## UNIVERSITE DE NANTES FACULTE DE MEDECINE

# Nanovecteurs synthétiques pour la délivrance intracellulaire de macromolécules biologiques

## THESE DE DOCTORAT

#### Ecole doctorale BIOLOGIE-SANTE de NANTES

**Discipline :** Biologie, médecine et santé **Spécialité :** Biologie cellulaire et moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

### Benoît CHATIN

Le lundi 26 novembre 2012, devant le jury ci dessous

Rapporteurs	Pr. Pierre Lehn, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale
	Dr. Marc Chanson, Professeur à l'Université de Genève
Examinateurs	Pr. Patricia Lemarchand, Professeur à l'Université de Nantes
	Dr. Aleksander Edelman, Directeur de recherches à l'Université Paris V
	Dr. Olivier Lambert, Directeur de recherches à l'Université Bordeaux I
Directeur de thèse	Dr. Bruno PITARD, Directeur de Recherche CNRS, Nantes

#### Le doute est père de la création

Galilée

Si tant est qu'on doive le respect aux savants dans un monde sans morale, j'aurais toujours plus de respect pour les enculeurs de mouches que pour les inventeurs de bombes à neutrons

Pierre Desproges

On se lasse de tout, excepté d'apprendre

Virgile

# Sommaire

TABLE DES ILL	USTRATIONS	7
LISTE DES ABR	ÉVIATIONS	9
AVANT PROPC	DS	13
GÉNÉRALITÉS.		16
CHAPITRE 1	- DÉLIVRANCE INTRACELLULAIRE D'ACIDES NUCLÉIQUES	16
CHAPITRE 2	- VECTEURS VIRAUX	
CHAPITRE 3	- VECTEURS SYNTHETIQUES POUR LE TRANSFERT DE GÈNES	20
A. Les	lipides cationiques	
1. S	tructure	21
а	Tête cationique	21
b	Queue hydrophobe	22
2. C	Caractéristiques physicochimiques des complexes lipide cationique/acides nucléiques	23
а	Etat de complexation de l'ADN au sein des lipoplexes	23
b	Stabilité colloïdale des lipoplexes	25
С	Morphologie des lipoplexes	26
3. N	Nécanisme d'action des lipides cationiques	29
а	Attachement à la membrane et internalisation	29
b	Echappement endosomal	32
С	Dissociation du complexe lipide cationique / ADN	35
d	Trafic intracellulaire du plasmide et importation nucléaire	
4. L	es derives lipidiques d'aminoglycosides (DLA)	40
5. T	ransfert d'acides nucléiques in vivo par les lipides cationiques	42
B. Les	polymères	44
1. P	olymères cationiques	44
2. C	opolymères à blocs amphiphiles	45
а	Structure et propriétés	45
b	Mécanisme d'action	48
CHAPITRE 4	- DELIVRANCE INTRACELLULAIRE D'ADN ET IMMUNOTHERAPIE	50
A. Dét	ection intracellulaire de l'ADN exogène	50
1. R	écepteurs conduisant à l'activation de la transcription	
а	TLR9	51
b	ZBP1	52
с	DHX	53
d	RIG-I et ARN polymérase III	53

2.	Récepteurs conduisant à la formation d'un inflammasome	55
а	AIM2	55
B. V	accination à ADN	57
CHAPITRE 5	- DÉLIVRANCE INTRACELLULAIRE DE PROTÉINES	59
A. V	ecteurs pour la délivrance intracellulaire de protéines	60
1.	Méthodes physiques	60
а	Micro-injection	60
b	Electroporation	61
2.	Internalisation spontanée	62
а	Immunotoxines	62
b	Domaines de transduction protéique	65
C	Virus recombinants	68
3.	Vecteurs synthétiques	69
а	Polymères	69
b	Vecteurs lipidiques	72
MATERIELS	ET METHODES	78
1	Linides estimations at collisides - Formulations linidianes	70
1.	Lipides cationiques et colipides – Formulations lipidiques	78 70
2.	Mosure de taille des complexes lipide cationique / proteine	
з. Л	Electronhorèse des complexes lipide cationique/protéine	
4. 5		
5. 6	Délivrance intracellulaire des protéines	80
0. 7.	Quantification de la β-gal internalisée	
8.	Observation de l'histone et des anticorps internalisés	
9.	Crvo-TEM	82
10.	Mesure de flux d'iode par vidéomicroscopie	82
RESULTATS		84
CHAPITRE 1	- DELIVRANCE INTRACELLULAIRE D'ADN PAR DES DERIVES LIPIDIQUES D'AMINOGLYCOSIDES	86
CHAPITRE 2	- ETUDE DU MODE D'ACTION DU COPOLYMÈRE À BLOCS AMPHIPHILE F68	98
CHAPITRE 3	- DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE VACCINATION A ADN DANS UN MODELE D'ASTHME ALLERGIQUE	115
CHAPITRE 4	- DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX VECTEURS POUR LA DÉLIVRANCE INTRACELLULAIRE DE PROTÉINES	129
A. C	riblage d'une librairie de lipides cationiques	130
1.	Lipides cationiques inclus dans le criblage	130
2.	Stratégie de criblage	130
3.	Résultats du criblage de la librairie	132
В. О	ptimisation des lipides cationiques pour la délivrance intracellulaire de protéines	136
1.	Influence de la quantité de protéine du rapport molaire lipide/protéine	136
2.	Influence du colipide	138
3.	Influence du milieu de formulation des complexes lipide cationique/protéine.	139
4.	Influence du sérum	141

	5.		Influence du temps d'incubation des complexes avec les cellules	
	6.		Validation du système sur d'autres types cellulaires	
	7.		Localisation intracellulaire de la protéine délivrée par le BGTC:DOPE	145
	С.	D	élivrance intracellulaire de protéines fonctionnelles à destinée cytosolique	
	1.		Induction de l'apoptose par délivrance intracellulaire de caspase 3	
	2.		Délivrance intracellulaire d'anticorps	150
		а	Délivrance d'un anticorps anti-β-tubuline	151
		b	Délivrance d'un anticorps anti-kératine 8	154
	3.		Délivrance d'une protéine cationique à destinée nucléaire	157
	D.	PI	ropriétés physicochimiques des complexes lipide cationique/protéines	
	1.		Propriétés des complexes BGTC:DOPE/β-gal	161
		а	Complexation de la $\beta$ -gal par le BGTC:DOPE	161
		b	Stabilité colloïdale des complexes BGTC:DOPE/β-gal	162
		с	Morphologie des complexes BGTC:DOPE/β-gal	
	2.		Propriétés des complexes lipide cationique/anticorps	166
	3.		Propriétés du mélange BGTC:DOPE / histone H1	169
		а	Complexation de l'histone H1 par le BGTC:DOPE	169
		b	Stabilité colloïdale du mélange BGTC:DOPE/histone H1	170
		с	Microscopie électronique du mélange BGTC:DOPE/histone	170
	Ε.	Si	gnification du rapport molaire lipide cationique/protéine	172
	F.	Re	estauration de CFTR ΔF508 par vectorisation d'anticorps anti kératine 8	
DISCU	JSSI	ON	ET PERSPECTIVES	180
RÉFÉI	REN	CES	BIBLIOGRAPHIQUES	191
ANNE	EXES			210

