [97]. L'anakinra (Kineret®), une forme recombinante de l'IL-1Ra est un médicament qui cible l'interleukine-1 (IL-1) et bloque les effets de cette cytokine [98].

L'infliximab s'administre par voie intraveineuse toutes les quatre ou six semaines. L'étanercept et l'anakinra s'administrent par injections sous-cutanées à une fréquence plus élevée.

Les médicaments de cette classe ont un puissant effet protecteur sur le cartilage et sur l'os et améliorent la qualité de vie de manière très importante. Ces médicaments sont très chers et ne sont remboursés que dans des conditions très strictes. La mise au point de nouveaux médicaments ou de nouvelles thérapies géniques qui ciblent différentes cytokines est en cours.

d) L'arthroplastie

La réflexion chirurgicale d'une articulation avec ou sans implantation d'une prothèse est considérée comme un traitement réussi et suggéré normalement dans un stade précoce de la maladie, en particulier pour ce qui concerne le traitement chirurgical de la main rhumatoïde [99].

Chapitre 3: Article

Chitosan-PEG-FA-DNA Nanoparticles for Non-Viral Gene Therapy and Expression of the IL-1Ra gene in an experimental model of Rheumatoid Arthritis

Christian Jreysaty^{1,2}, Qin Shi², Huijie Wang², Mohamed Benderdour², Patrick Lavigne², Xingpin Qiu³, Françoise M. Winnik³, Xiaoling Zhang⁴, Kerong Dai⁴ and Julio C. Fernandes^{*,1,2}

¹Institute of Biomedical Engineering, Faculty of Medicine, University of Montreal and École Polytechnique de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; ²Orthopaedics Research Laboratory, Research Center, Sacré-Coeur Hospital, Montreal, Quebec, Canada; ³Department of Physical Chemistry and Polymer Science, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; ⁴Department of Orthopaedics, Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China.

*** To whom correspondence should be addressed:**

Julio C. Fernandes
Centre de recherche - Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal
5400 boul. Gouin ouest, Montréal, Canada. H4J-1C5.
Tel: 514-338 2222 #2489.
E-mail: julio.c.fernandes@umontreal.ca

Author's Contribution

Christian Jreysaty
Qin Shi
Julio C. fernandes

80%

Huijie Wang
Mohamed Benderdour
Patrick Lavigne
Xingpin Qiu
Françoise M. Winnik
Xiaoling Zhang
Kerong Dai

20%

Abstract

Considered to be one of the medical challenges of the coming decade, the success of gene therapy depends on the ability to deliver therapeutic DNA to target cells. Non-viral polymers, such as chitosan (Ch), a cationic polymer, can be easily combined with DNA. Once a complex is formed, DNA is protected from degradation by nucleases.

The first objective of this study was to define the characteristics of the best-suited Ch nanoparticle for maximum selective transfection in human epidermoid carcinoma (KB) cells *in vitro*. Nanoparticles varied by the presence or absence of folic acid (FA) and Ch's molecular weight (MW 5, 25 and 50 kDa). They were then selected and combined with interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene, a natural blocker of the inflammatory cytokine interleukin-1beta (IL-1 β). The second objective was to inject these carriers by the hydrodynamic method in a rat model of adjuvant-induced arthritis and to evaluate the inhibitory effects of IL-1Ra against inflammation *in vivo*.

Ch-DNA nanoparticles with FA and Ch25 demonstrated selective transfection and significantly increased it in KB cells *in vitro*. The inhibitory effects of IL-1Ra gene therapy *in vivo* were evident from lower expression levels of inflammatory factors (IL-1 β and prostaglandin E2) and decreased macroscopic limb inflammation. The results also revealed the presence of human recombinant IL-1Ra protein in rat sera. Non-viral gene therapy with

Ch-PEG-FA-DNA nanoparticles containing the IL-1Ra gene appears to significantly decrease inflammation in this experimental model of arthritis.

Keywords:

Non-viral gene therapy, nanoparticle, chitosan, folic acid, molecular weight, in vitro, in vivo, hydrodynamic injection, transfection, gene, Lewis rats, rheumatoid arthritis, adjuvant-induced arthritis, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-1beta, prostaglandin E2, inflammation.

Grants:

*The Arthritis Society of Canada-Canadian Institutes of Health Research
Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)*

I. Introduction

Human diseases can be treated by the transfer of therapeutic genes (transgene) into specific cells or tissues of patients to correct or supplement defective, causative genes. In hereditary diseases, the defective mutant allele is replaced by a functional allele. The main challenge is to develop a method that delivers the transgene to selected cells, where proper gene expression can be achieved [1].

Gene therapy is being applied to various health problems, such as cancer, acquired immunodeficiency syndrome and cardiovascular diseases. Several trials have aimed at introducing genes straight into human cells, focusing on diseases caused by single-gene defects, such as cystic fibrosis [2], hemophilia [3], adenosine deaminase deficiency [4], muscular dystrophy [5] and sickle cell anemia [6]. However, some problems have occurred in carrying large sections of DNA and delivering them to the correct site on the comparatively large human genome. In other cases, the goal was not achieved owing to the inefficiency of gene transfer vectors that were used.

Ideally, gene therapy must protect DNA against degradation by nucleases in intercellular matrices so that the disposition of macromolecules is not affected. Transgenes should be brought across the plasma membrane and into the nucleus of targeted cells but should have no detrimental effects. Hence, interaction with blood components, vascular endothelial cells and uptake by the reticuloendothelial system must be avoided [1].

For gene therapy to succeed, small-sized systems must internalize into cells and pass to the nucleus. Also, flexible tropisms allow applicability to a range of disease targets. Last but

not least, such systems should be able to escape endosome-lysosome processing for endocytosis [7].

1. Viral vectors: advantages and disadvantages of current vectors

Viral gene therapy consists of using viral vectors which, given their structure and mechanisms of action, are good candidates or models to carry therapeutic genes efficiently, leading to long-term expression [8; 9]. They have the natural ability to enter cells and express their own proteins. Nowadays, most viral vectors used are retroviruses, herpes virus, adenoviruses and lentiviruses [10]. However, viral vectors can cause several problems to patients, namely, toxicity, oncogenic effects, and immune and inflammatory responses. While many studies have shown the effectiveness of some viruses, they have many limitations, such as the fact that regulatory sequences controlling therapeutic gene expression are often recognized as foreign and are inactivated by the cells that receive them. Furthermore, a virus can only contain a transgene of limited size, making mass production difficult to achieve [1].

2. Non-viral vectors

Because of safety and cost concerns, non-viral vectors have gained a lot of attention in the literature [1; 7].

Non-viral gene therapy has been explored by physical approaches (transfer by gene gun, electroporation, ultrasound-facilitated and hydrodynamic delivery) as well as chemical approaches (cationic lipid-mediated gene delivery and cationic polymer-mediated gene transfer) [11].

Synthetic and natural cationic polymers (positively-charged) have been widely used to carry DNA (negatively-charged) and condense it into small particles, facilitating cellular internalization via endocytosis through charge-charge interactions with anionic sites on cell surfaces. In this category, we include polyethylenimine, polyamidoamine and polypropylamine dendrimers, polyallylamine, chitosan, cationic dextran, cationic peptides and proteins [1; 12]. Non-viral delivery systems for gene therapy have been increasingly proposed as safer alternatives to viral vectors because they evoke a minimal host immune response, are stable in storage, easy to produce in large quantities and are low cost [13].

3. Chitosan (Ch)

Ch is a biocompatible, biodegradable, non-toxic, and cheap polycationic polymer with low immunogenicity. Positively-charged Ch can be easily complexed with DNA and protected from nuclease degradation [14; 7]. It is also hypoallergenic, and has natural anti-bacterial properties. Sonication and organic solvents are not required for its preparation, which

minimizes possible damage to DNA during complexation. Ch (α (1 \rightarrow 4) 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan) is produced commercially by deacetylation of chitin, the structural element in the exoskeleton of crustaceans (e.g. crab, shrimp) [15; 16]. This polymer has a weak base; consequently, in acidic media, the amine groups will be positively charged, conferring high-charge density to the polysaccharide [7]. The cationic characteristic of chitosan is a crucial parameter for complex formation.

4. Folic acid (FA)

FA receptors (FR) are overexpressed on many human cancer cell surfaces, and the non-epithelial isoform FR(β) is expressed on activated synovial macrophages present in large numbers in rheumatoid arthritis (RA) [17].

FA-mediated transfection has been shown to facilitate DNA internalization into cells through membrane receptors both *in vitro* and *in vivo*. Another strategy for improving transfection is to take advantage of the mechanism of folate uptake by cells to promote targeting and internalization, hence improving transfection efficiency [18]. FA is appealing as a ligand for targeting cell membranes and allowing nanoparticle endocytosis via FR for higher transfection yields. Importantly, the high affinity of folate for binding to its receptor (1 nm) and its small size make it ideal for specific cell-targeting. Moreover, the ability of FA to bind its receptor for endocytosis is not altered by covalent conjugation of small molecules [19].

The first objective of this study was to synthesize and then assess different Ch nanoparticles and to select the best suited ones for selective *in vitro* transfection in human epidermoid carcinoma (KB) cell lines.

RA is a chronic, systemic autoimmune disorder that causes the immune system to attack the joints, where it causes inflammation (arthritis) and destruction. Other problems may also develop, including inflammation of blood vessels (vasculitis), the development of bumps (called rheumatoid nodules) in various parts of the body, lung disease and blood disorders [20; 21].

Interleukin-1 (IL-1), a key mediator of inflammation, is produced by monocytes-macrophages after the activation of soluble factors and contact (by ligands and counterligands) with stimulated Th1 lymphocytes. IL-1 consists of 2 subtypes, IL-1 α and IL-1 β . IL-1 α remains mostly intracellular (or expressed on the cell surface), while IL-1 β , selected in this article, is secreted into the extracellular space [22].

Several lines of evidence suggest that at least some of the pro-inflammatory aspects of this disease are mediated by prostaglandin E2 (PGE2) [23].

In this process, IL-1 β plays the role of crucial mediator of the inflammatory response [20; 24]. Its physiologically-competitive agent, IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), has been proven to act as a powerful inhibitor [25]. Several therapeutic studies on the use of recombinant IL-1Ra, as an external source agent, have demonstrated its positive effect in controlling inflammation and symptoms of RA in animal models and in clinical practice [26; 27].

The second objective of the study was to examine the *in vivo* protective effects of IL-1Ra gene complexed to the ideal Ch nanoparticle in an adjuvant-induced arthritis (AIA) rat model.

II. Materials and Methods

II.1. *In vitro* studies

1.a) Synthesis of Ch nanoparticles

Low molecular weight (LMW) Ch (Wako-10, degree of deacetylation (DDA) = 89%, amine-phosphate ratio N:P of 3:1) was purchased from Wako Chemicals (Richmond, VA, USA). Ch of different molecular weights (MWs) (5 kDa: Ch5, 25 kDa: Ch25, and 50 kDa: Ch50) were selected to create different nanoparticles.

FA (MW = 441.41 Da) was purchased from Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). α -amino, ω -carboxyl poly(ethylene glycol) (NH₂-PEG-COOH, MW = 3,400 Dalton) was obtained from Shearwater Inc. (Dallas, Texas, USA). Ch was further deacetylated by treatment with concentrated NaOH solution (50%) to obtain ~89% deacetylation according to a reported procedure [28].

To prepare Ch-PEG-folate conjugate, FA was combined with Ch through the PEG arm. FA was first attached to NH₂-PEG-COOH via well-known carbodiimide chemistry to give

folate-PEG-COOH. Then, folate-PEG-COOH was again activated by *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) for conversion to the reactive intermediate folate-PEG-CO-NHS and subsequently grafted onto Ch to achieve Ch-PEG-folate conjugate [29] (Figure 1). The level of folate-PEG incorporation was determined to be 1.1 mol% with respect to the glucosamine unit of chitosan by UV-Vis spectroscopy using FA as standard. (The extinction coefficient ($\lambda_{363\text{nm}}$) of FA was $6,165 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in pH 7.4 phosphate buffer (0.1 M).) A stock solution of 0.1% Ch or Ch-PEG-FA was prepared in 25 mM acetic acid, under continuous stirring at 37°C , and then adjusted to pH 5.0 with 1 M NaOH. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA solution was buffered in 43 mM Na_2SO_4 [30].

The plasmids used in this study were VR1412 and pEGFP-C3. pEGFP-C3 is a non-viral, mammalian plasmid. It has a CMV promoter and backbone size of 4727 bp. It codes for GFP (green fluorescent protein) that allows researchers to optically detect specific types of cells *in vitro* or *in vivo* [31].

The plasmid DNA VR1412, encoding the β -galactosidase (β -gal) reporter gene with a CMV promoter and a backbone size of 8100 bp, was obtained from VICAL Inc. (San Diego, CA, USA) [31; 32].

Mass quantity plasmids (VR1412 and pEGFP-C3) were prepared with commercial kits (Mega Kits, Qiagen Mississauga, ON, Canada), and finally suspended in sterile water. The integrity of DNA plasmid was analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis and quantified (DNA concentration) by UV spectrometry at 260 nm. All procedures were undertaken according to manual instructions [33].

Ch solutions were heated at 55°C for 1 minute; then, nanoparticle synthesis was carried out by mixing an equal volume of Ch and DNA stock solutions at room temperature (Ch:DNA ratio=1:1), stirred for 30 minutes, and allowed to stand for 1 hour before transfection [33]. Four types of nanoparticles were synthesized: Ch-GFP, Ch-PEG-FA-GFP, Ch- β -gal and Ch-PEG-FA- β -gal. Ch5, Ch25 and Ch50 are used for each type, giving a total of 12 different nanoparticle complexes. Ch nanoparticles were compared to LipofectAMINE™2000 (LF), a commercially-available lipid vector, which is considered to be the gold standard for its high transfection efficiency. LF was combined with DNA by mixing with a respective volume ratio of 1:3.25 μ L at room temperature. All measurements were collected in triplicate, and each experiment repeated 3 times [7].

1.b) Electrophoresis gel analysis

Agarose gel electrophoresis is a technique that separates DNA or RNA molecules by size. It is performed by moving negatively-charged nucleic acid molecules through an agarose matrix with an electric field.

Electrophoresis gel analysis contributes to the assessment of gene condensation with Ch and DNA integrity. Intact and complexed genes are seen and analyzed [33].

1.c) Nanoparticle size

We measured the nanoparticle sizes of Ch-GFP, Ch-PEG-FA-GFP, Ch- β -gal and Ch-PEG-FA- β -gal with Ch5, Ch25 and Ch50 kDa in an ALV/CGS-3 Compact Goniometer System for dynamic light scattering fixed at a 90° angle with a wavelength of $\lambda=632.8$ nm. The results indicated the distribution curve and diameter of the nanoparticles in nm [16].

1.d) Zeta potential

Zeta potential allows the measurement of overall surface charge of nanoparticles, which represents a critical factor in their interaction with cellular membranes. This study was performed at 25°C, using a Malvern Zetasizer 4 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) and green disposable cuvettes for the zetasizer and nanoseries.

1.e) Cell preparation for *in vitro* transfection

In this study, we selected KB cells for their unlimited division capacity and overexpression of FR [34]. The cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were inoculated at a density of 14×10^5 cells/well (in 6-well plates) with RPMI medium 1640 containing 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin. The plates were kept in a cell culture incubator under 5% CO₂ at 37°C.

1.f) Cell transfection

In vitro transfection efficiency was undertaken in KB cells incubated in 6-well plates with 600 μ l of Ch nanoparticle complexes (Ch-GFP, Ch-PEG-FA-GFP, Ch- β -gal and Ch-PEG-FA- β -gal) with Ch5, Ch25 and Ch50 kDa. The cells are incubated for 2 hours at 37°C with 1,400 μ l of fresh antibiotic-free RPMI medium 1640, serum, and FA, then examined by optical microscopy.

Positive (cells transfected with LF or DNA) and negative (non-transfected cells) controls were used. Gene expression was detected 48 hours post-transfection [7].

1.g) GFP expression

GFP is composed of 238 amino acids (26.9 kDa), and fluoresces green when exposed to blue light under a fluorescence microscope equipped with an analog camera. In cellular and molecular biology, it is frequently deployed as a reporter of gene expression.

The fluorescence emitted by KB cells showing GFP expression was detected with Photon Technology International at an excitation wavelength of 484 nm and emission of 510 nm.

Each sample was measured 10 times. Numerical results were analyzed by FeliX 1.42.exe.

Photos of cells were taken to complete and confirm the quantitative results [13].

1.h) β -gal expression

The VR1412 gene codes for β -gal, an enzyme that catalyzes the hydrolysis of β -galactosides into monosaccharides.

β -gal activity was measured with Sigma kits (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and compared to total protein (pg β -gal per mg of cellular protein).

Total protein content in the solution was quantified by bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL, USA). In this assay, 2 molecules of bicinchoninic acid chelated a single Cu^{1+} ion, forming a purple water-soluble complex that strongly absorbed light at 562 nm.

The results of β -gal expression were read on 96-well plates by a EL-800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) at a wavelength of 420 nm [33].

