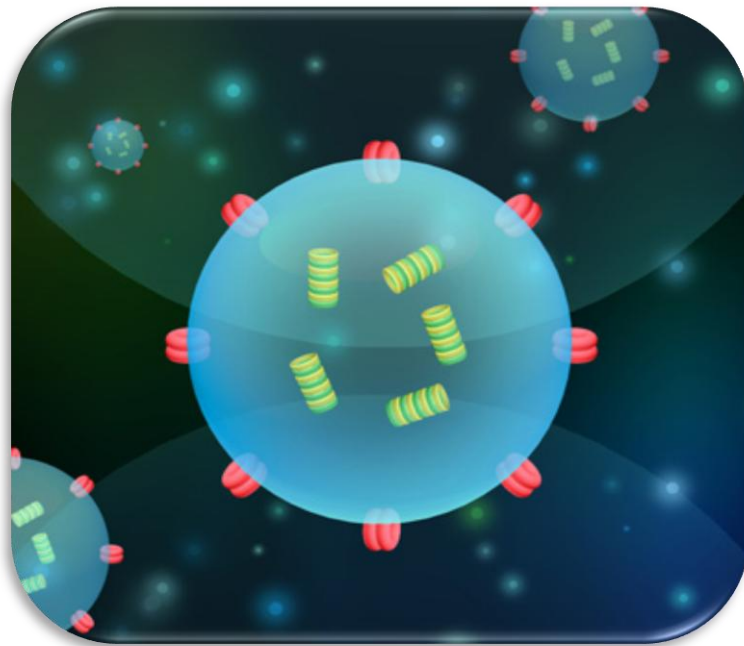


# Utilisation d'exosomes comme bithérapie contre le cancer du colon



MARTINEZ Nancy  
SAITTA Stéphane  
PATACQ Clément

Projet de recherche  
2013-2014

Une solution fortement concentrée en lipides et en enzyme est déposée dans cette cuve. Une pression est ensuite appliquée de sorte à forcer le passage de la solution à travers la membrane. Ce passage entraîne la formation de liposomes chargés en enzyme. Ensuite il faudra fusionner les liposomes avec les exosomes précédemment obtenus en appliquant un champ électrique. Cette technique entraînera une production de vésicules pouvant avoisiner 300 nm de diamètre, ce qui reste raisonnable pour conserver une taille relativement faible des particules.

### ***Optimisation d'un kit pour charger des exosomes***

Si aucune des deux stratégies précédentes ne permet un chargement suffisant des exosomes en HSV-TK, une dernière solution est envisageable. En effet, il existe des kits conçus pour charger des exosomes avec des acides nucléiques. Une stratégie visant à optimiser ce genre de kit pour un chargement avec une enzyme pourrait être utilisée. Le kit **ExoFectin® est souvent utilisé pour charger des acides nucléiques dans des exosomes.** Pour cela, des agents transfectants sont utilisés et un champ électrique d'environ 400mV avec des pulses de 10 à 15 ms sont appliqués. Afin d'adapter ce kit au chargement des exosomes en HSV-TK, il pourrait être possible de s'inspirer de ce protocole en utilisant un agent transfectant pour protéines tel que ProteoJuice™. Ainsi cette stratégie de dernier recours pourrait être envisagée.

Quelle que soit la technique utilisée, il faudra vérifier que les exosomes ont bien été chargés en lysant ces derniers et en réalisant un Western-Blot avec un anticorps anti-HSV-TK.

### **c) Test d'efficacité des exosomes-scFv-Hsv-TK**

A ce stade, les exosomes-scFv sélectionnés par chromatographie d'affinité, ont été chargés avec une forte concentration en HSV-TK par électroporation. Ce test ne sera pas un test pharmacologique car il ne s'agira pas d'étudier la dose minimum d'HSV-TK par cellule nécessaire pour induire la mort cellulaire. Il s'agit ici d'une preuve de concept. Seules les expériences permettront de savoir si les exosomes sont capables d'insérer assez d'HSV-TK pour induire la mort cellulaire après traitement au ganciclovir. Des doses importantes d'exosomes, de l'ordre de 1000 exosomes chargés par cellule cancéreuse seront utilisées.

Le test in vitro, consiste donc à mettre en présence une quantité maximale d'exosomes-scFv-HSV-TK dans le milieu de culture cellulaire pendant 1 heure, puis de laver les cellules avant de les traiter au ganciclovir à forte dose (10µg/mL). Le test est effectué soit sur les cellules cancéreuses, soit sur les cellules saines. Les résultats seront déterminés par un comptage avant et après traitement, soit par cellules de Malassez soit par comptage numérique ou colorimétrique XTT.

En cas d'échec du traitement, plusieurs critères seront modifiés. Le nombre d'exosomes par cellule traitée est le premier critère. Ce nombre ne peut pas dépasser une certaine limite car il doit rester cohérent avec la concentration maximale qu'il est possible d'obtenir dans le sang de la souris après injection.

This is a Google translate of Page 19.

results in the formation of enzyme-loaded liposomes. Then it will merge with liposomes exosomes previously obtained by applying an electric field. This technique will result the production of vesicles that can approach 300 nm in diameter, which is reasonable for keep a relatively small particle size.

#### *Optimizing a kit for loading exosomes*

### ExoFectin® Kit (101Bio, California, USA)

If neither of these strategies allows sufficient charging of exosomes HSV-TK, a final solution is possible. Indeed, there are kits designed to load exosomes with nucleic acids. A strategy to optimize this kind of kit for loading with an enzyme could be used. The kit **ExoFectin**® is often used to load nucleic acids in exosomes. For this, transfecting agents is used and an electric field of about 400mV with 10 to 15 ms pulses are applied. To adapt this kit to load the exosomes with HSV-TK, it might be possible to build on this protocol using a transfecting agent for proteins such as ProteoJuice™. Thus this strategy last resort could be considered.

Whatever the technique used, you should check that exosomes have been loaded lysing them and carrying out a Western blot with an anti-HSV-TK antibody.

#### **c) Effectiveness test exosome-scFv-Hsv-TK**

At this stage, the exosome-scFv selected by affinity chromatography, were charged with a high concentration of HSV-TK by electroporation. This test is not a test Pharmacological because it will not act to study the minimum dose required by HSV-TK cell to induce cell death. This is a proof of concept. Only experiments