# Table des illustrations

Figure 1 – Types de vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique	17
Figure 2 – Structure générale des lipides cationiques	21
Figure 3 – Structures chimiques de lipides cationiques.	23
Figure 4 – Evaluation de la complexation de l'ADN par les lipides cationiques.	25
Figure 5 - Stabilité colloïdale de complexes lipopolyamine/ADN.	26
Figure 6 – Observation en cryo-TEM de complexes lipide cationique/ADN des trois zones de stabilité colloïdale	27
Figure 7 – Représentation schématique des lipoplexes obtenus par l'association d'ADN et de micelles cationiques	27
Figure 8 – Représentation des phases lamellaire et hexagonale inverse	28
Figure 9 – Voies d'entrée dans la cellule par endocytose.	31
Figure 10 – Influence de la géométrie des lipides sur l'échappement endosomal.	33
Figure 11 – Mécanisme d'éponge à protons	34
Figure 12 – Mécanisme de relargage de l'ADN dans le cytosol.	36
Figure 13 - Observations en cryo-TEM de lipoplexes de BGTC:DOPE ou de DOSP:DOPE.	36
Figure 14 – Mécanisme d'importation nucléaire des plasmides.	38
Figure 15 – Bilan des différentes étapes du transfert de gènes par les lipides cationiques.	39
Figure 16 Structure de dérivés lipidiques d'aminoglycosides.	41
Figure 17 – Système multimodulaire pour la délivrance ciblée d'acides nucléiques in vivo.	43
Figure 18 – Structures du PEI linéaire et de la polylysine (	44
Figure 19 – Structure et auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles.	46
Figure 20 – Translocation, activation et voies de signalisation de TLR9.	52
Figure 21 – Reconnaissance de l'ADN exogène par ZBP1	53
Figure 22 – Détection des acides nucléiques par RIG-I.	54
Figure 23 – Formation d'un inflammasome suite à la reconnaissance d'ADNdb par AIM2	55
Figure 24 – Schéma de synthèse des voies de reconnaissance de l'ADN exogène	56
Figure 25 - Voies d'accès au cytosol de différentes AB-toxines.	64
Figure 26 – Mécanisme de délivrance intracellulaire d'une protéine exogène couplée à un PTD	67
Figure 27 – Structure générale des phosphonolipides cationiques	74
Figure 28 – Propriétés physicochimiques de protéines anioniques et de leurs formulations optimales avec la DOGS	75
Figure 29 – Stratégie de criblage de la librairie de lipides cationiques.	. 131
Figure 30 - Stabilité de la β-gal à 37°C en fonction du milieu	. 131
Figure 31 - Cinétique d'internalisation de la β-gal par le BGTC:DOPE	. 132
Figure 32 - Délivrance intracellulaire de β-gal dans les cellules HeLa par les dérivés lipidiques d'aminoglycosides	. 134
Figure 33 – Influence de la quantité de protéine et du rapport molaire sur l'efficacité et la toxicité du BGTC:DOPE	. 136
Figure 34 – Influences respectives du lipide cationique et de la protéine délivrée dans la toxicité induite par les complexes.	. 137
Figure 35 – Influence de l'ajout d'un colipide sur l'efficacité de délivrance de la β-gal	. 139
Figure 36 – Influence du milieu de formulation de complexes BGTC:DOPE/ β-gal sur le taux d'internalisation de la protéine.	. 140
Figure 37 – Influence de la présence de sérum sur l'efficacité d'internalisation de la β-gal par le BGTC:DOPE	. 141
Figure 38 – Cinétique d'internalisation de la β-gal et comparaison avec la transfection d'un plasmide pCMV- β-gal	. 143
Figure 39 – Evolution du taux de protéines totales après délivrance de la β-gal.	. 144
Figure 40 – Délivrance de la β-gal dans différents types cellulaires	. 145
Figure 41 – Localisation intracellulaire de la β-gal délivrée aux cellules HeLa par le BGTC:DOPE	. 146
Figure 42 – Evolution du pourcentage de cellules positives à la β-gal en fonction du temps	. 147
Figure 43 – Induction de l'apoptose dans les cellules HeLa par délivrance intracellulaire de caspase 3 active	. 149

Figure 44 – Observation de cellules HeLa incubées avec des complexes BGTC:DOPE/anticorps anti-β-tubuline	151
Figure 45 - Observation de cellules HeLa incubées avec des complexes BGTC:DOPE/anticorps anti-β-tubuline	152
Figure 46 – Structure du MM27	153
Figure 47 - Délivrance d'un anticorps anti-β-tubuline par le BGTC:MM27	154
Figure 48 – Délivrance d'un anticorps anti-K8 dans les cellules HeLa.	156
Figure 49 – Efficacité de délivrance de l'anticorps anti-K8	157
Figure 50 – Délivrance d'histone H1 par le BGTC :DOPE	159
Figure 51 - Délivrance d'histone H1 par la DOSP dans des cellules Hela	160
Figure 52 – Mesure de la complexation de la $\beta$ -gal par le BGTC:DOPE par PAGE.	162
Figure 53 – Stabilité colloïdale des complexes BGTC:DOPE/β-gal	162
Figure 54 – Observation en cryo-TEM de liposomes de BGTC:DOPE non complexés	
Figure 55 – Observation en cryo-TEM de complexes BGTC:DOPE/ β-gal	165
Figure 56 - Observation en cryo-TEM de complexes BGTC:DOPE/anticorps anti-K8	166
Figure 57 – Observation en cryo-TEM de complexes BGTC:DOPE/anticorps anti-β-tubuline	167
Figure 58 - Observation en cryo-TEM de DOSP:MM27	168
Figure 59 – Electrophorèse d'un mélange BGTC:DOPE/histone H1	170
Figure 60 - Stabilité colloïdale d'une solution de BGTC:DOPE et d'histone H1	170
Figure 61 - Observation en cryo-TEM d'un mélange de BGTC:DOPE et d'histone H1	171
Figure 62 – Relation entre le rapport optimal BGTC/protéine et les propriétes des protéines	173
Figure 63 – Mesure de flux d'iode dans des cellules traitées par l'anticorps.	176

# Liste des abréviations

AAV	Adeno associated virus
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFP	Alpha-foetoprotéine
AIM2	Absent in myeloma 2
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ASC	apoptosis-related speck-like protein
ASPGR	Asialoglycoprotein receptor
Bax	Bcl-2 associated Xprotein
BCA	Bicinchoninic acid
BET	Bromure d'éthidium
BGTC	Bis-guanidinium-tren-cholesterol
Blys	B-lymphocyte stimulator
BSA	Bovine serum albumine
c-fos	Cellular Finkel-Jinkins-Biskis osteosacroma virus-like oncogene
CFTR	Cyctic fibrosis transmembrane conductance regulator
CMC	Concentration micellaire critique
CMT	Température micellaire critique
CMV	Cytomégalovirus
с-Мус	Chromosomal myelocytomatosis virus-like oncogene
CPP	Cell penetrating peptide
cptAMPc	8-(4-chlorophenylthio)adénosine 3'-5' cyclique
Cryo-TEM	Cryogenic transmission electron microscopy
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
DC-Chol	Diéthylaminoéthane-carbamoyl-cholestérol
DDS	2-déoxystreptamine
DFF	DNA fragmentation factor
DHX	(DExD/H) box helicase
DLA	Dérivés lipidiques d'aminoglycosides

DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DODAPL	Dioctadélylaminopropylamine-lysine
DOGS	Dioctadecylamidoglycylspermine
DOPE	Dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine
DOSCP	Dioléoyl-succinyl-caproyl-paromomycine
DOSK	Dioleoyl-succinyl-kanamycine
DOSLP	Dioléoyl-succinyl-lysyl-paromomycine
DOSN	Dioléoyl-succinyl-neomycine
DOSP	Dioléoyl-succinyl-paromomycine
DOSPA	Dioléoyl-sperminecarboxamidoéthyl-diméthylpropanammonium
DOST	Dioléoyl-succinyl-tobramycine
DOTAP	Dioléoyl-trimethylammoniumpropane
DOTMA	Di-O-octadecenyl-trimethylammoniumpropane
eEF2	Eukaryotic elongation factor 2
EPO	Erythropoïétine
FDA	Food and drug administration
GAG	Glycosaminoglycane
GFP	Green fluorescent protein
HA	Hémagglutinine
HEPES	Acide hydroxyéthyl-pipérazine-éthanesulfonique
HLB	Hydrophilic/lipophilic balance
HPV	Human papillomavirus
HRP	Horse radish peroxidase
HSA	Human serum albumin
HSV-TK	Herpes simplex virus thymidine kinase
HTLV-1	Human T-cell lymphotropic virus 1
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
lgG	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ll-2	Interleukine-2
inh172	5-[(4-Carboxyphényl)méthylène]-2-thioxo-3-[(3-trifluorométhyl)phényl-
	4-thiazolidinone
iPLA2	Phospholipase A2 calcium-indépendante
IPS-1	Interferon β promoter stimulator
iPSc	Induced pluripotent stem cells

IRF7	Interferon regulatory factor 7
K18	Cytokératine 18
K8	Cytokératine 8
КС	Kanamycine-cholestérol
KCC	Kanamycine-caproyl-cholestérol
KLC	Kanamycine-lysyl-cholestérol
Klf-4	Krüppel-like factor 4
LTR	Long terminal repeat
MEQ	lodure de 6-méthoxy-N-éthylquinolinium
MTT	Bromure de (3-(4,5- <u>Diméthylthiazol</u> -2-yl)-2,5-di <u>phényl</u> tétrazolium
MW	Molecular weight
MyD88	Myeloid differenciation primary response gene 88
NBD1	Nucleotide binding domain 1
NC	Néomycine-cholestérol
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
ΝϜκΒ	Nuclear Factor $\kappa$ -light chain enhancer of activated B cells
NPC	Nuclear pore complex
Oct-3/4	Octamer binding transcription factor 3/4
ODN	Oligodésoxynucléotide
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Paromomycine-cholestérol
pCMV	Promoteur du cytomélagovirus humain
PCSD	Dioléoyl-caproyl-succinyl-paromomycine
PDX	Paromomycine-dexaméthasone
PEG	Polyéthylène-glycol
PEI	Polyéthylèneimine
PEO	Polyéthylène-oxyde
PKA	Protéine kinase AMPc dépendante
PKC	Protéine kinase C
PKI	cAMP-dependant protein kinase inhibitor
PLL-	Poly-lysine
PLSD	Dioléoyl-lysyl-succinyl-paromomycine
PPO	Polypropylène-oxyde
PRR	Pattern recognition receptor