1.i) Cell viability

Cytotoxicity (nanoparticle effects on cell viability) was studied by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay, a standard colorimetric assay for measuring the activity of enzymes that reduce yellow MTT to formazan in living cell mitochondria, giving it a purple color. The absorbance of this colored solution can be quantified by measurement with a spectrophotometer at a certain wavelength (usually between 500 and 600 nm). Coloration intensity was proportional to the number of living cells because reduction takes place only when mitochondrial reductase enzymes are active.

Viability was measured with the EL-800 Universal Microplate Reader at 570 nm, in 96-well plates [33].

1.j) Intracellular trafficking, nuclear uptake and localization

KB cells were incubated with Ch25-PEG-FA- β -gal nanoparticle complexes for 2 hours at 37°C, fixed and examined by confocal microscopy. Plasmid DNA was bound with propidium iodide (PI) (red), and stained DNA was purified before nanoparticle synthesis. Endosomes and lysosomes were immunolabeled with anti-early endosome marker, lysosomal-associated membrane protein-1 and fluorescent-labeled anti-mouse antibodies (green). DAPI staining located cell nuclei (blue).

II.2. *In vivo* studies

2.a) Nanoparticle preparations

We used human IL-1Ra as a curing agent, with its secretive variant (sIL-1Ra, 177 aa, NM_173842 X52015, GenBank). We sub-cloned this gene by polymerase chain reaction (PCR) with oligos carrying *Hind*III and *Xba*I sites (IL-1RaH3 CCAAGCTTGAATGGAAATCTGCAGAGGCC, IL-1RaH4 GCTCTAGACTGGGCAGTACTACTCGTCCTCC), employing genomic DNA of macrophages differentiated from the monocyte cell line THP1 stimulated with PMA as PCR DNA template. Then, the PCR product was inserted in the mammalian expression

vector pCDNA3 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) that drives over-expression of the gene with the CMV promoter. To reduce pDNA size, the *PvuII-PvuII* region was deleted. The final plasmid (3.8 kb), including the targeted gene, was verified by DNA sequencing [33].

2.b) AIA rat model

Arthritis was induced in 150 to 200 g female Lewis rats (Charles River, Montreal, QC, Canada). Briefly, on day 1, the rats were anaesthetized with 0.2 ml 0.5% ketamine and 0.5% xylazine hydrochloride. 0.1 mL of complete Freund's adjuvant containing 10 mg/mL of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* suspended in mineral oil (CFA, Difco, Detroit, MI, USA) was then injected intradermally into the right hind foot. Disease developed around 10-45 days after injection and usually occurred in all treated animals, as evidenced by dramatic swelling in the injected paws and progressive swelling in all uninjected paws [33]. All animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal.

2.c) Hydrodynamic injection of nanoparticles

Transfection was performed by the hydrodynamic intravenous injection technique in the right posterior paw, as published previously [38-40]. Nanoparticle solutions were adjusted to physiological osmolarity (pH=7.4) with 18% sterile NaCl just before injection. The injection point was located in the great saphenous vein inside the limb, in the direction of

the knee. A tourniquet was applied above the knee, forcing the solution back into the smaller limb veins and ending up in muscle tissue cells. The 4-ml transfection solution (200 μ g DNA) was injected at a rate of 10 ml/minute, with a Model 940 infusion/withdrawal pump (Harvard Apparatus, Millis, MA, USA). The cuff was kept in place for 1 minute after injection. The eyes were humidified with Liquifilm tear eye drops from Allergan (Markham, ON, Canada).

2.d) Experimental and control groups

A naked DNA group (n=5), a natural Ch-DNA nanoparticle group (n=5) and a Ch-PEG-FA-DNA nanoparticle group (n=5) were injected on day 18 post-AIA induction. A non-treated group (RA) (n=5) served as positive controls. All animals were sacrificed on day 35, and the clinical results were compared among the groups. Measurements of the ankle joints and circumferences were taken with a digital caliper to evaluate inflammation.

2.e) Histological presence of nanoparticles in the soleus muscle

The injection solution's pathway was verified by replacing the expression cassette of IL-1Ra with the transfected β -gal gene carried by the plasmid VR1412. Afterwards, the results were obtained through X-gal staining (blue coloration) and scanning of the muscle histological cross sectional patterns of β -gal protein when expression stained with its corresponding antibody [35].

2.f) Blood samples

7-9 ml of whole rat blood was obtained by heart puncture under anesthesia. Blood sera, separated by centrifugation at 6,000 rpm for 10 minutes at room temperature, were kept separately at -80°C and then used for later assays [33].

2.g) Immunological analysis

Human sIL-1Ra in rats was detected with ELISA DuoSet kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Serum samples were diluted 5-10 times in assay diluent (BioFX, Owings Mills, MD, USA). 100 µl of the diluted samples were added in 96-well plates. No special treatment was necessary for standard series. The rest of the process followed the kit provider's protocol. IL-1β was detected with ELISA kits (R&D Systems), by diluting serum samples 100 times with PBS containing 1% bovine serum albumin. PGE2 a pro-inflammatory factor, was assessed with PGE2 enzyme immunoassay kits from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). This assay is based on competition between PGE2 and a PGE2-acetylcholinesterase conjugate (PGE2 tracer) for a limited amount of PGE2 monoclonal antibody. The sensitivity of these assays was 9 pg/ml [33].

II.3. Statistical analyses

All values were expressed as means \pm standard deviation and analyzed by unpaired Student's t-test and/or 1-way ANOVA with $p \leq 0.05$ considered as a statistically significant difference.

III. Results

III.1. *In vitro* studies

1.a) Nanoparticle characterization

Agarose gel electrophoresis of β -gal (Figure 2-a-2) and GFP (Figure 2-b-2) as well as Ch-DNA and Ch-PEG-FA-DNA nanoparticles with different MW Ch presented dense bands, confirming complex formation (Figure 2-a and b-3, 4, 5, 6, 7, 8).

Particle sizes were found to be in the range of 100 to 300 nm, depending on the plasmid and presence/absence of FA (Figure 3).

Zeta potential remained stable for all nanoparticles with average values around +15 mV.

MTT viability studies revealed low cell toxicity compared to naked DNA and LF (Figure 4).

1.b) *In vitro* transfection efficiency in KB cells

Gene expression was most significant with Ch25-PEG-FA-DNA nanoparticles (Figure 5-a,b,c).

β -gal expression was different among the various groups. Significant differences were observed when the experimental groups (3, 5, 6 and 7) were compared to the negative controls (1) (Figure 5-a).

By comparing the transfection rate using LF with the Ch25-PEG-FA-DNA nanoparticle, we found no significant difference ($p=NS$) between the 2 groups (Figure 5-b-6 and 9).

Figure 5-c illustrates the overall results and greater transfection efficiency of GFP gene expression in KB cells with Ch25-PEG-FA-DNA. The density of fluorescent cells compared to existing $14 \cdot 10^5$ cells in each 6-well plate was an indicator of the transfection rate.

1.c) Intracellular trafficking, nuclear uptake and localization

We localized endosomes and lysosomes stained in green, DNA in red and nuclei in blue of KB cells transfected with Ch25-PEG-FA- β -gal nanoparticles.

VR1412 plasmid bound PI and appeared in red. After nuclei isolation, we observed red coloration, which confirmed that DNA was delivered to cell nuclei to be expressed (Figure 6).

III.2. *In vivo* studies

2.1) Presence of nanoparticles in the soleus muscle

Normal Lewis rats were treated by hydrodynamic intravenous injection wielding 200 µg of β-gal DNA, and X-gal expression was evaluated 3 days post-injection. The results of all experimental groups are shown in Figure 7-A. After hydrodynamic Ch-FA-lacZ injection, staining disclosed the presence of β-gal in muscles of all groups except for the untreated RA group.

A mosaic staining pattern (dark staining) was noted in the soleus muscle (Figure 7-B).

2.2) Macroscopic inflammation

Macroscopic inflammation in AIA rat paws was significantly decreased after treatment with Ch-IL-1Ra or Ch-PEG-FA-IL-1Ra nanoparticles (Figure 8-a). Ankle size was significantly reduced in all treated groups compared to the untreated RA-positive control group ($p \leq 0.05$) (Figure 8- b).

The graph presents changes of absolute ankle size (mm) in AIA rats before and after different treatment at day 18. Inflammation after Ch-PEG-FA-IL-1Ra gene therapy was most significantly reduced in comparison to the AIA untreated controls.

2.3) Human IL-1Ra

Human IL-1Ra concentration in rat sera treated with Ch-IL-1Ra or Ch-PEG-FA-IL-1Ra nanoparticles presented significant differences compared to the negative control group. These results show absolute sIL-1Ra normalization to values of RA group sera (Figure 9). As illustrated in this figure, naked plasmid was more rapidly expressed in greater quantity in serum than Ch and Ch-PEG-FA nanoparticles and remained stable. However, after 28 days, the concentration of sIL-1Ra increased in the Ch-PEG-FA-DNA group over taking concentration values of the other groups. There were no significant differences in IL-1Ra concentration across the 3 injected groups (naked DNA, Ch and Ch-PEG-FA).

2.4) IL-1 β and PGE2 concentration in serum after IL-1Ra treatment

To assess the changes in inflammation after treatment, IL-1 β , a potent immuno-modulator which mediates a wide range of immune and inflammatory responses, was quantified in the sera of rats. A gradual increase of cytokine level was seen in the positive control group (RA), whereas an abrupt decrease of IL-1 β levels occurred after treatment with Naked DNA, Ch-IL-1Ra or Ch-FA-IL-1Ra nanoparticles at day 18, and AIA animals presented a steep elevation of IL-1 β (Figure 10-a).

Heightened PGE2 levels were seen in the positive control group (RA) from day 24 to 35, with a sharp decline after gene therapy with IL-1Ra. Lower PGE2 synthesis was observed in all treated groups compared to the positive controls (Figure 10-b).

IV. Discussion

We have shown that biodegradable cationic polymers such as Ch have the potential for DNA complexation and may be used as non-viral vectors for gene therapy. The first aim of this study was to design and then evaluate Ch nanoparticles with different characteristics.

We also found Ch and Ch nanoparticles to be non-toxic in a range of toxicity tests. We also demonstrated the ability of Ch-DNA and Ch-PEG-FA-DNA complexes to condense and deliver plasmid DNA in human KB cells.

In our study, transfection efficiency depended on Ch's MW, the presence or absence of FA and the nature of the combined gene. Ch25-PEG-FA-DNA showed better GFP and β -gal expression *in vitro*.

The second part of the study involved the intravenous injection of Ch nanoparticles containing the IL-1Ra gene in rats with AIA. By demonstrating the presence of recombinant IL-1Ra protein in rat serum, we validated gene expression *in vivo* and inflammation reduction, as confirmed by macroscopic decreases of limb inflammation and lower IL-1 β and PGE2 serum levels.

IV.1. Nanoparticle characteristics

The first aim of this study was to synthesize and then evaluate different Ch nanoparticles. It revealed that different combinations of MW, the presence or absence of FA and different plasmid DNA sizes can lead to nanoparticles with various diameters and diverse

transfection efficiencies. The efficacy of Ch-based nanovectors was confirmed *in vitro* in KB cells and *in vivo* by hydrodynamic delivery in Lewis rats.

Agarose gel electrophoresis confirmed the strong attachment of DNA to Ch and Ch-PEG-FA. The synthesis of Ch-DNA complexes was facilitated by attraction between free amino groups on the polymer and negatively-charged phosphates found on DNA [32]. Lanes showing no unbound DNA explain the strong attachment of Ch- β -gal, Ch-GFP, Ch-PEG-FA- β -gal and Ch-PEG-FA-GFP complexes. The interaction involved in the complexes was mainly electrostatic [7]. Previous studies suggested that covalent linkage of FA with Ch did not affect electrostatic attachment with DNA. After digestion with chitosanase and lysozyme, intact plasmid DNA was released from Ch [33], suggesting that the synthesis conditions and FA covalent linkage with Ch did not affect the integrity of condensed DNA. Usually, DNA has to maintain its supercoiled circular form for optimal gene expression. Nanoparticle complexes must provide DNA protection from physical, chemical and enzymatic degradation. During the preparation of nanoparticles, there is a risk of damaging supercoiled DNA and converting it to linear or even fragmented DNA [36]. This was not observed in our experiments.

We suggest that the size of 12 different nanoparticles depends on the size of the DNA molecule and the conjugate (PEG-FA) added to promote targeting and internalization on transfection. In the presence of FA attached to Ch through the PEG arm, we expected an increase in nanoparticle size. The MW of Ch did not significantly affect nanoparticle size. Also, zeta potential remained stable around +15 mV for all nanoparticle samples (N:P ratio of 3:1, DDA = 89%), and no impact on size was observed.

The normal distribution of Ch-DNA and Ch-PEG-FA-DNA nanoparticle diameters makes this study unique as very few have elaborated the Gaussian distribution of Ch nanoparticle size [37]. It has been suggested that polydispersity of the Ch used to complex DNA can have an effect on the size of the resulting particle [36].

Two properties are necessary to assure nanoparticle uptake by cells: zeta potential (or surface charge) and size. Previous studies have confirmed that DDA, MW, N:P ratio and pH do not influence complex size [38]. Nanoparticle size is one of the variables for favorable cellular uptake. Nanoparticles of smaller size have the advantage of entering cells more easily by endocytosis or pinocytosis and crossing nuclear-pore complexes, thereby increasing the transfection rate [15]. It has been proposed that for polycation-DNA gene delivery systems to enter cells, a size requirement below 100 nm is necessary [32].

Our team and others have previously demonstrated that a positive surface charge allows electrostatic interaction between negatively-charged cellular membranes and positively-charged nanoparticles [16]. Ch-DNA nanoparticle size was indirectly proportional to the charge ratio (N:P) up to 12 mV, while zeta potential was directly proportional to it (N:P). A fine balance must be achieved between extracellular DNA protection (better with high MW or HMW) versus efficient intracellular unpacking (better with LMW) to obtain high levels of transfection. HMW Ch can be depolymerized by different methods, such as ultrasound, heat, enzymatic hydrolysis and chemical hydrolysis. Depolymerization of Ch by nitrous acid is becoming a favored technique since it is economical, rapid and can be controlled to produce Ch of pre-selected size [38].

In this study, the effect of Ch-DNA and Ch-PEG-FA-DNA nanoparticles on KB cell viability was compared to naked DNA and LF. There was no significant change in cell viability between Ch-treated and untreated KB cells. KB cells incubated with Ch25-PEG-FA- β -gal nanoparticles showed 100% cell viability. Also, 90% to 100% cell viability was observed in cells incubated with Ch25-PEG-FA or Ch50-PEG-FA. All Ch nanoparticle combinations showed much lower cytotoxicity compared to LF.

These results and previous studies confirm that Ch and Ch nanoparticles are non-toxic in a range of toxicity tests, both *in vitro* [32] and in experimental animals [13].

IV.2. *In vitro* transfection efficiency of Ch nanoparticles in KB cells

We compared transfection efficiency to different MW Chs (5, 25 and 50 kDa) and the presence or absence of PEG-FA. Different LMW Chs were used because it was previously demonstrated that DNA can be more easily released from them [39].

The choice of plasmid DNA was based on the evaluation method of gene expression and its corresponding size, either VR1412 (β -gal reporter vector for assaying β -gal activity) or GFP (emitting green fluorescence when expressed). KB cells were mainly chosen because of FR overexpression [34]. The transfection efficiency of Ch nanoparticles has been studied previously in Cos-1 cells, HeLa cells, Hep-G2 cells and 293human embryonic kidney cells [13; 32].

Gene expression was significantly higher with Ch25-PEG-FA-DNA nanoparticles. No significant differences were seen when comparing the rate of transfection with LF (positive control) to Ch25-PEG-FA-DNA nanoparticles.

The transfection efficiency of non-viral vectors may depend on several factors, such as chemical polycation characteristics (DDA, MW, N:P ratio, Ch:DNA ratio and pH), size and composition of complexes, interaction between cells and complexes, and cell type [15]. We have studied the influence of Ch MW while other factors were kept constant (DDA=89, pH=7.4).

It has been demonstrated that gene expression levels are closely related to polymer MW [38]. Binding affinity and complex formation between oppositely-charged macromolecules are strongly dependent on the valence of each molecule, with low valence yielding only weak binding. The reduction in Ch valence at LMW has been shown to decrease its binding affinity for DNA and to increase DNA decomplexation and gene expression [38].

The percentage of transfected cells significantly depends on the type of complexes used and is sensitive to Ch MW. It was suggested that high MW Ch may form very stable complexes, making it hard to express a given gene sequence since they may not be disassembled once inside the cell. On the other hand, at critical LMW, Ch cannot fully condense DNA [38].

The more efficient cell transfection of Ch-DNA complexes compared to naked DNA may be due to a zipper-like association of excess positive charges of the complexes with the negatively-charged cell surface. This interaction may result in adsorptive endocytosis and membrane instability [36].

PEG-FA nanoparticle complexes (Ch25-PEG-FA-DNA) have been shown to facilitate DNA internalization into cells. High-affinity FR binding is retained when FA is covalently linked via its γ -carboxyl group to a foreign molecule. The presence of FR in certain diseases helps to target and deliver DNA to diseased cells while avoiding uptake into

normal cells. It is a highly specific and versatile technique that can be applied to a wide variety of drugs and diseases. It is a good strategy to transfect several cancer cell types (such as ovarian and breast cancers) [40]. Activated macrophages are responsible for the progression of autoimmune diseases such as RA, psoriasis, ulcerative colitis, and lupus [18; 19]. Activated macrophages in RA overexpress membrane FR [18; 41] and represent a potential opportunity for FR-targeted gene therapy. The presence of the FA group seems to help internalization in KB cells, probably through their FR.

To the best of our knowledge, this is the first study to confirm that nanoparticles with Ch25 complexed to FA obtain better transfection efficiency in cells overexpressing FR. Our system should have the potential of being employed as specific cell-targeting systems with cells having high FA occurrence.

IV.3) *In vivo* application of Ch-PEG-FA-DNA nanoparticles in an experimental animal model of RA

RA pathophysiology. RA is characterized by massive infiltration of synovial joints by T cells, macrophages, B cells, neutrophils and other blood-derived cells which cause synovial inflammation (evaluated in this article) associated with progressive cartilage destruction and bone damage, including local bone erosion and generalized osteoporosis [22].

IL-1 β binds to IL-1 receptor I (IL-1RI) and IL-1 receptor II (IL-1RII), which are expressed on many different cell types. IL-1Ra is a molecule with structural and sequence homology to IL-1 β that allows it to bind to its receptors [22].

IL-1Ra, secreted by activated monocytes and macrophages, plays an important anti-inflammatory role [42]. It binds to IL-1R but does not induce any intracellular response [43]. It blocks the in vitro effects of IL-1 β on PGE2 [44]. It has been demonstrated that after an inflammatory stimulus, a rise in IL-1 β concentration under physiological conditions is followed by a strong rise in IL-1Ra concentrations [44].

In RA, a significant correlation is observed between IL-1 β and IL-1Ra levels ($r = 0.77$) [45]. It appears that endogenous IL-1Ra production is dysregulated in comparison to the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . Studies have confirmed that this imbalance is due to excessive IL-1 production and/or insufficient IL-1Ra secretion by cells in the synovium [22].

Less than 5% of IL-1R need to be occupied by IL-1 for the induction of a biological response, and a 10- to 100-fold excess of IL-1Ra is required to achieve 50% inhibition of the IL-1 response [45]. IL-1Ra concentration over IL-1 primarily reflects sIL-1Ra production by the liver as an acute phase protein [44].

Previous immunohistochemistry studies have detected IL-1Ra in rabbit knees injected with Ch-IL-1Ra nanoparticles and explained the inhibitory effect of increased local IL-1Ra production on IL-1 action. These results are in agreement with previous experiments on IL-1Ra gene expression with Ch [13].

Rodent models of RA serve as valuable tools to investigate the underlying mechanisms at all stages of RA [46; 47]. Rodent RA models have been developed in both rats and mice [48; 49]. Other species have also been used, but rodent models are the most common because of cost and homogeneity of the genetic background [50].

β -gal expression after Ch-PEG-FA- β -gal nanoparticles injection in the soleus muscle.

In a pilot study, we observed β -gal expression (reflected by β -gal staining) in the soleus muscle after hydrodynamic injection of naked DNA, Ch- β -gal and Ch-PEG-FA- β -gal nanoparticles. These results suggested that nanoparticles are bigger in size than naked plasmids and that decomplexation of complexes takes longer to deliver free cDNA.

Hydrodynamic gene delivery allows for greater concentration of nanoparticles around cells, indicating a greater potential of capture through endocytosis over time [51-52]. The highly effective delivery of naked plasmid by the hydrodynamic injection technique has already been demonstrated [53-54].

Inflammation evaluation. We evaluated the degree of inflammation, concentration of IL-1 β and PGE2 as well as the synthesis of human sIL-1Ra in RA rat sera after treatment with different nanoparticles.

Macroscopically, hydrodynamic injection of nanoparticles in an AIA rat model induced a significant decrease of inflammation in the rat ankle compared to untreated rats, indicating the efficacy of IL-1Ra gene therapy.

Gene therapy with IL-1Ra seems to give significant and measurable results in terms of decreased inflammation in an AIA rat model. The results show that the RA group treated with Ch25-PEG-FA-IL-1Ra nanoparticles represents what could be considered a clinically significant reduction of inflammation (20%). Other than inflammation, fatigue and pain are common symptoms of human RA [55], but these 2 clinical symptoms were not examined in this study.

Inflammation markers evaluation. The inflammation markers IL-1 β and PGE2 showed a significant decrease in serum levels after the injection of Ch nanoparticles complexed with IL-1Ra gene.

We observed 52% and 37% declines of IL-1 β concentration in the sera of RA groups treated with Ch-PEG-FA-IL-1Ra and Ch-IL-1Ra, respectively.

We also noted a decline of PGE2 levels in the sera of RA groups treated with nanoparticles. A 27% reduction of PGE2 concentration was apparent on the 24th day and 43% on the 35th day after treatment with Ch-PEG-FA-IL-1Ra nanoparticles. In groups treated with Ch-IL-1Ra nanoparticles, only a 4.2% decrease of PGE2 concentration was observed on the 24th day but reached 50% on the 35th day.

sIL-1Ra detection. Human sIL-1Ra protein was detected in rat sera after the injection of different nanoparticles. This protein is hard to detect because it is unstable and able to condense with other macromolecules of serum. However, our results showed high concentration detection (up to 500 pg/mL with Ch25-PEG-FA-IL-1Ra on the 35th day) compared to other studies in which a concentration of 185 pg/mL was considered consistent [56]. This confirms that IL-1Ra bioactivity in sera represents the efficacy of this gene transfer strategy to deliver functional recombinant proteins to the systemic circulation.

Standard ACR evaluation criteria. ACR20 (American College of Rheumatology 20) is the standard measure in which patients must achieve at least individual improvement of 20% to assess treatment effects in RA. Identifying promising therapies is most appropriately done with ACR20 [57]. Surveys undertaken during the development of

ACR20 showed that swollen joint count is the most important measure to evaluate disease activity, and rheumatologists rely heavily on it to decide whether a patient is improved [58].

ACR50 and ACR70 are standard measures to assess treatment effectiveness in RA (at least 50% or 70% improvement respectively) in randomized controlled clinical trials.

Ch-PEG-FA-DNA nanoparticles, a promising approach. Many drugs, such as Anakinra, a recombinant human IL-1Ra, are used nowadays to treat RA patients. In a randomized controlled multicenter trial, Anakinra (100 mg/day) combined with methotrexate produced a 6-month ACR20 response rate of 38%. Other drugs, such as methotrexate and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) antagonists, showed 6-month ACR response rates of 22% and over 50%, respectively [59].

Anakinra is useful and effective in RA, with a subset of patients experiencing substantial clinical and structural improvements.

Recent studies showed that TNF- α has a predominant effect on IL-1 and mainly exacerbates articular inflammation. They suggested that TNF α antagonists may be most appropriate in patients with highly active disease (systemic inflammation), much like Anakinra in patients with limited inflammation (small increases in inflammation markers) [60].

We suggest that this non-viral gene therapy method is effective for IL-1Ra expression *in vivo* with potential clinical applications in human RA. This non-viral gene therapy would allow longer term expression and regulation of the therapeutic gene in RA.

Limitations. The number of groups and the relatively low number of animals per group (n=5) may have decreased the statistical power of our study to detect highly significant differences between groups. Moreover, by allowing maximum inflammation to occur at day 17 before treatment started, lesions such as articular fibrosis, chronic edema and swelling may not have responded significantly to treatment, as observed in the clinical presentation of RA in humans. Finally, although Ch and Ch-PEG-FA are regularly used to form nanoparticles, possible low disassembling rates between the vector and the plasmid, or low expression of FR by macrophages in an AIA rat model [61] could have also limited their efficacy in the present study.

V. Conclusion

We synthesized and then assessed Ch nanoparticles with different characteristics and selected the one best suited for selective transfection efficiency in human KB cells *in vitro*. This study demonstrated the efficacy of a therapeutic approach (after maximum disease progression) with hydrodynamic delivery of plasmid IL-1Ra DNA- and Ch-DNA-based nano-carriers in controlling the progression of inflammation in an AIA rat model. It also demonstrated that Ch-DNA nanoparticles represent a promising method for the direct transfer of therapeutic genes *in vivo*.

VI. Acknowledgements

This study was supported by a grant from The Arthritis Society of Canada and the Canadian Institutes of Health Research partnership program. Christian Jreysaty received excellence prizes such as the J.A. de Sève Award from Sacré-Coeur Hospital in Montreal and the J. Armand Bombardier Award from the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies at the University of Montreal. Dr. Julio C Fernandes is a research scholar of Fonds de la recherche en santé de Québec (FRSQ). Thanks are due to Marie-Christine Taillefer, Ph.D., for correcting this manuscript.

VII. References

- [1] *Xiang G, Keun-Sik K and Dexi L*, “Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next”, *The AAPS Journal*, (2007); 9(1).
- [2] *Porteous DJ, dorin JR, Mclachlan G et al.*, “Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis”, *Gene Therapy* (1997); 4: 210-218.
- [3] *Youjin S and Jun Y*, “The treatment of hemophilia A: from protein replacement to AAV-mediated gene therapy” *Biotechnol lett* (2008).
- [4] *Liu P, Santisteban I, Burroughs LR, Ochs HD et al.*, “Immunologic reconstitution during PEG-ADA therapy in an unusual mosaic ADA deficient patient”, *Clin Immunol.* (2008).
- [5] *Braun S*, “Muscular gene transfer using nonviral vectors”, *Curr Gene Ther.* (2008); 391-405.
- [6] *Ulug P, Vasavda N, Kumar R et al.*, “Hydroxyurea therapy lowers circulating DNA levels in sickle cell anemia”, *Am J Hematol.* (2008); 714-716.
- [7] *Mansouri S., Lavigne P, Corsi K et al.*, “Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2004); 57: 1-8.
- [8] *Marsh M and Helenius A*, “Virus Entry: Open Sesame”, *Cell* (2006); 124: 729-740.
- [9] *Campbell EM and Hope TJ*, “Gene Therapy Progress and Prospects: Viral Trafficking during infection”, *Gene Therapy* (2005); 12: 1353-1359.
- [10] *Oligino TJ, Yao Q, Ghivizzani SC et al.*, “Vector systems for gene transfer to joints”, *Clin. Orthop.* (2000); 379: S17-S30.
- [11] *Niidome T and Huang L*, “Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors”, *Gene Therapy* (2002); 9: 1647-1652.
- [12] *Nishikawa M and Huang L*, “Nonviral Vectors in the New Millenium: Delivery Barriers in Gene Transfer”, *Human Gene Therapy* (2001); 12: 861-870.

- [13] *Zhang XL, Yu C, Dai K et al.*, “Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints *in vitro* and *in vivo*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2006); 341: 202-208.
- [14] *Borchard G*, “Chitosans for gene delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001); 52: 145-150.
- [15] *Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL et al.*, “Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency”, *Journal of controlled release* (2001); 70: 399-421.
- [16] *Fernandes JC, Tiera MJ and Winnik FM*, “DNA-Chitosan Nanoparticles for Gene Therapy: Current Knowledge and Future Trends”, *Nanotechnologies for the Life Sciences*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., (2007).
- [17] *Turk MJ, Breur GJ, Widmer WR et al.*, “Folate-targeted imaging of activated macrophages in rats with adjuvant –induced arthritis”, *Arthritis Rheum* (2002); 46: 1947-1955.
- [18] *Sabharanjak S and Mayor S*, “Folate receptor endocytosis and trafficking”, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2004); 56: 1099-1109.
- [19] *Sudimack J, Lee RJ, et al.*, “Targeted drug delivery via the folate receptor”, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2000); 41: 147-162.
- [20] *Fontana A, Hengartner H, Weber E, et al.*, “Interleukin 1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis”, *Rheumatol Int* (1982); 2: 49-53.
- [21] *The Arthritis Society*, “Rheumatoid Arthritis”, *Arthritis ... Fight it* (2007), www.arthritis.ca, educational grant from Pfizer, last update 1/4/3008.
- [22] *Spohn G, Keller I, Beck M et al.*, “Active immunization with IL-1 displayed on virus-like particles protects from autoimmune arthritis”, *Eur J Immunol.* (2008); 38(3): 877-887.
- [23] *McCoy J, Wicks J and Audoly L*, “The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis”, *J. Clin. Invest.* (2002); 110: 651-658.
- [24] *Mizel SB, Dayer JM, Krane SM et al.*, “Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1)”. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981); 78: 2474-2477.
- [25] *Liao Z, Grimshaw RS and Rosenstreich DL*. “Identification of a specific interleukin 1 inhibitor in the urine of febrile patients”, *J Exp Med* (1984); 159: 126-136.

- [26] Schwab JH, Anderle SK, Brown RR, et al., "Pro- and anti-inflammatory roles of interleukin-1 in recurrence of bacterial cell wall-induced arthritis in rats", *Infect Immun* (1991); 59: 4436-4442.
- [27] Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D, "Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease", *Pathophysiology* (2005); 12: 167-181.
- [28] Mima S, Iwamoto R and Yoshikawa S, "Highly deacetylated chitosan and its properties", *J Appl Polym Sci* (1983); 28: 1909-1907.
- [29] Chul CK, Hoon JJ, Jung CH et al., "Folate receptor-mediated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis", *J Control Release* (2005); 108: 121-131.
- [30] Kiang T, Wen J, Lim HW, Leong KW, "The effect of the degree of Chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection", *Biomaterials* (2004); 25: 5293- 5301.
- [31] Addgene, Molecular Biology Reference, Genetic Code, <http://www.addgene.org/pgvec1>, 2003-2008.
- [32] Corsi K, Yahia L'H, Fernandes JC and al., "Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles", *Biomaterials* (2003); 24: 1255-1264.
- [33] Shi Q, Jreysaty C, Fernandes JC et al. "Bone-protective Effects of Nonviral Gene Therapy With Folate-Chitosan DNA Nanoparticle Containing Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene in Rats With Adjuvant-induced Arthritis", *Molecular Therapy* (2008) vol. 16 no. 7, 1243-1251.
- [34] Reddy JA, Haneline LS, Antony AC et al., "Expression and Functional Characterization of the β -Isoform of the Folate Receptor on CD34+ Cells", *Blood* (1999); 11: 3940- 3948.
- [35] Doh SG, Vahlsing HL, Liang X, Manthorpe M, et al., "Spatial-temporal patterns of gene expression in mouse skeletal muscle after injection of lacZ plasmid DNA", *Gene Ther* (1997); 4: 648-663.
- [36] Bozkir A and Saka OM, "Chitosan-DNA Nanoparticles: Effect on DNA Integrity, Bacterial Transformation and Transfection Efficiency", *Journal of Drug Targeting* (2004); 12: 281-288.
- [37] Jo HG, Min KH, Nam TH et al., "Prolonged antidiabetic effect of zinc-crystallized insulin loaded glycol chitosan nanoparticles in type 1 diabetic rats", *Arch Pharm Res.* (2008); 31(7): 918-23.

- [38] Lavertu M, Méhot S, Buschmann MD et al., “High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of désacétylation”, *Biomaterials* (2006); 27: 4815-4824.
- [39] Turan K and Nagata K, “Chitosan-DNA Nanoparticles: The Effect of Cell Type and Hydrolysis of Chitosan on *In Vitro* DNA Transfection”, *Pharmaceutical Development and Technology* (2006); 11: 503-512.
- [40] Lee D, Lockey R, Mohapatra S, “Folate receptor-mediated cancer cell specific gene delivery using folic acid-conjugated oligochitosans”, *J Nanosci Nanotechnol.* (2006); 6(9-10): 2860-6
- [41] Nakashima-Matsushita N, Homma T, Yu S et al., “Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum* (1999); 42: 1609-1616.
- [42] Gabay C, Porter B, Fantuzzi G et al., “Mouse Il-1 receptor antagonist isoforms: complementary DNA cloning and protein expression of intracellular isoform and tissue distribution of secreted and intracellular IL-1 receptor antagonist *in vivo*”, *J Immunol* (1997); 159:5905-5913.
- [43] Dayer JM, “Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra”, *Clin Exp Rheumatol.*, (2002); 20:14-20.
- [44] Arend WP, “The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease”, *Cytokine Growth Factor Rev.* (2002); 13(4-5): 323-340.
- [45] Sandler C, Lindstedt KA, Joutsiniemi S et al., “Selective activation of mast cells in rheumatoid synovial tissue results in production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-1Ra”, *Inflamm Res.* (2007); 56(6): 230-239.
- [46] Williams RO, “Rodent models of arthritis: relevance for human disease” *Clin Exp Immunol* (1998); 114: 330-332.
- [47] Williams RO, “Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis”, *Methods Mol Med* (2004); 98: 207-216.
- [48] Williams RO, “Models of rheumatoid arthritis”, *Ernst Schering Res Found Workshop* (2005); 89-117.
- [49] Muller-Ladner U and Gay S, “The SCID mouse-a novel experimental model for gene therapy in human rheumatoid arthritis”, *Drugs Today (Barc)* (1999); 35: 379-388.
- [50] Robbins PD, Evans CH and Chernajovsky Y, “Gene therapy for arthritis”, *Gene Ther* (2003); 10: 902-911.