PTD	Protein transduction domain
PVP	Polyvinyl-pyrrolidone
QD	Quantum dot
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RACKS	Receptors for activated C-kinase
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RIP	Receptor interacting protein
RM	Rapport molaire lipide cationique/protéine
Saint-2	Chlorure de méthyl-dioléoyl-méthylpyrimidinium
SAXS	Small angle X-ray scattering
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
Sod-1	Superoxyde-dismutase 1
Sox-2	Sex determining region Y box 2
SV40	Simian Virus 40
TAT	Transcription transactivating protein
TBK1	Tank binding kinase 1
ТСС	Tobramycine-caproyl-cholestérol
TGKC	Tri-guanidinium-kanamycine-cholestérol
TGN	Trans Golgi network
TLC	Tobramycine-lysyl-cholestérol
TLR	Toll-like receptor
TLR	Toll-like receptor
TMC	Triméthylchitosan
TNF	Tumor necrosis factor
TO-PRO-3	lodure de 4-[3-(3-méthyl-2(3H)-benzothiazolylidène)-1-propényl]-1-[3-
	(triméthylammonio)propyl] quinolinium
U.A.	Unités arbitraires
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β-D-galactopyranoside
ZBP1	Z-DNA binding protein 1
α-gal	alpha-galactosidase
β-gal	Bêta-galactosidase

## **Avant propos**

La majorité des molécules utilisées aujourd'hui en médecine humaine ou vétérinaire sont issues de la synthèse chimique, qu'elles soient inspirées de composés naturels ou créées de novo. Parallèlement à cette approche classique qui peut être qualifiée de "chimiothérapie" au sens large, un domaine basé sur l'utilisation de molécules directement issues du vivant est en plein essor : les biothérapies. Ces biothérapies sont notamment basées sur la délivrance intracellulaire de macromolécules, qui constitue aujourd'hui un domaine de recherche particulièrement actif et dynamique. Sous cette appellation se retrouvent des techniques très variées, utilisant aussi bien des vecteurs synthétiques que dérivés du vivant ou des méthodes physiques, visant toutes le même but : introduire au sein de cellules vivantes des macromolécules afin d'induire une réponse biologique, généralement dans un but thérapeutique.

L'application la plus emblématique de ces techniques reste aujourd'hui la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques. La plupart des vecteurs développés au cours des trois dernières décennies l'ont en effet été dans le cadre de la thérapie génique, afin d'introduire dans les cellules atteintes par une pathologie d'origine génétique des molécules d'ADN porteuses du gène sain. La découverte de l'interférence ARN dans les années 1990 et de ses applications a également conduit à adapter ces vecteurs au transfert de siRNA. La mise au point de vecteurs synthétiques pour les acides nucléiques et l'étude de leurs propriétés physicochimiques constituent l'axe de recherche fondamental de notre équipe : ces propriétés sont détaillées dans le **chapitre 3 des généralités**. La découverte au cours des dernières années des réactions immunitaires induites par l'ADN introduit dans les cellules et par l'expression d'un transgène a conduit plus récemment à élargir son champ d'utilisation : à l'origine simple véhicule pour les gènes, l'ADN est aujourd'hui vu comme un puissant immunomodulateur, particulièrement prometteur dans le cadre de la cancérologie ou de la vaccination. Quelques aspects de la délivrance intracellulaire d'ADN pour l'immunothérapie sont présentés dans le **chapitre 4 des généralités**.

Parallèlement aux acides nucléiques, les protéines constituent une autre grande classe de macromolécules d'intérêt biologique. Utilisées depuis près d'un siècle en médecine humaine, elles possèdent une grande spécificité d'action mais n'agissent qu'au niveau extracellulaire. Pourtant, leur délivrance à l'intérieur même des cellules permet d'envisager des applications

nombreuses. Des techniques variées ont été récemment développées pour délivrer ces macromolécules au sein de cellules vivantes, mais leur efficacité limitée et leur mode d'action mal compris freinent leur développement. Les propriétés de ces vecteurs pour les protéines sont détaillées dans le **chapitre 5 des généralités**.

L'objectif de mon travail de thèse a été le développement et la caractérisation de nouveaux vecteurs sythétiques pour la délivrance de différentes classes de macromolécules biologiques, notamment au travers de l'étude des relations entre leurs propriétés physicochimiques et leur activité biologique, dans le cadre de plusieurs projets de recherche. La majeure partie de ce travail a consisté en la mise au point de nanovecteurs dédiés à la délivrance intracellulaire de protéines, à travers un modèle permettant l'identification de composés efficaces parmi des molécules initialement développées pour la vectorisation d'acides nucléiques. Cette approche a permis la découverte de nouveaux vecteurs permettant la délivrance, au sein de cellules en culture, de protéines modèles à destinée nucléaire ou cytosolique. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 4 des résultats. L'efficacité de ces vecteurs nous a ensuite conduits à cibler par la délivrance intracellulaire d'anticorps une cible thérapeutique, la kératine 8, prometteuse dans l'approche de la mucoviscidose. En parallèle, l'étude des propriétés physicochimiques de ces vecteurs nous a permis d'approcher certains aspects de leur mode d'action et devrait permettre, à terme, le développement rationnel de nanovecteurs pour le transport intracellulaire de protéines. Par ailleurs, j'ai eu l'opportunité de participer durant ma thèse à la valorisation industrielle de tels vecteurs par le biais d'une mission de doctorant-expert au sein de la société In Cell Art.

Parallèlement à cet axe de recherche, j'ai eu l'occasion de contribuer à des projets collaboratifs concernant le développement de nouveaux vecteurs synthétiques pour la délivrance d'acides nucléiques in vitro et in vivo, dont les résultats sont exposés dans les **chapitres 1 et 2 des résultats**. Enfin, une application concrète de tels vecteurs dans le cadre de l'immunothérapie est illustrée par les résultats que nous avons obtenus dans le développement d'un nouveau protocole de vaccination à ADN chez la souris, et qui sont exposés dans le **chapitre 3 des résultats**.

# Généralités

# Généralités

## Chapitre 1 - Délivrance intracellulaire d'acides nucléiques

Les techniques mises en œuvre à l'heure actuelle pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques trouvent leur origine dans les années 1940, lorsque O. Avery montre que l'ADN est le support de l'information génétique et peut transférer des gènes depuis une bactérie vers une autre (Avery et al., 1944). Dans la décennie suivante, la capacité des virus à délivrer leur génome dans des cellules eucaryotes a été démontrée, posant les bases du transfert d'acides nucléiques dans des cellules de mammifères. S.M. Gartler observe en 1960 que des cellules murines sont capables d'internaliser spontanément de l'ADN génomique marqué (Gartler and Pavlovskis, 1960), et G.R. Dubes montre l'année suivante que l'ARN isolé du poliovirus est facilement internalisé par des cellules rénales de singe lorsqu'il est complexé à des sels peu solubles, ouvrant ainsi la voie aux vecteurs synthétiques (Dubes and Klingler, 1961). A l'époque, l'absence d'outils moléculaires permettant la manipulation de séquences génétiques limite l'application de ces techniques à l'étude des virus, mais déjà le concept de thérapie génique est en germe et dès 1966, le prix Nobel de physiologie et médecine E. Tatum prédit dans une conférence l'utilisation de la transduction d'ADN dans un but thérapeutique (Tatum, 1966; Wolff and Lederberg, 1994). L'identification de la première enzyme de restriction de type II, Hind II, en 1970 par l'équipe de H.O. Smith, a ouvert la voie à la biologie moléculaire et aux techniques de l'ADN recombinant, permettant la modification ciblée de séquences nucléotidiques (Roberts, 2005). Suite à ces découvertes, le clonage du gène de la  $\beta$ -globine par T. Maniatis en 1976 et la preuve de son implication dans la β-thalassémie en ont rapidement fait un candidat de choix pour une thérapie de remplacement génique : après la démonstration de faisabilité chez la souris, le premier essai chez l'humain a été effectué en 1980 par M. Cline en transfectant in vitro par du phosphate de calcium le gène manquant aux cellules hématopoïétiques de deux patients puis en les réinjectant (Friedmann, 1992). Cet essai, infructueux et extrêmement controversé, a permis de mettre en lumière deux aspects essentiels concernant la thérapie génique : l'exigence d'un cadre expérimental et éthique rigoureux, et la nécessité de nouveaux vecteurs plus efficaces pour délivrer les acides nucléiques au sein des cellules cibles.

Les années 1980 ont vu une augmentation importante des recherches sur le sujet. Si les virus ont naturellement eu une place de choix dans le développement de ces nouveaux vecteurs du fait de leur efficacité, ils présentent aussi de nombreux inconvénients qui ont

rapidement amené au développement de vecteurs synthétiques. Parmi de nombreuses approches, on peut citer l'encapsulation d'ADN dans des liposomes, qui a permis la délivrance in vivo du gène de l'insuline chez le rat (Nicolau et al., 1983). Malgré certains succès, les vecteurs développés au cours de cette période se sont avérés peu efficaces ou trop toxiques pour envisager une utilisation chez l'Homme. Cependant, en 1987 avec la synthèse de la DOTMA (Di-O-octadecenyl-trimethylammoniumpropane), une nouvelle classe de molécules dédiées à la vectorisation d'acides nucléiques fait son apparition : les lipides cationiques (Felgner et al., 1987). Ces composés sont capables de former des complexes avec l'ADN, d'être internalisés par des cellules en culture, et s'avèrent être les vecteurs synthétiques les plus efficaces disponibles à l'époque. Bien que peu efficaces in vivo, ils sont particulièrement adaptés à des transfections in vitro pour la recherche ou pour des approches de remplacement génique ex vivo, et des stratégies existent pour améliorer leur efficacité in vivo. Dans les années 1990, le développement de nouveaux vecteurs basés sur des polymères a permis l'élargissement du champ des vecteurs synthétiques, avec par exemple le polyéthylèneimine (PEI) qui permet le transfert d'acides nucléiques in vivo et in vitro (Boussif et al., 1995; Demeneix and Behr, 2005), ou les copolymères à blocs qui se sont révélés de puissant agents pour le transfert de gène dans des organes comme le muscle ou le poumon (Lemieux et al., 2000; Pitard et al., 2002; Pitard et al., 2004; Desigaux et al., 2005).

A l'heure actuelle (juin 2012), plus de 1800 essais cliniques de thérapie génique sont en cours ou terminés dans le monde d'après *The Journal of Gene Medicine* (Figure 1). Si les virus représentent encore l'immense majorité des vecteurs utilisés (près de 70 %), l'utilisation des vecteurs synthétiques ne cesse d'augmenter et leur domaine d'application s'élargit au fur et à mesure des avancées technologiques.



Figure 1 – Types de vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique (d'après *The Journal Of Gene Medicine*, juin 2012).

#### **Chapitre 2 - Vecteurs viraux**

Le principal obstacle à la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques est la membrane plasmique, véritable frontière entre la cellule et son milieu extérieur. Si elle permet le passage d'ions ou de petites molécules par simple diffusion ou par le biais de protéines transmembranaires comme les canaux ioniques, elle est en revanche imperméable à la plupart des macromolécules. Dans le cas des acides nucléiques en particulier, la charge négative de la membrane que lui confère le glycocalyx, composé essentiellement d'acide sialique et de glycosaminoglycanes, a tendance à repousser les molécules d'ADN ou d'ARN négativement chargées à pH physiologique, rendant le passage d'acides nucléiques nus très peu efficace (Palte and Raines, 2012). L'utilisation de vecteurs pour délivrer ce type de molécules dans des cellules in vivo comme in vitro est donc indispensable.

Les virus ont, par nature, la capacité de délivrer leur génome dans les cellules qu'ils infectent, c'est donc naturellement vers eux que la majorité des recherches sur le transfert de gène se sont portées. Les premiers vecteurs développés ont été basés sur des rétrovirus (Miller et al., 1983), virus à ARN capables d'infecter de manière très efficace des cellules en division et d'intégrer une copie de leur génome dans leurs chromosomes grâce à une rétrotranscriptase. Bien adaptés à des stratégies de remplacement génique ex vivo, ils ont été à l'origine des premiers succès enregistrés par la thérapie génique (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Cependant, il a rapidement été établi que ces vecteurs, en intégrant le transgène à proximité de proto-oncogènes dans le génome hôte, sont responsables du développement de leucémies observées chez certains des patients traités par cette technique (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Les lentivirus, de la famille des VIH, sont également utilisés du fait de leur capacité à intégrer leur génome dans des cellules guiescentes, ce que les rétrovirus ne sont pas capables de faire, mais posent les mêmes problèmes de mutagénèse insertionnelle et d'un éventuel retour à la pathogénicité (Naldini et al., 1996). Les adénovirus, qui sont des virus à ADN capables d'infecter des cellules quiescentes ou en division, permettent de résoudre ce problème de mutagénèse insertionnelle car le transgène reste sous forme épisomale dans le noyau de la cellule hôte. En contrepartie, l'expression de ce transgène est limitée dans le temps puisqu'il sera perdu lors d'une éventuelle division cellulaire. De plus, ces virus étant des pathogènes courants chez l'humain, ils induisent de puissantes réactions inflammatoires lorsqu'ils sont administrés à des doses thérapeutiques (de l'ordre de 10<sup>13</sup> particules virales), cela s'étant soldé par le décès d'un patient lors d'un essai clinique (Marshall, 1999). Malgré ces inconvénients, les vecteurs adénoviraux représentent à eux seuls 20 % des essais cliniques Plus récemment, l'utilisation des AAV (Adeno-associated viruses) a permis la délivrance de gènes in vivo dans la rétine, le foie, le muscle ou les

poumons. Ces virus non pathogènes présentent l'avantage d'être peu immunogènes et de pouvoir être intégrés au génome de l'hôte de manière relativement spécifique, limitant ainsi les risques de mutagénèse insertionnelle dans des stratégies in vitro. Plusieurs sérotypes ayant des tropismes différents pour divers tissus sont disponibles, autorisant un transfert de gène relativement ciblé (Wang et al., 2011). Leur principal inconvénient vient de la petite taille du transgène qu'ils peuvent transporter, 4,8 kb au maximum (Grieger and Samulski, 2005), et du développement d'anticorps anti-AAV.

Les vecteurs viraux constituent donc une classe d'agents efficaces pour des approches de thérapie génique in vivo et ex vivo, mais présentent de nombreux inconvénients : taille du transgène limitée par la capacité de la capside virale, mutagénèse insertionnelle, retour possible à la pathogénicité. La principale limitation de leur usage in vivo est leur immunogénicité : en plus des risques d'inflammation généralisée due aux doses de virus employées, les vecteurs viraux sont susceptibles d'être neutralisés par des anticorps pré-existants à la première injection, et dans tous les cas ne peuvent pas être utilisés à répétition car l'organisme est rapidement "vacciné" contre le vecteur. De plus, leur production nécessite des exigences de sécurité qui la rendent très coûteuses Ces limitations ont donc conduit au développement de vecteurs non viraux pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques.

#### Chapitre 3 - Vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes

Parallèlement aux vecteurs viraux, d'autres techniques ont été développées pour la vectorisation d'acides nucléiques. L'injection d'ADN nu est simple à mettre en œuvre et permet le transfert de gènes in vivo, notamment in situ dans le muscle, mais son efficacité est limitée par la faible internalisation des acides nucléiques ainsi délivrés, et par leur dégradation car ils ne sont pas protégés de l'action des nucléases présentes dans l'organisme (Wolff and Budker, 2005). La micro-injection permet le traitement de cellules in vitro mais ne peut pas être appliquée à un organisme et est traumatisante pour les cellules. L'électroporation permet la transfection efficace de cellules en culture ou in vivo mais peut poser des problèmes de mortalité cellulaire et d'ischémie post-électrisation dans les tissus, et la zone transfectée est limitée à l'espace entre les électrodes (Gehl, 2003).

Pour pallier aux limitations de ces techniques physiques, des vecteurs basés sur des molécules relativement simples, issues de la chimie, ont été développés : les vecteurs synthétiques ou vecteurs non viraux. Leur conception est moins coûteuse que celle des vecteurs viraux, notamment parce qu'ils sont plus faciles à caractériser et purifier. Ils sont peu immunogènes ce qui permet d'envisager des administrations répétées dans le temps, et la taille du transgène qu'ils peuvent véhiculer n'est pas limitée en théorie (Kreiss et al., 1999). Leur conception rationnelle est basée sur cinq critères définissant le "vecteur idéal" :

1 – Permettre la compaction des acides nucléiques à délivrer, sous forme d'objets dont la taille est compatible avec une entrée dans la cellule, et où l'acide nucléique est protégé d'une éventuelle dégradation.

2 – Etre non immunogènes et inertes dans les fluides biologiques.

3 – Permettre une interaction avec les membranes plasmiques pour être internalisés.

4 – Permettre l'accès au cytoplasme des acides nucléiques internalisés, c'est-à-dire provoquer la rupture des endosomes dans le cas d'une entrée par endocytose.

5 - Permettre aux acides nucléiques d'être transportés vers le noyau de la cellule ciblée.

Ces critères ont amené à la mise au point de deux grandes classes de vecteurs synthétiques : les lipides cationiques d'une part, les polymères cationiques ou non ioniques d'autre part. Notre équipe a contribué au développement de ces deux familles de vecteurs et s'est attachée à l'étude des relations entre leurs propriétés physicochimiques et leur efficacité, qui sont détaillées dans ce troisième chapitre.

#### A. Les lipides cationiques

#### 1. Structure

Il a été observé très tôt que la complexation d'acides nucléiques avec des sels comme le phosphate de calcium facilite leur internalisation par des cellules en culture (Dubes and Klingler, 1961). Une autre approche basée sur l'encapsulation d'acides nucléiques dans des liposomes, développée au début des années 1980, a permis la délivrance d'acides nucléiques avec une efficacité similaire au phosphate de calcium (Fraley et al., 1980; Schaefer-Ridder et al., 1982). En se basant sur ces observations, l'équipe de P.L. Felgner a travaillé à la mise au point d'une molécule alliant une charge cationique permettant la formation d'un complexe avec les acides nucléiques, et une partie hydrophobe autorisant la formation de structure supramoléculaires et la fusion avec les membranes cellulaires. Ces travaux ont abouti à la synthèse du premier lipide cationique, la DOTMA (Felgner et al., 1987), toujours commercialisée sous le nom de Lipofectin<sup>®</sup>. Les nombreux lipides cationiques développés depuis sont basés sur la même structure : un domaine cationique lié à un domaine hydrophobe, éventuellement par le biais d'un bras espaceur (Figure 2).



**Figure** 2 – **Structure générale des lipides cationiques.** La queue hydrophobe composée d'acides gras ou de cholestérol est liée à la tête cationique permettant la complexation des acides nucléiques par un bras espaceur de nature variable.