- [51] *Toumi H, Hegge J, Herweijer H et al.*, “Rapid intravascular injection into limb skeletal muscle: a damage assessment study”, *Mol Ther* (2006); 13: 229-236.
- [52] *Herweijer H, Bates MK, Albertini MR, et al.*, “Hydrodynamic limb vein delivery of a xenogeneic DNA cancer vaccine effectively induces antitumor immunity”, *Mol Ther* (2007); 15(2): 422-430.
- [53] *Liu F, Song Y, Liu D*, “Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA”, *Gene Ther* (1999); 6:1258-1266.
- [54] *Zhang G, Budker V, Wolff JA*, “High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA”, *Hum Gene Ther* (1999); 10: 1735-1737.
- [55] *Treharne GJ, Lyons AC, Hale ED et al.*, “Predictors of fatigue over 1 year among people with rheumatoid arthritis”, *Psychol Health Med.* (2008); 13(4): 494-504.
- [56] *Welling TH, Davidson BL, Stanley J et al.*, “Systemic delivery of the Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein using a new strategy of direct adenoviral-mediated gene transfer to skeletal muscle capillary endothelium in the isolated rat hindlimb”, *Human Gene Therapy* (1996); 7: 1795-1802.
- [57] *Albert DA, Huang G, Dubrow G, et al.* “Criteria for improvement in rheumatoid arthritis: alternatives to the American College of Rheumatology 20”, *J Rheumatol* (2004) May; 31(5):856-866.
- [58] *Felson DT*, “Whither the ACR20?”, *J Rheumatol* (2004); 31(5):835-837.
- [59] *Cohen SB, Moreland LW, Cush JJ et al.*, “A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate”, *Ann Rheum Dis* (2004); 63: 1062–1068.
- [60] *Dayer JM*, “Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis?”, *J Rheumatol* (2002); 65: 10-15.
- [61] *Danielsen S, Varum KM, Stokke BT*, “Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: influence of chitosan molecular parameters”, *Biomacromolecules* (2004); 5: 928-936.

VII. Figures

Figure 1

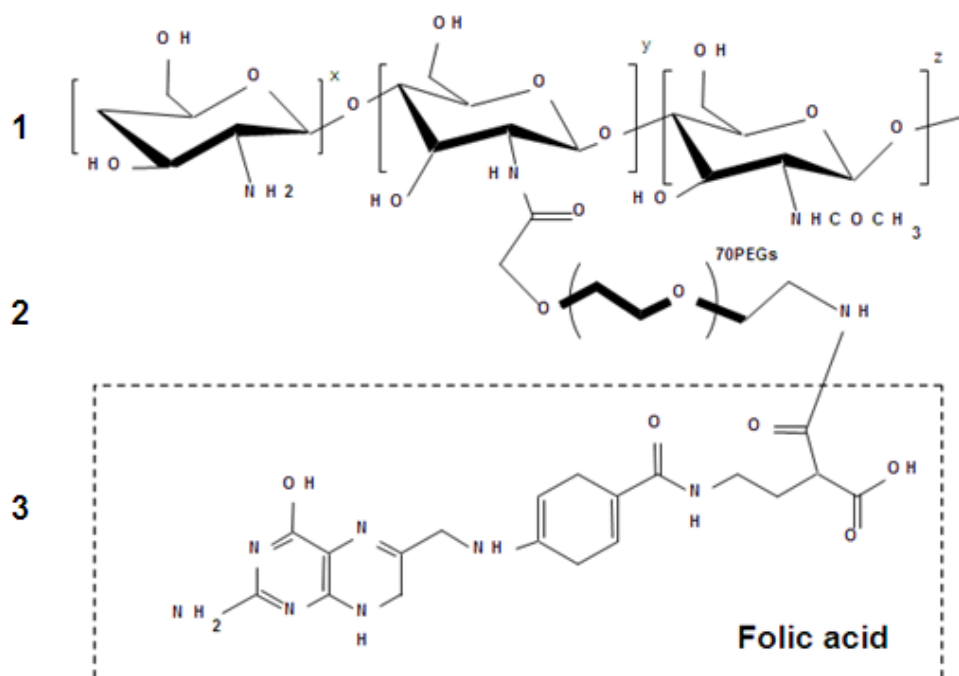


Figure 2

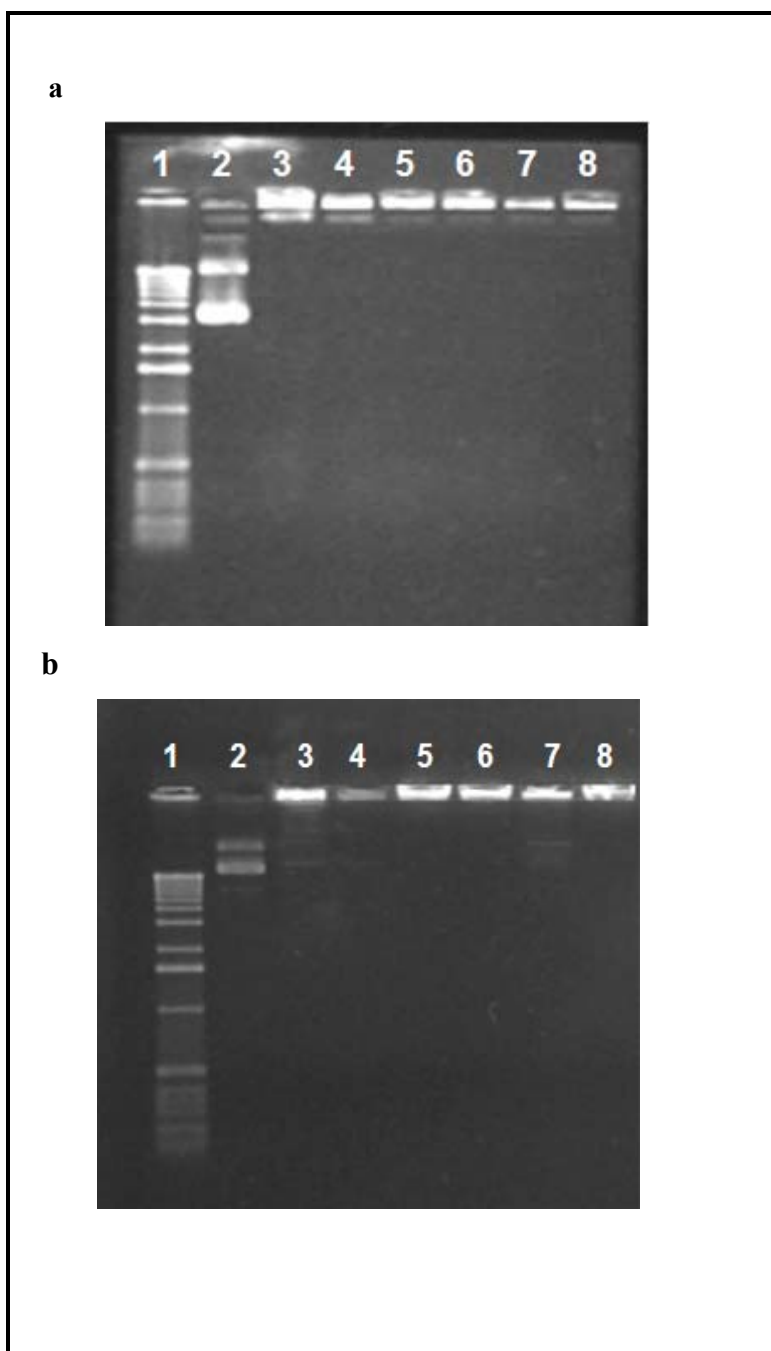


Figure 3

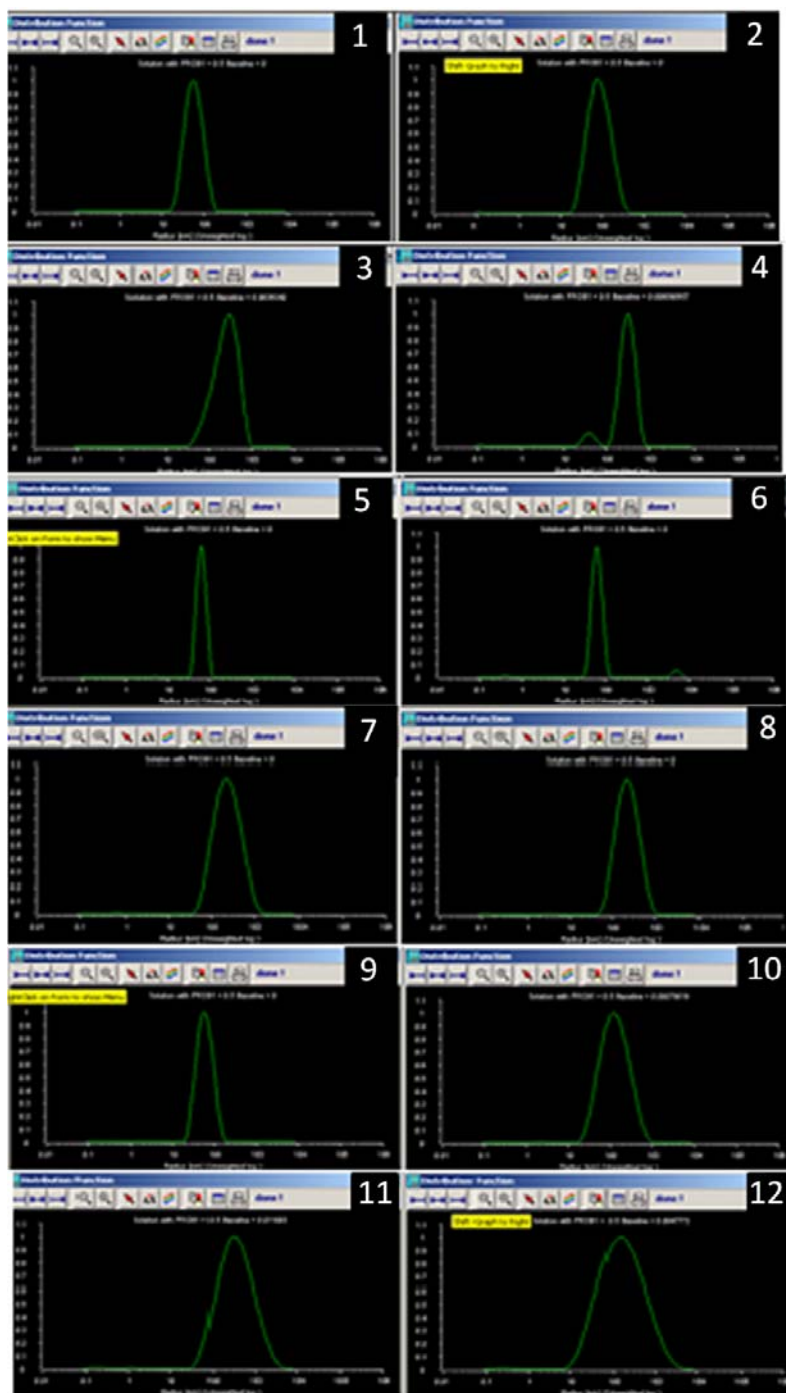


Figure 4

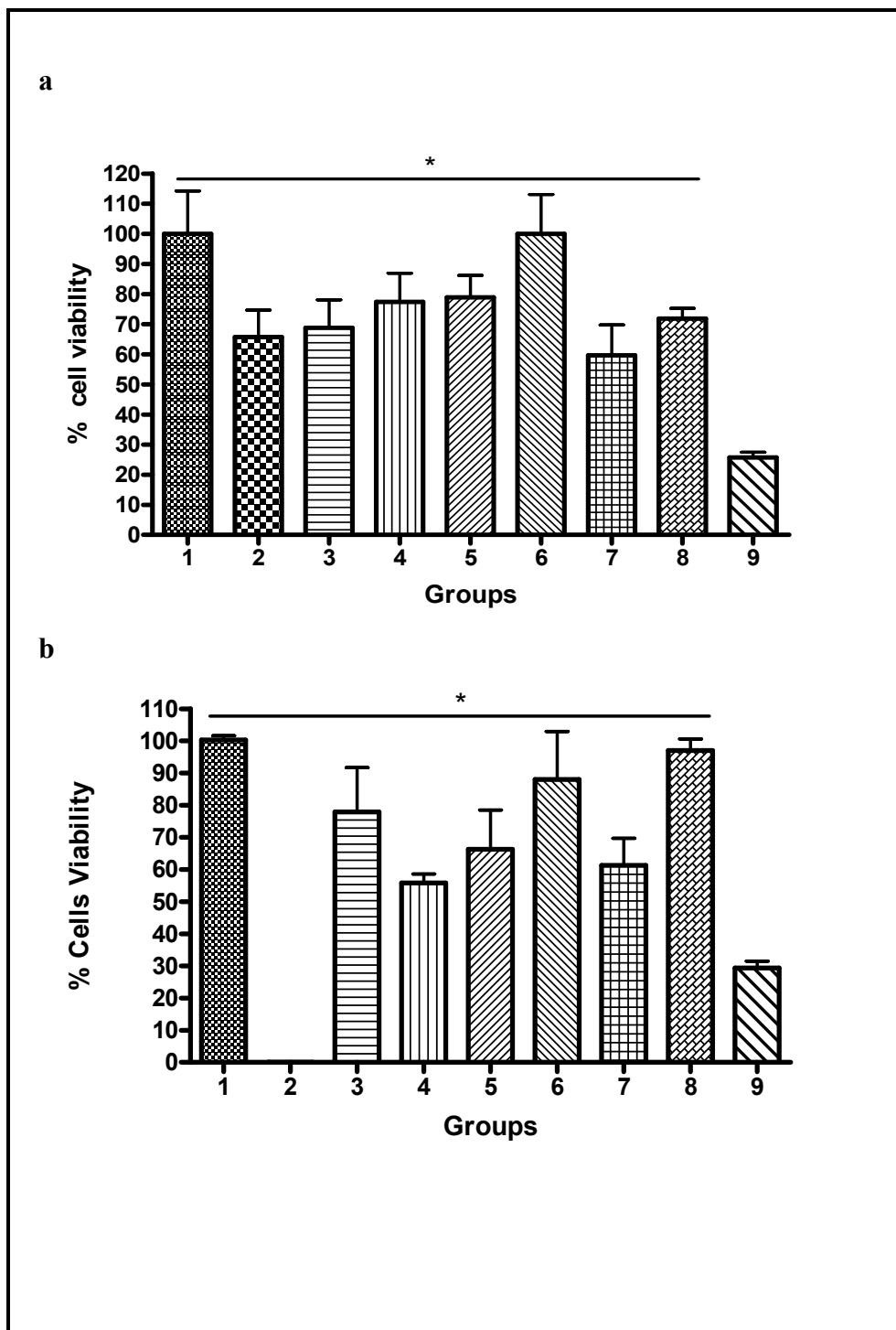
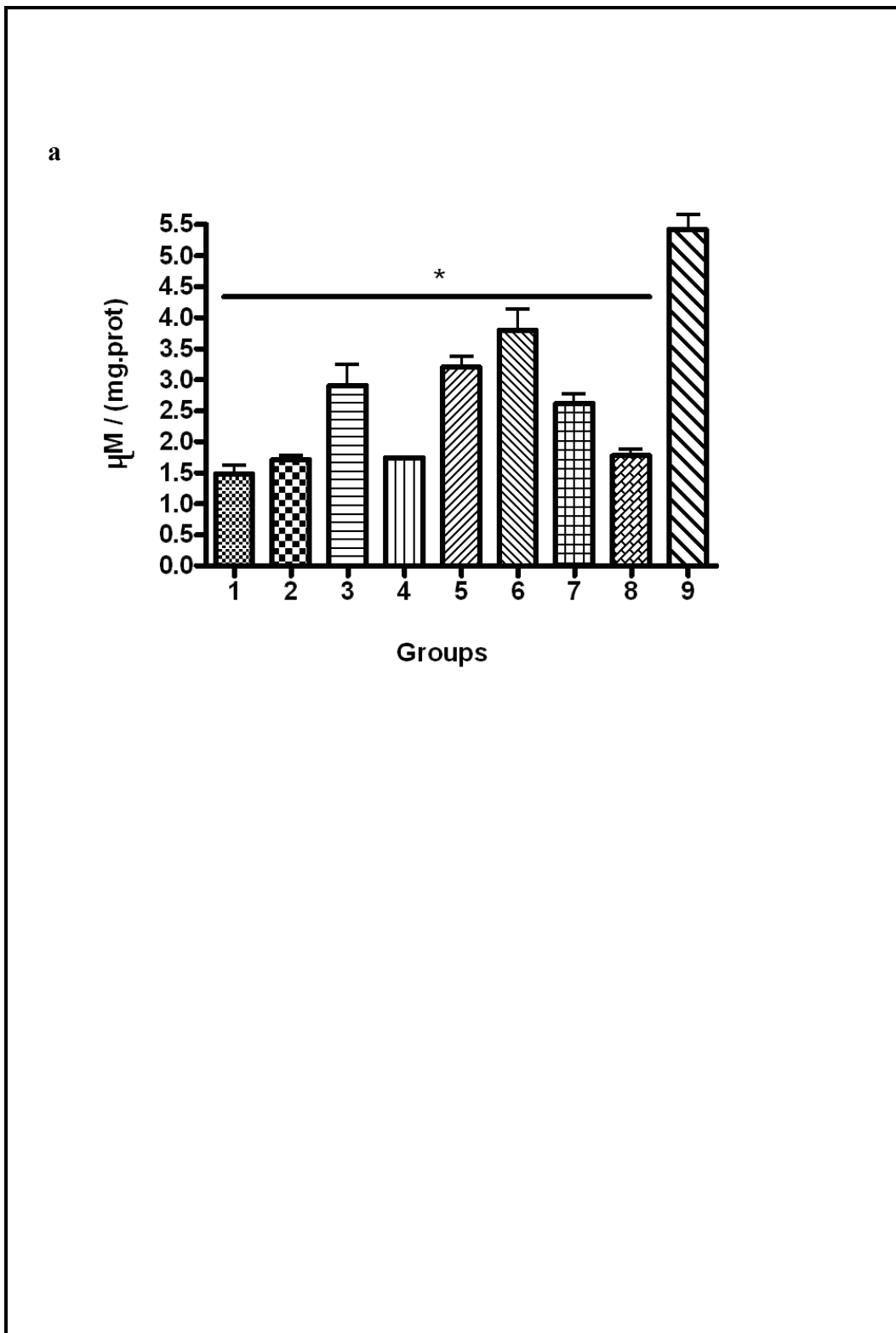