#### a Tête cationique

La partie polaire de ces lipides est généralement basée sur des fonctions azotées comme les amines ou les guanidiniums, qui sont protonées et donc positivement chargées à pH physiologique, ou des ammoniums quaternaires chargés en permanence. La DOTMA par exemple est basée sur un tel groupement ammonium, qui constitue une tête monocationique (Figure 3 A). D'autres lipides monocationiques ont été développés, tel la DOTAP (Dioléoyl-triméthylammoniumpropane) qui possède la même tête cationique liée aux chaînes d'acides gras par des liaisons ester au lieu d'éthers (Figure 3 B).

Afin d'augmenter le degré de complexation de l'ADN par ces composés, des lipides polycationiques ont été mis au point. Ainsi, la dioctadecyl-amido-glycylspermine ou DOGS (Figure 3 C) synthétisée par l'équipe de J.P. Behr est basée sur une spermine (Behr et al., 1989). Cette polyamine naturellement présente dans les cellules se lie au grand sillon de

l'ADN avec une affinité importante (K = 10<sup>-5</sup>-10<sup>-7</sup> M) (Feuerstein et al., 1986). La DOGS permet la formation de complexes stables avec l'ADN qui sont plus efficaces que les lipides monocationiques pour délivrer de l'ADN plasmidique dans des cellules en culture. Elle est aujourd'hui commercialisée sous le nom Transfectam<sup>®</sup>. Une autre lipopolyamine, la DOSPA (dioléoyl-sperminecarboxamidoéthyl-diméthylpropanammonium), également basée sur la spermine (Figure 3 D), entre dans la composition de la Lipofectamine<sup>®</sup>. Plus récemment, une famille de lipides polycationiques basés sur les aminoglycosides a été développée par les équipes de J.M. Lehn et P. Lehn : ces composés seront détaillés dans la partie A.4 de ce chapitre.

#### b Queue hydrophobe

La partie hydrophobe des lipides cationiques permet leur auto-assemblage sous forme de micelles ou de liposomes et, dans une certaine mesure, la fusion de ces structures supramoléculaires avec les membranes plasmiques. Cette partie est généralement constituée de chaînes d'acides gras, mais des lipides basés sur un groupement cholestérol ont également été développés. Le cholestérol fluidifie les membranes lipidiques et augmente la densité des lipides dans la bicouche, permettant une plus grande densité de charges positives dans le cas de lipides cationiques (Semple et al., 1996), et facilite la formation de phases H<sub>II</sub> importantes pour l'échappement endosomal (ce point sera détaillé dans la suite de ce chapitre). Il a également été montré que la conjugaison d'oligonucléotides avec un cholestérol facilite leur internalisation (Boutorin et al., 1989). Le premier lipide cationique dérivé du cholestérol est le diéthylaminoéthane-carbamoyl-cholestérol (DC-Chol, Figure 3 E), basé sur une tête monocationique. Il s'est avéré efficace et moins toxique que la DOTMA lorsqu'il est utilisé sous forme de liposomes mélangé au colipide neutre DOPE (dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine) (Gao and Huang, 1991).

La possibilité d'augmenter l'activité de transfection de ces lipides dérivés du cholestérol a amené à la synthèse d'un composé porteur d'une tête polycationique, le BGTC (bisguanidinium-tren-cholestérol). Les groupements guanidinium qu'il porte sont très fortement protonés à pH physiologique et sont connus pour interagir avec l'ADN, dans les histones par exemple. Combiné à la DOPE, il est légèrement plus efficace que la DOTMA pour la transfection de nombreux types cellulaires in vitro (Vigneron et al., 1996; Pitard et al., 1999). Les liposomes de BGTC:DOPE sont également capables de transfecter l'épithélium des voies aériennes chez la souris (Oudrhiri et al., 1997).



**Figure 3 – Structures chimiques de lipides cationiques.** (A) DOTMA; (B) DOTAP; (C) DOGS; (D) DOSPA; (E) DC-Chol; (F) BGTC

#### 2. Caractéristiques physicochimiques des complexes lipide cationique/acides nucléiques

L'efficacité de transfection des lipides cationiques est étroitement corrélée aux caractéristiques physicochimiques des assemblages supramoléculaires qu'ils forment avec les acides nucléiques. Des ces paramètres dépendent en effet le mécanisme d'entrée des lipoplexes dans les cellules, l'efficacité de l'échappement endosomal et, pour des applications in vivo, la comportement des lipoplexes dans les fluides biologiques. Ils peuvent être observés à l'échelle macroscopique, comme l'état de complexation de l'ADN au sein des lipoplexes ou leur taille, et à l'échelle microscopique avec l'étude de leur structure supramoléculaire.

#### a Etat de complexation de l'ADN au sein des lipoplexes

Les lipoplexes sont habituellement formés en combinant une solution d'ADN et une suspension de lipides cationiques. L'interaction électrostatique entre les groupements phosphates de l'ADN et les charges positives du lipide cationique est le moteur de la formation d'un complexe supramoléculaire plus ou moins stable dont la cohérence est assurée à la fois par cette interaction électrostatique et par l'interaction hydrophobe entre les lipides cationiques. L'efficacité de transfection des lipides cationiques dépend en grande partie de cette capacité à former un complexe avec l'ADN pour le véhiculer jusqu'aux cellules ciblées. L'état de complexation de l'ADN peut être évalué en mesurant son accessibilité à la DNAse I (Bertling et al., 1991) ou à des agents intercalants comme le bromure d'éthidium (BET) ou le PicoGreen (Eastman et al., 1997; Ferrari et al., 1998). Le BET est un composé fluorescent dont l'émission à 610 nm est fortement quenchée en solution dans l'eau. Son intercalation dans l'environnement hydrophobe de la double hélice d'ADN conduit à une augmentation de sa fluorescence d'un facteur 20. Sa charge positive empêche sa diffusion dans les lipoplexes, et donc son accès à l'ADN complexé. Il permet donc une mesure quantitative de la proportion d'ADN libre et d'ADN complexé dans une suspension de lipoplexes. La Figure 4 A montre l'évolution de la fluorescence du BET dans une suspension de complexes lipopolyamine/ADN en fonction du rapport de charge +/- de ces complexes, qui correspond au rapport entre les charges positives des amines du lipide cationique et les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN. On observe une décroissance rapide de cette fluorescence de 100 % au rapport de charge 0 (correspondant à une solution d'ADN pur) vers un minima à partir du rapport de charge 1, qui équivaut à la neutralité électrique des complexes. Ce résultat indique qu'à partir du rapport de charge 1, l'ADN est entièrement recouvert par les lipides cationiques qui empêchent au BET d'y accéder. En revanche, pour des rapports de charge entre 0 et 1, il n'est pas possible de déterminer si la fluorescence observée résulte de la présence d'ADN libre en solution ou de la présence de complexes lâches où l'ADN est toujours accessible à la sonde. L'électrophorèse sur gel d'agarose permet une évaluation plus précise de l'état de condensation de l'ADN : les lipoplexes déposés sur le gel restent dans les puits alors que seul l'ADN libre est capable de migrer à travers les mailles du gel. La Figure 4 B montre que pour des rapports de charge inférieurs à 1, une partie de l'ADN est libre en solution. On remarque également que l'ADN complexé à ces rapports de charge est faiblement condensé, comme le montre la fluorescence des lipoplexes bloqués dans les puits. Pour des rapports de charge supérieurs à 1, l'acide nucléique est totalement condensé, indiquant la formation de complexes stables.





**Figure 4 – Evaluation de la complexation de l'ADN par les lipides cationiques.** (A) Mesure de fluorescence du BET dans une suspension de complexes lipopolyamine/ADN en fonction du rapport de charge. (B) Electrophorèse sur gel d'agarose de complexes lipopolyamine/ADN à différents rapports de charge (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9, 1, 2, 4 et 8) (Pitard, 2002)

В

#### b Stabilité colloïdale des lipoplexes

La taille des complexes formés par les lipides cationiques et les acides nucléiques est un autre facteur essentiel pour leur efficacité de transfection. Ils doivent en effet posséder une taille compatible avec leur entrée par endocytose dans les cellules, soit quelques micromètres au maximum, tout en étant suffisamment grands pour sédimenter sur les cellules malgré le mouvement brownien. Leur diamètre peut être évalué par diffusion quasiélastique de la lumière .Cette technique est basée sur les variations de la diffusion d'un laser dans une suspension de particules, qui dépendent de la vitesse de ces particules et donc de leur rayon hydrodynamique. La Figure 5 A montre que l'évolution de la taille de complexes lipopolyamine/ADN en fonction du rapport de charge +/- suit un modèle à trois zones (Pitard et al., 1997). La zone A est formée de lipoplexes négativement chargée où l'ADN est en excès. Ces lipoplexes sont colloïdalement stables et les mesures de fluorescence du BET montrent que l'ADN y coexiste sous forme libre et sous forme peu condensée dans ces conditions. Leur activité de transfection est quasi-nulle comme indiqué par la Figure 5 B. A l'approche de l'électroneutralité, l'absence de répulsion électrostatique entre les lipoplexes conduit à leur agrégation par interaction hydrophobe : ils forment un précipité visible à l'œil nu qui définit la zone B d'instabilité colloïdale. L'activité de transfection de ces complexes est faible, probablement du fait de leur taille importante qui limite leur internalisation par les cellules. La zone C est faite de petits lipoplexes stabilisés par leur charge positive. Ces complexes où l'ADN est fortement condensé sont capables de s'associer aux membranes cellulaires par interaction électrostatique et transfectent très efficacement des cellules en culture. Il est à noter que ce comportement suivant un diagramme à trois phases est retrouvé avec l'ensemble des complexes lipide cationique/acide nucléique, mais que les limites entre les trois zones sont dépendantes de nombreux facteurs, notamment du lipide cationique utilisé, de la présence d'un colipide, et de la force ionique de la solution contenant les lipoplexes.