Figure 5



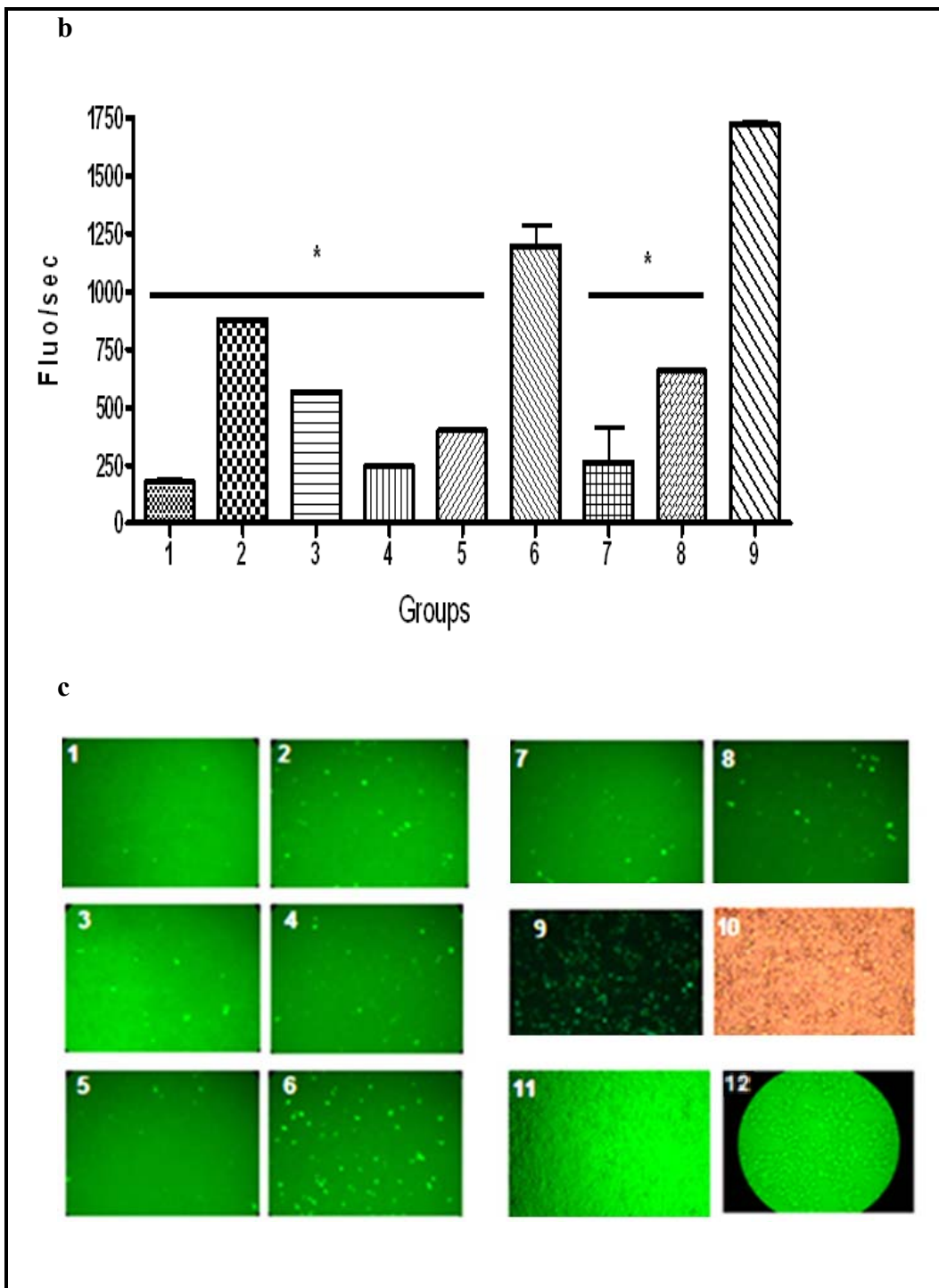


Figure 6

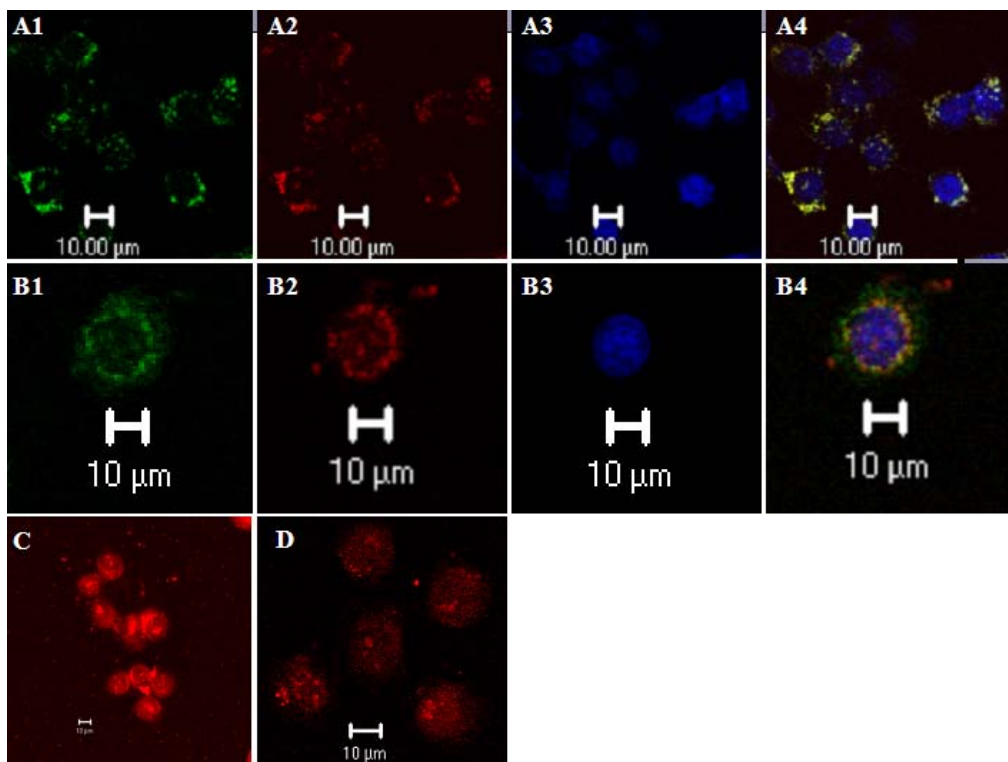


Figure 7

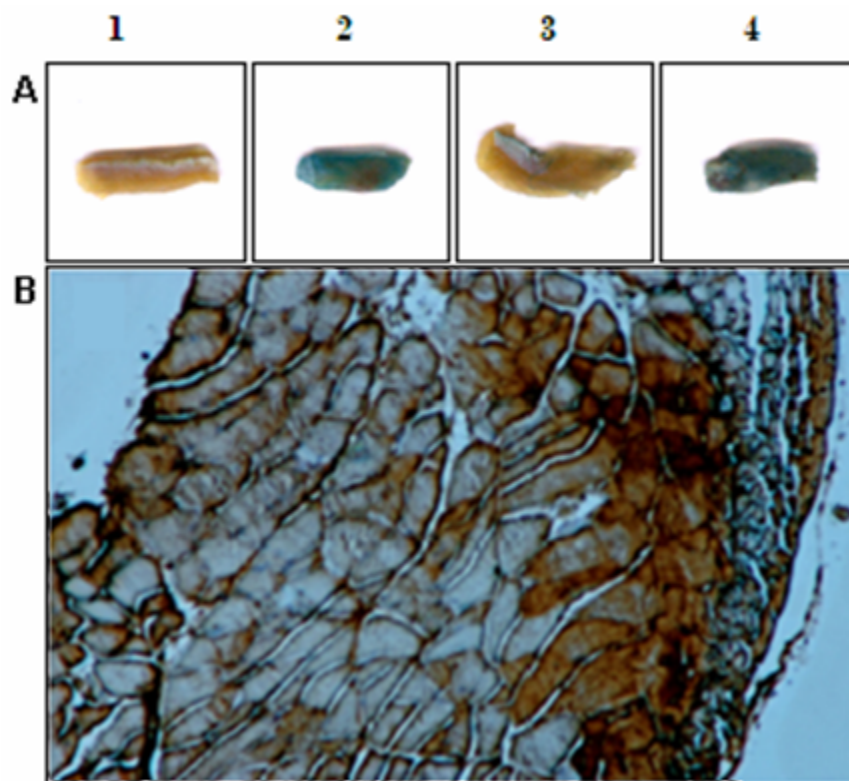


Figure 8

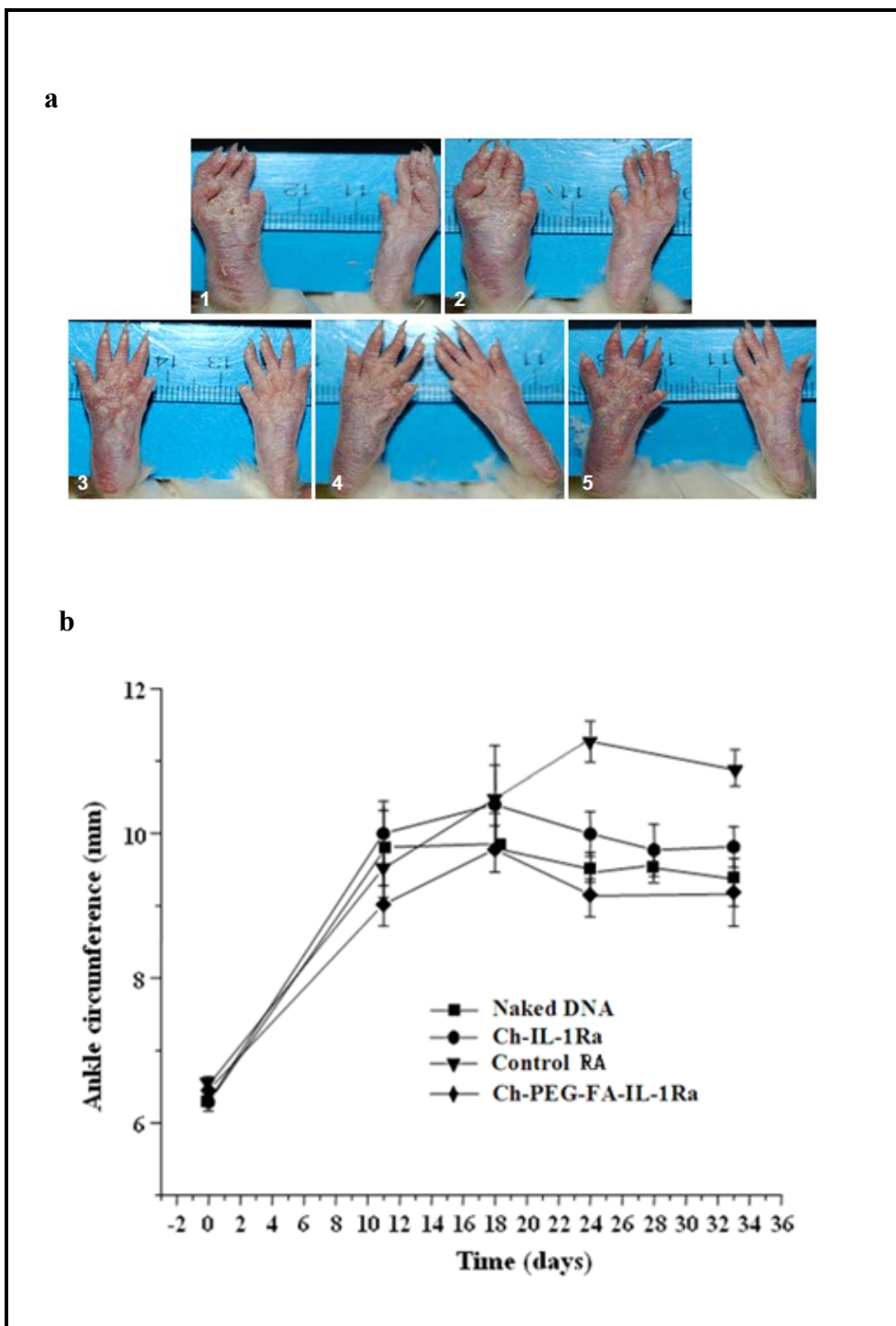


Figure 9

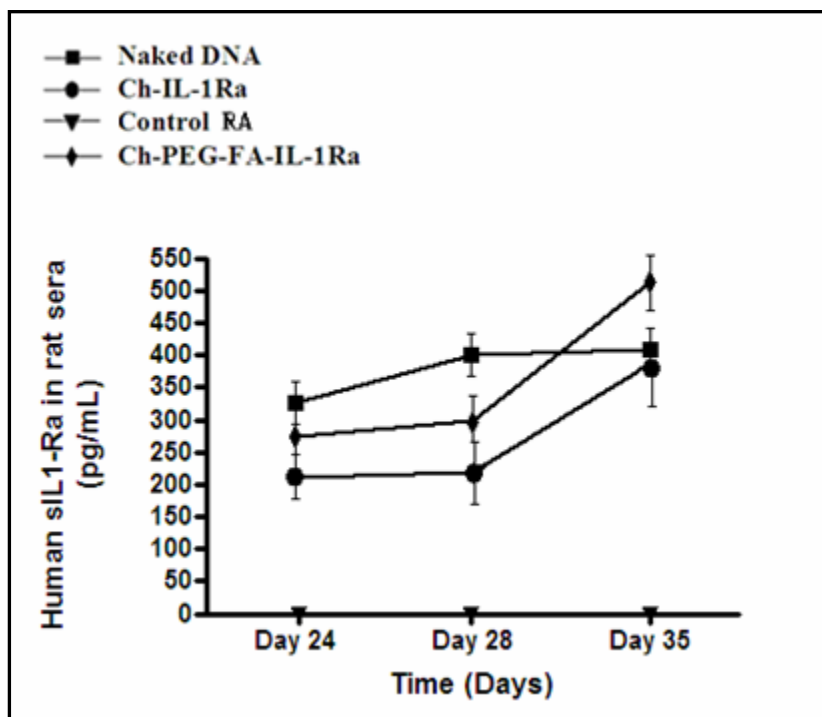
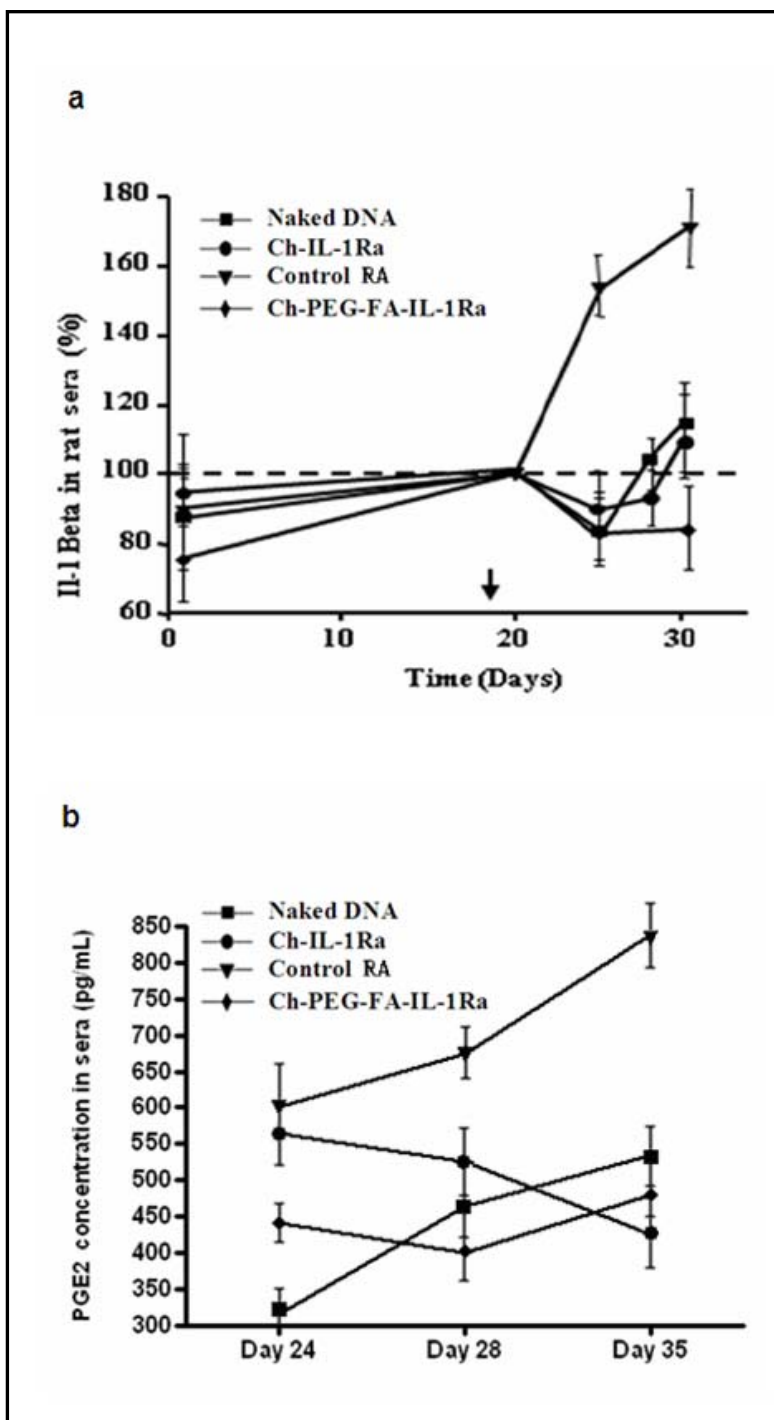


Figure 10



VIII. Figure Legends

Figure 1: Molecular grafted structure of Ch-PEG-FA complex.

(1) Chitosan; **(2)** Polyethylene glycol; **(3)** Folic acid.

Figure 2: Agarose gel electrophoresis. (a) Chitosan nanoparticles with β -gal gene. (b) Chitosan nanoparticles with GFP gene.

Lane 1: Ladder; **lane 2:** Naked DNA; **lane 3:** Ch5-DNA nanoparticle; **lane 4:** Ch5-PEG-FA-DNA nanoparticle; **lane 5:** Ch25-DNA nanoparticle; **lane 6:** Ch25-PEG-FA-DNA nanoparticle; **lane 7:** Ch50-DNA nanoparticle; **lane 8:** Ch50-PEG-FA-DNA nanoparticle.

Figure 3: Normal distribution function of nanoparticle sizes (diameter in nm). (1) Ch5- β -gal: 114.27 ± 20.08 nm; **(2)** Ch5-PEG-FA- β -gal: 150.03 ± 9.76 nm; **(3)** Ch5-GFP: 223.83 ± 11.54 nm; **(4)** Ch5-PEG-FA-GFP: 278 ± 27.22 nm; **(5)** Ch25- β -gal: 127.67 ± 16.21 nm; **(6)** Ch25-PEG-FA- β -gal: 134.84 ± 14.13 nm; **(7)** Ch25-GFP: 151.43 ± 9.35 nm; **(8)** Ch25-PEG-FA-GFP: 204.33 ± 5.91 nm; **(9)** Ch50- β -gal: 111.94 ± 20.75 nm; **(10)** Ch50-PEG-FA- β -gal: 247.34 ± 18.33 nm; **(11)** Ch50-GFP: 160.21 ± 6.82 nm; **(12)** Ch50-PEG-FA-GFP: 302.08 ± 34.13 nm ($p \leq 0.05$, $n=5$).

Figure 4: Cell viability treated with chitosan nanoparticles (a) containing β -gal gene:

(1) Negative control (KB cells); **(2)** Naked DNA; **(3)** Ch5-DNA nanoparticles; **(4)** Ch5-PEG-FA-DNA nanoparticles; **(5)** Ch25-DNA nanoparticles; **(6)** Ch25-PEG-FA-DNA

nanoparticles; (7) Ch50-DNA nanoparticles; (8) Ch50-PEG-FA-DNA nanoparticles; (9) LipofectAMINE™, and (b) **Chitosan non-conjugated with DNA: (1) Negative control; (3) Ch5; (4) Ch5-PEG-FA; (5) Ch25; (6) Ch25-PEG-FA; (7): Ch50; (8) Ch50-PEG-FA; (9) LipofectAMINE™.**

* Statistically significant differences compared to the positive control ($p \leq 0.05$)

Figure 5: Expression of (a) β -gal and (b) GFP in KB cells. (c) KB cells expressing GFP seen with fluorescence microscopy (magnification x10).

Group 1: Negative control (KB cells); **Group 2:** Naked DNA; **Group 3:** Ch5-DNA nanoparticles; **Group 4:** Ch5-PEG-FA-DNA nanoparticles; **Group 5:** Ch25-DNA nanoparticles; **Group 6:** Ch25-PEG-FA-DNA nanoparticles; **Group 7:** Ch50-DNA nanoparticles; **Group 8:** Ch50-PEG-FA-DNA nanoparticles; **Group 9:** Lipofectamine coupled with DNA; **Group 10:** KB cells seen by optical microscopy; **Group 11:** KB cells seen by fluorescence microscopy; **Group 12:** KB cells seen by fluorescence microscopy (x100). *Statistically significant differences compared to the positive controls ($p \leq 0.05$).

Figure 6: Intracellular trafficking in KB cells (confocal microscopy). A1, B1: Endosomes and lysosomes. **A2, B2:** Plasmid DNA. **A3, B3:** Cell nuclei. **A4, B4:** Superposition of different staining for 3-dimensional image reconstruction. **C, D:** isolated nuclei after cell lysis.

Figure 7: Scanned images from the rat soleus muscle stained (A) with X-gal: (1) Soleus muscle of non-treated rat, (2) Rat treated with naked DNA, (3) Rat treated with Ch- β -gal,

and (4) Rat treated with Ch-PEG-FA- β -gal nanoparticles. **(B)** Soleus muscle histological cross-sectional patterns of β -gal protein when expression stained (dark brown staining) with corresponding antibody (peroxidase and its optimal substrate is hydrogen peroxide).

Figure 8: Macroscopic evolution of inflammation in AIA rats measured (mm) before and after treatment on the 18th day. (a) Average degree of inflammation in rheumatoid arthritis-positive control groups compared to (1) non-treated RA rats, (2) rats treated with chitosan alone, (3) rats treated with nude plasmid, (4) Chitosan-IL-1Ra, and (5) Ch-PEG-FA-IL-1Ra nanoparticles. (b) Rat ankle size change (mm) with time. ($p \leq 0.05$, $n=5$)

Figure 9: Human IL-1Ra detection by ELISA. Three rat groups were injected with different delivery systems to express human sIL-1Ra in sera and 1 non-injected group as a negative control. Data=means \pm SD. ($p \leq 0.05$, $n=5$ for each group).

Figure 10: Immunological analysis of (a) IL-1 β concentration in rat sera. The black arrow indicates the day of starting IL-1Ra gene therapy. (b) PGE2 level in rat sera after IL-1Ra treatment. PGE2 levels are significantly decreased in all 3 treatment groups (Naked DNA, Ch-IL-1Ra and Ch-PEG-FA-IL-1Ra nanoparticles) ($p \leq 0.05$, $n=5$).

Chapitre 4 : Discussion

Le premier objectif de l'étude était de créer et évaluer des nanoparticules de chitosane de différentes caractéristiques. Nous avons démontré que le chitosane seul et les nanoparticules de chitosane ne sont pas toxiques. Aussi nous avons une évidence que les nanoparticules Ch-ADN et Ch-PEG-FA-ADN sont capables de se condenser et puis transmettre l'ADN dans les cellules KB humaines.

L'efficacité de transfection de nanoparticules de différentes tailles (échelle nanométrique), dépend du poids moléculaire (PM) du chitosane, de la présence ou de l'absence de FA et du gène ajouté.

Les nanoparticules Ch₂₅-PEG-FA-ADN présentent une meilleure efficacité de transfection de β -gal et GFP *in vitro*.

Le deuxième objectif de l'étude consiste en l'application de la nanoparticule ayant une efficacité de transfection maximale *in vitro* dans un modèle d'arthrite induite par un adjuvant chez le rat en présence du gène de l'IL-1Ra. Dans cette étude *in vivo* nous avons démontré l'expression du gène et présence de la protéine IL-1Ra dans le sérum de rat. Le rôle de l'IL-1Ra a été confirmé, suite à l'amélioration de l'inflammation et la baisse de concentration de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et la PGE₂.

4.1. Etude *in vitro*

4.1.1. Caractéristiques de nanoparticules

a) Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose confirme l'attachement de l'ADN avec le Ch et le Ch-PEG-FA. La synthèse de nanoparticules se fait suite à l'attraction du groupe amine du polymère cationique avec le groupe phosphate de l'ADN chargé négativement [100]. Les bandes sombres et non migrantes expliquent la formation de complexes Ch-GFP, Ch-PEG-FA-GFP, Ch- β -gal et Ch-PEG-FA- β -gal. L'interaction de l'ADN et du chitosane est électrostatique [7] et n'a pas été affectée en présence du FA. Des études précédentes ont montré que suite à une digestion avec la chitosanase et le lysozyme, l'ADN est libéré du complexe tout en restant stable et intact. [101]

En général, l'ADN devrait maintenir sa forme circulaire super-enroulée pour une efficacité de transfection, évitant ainsi de le rendre linéaire ou fragmenté et préservant sa stabilité [102].

b) Taille de nanoparticules

La combinaison de différents PM, l'absence ou présence de FA et différents plasmides permet d'obtenir des nanoparticules de différents diamètres (nm).

Suite aux résultats, nous suggérons que la taille des douze différentes nanoparticules dépend de la taille de la molécule d'ADN et du PEG-FA conjugué. Pour les nanoparticules Ch-PEG-FA on s'attendait à avoir des tailles supérieures comparées à celles des nanoparticules Ch-ADN. Par contre le PM du chitosane n'a pas affecté significativement la taille des nanoparticules. Les mesures de zeta potentiel (charge de la nanoparticule) ont donné une valeur stable de 15 mV pour toutes les nanoparticules avec un ratio N:P= 3:1 et un degré de désacétylation (DDA)= 89% constants. La polydiversité du chitosane a un effet sur la taille du complexe [102].

L'unicité de cette étude repose sur la distribution normale de la taille des nanoparticules de chitosane puisque rares sont les études qui évoquent cette distribution Gaussienne [103].

La taille et le zeta potentiel sont deux facteurs essentiels qui déterminent l'internalisation du complexe. Des études confirment que le DDA, le PM, ratio N:P et PH n'influencent pas la taille du complexe [104].

Les nanoparticules de petites tailles (préférentiellement inférieures à 100 nm [100]) ont l'avantage de pénétrer plus facilement dans les cellules par endocytose ou pinocytose, augmentant ainsi le taux de transfection [57].

Un équilibre doit avoir lieu entre un chitosane de PM élevé pour une protection maximale de l'ADN et un chitosane de faible PM pour une internalisation et puis libération de l'ADN au sein de la cellule. Le chitosane de PM élevé peut être dépolymérisé selon les méthodes utilisées tels que les ultrasons, la chaleur, les hydrolyses enzymatiques et chimiques. La dépolymérisation du chitosane avec l'acide nitrique devient de plus en plus utilisée grâce à son coût abordable, sa rapidité et le pouvoir de contrôler la taille du polymère [104].

c) La cytotoxicité

La viabilité des cellules KB incubées avec du chitosane, nanoparticules Ch-ADN et Ch-PEG-FA-ADN a été comparée à celle des cellules incubées avec la LF. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules KB non incubées et celles incubées avec les solutions de chitosane seules et nanoparticules de chitosane.

Les cellules KB incubées avec les nanoparticules Ch25-PEG-FA- β -gal ont montré une viabilité de 100%. De même, les cellules incubées avec le Ch25-PEG-FA et Ch-50-PEG-FA ont montré qu'elles ont une viabilité variant entre 90 et 100%. En général, les cellules incubées avec les différentes solutions de chitosane (Ch5, Ch25 et Ch50) et différentes nanoparticules de chitosane ont montré une différence significative et des valeurs de cytotoxicité beaucoup plus inférieures que celle de la LF.

Les résultats obtenus dans cette étude reconfirment les hypothèses proposées dans des études précédentes indiquant que les nanoparticules de chitosane sont non toxiques *in vitro* [100 ; 101] et *in vivo* [105].

4.1.2. Efficacité de transfection des nanoparticules de chitosane *in vitro* dans les cellules KB

La relation entre le PM du chitosane, la présence ou absence de FA avec le taux de transfection des cellules KB a été étudiée. Différents faibles PM ont été utilisés (5, 25, 50 kDa) puisqu'il a été déjà prouvé que l'ADN se dissocie plus facilement du chitosane à faible PM [106].

Le choix de plasmides (que se soit la VR1412 codant pour la β -galactosidase ou la GFP émettant une fluorescence verte quand exprimée) a été basé sur la taille et les méthodes d'évaluations et d'identifications fiables et disponibles. Les cellules KB ont été utilisées puisqu'elles sur-expriment les récepteurs FA [66].

Plusieurs études de transfection avec des nanoparticules de chitosane ont été réalisées avec des cellules Cos-1, HeLa, Hep-G2 et autres [105].

a) Effet du poids moléculaire (PM) du chitosane sur l'efficacité de transfection

L'expression génique a été significativement plus élevée avec les nanoparticules Ch25-PEG-FA-DNA. Aucune différence significative n'a été observée en comparant le taux de transfection des nanoparticules Ch25-PEG-FA-ADN avec le contrôle positif LF.

En général, les facteurs qui affectent l'efficacité de transfection sont le PM, le ratio N:P, le DDA, le ratio Chitosane/ADN et le PH. Dans cette étude nous avons ciblé l'influence du PM de chitosane alors que les autres facteurs restent constants.

L'efficacité de transfection avec des vecteurs non viraux dépend aussi de la structure chimique du polycation, la taille et la composition des complexes, l'interaction complexe-cellule et du type cellulaire [57 ; 101].

Dans la littérature, il a été affirmé que le taux de transfection est étroitement lié au PM du polymère utilisé. Il est important de noter qu'avec un PM élevé de chitosane on forme un complexe Chitosane-ADN stable mais difficile à être dissocié, alors qu'avec un faible PM de chitosane, on facilite l'internalisation mais n'ayant pas une bonne condensation Chitosane-ADN dès le départ [104].

Le meilleur taux de transfection de certaines nanoparticules par rapport à l'ADN nu est expliqué par la charge positive des complexes facilitant l'association avec la membrane cellulaire chargée négativement et puis l'internalisation cellulaire [102].

b) Effet de la présence de PEG-FA dans la formulation chimique de nanoparticules sur l'efficacité de transfection

La conjugaison du PEG-FA au chitosane a permis aux nanoparticules (Ch-PEG-FA-ADN) une internalisation de l'ADN dans les cellules, facilitée par le FA se liant aux récepteurs FRs surexprimé dans les cellules KB.

La présence de récepteurs FRs dans certaines maladies facilite un ciblage spécifique des nanoparticules dans les cellules infectées, évitant ainsi les cellules normales. C'est une bonne stratégie pour transférer différents types de cellules cancéreuses (ex. cancer de l'ovaire et du sein) [61]. De même les macrophages actifs **sur-exprimant** les récepteurs FRs sont responsables de la progression de plusieurs maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la colite ulcéreuse, et le lupus [107 ; 108] C'était donc une opportunité de pouvoir acheminer un gène thérapeutique à l'aide de nanoparticules Ch-PEG-FA-ADN, tout en ciblant spécifiquement les FRs.

Compte tenu des études portées à notre connaissance, celle-ci est la première à confirmer que des nanoparticules de chitosane avec un Ch25 et en présence de PEG-FA permettent d'obtenir une meilleure efficacité de transfection dans les cellules surexprimants les FRs. La surexpression des FRs dans les macrophages de l'arthrite rhumatoïde [107 ; 109] a

permis l'élaboration d'une nouvelle partie d'étude consistant à appliquer des nanoparticules de chitosane dans un modèle expérimental de la maladie et d'en évaluer les conséquences.

4.1.3. Limitations

Les plus grandes difficultés auxquelles on a fait face dans cette première partie de l'étude, étaient essentiellement la précipitation rapide lors de la préparation des nanoparticules de chitosane et le volume nécessaire pour effectuer certaines manipulations (tel que la mesure de taille qui nécessite un volume de 1mL pour chaque échantillon de nanoparticules, donc un volume considérable d'ADN à purifier).

4.2. Etude *in vivo*

Dans cette deuxième partie de l'étude, on a évalué le degré d'inflammation et la concentration de marqueurs pro-inflammatoires (IL-1 β et PGE-2) ainsi que la sécrétion de la protéine humaine sIL-1Ra dans le sérum de rats traités avec des nanoparticules de chitosane contenant le gène de l'IL-1Ra.

4.2.1. Mécanismes d'action de l'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est caractérisée par une inflammation de la synoviale des articulations induite par une infiltration de cellules T, macrophages, cellules B,

neutrophiles et autres (évoqués dans l'article) ainsi qu'une destruction progressive du cartilage et une érosion de l'os [101].

Des évidences suite à des études cliniques ont montré que l'IL-1 β et la TNF- α ainsi que d'autres cytokines et médiateurs pro-inflammatoires peuvent induire l'inflammation et la destruction de l'os et du cartilage [110].