**Figure 5 - Stabilité colloïdale de complexes lipopolyamine/ADN.** (A)Mesure par diffusion quasi-élastique de la lumière du diamètre de complexes lipopolyamine/ADN en fonction du rapport de charge. Les lipoplexes des zones A et C sont stables alors que ceux de la zone B sont colloïdalement instables et forment un précipité. Une valeur arbitraire de 700 nm est attribuée aux objets de cette zone dont la taille ne peut pas être mesurée par cette technique. (B) Activité de transfection d'un plasmide encodant la luciférase par une lipopolyamine dans des cellules HeLa en fonction du rapport de charge (Pitard et al., 1997; Pitard, 2002).

#### c Morphologie des lipoplexes

La structure des complexes lipide cationique/ADN peut être étudiée par microscopie électronique, et plus particulièrement par cryo-TEM (cryogenic transmission electron microscopy), permet l'observation de macromolécules ou de structures qui supramoléculaires incluses dans de la glace vitreuse à basse température avec un minimum de préparation de l'échantillon et donc d'artefacts (Gustafsson et al., 1995). La Figure 6 montre la morphologie typique de lipolexes issus des trois zones de stabilité colloïdale. Dans la zone A, on observe des fibres d'ADN libres ou faiblement complexées au lipide cationique (Figure 6 B). Le cœur de ces complexes observé à fort grossissement montre une structure lamellaire en "empreintes digitales" (Figure 6 A) qui est composée d'ADN condensé entre des couches de lipide cationique. Les complexes formés dans la zone B forment d'importants agrégats. Leur observation en microscopie optique montre que leur taille est de l'ordre de la dizaine de micromètres, peu compatible avec une internalisation cellulaire Figure 6 C), cependant l'ADN y est efficacement complexé puisqu'on ne retrouve pas de fibres libres (Figure 6 D). On observe une plus forte proportion de structures lamellaires. Dans la zone C, les objets formés sont de petite taille, stabilisés par répulsion électrostatique et possèdent clairement une structure lamellaire. On n'y retrouve pas d'ADN libre (Figure 6 E-F). Cette association lipide cationique/ADN selon un modèle à trois zones est schématisé sur la Figure 7.



**Figure 6 – Observation en cryo-TEM de complexes lipide cationique/ADN des trois zones de stabilité colloïdale.** (A-B) Complexes issus de la zone A; (C-D) Complexes issus de la zone B (C : microscopie optique à contraste de phase. D : Cryo-TEM); (E-F) Complexes issus de la zone C. Barres d'échelle : 100 nm (A, D, E, F), 500 nm (B), 10µm (C) (Pitard et al., 1997).



**Figure 7 – Représentation schématique des lipoplexes obtenus par l'association d'ADN et de micelles cationiques**, en fonction de leur appartenance aux zones A, B ou C du modèle de stabilité colloïdale (Barteau et al., 2008)

Une autre technique permettant l'étude de la structure des lipoplexes est la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Elle consiste à analyser un échantillon soumis à un puissant rayonnement X, généralement issu d'un synchrotron. Des photons sont diffusés par les lipoplexes à des angles proches du rayonnement incident : l'analyse de ce rayonnement fournit des informations sur la structure supramoléculaire des lipoplexes. On peut généralement classifier les complexes lipide cationique/ADN selon deux types d'organisation

supramoléculaire : soit une phase lamellaire  $L_{\alpha}$  correspondant aux structures observées sur la Figure 6, soit une phase hexagonale inverse  $H_{II}$  (Figure 8). L'existence de ces phases dépend du lipide cationique utilisé et de la présence ou non d'un colipide. La DOPE par exemple a tendance à favoriser l'adoption de la phase  $H_{II}$ . L'organisation supramoléculaire des lipoplexes a une incidence sur leur capacité à fusionner avec les membranes, notamment au niveau des endosomes, et a donc une influence directe sur leur efficacité de transfection (Barteau et al., 2008). Le SAXS permet également de mettre en évidence, en plus de l'organisation périodique des lipides, une périodicité de 2,5 à 6 nm suivant les conditions, qui est attribuée à l'organisation de l'ADN au sein du lipoplexe. Ces observations montrent que les complexes auto-assemblés lipide cationique/ADN sont des objets hautement organisés, tant au niveau des lipides que de l'acide nucléique.



**Figure 8 – Représentation des phases lamellaire et hexagonale inverse.** (A) Représentation schématique de la phase lamellaire  $L_{\alpha}$ ; (B) représentation schématique de la phase hexagonale inverse  $H_{II}$ . Les lipides sont représentés en jaune (queues hydrophobes) et vert/blanc (têtes hydrophiles). (C) Observation en cryo-TEM d'un lipoplexe en phase lamellaire (les structures circulaires sombres sont des artefacts). (D) Observation en cryo-TEM d'un lipoplexes en phase hexagonale inverse; encart : structure à haute résolution de la phase hexagonale inverse obtenue par transformée de Fourier. Barres d'échelle : 100nm sauf encart du D : 0,5 nm (Koltover et al., 1998; Bell et al., 2003).

#### 3. Mécanisme d'action des lipides cationiques

#### a Attachement à la membrane et internalisation

La membrane des cellules est couverte d'une couche de molécules hautement hydratées, le glycocalyx. Celui-ci est composé de glycoprotéines riches en acide sialique et de glycosaminoglycanes (GAG) dont la charge négative repousse les groupements phosphate des acides nucléiques, également chargés négativement à pH physiologique. Il a notamment été observé que des cellules modifiées CHO-745 (cellules ovariennes de hamster chinois) présentant un défaut de synthèse de l'héparane sulfate et de la chondroïtine sulfate, ou des cellules Lec-2 déficientes en acide sialique, incorporent plus facilement dans leur membrane plasmique des conjugués lipide-oligonucléotide que des CHO sauvages (Palte and Raines, 2012). Il a également été suggéré que la facilité avec laguelle les cellules du nématode C. elegans internalisent des siRNAs tient au fait que ces animaux sont déficients en acide sialique et en GAG. Cet effet répulsif du glycocalyx associé à l'hydrophobicité de la membrane plasmique rend presqu'impossible le passage spontané d'acides nucléigues vers le cytoplasme des cellules de mammifère. Les vecteurs cationiques, en formant avec les acides nucléiques des complexes stables et positivement chargés, permettent de franchir cette barrière du glycocalyx en exploitant sa charge négative pour s'y associer par interaction électrostatique. Il a été montré que les cellules CHO-745 ont un niveau de transfection par les vecteurs cationiques 50 fois moindre que leurs homologues non déficientes en GAG, et que la déplétion par voie chimique du glycocalyx de cellules HeLa diminue également de manière importante leur transfection par les vecteurs cationiques. De plus, de l'héparane sulfate libre dans le milieu de transfection inhibe l'internalisation des lipoplexes par les cellules HeLa (Mislick and Baldeschwieler, 1996). Ces résultats montrent que l'interaction non spécifique entre les lipoplexes et la surface de la cellule constitue la première étape de leur internalisation.

La bicouche lipidique constituant la membrane plasmique constitue le deuxième obstacle à franchir par les lipoplexes avant d'atteindre l'intérieur de la cellule. Les auteurs des premières études sur le transfert de gène par les lipides cationiques ont suggéré un mécanisme de fusion entre les lipoplexes et la membrane plasmique assez intuitif vu la nature membranaire des liposomes cationiques, impliquant une délivrance directe des acides nucléiques dans le cytosol (Felgner et al., 1995). Il a cependant rapidement été observé que des lipoplexes de DOTAP ou de DOTMA contenant des lipides marqués fusionnent avec les membranes plasmiques, mais que ce mélange n'est pas corrélé avec le niveau de transfection. Plus intéressant, il a été montré que le mélange des lipides cationiques avec les membranes cellulaires est diminué lorsque l'endocytose est inhibée,

indiquant que la majorité des lipoplexes ne fusionnent pas directement avec la membrane plasmique mais qu'une étape intermédiaire d'endocytose est en jeu dans le processus (Hui et al., 1996; Stegmann and Legendre, 1997).

L'endocytose permet aux cellules d'internaliser des éléments présents dans son milieu extérieur ou à sa surface et peut revêtir plusieurs formes (Figure 9). La phagocytose, principalement à l'œuvre dans les cellules immunitaires, consiste à internaliser des particules de grande taille en les englobant dans des protrusions de la membrane plasmique. C'est un processus hautement régulé, dépendant de récepteurs qui activent des voies de signalisation intracellulaire conduisant à la déformation de la membrane par le réseau d'actine sous-jacent. L'exemple typique est la reconnaissance des domaines Fc (fragment cristallisable) d'immunoglobulines liées à leur antigène, permettant aux macrophages d'internaliser des éléments du non-soi opsonisés. L'entrée des lipoplexes dans la cellule se faisant par attachement non spécifique aux GAG, il est peu probable qu'ils empruntent cette voie. La pinocytose consiste en l'internalisation de solutés en phase fluide, et est donc dépendante de la concentration du soluté dans le milieu extracellulaire. Elle peut être facilitée par l'adsorption sur la membrane plasmique des composés à internaliser et peut se décliner sous quatre voies. La macropinocytose, processus proche de la phagocytose, permet d'englober un grand volume de milieu extracellulaire par protrusion de la membrane plasmigue. Elle est également sous la dépendance de voies de signalisation intracellulaires et du réseau d'actine. Les autres formes de pinocytose sont plus sélectives et conduisent à la formation de petites vésicules selon trois mécanismes : endocytose cavéole dépendante, clathrine dépendante, ou clathrine-cavéole indépendante. L'endocytose cavéole-dépendante conduit à la formation de petites vésicules de 50-60 nm de diamètre, formées au niveau de régions de la membrane riches en cholestérol et sphingolipides. C'est également un processus très régulé qui semble faire appel à une interaction entre le cargo et des récepteurs de surface. L'endocytose clathrine-dépendante est un processus constitutif présent dans toutes les cellules de l'organisme. Elle permet l'internalisation de nombreux solutés comme les lipoprotéines de basse densité (LDL-cholestérol), la transferrine ou le recyclage des protéines membranaires par internalisation de portions de membrane. C'est le processus d'endocytose le mieux compris. Elle est récepteur-dépendante : des récepteurs liés à leur ligand sont concentrés au niveau de puits membranaires recouvertes d'un feutrage de clathrine. Cette protéine conduit à l'invagination de la portion de membrane qu'elle recouvre, qui est désolidarisée de la membrane plasmique par l'action de la dynamine. Une fois la vésicule d'endocytose formée, d'un diamètre d'une centaine de nanomètres, le feutrage de clathrine se désassemble et est recyclé vers d'autres puits membranaires. L'endocytose cavéole et clathrine-indépendante est un processus encore mal étudié qui

conduit à la formation de petites vésicules de 90 nm de diamètre au niveau de microdomaines membranaires riches en cholestérol. La composition en lipides de ces microdomaines conduit à la concentration de certaines protéines membranaires, par exemple le récepteur à l'interleukine-2, qui sont internalisés par un processus indépendant de la clathrine et des cavéoles, mais qui peut dépendre ou non de la dynamine, indiquant qu'il existe au moins deux formes de ce processus (Conner and Schmid, 2003).



**Figure 9 – Voies d'entrée dans la cellule par endocytose.** Ces voies diffèrent par la taille de la particule internalisée et par les récepteurs éventuellement mis en jeu. (Conner and Schmid, 2003)

Pour élucider le mécanisme d'entrée des lipoplexes dans les cellules, de nombreuses éxpériences ont été conduites en présence d'inhibiteurs spécifiques de voies d'endocytose. La filipine et la génistéine, qui sont des inhibiteurs de l'endocytose cavéole-dépendante, ont peu d'effet sur le niveau de transfection par les lipoplexes (baisse de 10-20 %). En revanche, l'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante par la chlorpromazine conduit à une baisse importante (80%) du niveau de transfection (Zuhorn et al., 2002; Rejman et al., 2004; Wasungu and Hoekstra, 2006). Au vu de ces résultats, l'endocytose clathrine-dépendante est la voie d'entrée majeure des complexes lipide cationique/acide nucléique dans les cellules, même si cette affirmation sont à nuancer en fonction du type cellulaire transfecté et de la taille des lipoplexes déposés sur les cellules.

Notre équipe a récemment participé à un travail collaboratif sur les voies d'entrée dans les cellules de vecteurs synthétiques complexés à l'ADN. L'utilisation de cellules C2C12 exprimant des protéines fluorescentes spécifiques de compartiments cellulaires comme les endosomes et les cavéoles a permis de suivre le devenir d'un plasmide marqué vectorisé dans ces cellules au moyen de lipides cationiques ou de polymères. Cette étude a montré que la voie d'entrée majoritaire pour les vecteurs les plus efficaces, basés par exemple sur la Lipofectamine, le PEI ou la DOSP:MM27, est l'endocytose clathrine-dépendante, qui conduit

ces complexes vers les endosomes. A l'inverse, des vecteurs moins efficaces pour le transfert de gène sont internalisés par endocytose cavéole-dépendante (Billiet et al., 2012). De manière intéressante, l'efficacité de transfection des vecteurs dépendants de la clathrine pour leur internalisation n'est pas corrélée avec la quantité de plasmide effectivement internalisée, montrant qu'une étape limitante dans le processus de transfection se situe en aval du passage de la membrane plasmique : le franchissement de la barrière endosomale pour accéder au cytosol.

#### b Echappement endosomal

Les vésicules d'endocytose issues de la membrane plasmique par endocytose clathrinedépendante sont habituellement dirigées vers les lysosomes avec lesquels elles fusionnent. Ces organites contiennent des pompes à protons dans leur membrane qui maintiennent un pH de 4,5-5 dans leur lumière (Mindell, 2012). Ils contiennent également de nombreuses hydrolases acides, dont des nucléases comme la DNAse II, susceptibles de dégrader les acides nucléiques internalisés par endocytose. Il a d'ailleurs été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de nucléases favorise la transfection de cellules en culture (Ross et al., 1998). Il est donc nécessaire que les lipolexes contenus dans les endosomes puissent en sortir avant la fusion de ceux-ci avec les lysosomes : la membrane endosomale constitue par conséquent la troisième barrière à franchir pour la délivrance des acides nucléiques dans le cytoplasme des cellules transfectées. L'échappement endosomal des lipoplexes repose sur deux mécanismes : la fusion entre la membrane de l'endosome et le lipoplexe, ou l'éclatement de l'endosome par choc osmotique.

Le mécanisme le plus couramment proposé pour expliquer l'échappement endosomal des lipoplexes est la fusion membranaire. Cette fusion des lipoplexes avec la membrane endosomale est favorisée par la présence de lipides dits fusogéniques, dont le plus emblématique est la DOPE : dès les débuts de l'utilisation des lipides cationiques pour le transfert de gènes, il a été observé que l'ajout de DOPE aux formulations augmente leur efficacité de transfection (Gao and Huang, 1991; Felgner et al., 1994). Cet effet a été attribué à la capacité de la DOPE à déstabiliser la membrane endosomale par fusion, et plus précisément par sa capacité à induire un changement dans l'organisation des lipoplexes. Alors que des lipoplexes organisés selon une phase lamellaire  $L_{\alpha}$  ont tendance à s'associer aux bicouches lipidiques sans se mélanger avec, il a été observé que la fusion est facilitée lorsque le lipoplexe adopte une phase non lamellaire  $H_{II}$ : les chaînes hydrophobe des lipides étant orientées vers l'extérieur des micelles, elles sont plus susceptibles de s'insérer dans une bicouche lipidique adjacente. Ainsi, des liposomes de DOTAP:DOPC ont une structure

lamellaire et transfectent peu comparé à des liposomes de DOTAP:DOPE organisés en structure hexagonale inverse (Mok and Cullis, 1997; Koltover et al., 1998). Cette capacité de la DOPE à favoriser l'adoption de la phase H<sub>II</sub> tient à sa géométrie : sa tête polaire ayant une aire inférieure à celle de ses chaînes alkyle, elle a une géométrie conique qui modifie le rayon de courbure des membranes où elle est insérée (Figure 10 A) et contribue au changement de phase (Smisterova et al., 2001). Certains lipides cationiques formant des phases lamellaires sont également capables d'adopter la phase H<sub>II</sub> lorsque la densité de charges à la surface du lipoplexe diminue : la neutralisation des lipides cationiques par les lipides anioniques de la membrane endosomale pourraient donc provoquer la transition de phase sans l'aide d'un colipide, expliquant que certains lipides cationiques soient efficaces lorsqu'ils sont utilisés seuls (Zuhorn and Hoekstra, 2002). Suite à l'adoption de la phase H<sub>II</sub>, les membranes peuvent fusionner et aboutir à la création d'un pore selon deux modèles (Figure 10 B) : dans un des modèles, la formation d'une micelle inverse dans l'accolement des membranes aboutit à leur rupture par déstabilisation (Cullis and Hope, 1978). L'autre modèle fait appel à la formation d'un pédicule ou stalk entre les membranes, également favorisé par les lipides à géométrie conique, qui aboutit à la formation d'une monocouche intermédiaire (transmonolayer contact, ou TMC). Cette TMC est rompue par l'augmentation des forces de tension dans la bicouche et aboutit également à la formation d'un pore (Siegel, 1999).