L'IL-1 β induit un signal de transduction, activant entre autres les JNk (c-Jun-N-terminal kinase, une des trois grandes familles de MAP kinase). Ceci induit la production de marqueurs inflammatoires tels que les cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-6), les médiateurs enzymatiques (COX-2, l'oxyde nitrique synthase (iNOS), les métalloprotéinases matricielles (MMPs: MMP-3, MMP-13)), et leurs catabolites (NO et PGE2). L'iNOS produit l'oxyde nitrique (NO) qui génère la production de prostglandine-E2 (PGE2) à travers les cyclo-oxygénases (COX) causant entre autres la maladie [86].

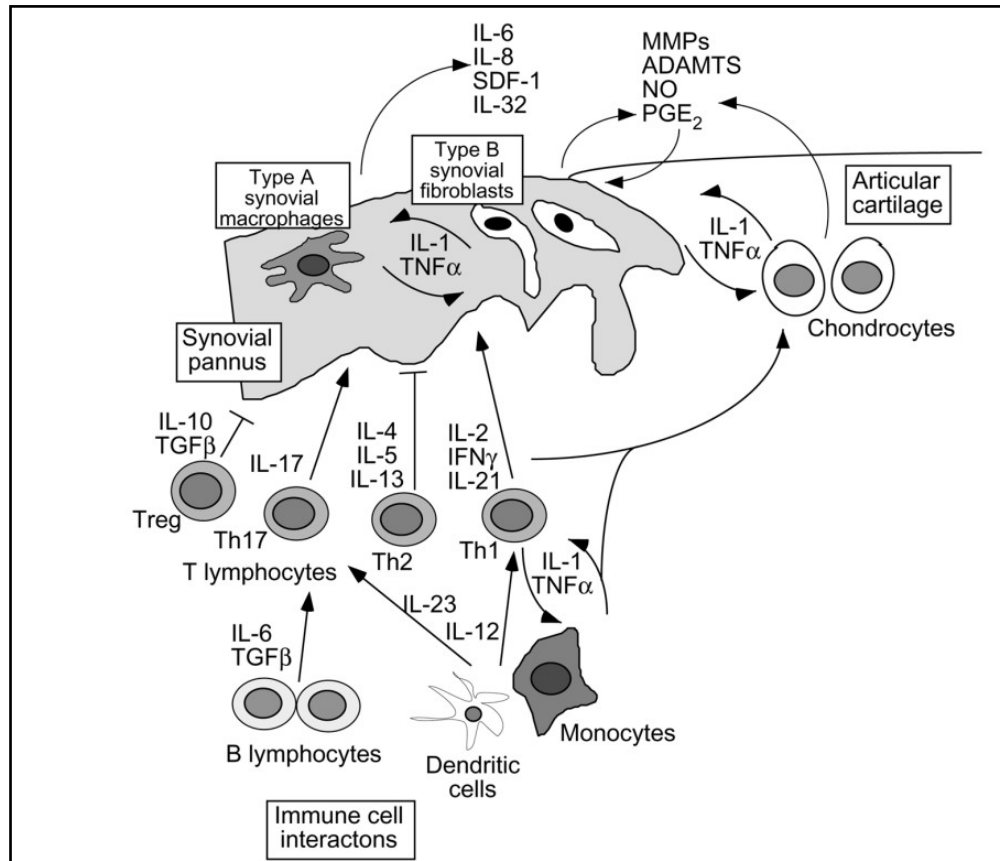


Figure 11: Réseau de cytokines et interactions cellulaires dans la destruction progressive du cartilage associé avec l'inflammation de la synoviale dans le cas d'arthrite rhumatoïde.

[110]

L'IL-1 β se lie au récepteurs IL-1RI et IL-1RII qui s'expriment sur la surface de plusieurs types de cellules. L'IL-1Ra, antagoniste au récepteur de l'IL-1, est une molécule d'une homologie structurale et séquentielle avec l'IL-1 β , lui permettant de se lier aux récepteurs de ce dernier [83].

L'IL-1Ra est secrété par les monocytes et macrophages activés et joue un rôle anti-inflammatoire considérable [111] juste par le fait de se lier aux récepteurs de l'IL-1 sans induire aucune réponse intracellulaire [89].

Dans les conditions physiologiques, une inflammation induit une hausse de la concentration d'IL-1 β qui sera suivie par une forte hausse de la concentration d'IL-1Ra [90].

Dans le cas RA, une corrélation significative a été observée entre les niveaux de l'IL-1 β et ceux de l'IL-1Ra [112]. Il a été prouvé qu'un déséquilibre existait entre la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire IL-1 β et la production d'IL-1Ra. Ceci est dû à la production excessive d'IL-1 β et/ou à l'insuffisante sécrétion de l'IL-1Ra dans la synoviale [83].

Moins que 5% des IL-1 β liés à leurs récepteurs seront suffisants pour induire une réponse biologique, alors qu'un excès d'IL-1Ra, 10 à 100 fois plus élevé, sera nécessaire pour inhiber 50% de la réponse [112].

Des études immuno-histochimique ont démontré que l'IL-1Ra peut être détectée au niveau des articulations de pattes de lapins après une injection de nanoparticules Chitosane-IL-1Ra. De même, les études ont confirmé l'action inhibitoire d'un excès d'IL-1Ra sur l'IL-1 β suite à une expression du gène véhiculé par des nanoparticules de chitosane [105].

Dans des études précédentes, nous avons étudié les effets protecteurs des os suite à un traitement d'un modèle AIA avec des nanoparticules de chitosane contenant le gène de l'IL-1Ra. Différents marqueurs du métabolisme osseux ont été détectés dans le sérum et ostéoblastes de rats, tels que la phosphatase alcaline (ALP), l'ostéocalcine (OC) et la "Tartrate-resistant acid phosphatase" (TRAP).

Il a été prouvé que la formation osseuse est réduite chez le patient malade alors que la résorption osseuse est intensifiée. L'ALP et l'OC sont considérés comme des bio-marqueurs de formation osseuse, alors que la TRAP des bio-marqueurs de résorption osseuse [101].

4.2.2. Choix du modèle animal

Le choix de rat comme modèle animal est basé sur plusieurs critères. Les rongeurs servent de bons modèles pour évaluer les mécanismes d'actions de la maladie dans tous ses stades [73 ; 113]. Des modèles expérimentaux d'arthrite ont été développés chez la souris et le rat [114 ; 115] essentiellement pour leurs coûts abordables et l'homogénéité du code génétique [116].

Le modèle AIA créé par notre équipe est robuste et partage plusieurs caractéristiques avec le cas RA chez les humains, telles que l'inflammation et la résorption osseuse et cartilagineuse [101].

4.2.3. Evaluation de l'inflammation

Au niveau macroscopique, une injection de nanoparticules dans un modèle de rat (AIA) induit une diminution significative de l'inflammation au niveau de la cheville comparée à celles des rats non traités.

Les rats traités avec les nanoparticules Ch25-PEG-FA-IL-1Ra ont montré une réduction cliniquement significative de l'inflammation (20%). Nous avons prouvé alors la capacité

d'acheminer l'IL-1Ra à l'aide du vecteur et par la suite confirmé le rôle protecteur de l'antagoniste envers l'inflammation de l'arthrite rhumatoïde.

Outre l'inflammation, la douleur et la fatigue sont deux symptômes cliniques mais qui ne sont pas évalués dans cette étude. [117]

4.2.4. Evaluation des marqueurs inflammatoires

Une diminution de la concentration de plusieurs marqueurs inflammatoires tels que l'IL-1 β et la PGE2 a été observée dans le sérum de rats suite à une injection de nanoparticules complexées avec le gène de l'IL-1Ra.

Pour les concentrations de l'IL-1 β dans le sérum, nous avons observé une diminution de 52% et de 37% pour les groupes RA traités respectivement avec des nanoparticules Ch25-PEG-FA-IL-1Ra et Ch25-IL-1Ra.

De même, nous avons démontré une diminution de la concentration de PGE2 dans le sérum pour les groupes RA traités. Une diminution de 27% du taux de PGE2 a été observée au 24eme jour et 43% au 35eme jour après traitement avec les nanoparticules Ch25-PEG-FA-IL-1Ra. Dans le groupe traité avec les nanoparticules Ch25-IL-1Ra, une diminution de 4.2% seulement de la concentration de PGE2 a été observée au 24eme jour et atteignant les 50% au 35eme jour après le traitement.

La protéine sIL-1Ra humaine a été détectée dans le sérum de rats après injection des différentes nanoparticules de chitosane. Il est difficile de détecter cette protéine parce qu'elle est instable et capable de se condenser avec d'autres macromolécules du sérum. Toutefois, cette étude a montré une concentration protéique élevée (jusqu'à 500 pg/mL avec les nanoparticules Ch25-PEG-FA-IL-1Ra après 35 jours du traitement) comparée avec d'autres études ou une concentration de 185 pg/mL est considérée comme consistante [118].

Ceci confirme l'efficacité de notre stratégie pour transférer et puis exprimer un gène et induire la bioactivité de la protéine pour une fin thérapeutique.

4.2.5. Mesure standard de l'ACR

ACR 20 (the American College of Rheumatology 20) est la mesure standard (norme de mesure) pour laquelle un patient atteint d'arthrite rhumatoïde doit effectuer une amélioration d'au moins 20%. Aussi, on parle d'ACR50 et ACR70 pour évaluer l'efficacité d'un traitement (50% et 70% d'amélioration respectivement) dans les essais cliniques contrôlés et randomisés (ECR). L'identification des thérapies les plus prometteuses se font avec un ACR20 [119]. Des études durant le développement de l'ACR20 ont montré que l'évaluation de l'articulation enflammée est le moyen le plus fiable pour évaluer l'activité de la maladie. Les rhumatologues en ont toujours recours pour décider si un patient subit une amélioration ou non suite à un traitement quelconque [120].

4.2.6. Nanoparticules Ch-PEG-FA-IL-1Ra, nouvelle approche prometteuse.

Beaucoup de médicaments sont utilisés de nos jours pour traiter les patients atteints d'arthrite rhumatoïde tels que l'Anakinra, un IL-1Ra recombinant.

Dans un essai randomisé multicentrique, l'anakinra (100 mg/j) combiné au méthotrexate a un taux de réponse ACR20 de 38% après 6 mois. D'autres médicaments également utilisés, tels que le méthotrexate et les antagonistes de TNF- α ont montré un taux de réponse ACR de 22% et plus de 50% respectivement, 6 mois après traitement [121]. L'Anakinra est utile et efficace pour les patients RA, montrant des améliorations cliniques. Toutefois, l'Anakinra présente des effets indésirables; les plus courants ont été les réactions secondaires au niveau du site d'injection (érythème, prurit, éruption cutanée), au cours du premier mois de traitement chez 70% des patients [122 ; 123].

Nous proposons que cette méthode de thérapie génique non virale soit efficace pour exprimer l'IL-1Ra et puis améliorer les conditions du patient RA. Avec des taux d'amélioration (ACR) comparatifs à ceux de l'Anakinra, nous considérons cette technique comme étant prometteuse puisqu'elle élimine le besoin d'injections successives du médicament. Cette thérapie génique non virale permettra une expression et une régulation prometteuse du gène thérapeutique à long terme.

Des études ont montré que le TNF- α a un effet prédominant sur l'IL-1 et exacerbe l'inflammation articulaire. Il a été suggéré que les antagonistes de TNF α peuvent être plus appropriés chez les patients dans un stade avancé de la maladie systémique et l'IL-1Ra chez les patients montrant une faible inflammation (et une augmentation limitée des marqueurs

inflammatoires) [124]. De plus, en permettant un maximum d'inflammation au 17^{eme} jour avant traitement, des lésions articulaires peuvent prendre place. Pour cette fin, on considère actuellement une approche prophylactique qui consiste en un traitement avec les nanoparticules de chitosane contenant le gène de l'IL-1Ra au jour 1 après induction de l'arthrite par l'adjuvant. On s'attend à prévenir le développement de la maladie au lieu de la traiter, et à obtenir de meilleurs résultats, tout en ayant recours aux mêmes méthodes expérimentales utilisées.

4.2.7. Limitations

Le faible nombre d'animaux par groupe auront pu diminuer la puissance statistique de l'étude. La possibilité d'une faible dissociation de plasmide et de vecteurs (Ch ou Ch-PEG-FA) ainsi qu'une faible expression des récepteurs FA sur les macrophages dans le modèle AIA créé auront pu limiter l'efficacité de transfection du gène [125].

Chapitre 5 : Conclusion

Alors que la thérapie génique a le potentiel de traiter des maladies humaines, les essais cliniques ont confirmé qu'un vecteur efficace pour une transfection de gène réussie manque toujours. Un polymère cationique biodégradable, non toxique tel que le chitosane a le potentiel de complexer l'ADN et être utile en tant que vecteur non viral pour des applications de thérapies géniques.

Les nanoparticules Ch-ADN et Ch-PEG-FA-ADN ont la capacité de condenser l'ADN et le transférer dans les cellules KB où il sera exprimé. L'efficacité de transfection dépend du poids moléculaire de chitosane, de la présence ou absence d'acide folique et de la nature du plasmide. Les nanoparticules Ch25-PEG-FA-DNA montrent une meilleure expression de GFP et β -gal *in vitro*.

L'application *in vivo* de nanoparticules contenant le gène de l'IL-1Ra dans un modèle d'arthrite induite par un adjuvant chez le rat a démontré l'efficacité de l'approche thérapeutique après une progression maximale de la maladie. Cette méthode a permis l'expression du gène suivi de la synthèse d'IL-1Ra permettant un contrôle de l'inflammation et une diminution significative de la concentration de marqueurs pro-inflammatoires, l'IL-1 β et la PGE-2.

L'utilisation de nanoparticules de chitosane représente une technique prometteuse pour un transfert direct de gènes thérapeutiques. Le but de cette étude est de développer une méthode de thérapie génique non virale pour des applications cliniques pour traiter l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies humaines.

Références

[1] *Wolff JA and Lederberg J*, “An early history of gene transfer and therapy”, *Human Gene Therapy* (1994); 5:469-480.

[2] *Davis BD*, “Prospects for genetic interventions in man”, *Science* (1970); 170: 1279-1283.

[3] *Heard JM, Danos O, Peschanski M*, “Réflexions sur l’avenir de la thérapie génique”, *médecine/sciences* (2000); 16 : 1305-1309.

[4] *Capron A*, *Splicing life: A Report on the Social and Ethical Issues of Genetic Engineering with Human Beings*. Washington, DC: President's Commission for the Study of Ethical Problems in Medicine and Biomedical and Behavioral Research (1982); 95-96.

[5] *Friedmann T*, “A brief history of gene therapy”, *nature genetics* (1990); 2: 93-98.

[6] *The Journal of Gene Medicine*, John Wiley and sons Ltd, <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>, last updated: September 2008

[7] *Mansouri S., Lavigne P, Corsi K et al.*, “Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2004); 57: 1-8.

[8] *Suri SS, Fenniri H, Singh B.*, “Nanotechnology-based drug delivery systems”, *J Occup Med Toxicol.* (2007); 2-16

[9] *Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y et al.*, “Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients”, *FEBS J.* (2008); 257(18): 4448-55.

[10] *Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T et al.*, “IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels”, *Genes and Immunity* (2001); 2: 222-228.

[11] *Contandriopoulos AP, Champagne F, Potvin L et al.*, *Savoir préparer la recherche : La définir, la structurer, la financer*, gaetan morin editeur ltée (2005).

[12] *Gao X, Kim KS and Liu D*, “Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next”, *The AAPS Journal*, (2007); 9(1).

[13] *Choate KA, Khavari PA*, “Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease”, *Hum. Gene Ther.* (1997); 8: 1659-1665.

- [14] *Freeman DJ, Niven RW*, “The influence of sodium glycocholate and other additives on the in vivo transfection of plasmid DNA in the lungs, *Pharm Res.* (1996); 13: 202-209.
- [15] *Lemoine JL, Farley R, Huang L*, “Mechanism of efficient transfection of the nasal airway epithelium by hypotonic shock”, *Gene Ther.* (1998); 5: 1275-1282.
- [16] *Walther W, Stein U, Siegel R et al.*, “Use of the nuclease inhibitor aurintricarboxylic acid (ATA) for improved non-viral intratumoral in vivo gene transfer by jet-injection. *J Gene Med.* (2005); 7: 477-485.
- [17] *Glasspool-Malone J, Malone RW*, “Marked enhancement of direct respiratory tissue transfection by aurintricarboxylic acid”, *Hum Gene Ther.* (1999); 10: 1703-1713.
- [18] *Dobbelstein M*, “Viruses in Therapy – Royal road or dead end?”, *Virus Research* (2003); 92: 219-221.
- [19] *Oligino TJ, Yao Q, Robbins P et al.*, “Vector systems for gene transfer to joints”, *Clin. Orthop.* (2000); 379: S17-S30.
- [20] *Zheng F, Shi XW, Yang GF et al.*, “Chitosan nanoparticle as gene therapy vector via gastrointestinal mucosa administration: Results of an in vitro and in vivo study”, *Life Sciences* (2007); 80: 388-396.
- [21] *Yang NS, Burkholder J, Roberts B et al.*, “In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment”, *Proc Natl Acad Sci USA* (1990); 87: 9568-9572.
- [22] *O'Brien J, Lummis SC*, “An improved method of preparing microcarriers for biolistic transfection. *Brain Res Protoc.* (2002); 10: 12-15.
- [23] *Magin-Lachmann C, Kotzamanis G, D'Aiuto L et al.*, “In vitro and in vivo delivery of intact BAC DNA- comparison of different method”, *J Gene Med.* (2004); 6: 195-209.
- [24] *Sakai M, Nishikawa M, Hashida M, et al.* “Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation”, *Gene Ther.* (2005); 12: 607-616.
- [25] *Durieux AC, Bonnefoy R, Busso T et al.*, “In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle : effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage”, *J Gene Med.* (2004); 6: 809-816.
- [26] *Huber PE, Jenne J, Debus J et al.*, “A comparison of shock wave and sinusoidal-focused ultrasound-induced localized transfection of HeLa cells”, *Ultrasound Med Biol.* (1999); 25: 1451-1457.

- [27] Koch S, Pohl P, Cobet U *et al.*, "Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects", *Ultrasound Med Biol.* (2000); 26: 897-903.
- [28] Zhang G, Gao X, Song YK *et al.*, "Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery", *Gene Ther.* (2004); 11: 675-682.
- [29] Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E, "Naked plasmid DNA transferto the porcine liver using rapid injection with large volume", *Gene Ther.* (2006); 13: 1696-1702.
- [30] Tsouflas G, Takahashi Y, Liu D *et al.*, "Hydrodynamic plasmid DNA gene therapy model in liver transplantation", *J Surg Res* (2006); 135: 242-249.
- [31] Zhang X, Dong X, Sawyer GJ *et al.*, "Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution", *J Gene Med* (2004); 6: 693-703.
- [32] Jiang J, Yamoto E, Myazaki J, "Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression", *Biochem Biophys Res Commun.* (2001); 289: 1088-1092.
- [33] Liu D, Suda T, Gao X, "Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver", *Gene Ther.* (2007); 14: 129-137.
- [34] Suda T, Liu D, "Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications", *Molecular Therapy* (2007); 15: 2063-2069.
- [35] Pedroso de Lima MC, Simoes S, Pires P *et al.*, "Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery : from biophysics to biological applications", *Adv Drug Deliv Rev.* (2001); 47: 277-294.
- [36] Wheeler JJ, Palmer L, Ossanlou M *et al.*, "Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization", *Gene Ther.* (1999); 6(2): 271-281.
- [37] Zelphati O, Felgner PL, Corbeil J, *et al.*, " Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system", *J Biol Chem.* (2001); 276(37): 35103-10.
- [38] Zhang S, Xu Y, Wang B, *et al.*, "Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery", *J Control Release* (2004); 100(2): 165-180.
- [39] Liu F, Huang L, "Development of non-viral vectors for systemic gene delivery", *J Controlled release* (2002); 17: 259-266.
- [40] Farhood H, Sebrina N, Huang L, "The role of dioleoylphosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer", *Biochim Biophys Acta.* (1995); 1235: 296-304.

- [41] *Li S, Tseng WC, Stolz DB et al.* “Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection”, *Gene Ther.* (1999); 6: 585-594.
- [42] *Song LY, Ahkong QF, Rong Q et al.* “Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes”, *Biochim Biophys Acta.* (2002); 1958: 1-13.
- [43] *Huang L, Gao X,* “Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations, *Biochemistry* (1996); 35: 1027-1036.
- [44] *Gy W,* “Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo”, *J Biol Chem* (1988); 263: 14621-14624.
- [45] *Boussif O, Lezoualch MA, Zanta MD et al.,* “A versatile vector for gene and oligonucleotide delivery into cells in culture and in vivo: polyethyleneimine”, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* (1995); 92: 7297-7310.
- [46] *Fischer D, Bieber T, Li Y et al.,* “A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity”, *Pharm Res.* (1999); 16: 1273-1279.
- [47] *Pouton CW, Seymour LW,* “Key issues in non-viral gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2001); 46: 187-203.
- [48] *Mumper RJ, Wang JM, Claspell AP et al.,* “Novel polymeric condensing carriers for gene delivery”, *Proceedings of the international symposium on controlled release bioactive materials* (1995); 22 : 178-179.
- [49] *Fang N, Chan V, Leong KW et al.,* “Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and PH”, *Biomacromolecules* (2001); 2: 1161-1168.
- [50] *Chandy T, Sharma CP,* “Chitosan as a biomaterial”, *Biomat. Art. Cells Art. Org.* (1990); 18: 1-24.
- [51] *Borchard G,* “Chitosans for gene delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001); 52: 145-150.
- [52] *Kjoniksen AL, Iversen C, Nystro B et al.,* “Light Scattering Study of Semidilute Aqueous Systems of Chitosan and Hydrophobically Modified Chitosans”, *Macromolecules* (1998); 31: 8142-8148.
- [53] *No HK, Meyers SP,* “Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams”, *J. Agric. Food Chem.* (1989); 37: 580-583.

- [54] *Kurita K, Sannan T, Iwakura Y*, “Studies on chitin, 4: evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Makromol. Chem.* (1977); 178: 3197-3202.
- [55] *Fernandes JC, Tiera MJ and Winnik FM*, “DNA-Chitosan Nanoparticles for Gene Therapy: Current Knowledge and Future Trends”, *Nanotechnologies for the Life Sciences*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., (2007).
- [56] *Hejazi R, Amiji M*, “Chitosan-based gastrointestinal delivery systems”, *J. Controlled release* (2003); 89: 151-165.
- [57] *Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL et al.*, “Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency”, *Journal of controlled release* (2001); 70: 399-421.
- [58] *Strozzi GP, Mogna L.*, “Quantification of folic acid in human feces after administration of Bifidobacterium probiotic strains”, *J Clin Gastroenterol.* (2008); 42: 179-184.
- [59] PubChem Substance, NCBI, http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=3787&loc=es_rss, PubChem, 2D, compound ID: 6037, last updated: 2008.
- [60] *Sudimack J, Lee RJ, et al.*, “Targeted drug delivery via the folate receptor”, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2000); 41: 147-162.
- [61] *Lee D, Lockey R, Mohapatra S*, “Folate receptor-mediated cancer cell specific gene delivery using folic acid-conjugated oligochitosans”, *J Nanosci Nanotechnol.* (2006); 6(9-10): 2860-6
- [62] *Nakashima-Matsushita N, Homma T, Yu S et al.*, “Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum* (1999); 42: 1609-1616.
- [63] *Turk MJ, Breur GJ., Widmer WR et al.*, “Folate-targeted imaging of activated macrophages in rats with adjuvant –induced arthritis”, *Arthritis Rheum* (2002); 46: 1947-1955.
- [64] *Guo W, Lee RL*, “Receptor-Targeted Gene Delivery Via Folate-Conjugated Polyethylenimine”, *AAPS PharmSci.* (1999); 1(4): 19.
- [65] *Lee RJ, Low PS*, “Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis”, *J Biol Chem.* (1994); 269: 3198-3204.

- [66] Reddy JA, Haneline LS, Antony AC et al., "Expression and Functional Characterization of the β -Isoform of the Folate Receptor on CD34+ Cells", *Blood* (1999); 11: 3940- 3948.
- [67] Dauty E, Remy JS, Zuber G et al., "Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor", *Bioconjug Chem.* (2002); 13: 831-839.
- [68] Tsai LW, Ingenito EP, "Lung Volume Reduction Therapy Using Crosslinked Biopolymers", Aeris Therapeutics Inc., Patent docs (2007)
- [69] Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD, "Orthopedic gene therapy in 2008", *Molecular Therapy* (2009), 17: 231-244.
- [70] *The Arthritis Society*, "Rheumatoid Arthritis", *Arthritis ... Fight it* (2007), www.arthritis.ca, educational grant from Pfizer, last updated: 2008.
- [71] *MedicineNet: we bring doctors to you*, "Rheumatoid Arthritis (RA)", www.medicinenet.com, last updated: 2009.
- [72] Pearson CM, "Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants", *Proc Soc Exp Biol Med.* (1956); 91: 95-101.
- [73] Williams RO, "Rodent models of arthritis: relevance for human disease" *Clin Exp Immunol* (1998); 114: 330-332.
- [74] Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR, "Antigen-Induced arthritis in mice. I. Introduction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* (1977); 20: 841-50.
- [75] Busso N, Peclat V, Van Ness K, et al. "Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice", *J clin Invest* (1998); 102: 41-50.
- [76] Wilder RL, "Streptococcal cell-wall-induced arthritis in rats: an overview", *Int. J tissue React.* (1988); 10(1): 1-5.
- [77] Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP et al., "Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989); 86: 2374-5.
- [78] Trentham DE, Townes AS, Kang AH, "Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis", *J Exp Med* (1977); 146: 875-68.
- [79] Andersson M, Holmdahl R, "Analysis of type II collagen-reactive T cells in the mouse. I. Different regulation of autoreactive vs. non-autoreactive anti-type II collagen T cells in the DBA/1 mouse", *Eur. J. Immunol.* (1990); 20(5): 1061-1066.

- [80] *Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D*, “Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease”, *Pathophysiology* (2005); 12: 167-181.
- [81] *Goodson T, Morgan SL, Carlee JR et al.*, “The energy cost of adjuvant-induced arthritis in rats”, *Arthritis Rheum.* (2003); 48(10): 2979-2982.
- [82] *Cavaillon JM*, “Molecular mediators: Cytokines”, *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2nd Edition, (2005); Vol. 8 Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 431-460.
- [83] *Spohn G, Keller I, Beck M et al.*, “Active immunization with IL-1 displayed on virus-like particles protects from autoimmune arthritis”, *Eur J Immunol.* (2008); 38(3): 877-887.
- [84] *Feldmann M, Maini RN*, “The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis”, *Rheumatology (Oxford)* (1999); 38: 3-7.
- [85] *Szekanecz Z, Kim J, Koch AE et al.*, “Chemokines and chemokines receptors in rheumatoid arthritis”, *Semin. Immunol.* (2003); 15(1): 15-21.
- [86] *Rai MF, Rachakonda PS, Manning K et al.*, “Quantification of cytokines and inflammatory mediators in a three-dimensional model of inflammatory arthritis”, *Cytokine* (2008); 42: 8-17.
- [87] *McCoy J, Wicks J and Audoly L*, “The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis”, *J. Clin. Invest.* (2002); 110: 651-658.
- [88] *Towns M, Bathon J*, “Inhibition of Interleukin-1 as a Strategy for the Treatment of Rheumatoid Arthritis”, The Johns Hopkins arthritis center, <http://www.hopkins-arthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/il1.html>, last updated: 2009.
- [89] *Dayer JM*, “Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra”, *Clin Exp Rheumatol.*, (2002); 20:14-20.
- [90] *Arend WP*, “The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease”, *Cytokine Growth Factor Rev.* (2002); 13(4-5): 323-340.
- [91] *Heumann D, Bas S, Gallay P, et al.*, “Lipopolysaccharide binding protein as a marker of inflammation in synovial fluid of patients with arthritis: correlation with interleukin 6 and C-reactive protein”, *J Rheumatol* (1995); 22(7): 1224-1229.
- [92] *Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al.*, “The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum.* (1988); 31(3): 315-24.

- [93] *Moodley I*, “Review of the cardiovascular safety of COXIBs compared to NSAIDs”, *Cardiovasc J Afr.* (2008); 19(2): 102-7.
- [94] *Zetterström R*, “The discovery that cortisone may effectively ameliorate inflammatory and allergic diseases”, *Acta Paediatr.* (2008); 97(4): 513-7.
- [95] *Kaiser H*, “Corticoids in therapy of rheumatic diseases yesterday, today and tomorrow”, *Z Rheumatol.* (2000); 59(2): 75-85.
- [96] *Liang LS, Salo PT, Hart DA et al.*, “Intra-articular treatment of inflammatory arthritis with microsphere formulations of methotrexate: pharmacokinetics and efficacy determination in antigen-induced arthritic rabbits”, *Inflamm Res.* (2009): DOI 10.1007/s00011-009-0009-7
- [97] *Prokes M*, “Effectiveness of TNF antagonists in routine clinical practice and costs”, *Vnitr Lek.* (2009); 55(1): 45-53.
- [98] *Cohen SB, Moreland LW, Cush JJ et al.*, “A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate”, *Ann Rheum Dis* (2004); 63: 1062–1068.
- [99] *Duncan SF, Merritt MV, Kakinoki R*, “The volar approach to proximal interphalangeal joint arthroplasty”, *Tech Hand Up Extrem Surg.* (2009); 13(1): 47-53.
- [100] *Corsi K, Yahia L'H, Fernandes JC and al.*, “Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles”, *Biomaterials* (2003); 24: 1255-1264.
- [101] *Shi Q, Jreyssaty C, Fernandes JC et al.* “Bone-protective Effects of Nonviral Gene Therapy With Folate–Chitosan DNA Nanoparticle Containing Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene in Rats With Adjuvant-induced Arthritis”, *Molecular Therapy* (2008) vol. 16
- [102] *Bozkir A and Saka OM*, “Chitosan-DNA Nanoparticles: Effect on DNA Integrity, Bacterial Transformation and Transfection Efficiency”, *Journal of Drug Targeting* (2004); 12: 281-288.
- [103] *Jo HG, Min KH, Nam TH et al.*, “Prolonged antidiabetic effect of zinc-crystallized insulin loaded glycol chitosan nanoparticles in type 1 diabetic rats”, *Arch Pharm Res.* (2008); 31(7): 918-23.
- [104] *Lavertu M, Méhot S, Buschmann MD et al.*, “High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of désacétylation”, *Biomaterials* (2006); 27: 4815-4824.

[105] *Zhang XL, Yu C, Dai K et al.*, “Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints *in vitro* and *in vivo*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2006); 341: 202-208.

[106] *Turan K and Nagata K*, “Chitosan-DNA Nanoparticles: The Effect of Cell Type and Hydrolysis of Chitosan on *In Vitro* DNA Transfection”, *Pharmaceutical Development and Technology* (2006); 11: 503-512.

[107] *Sabharanjak S and Mayor S*, “Folate receptor endocytosis and trafficking”, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2004); 56: 1099-1109.

[108] *Sudimack J, Lee RJ, et al.*, “Targeted drug delivery via the folate receptor”, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2000); 41: 147-162.

[109] *Nakashima-Matsushita N, Homma T, Yu S et al.*, “Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis”, *Arthritis Rheum* (1999); 42: 1609-1616.

[110] *Otero M, Goldring MB*, “Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes”, *Arthritis Res Ther.* (2008); 10(1): 401.

[111] *Gabay C, Porter B, Fantuzzi G et al.*, “Mouse Il-1 receptor antagonist isoforms: complementary DNA cloning and protein expression of intracellular isoform and tissue distribution of secreted and intracellular IL-1 receptor antagonist *in vivo*”, *J Immunol* (1997); 159:5905-5913.

[112] *Sandler C, Lindstedt KA, Joutsiniemi S et al.*, “Selective activation of mast cells in rheumatoid synovial tissue results in production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-1Ra”, *Inflamm Res.* (2007); 56(6): 230-239.

[113] *Williams RO*, “Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis”, *Methods Mol Med* (2004); 98: 207-216.

[114] *Williams RO*, “Models of rheumatoid arthritis”, *Ernst Schering Res Found Workshop* (2005); 89-117.

[115] *Muller-Ladner U and Gay S*, “The SCID mouse--a novel experimental model for gene therapy in human rheumatoid arthritis”, *Drugs Today (Barc)* (1999); 35: 379-388.

[116] *Robbins PD, Evans CH and Chernajovsky Y*, “Gene therapy for arthritis”, *Gene Ther* (2003); 10: 902-911.

[117] *Trehanne GJ, Lyons AC, Hale ED et al.*, “Predictors of fatigue over 1 year among people with rheumatoid arthritis”, *Psychol Health Med.* (2008); 13(4): 494-504.

[118] *Welling TH, Davidson BL, Stanley J et al.*, “Systemic delivery of the Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein using a new strategy of direct adenoviral-mediated gene transfer to skeletal muscle capillary endothelium in the isolated rat hindlimb”, *Human Gene Therapy* (1996); 7: 1795-1802.

[119] *Albert DA, Huang G, Dubrow G, et al.* “Criteria for improvement in rheumatoid arthritis: alternatives to the American College of Rheumatology 20”, *J Rheumatol* (2004) May; 31(5):856-866.

[120] *Felson DT*, “Whither the ACR20?”, *J Rheumatol*. (2004); 31(5):835-837.

[121] *Cohen SB, Moreland LW, Cush JJ et al.*, “A multicentre, double blind, randomised, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate”, *Ann Rheum Dis* (2004); 63: 1062–1068.

[122] *Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R et al.* “A recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: a large, international, multicenter, placebo-controlled trial”, *Arthritis Rheum* (2003); 48: 927–934.

[123] *Le Loët X, Nordstrom D, Rodriguez M et al.*, “Safety of Anakinra (Kineret) added to traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy in patients with active rheumatoid arthritis: results of the OMEGA Trial”, *Ann Rheum Dis* (2004); 1:91.

[124] *Dayer JM*, “Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis?”, *J Rheumatol* (2002); 65: 10-15.

[125] *Danielsen S, Varum KM, Stokke BT*, “Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: influence of chitosan molecular parameters”, *Biomacromolecules* (2004); 5: 928-936.