**Figure 10 – Influence de la géométrie des lipides sur l'échappement endosomal.** (A) Conséquences de la géométrie des lipides sur leur organisation supramoléculaire. La DOPE correspond au modèle présenté en bas, avec une forme conique qui permet la formation de phases hexagonales inversées. (B) Mécanismes proposés pour la fusion membranaire. Gauche : fusion membranaire et création d'un pore via un intermédiaire en micelle inverse. Droite : Formation d'un pore par accolement direct des membranes et formation d'un pédicule (stalk). (Hafez and Cullis, 2001)

Un autre mécanisme d'échappement endosomal couramment utilisé repose sur le phénomène d'éponge à protons (Figure 11). Le polymère cationique PEI transfecte efficacement des cellules en culture alors qu'il n'a pas de propriétés fusogéniques intrinsèques. Cette efficacité est attribuée à ses nombreux groupements protonables qui offrent un pouvoir tampon important à ce vecteur (Boussif et al., 1995). Lors de l'acidification de l'endosome précoce par des ATPases à protons, qui fait suite à l'internalisation des complexes, ces groupements sont capables d'absorber les protons et d'empêcher l'acidification du compartiment endosomal, amenant les pompes à protons à fonctionner de facon exagérée. L'entrée d'anions et d'eau suivant ce flux de protons conduit au gonflement de l'endosome puis à sa rupture (Sonawane et al., 2003). Parallèlement aux polymères protonables, il a été montré que des lipides ou des peptides contenant des groupements imidazole, également protonables dans les endosomes en cours d'acidification, sont capables de favoriser l'échappement endosomal (Midoux et al., 2002; Kumar et al., 2003; Mevel et al., 2008; Midoux et al., 2009; Billiet et al., 2012). Cet effet reposerait sur le phénomène d'éponge à protons, mais également sur la capacité de ces composés à fusionner avec la membrane endosomale suite à leur protonation, en faisant une classe de composés susceptibles de favoriser l'échappement endosomal par les deux mécanismes habituellement exploités de façon distincte.



**Figure 11 – Mécanisme d'éponge à protons.** Le cargo contenu dans l'endosome comporte des groupements basiques protonables (B) qui sont protonés lors de l'acidification de l'endosome (BH). L'entrée d'eau et de contre-ions conduit à la rupture osmotique de l'endosome (Pack et al., 2005).

Le mécanisme d'éponge à protons permet d'expliquer au moins partiellement l'efficacité des vecteurs qui sont internalisés par endocytose clathrine-dépendante : cette voie conduit les complexes vers les endosomes dont l'acidification déclenche le mécanisme d'éponge à protons. A contrario, les vecteurs internalisés par endocytose cavéole-dépendante ne sont

pas dirigés vers les endosomes et ne sont donc pas soumis à l'acidification, ce qui explique que des composés histidinylés rentrant dans les cellules par cette voie soient relativement peu efficaces malgré leur pouvoir tampon (Billiet et al., 2012). Cette explication est toutefois à nuancer par le fait que les vésicules issues de l'endocytose cavéole-dépendante sont capables dans une certaine mesure de rejoindre la voie des endosomes, permettant ainsi à leur contenu de subir l'acidification et d'y déclencher le mécanisme d'éponge à protons (Aoki et al., 2007).

#### c Dissociation du complexe lipide cationique / ADN

Durant l'échappement endosomal, une partie des lipides du lipoplexe se mélange à ceux de l'endosome. L'acide nucléique transporté ainsi jusqu'au cytosol doit se dissocier des lipides cationiques pour accéder au noyau. Il a été observé que l'injection directe de complexes lipide cationique/ADN dans le noyau d'ovocytes de xénope est moins efficace que l'injection d'ADN seul, indiquant que les lipides cationiques liés à l'ADN inhibent l'expression du transgène (Zabner et al., 1995). La dissociation du complexe paraît donc essentielle pour une transfection efficace.

Un modèle a été proposé par l'équipe de F.C. Szoka pour la dissociation des acides nucléiques et de leur vecteur une fois les barrières cellulaires franchies (Figure 12). Après l'internalisation du complexe, les lipides anioniques de la membrane endosomale (phosphatidylsérine et acide phosphatidique notamment) passent par flip-flop dans le lipoplexe où ils forment des paires d'ions avec les lipides cationiques. L'interaction lipide cationique étant nettement plus forte que l'interaction lipide cationique/ADN du fait de l'interaction hydrophobe qui s'ajoute à l'interaction électrostatique, l'ADN n'est plus lié au lipide cationique et est libéré dans le cytosol (Xu and Szoka, Jr., 1996). Il est également possible qu'une fois dans le cytoplasme, les lipoplexes se lient à des composants cellulaires comme les ARN ou des protéines négativement chargées, qui en déplaçant l'ADN du lipide cationique contribueraient à sa libération dans le cytosol (Scherman et al., 1998). Ce mécanisme de libération des acides nucléiques semble cependant à nuancer car il est dépendant du lipide cationique utilisé.

Notre équipe a collaboré à une étude du mécanisme intracellulaire de deux lipides cationiques, la DOSP (Mevel et al., 2012) et le BGTC (Vigneron et al., 1996). Le suivi par cryo-TEM de lipoplexes formés par ces lipides avec de l'ADN lié à des billes d'or montre que même si les grandes étapes de délivrance de l'ADN sont communes aux deux vecteurs, leur comportement dans l'endosome diffère : les lipoplexes BGTC/ADN se dissocient avant la

rupture des membranes endosomales alors que les deux évènements sont concomitants dans le cas de la DOSP (Figure 13). Ceci explique probablement pourquoi l'efficacité de transfection du BGTC est inférieure : l'ADN n'étant que partiellement protégé dans l'endosome par le BGTC, il est plus susceptible d'être dégradé qu'avec la DOSP (Le Bihan et al., 2011).



**Figure 12 – Mécanisme de relargage de l'ADN dans le cytosol.** Etape 1 : internalisation du complexe par endocytose. Etape 2 : mélange des lipides anioniques de la membrane avec les lipides cationiques du lipoplexe. Etape 3 : création de paires d'ions et neutralisation. Etape 4 : relargage de l'ADN par le complexe. (Xu and Szoka, Jr., 1996)



Figure 13 - Observations en cryo-TEM de lipoplexes de BGTC:DOPE ou de DOSP:DOPE formulée à de l'ADN plasmidique après endocytose par des cellules H1299. (A) lipoplexe BGTC:DOPE/ADN partiellement désassemblé contenu dans un endosome dont la membrane est intacte. Barre d'échelle 500 nm. (B) Lipoplexe de DOSP:DOPE/ADN en cours de désassemblage contenu dans un endosome dont la membrane est rompue. Barre d'échelle 100 nm. Encart : structure multilamellaire du lipoplexe DOSP:DOPE/ADN présentant un expacement caractéristique de 6,5 nm indiquant que l'ADN est toujours complexé entre les couches lipidiques. Barre d'échelle 20 nm (Le Bihan et al., 2011).

#### d Trafic intracellulaire du plasmide et importation nucléaire

Suite à l'échappement endosomal, l'acide nucléique doit encore être dirigé vers sa cible moléculaire. Le trafic des siRNA ne pose pas de problème puisque leur cible est le complexe cytosolique RISC. En revanche, l'ADN doit gagner le noyau pour être transcrit par l'ARN polymérase II. L'accès au noyau des plasmides est limité par la consistance du cytosol dont la richesse en biomolécules l'apparente plus à un gel qu'à une solution liquide, et où la diffusion des macromolécules est limitée (Luby-Phelps, 2000). Cette propriété du cytosol fait que peu de plasmides délivrés à l'intérieur de la cellule gagnent effectivement le noyau : ainsi l'injection cytosolique d'un plasmide conduit à une expression nettement moins forte que son injection intranucléaire (Graessmann et al., 1989), et suite à la délivrance par des lipides cationiques de 1x10<sup>5</sup> à 1x10<sup>6</sup> plasmides à des cellules B1F10 ou A549, on ne retrouve que 0,1 à 5 % des plasmides dans le noyau (Cohen et al., 2009). Ce taux de 0,1 % a également été observé dans notre laboratoire sur des cellules COS-7 (Pollard et al., 1998). Il a été observé que des endosomes contenant les lipoplexes se situent à proximité de la membrane nucléaire suite à une transfection (Le Bihan et al., 2011), ce qui peut faciliter la diffusion de l'ADN qu'ils relarguent et limiter son temps de résidence dans le cytosol où il est exposé à l'action des nucléases.

L'accès au noyau des plasmides est nettement favorisé par la rupture de la membrane nucléaire lorsque les cellules sont en division, cependant il est également possible en interphase (Escriou et al., 2001). Des mécanismes ont été proposés pour expliquer le passage des molécules d'ADN à travers l'enveloppe nucléaire. Des séquences d'origine virale, comme l'enhancer du virus simien SV40, favorisent l'importation nucléaire des plasmides les contenant en se fixant à des facteurs de transcription qui sont eux-même importés vers le noyau via leurs signaux de localisation nucléaire (NLS)(Figure 14)(Graessmann et al., 1989; Dean et al., 1999). Les promoteurs utilisés dans les plasmides étant fréquemment dérivés de séquences virales (promoteurs du CMV et du SV40 notamment) sont donc utiles non seulement pour la transcription proprement-dite, mais également pour l'étape d'import nucléaire. Il a également été suggéré que l'entrée des plasmides dans le noyau puisse impliquer les histones : l'adénovirus Ad2 utilise l'histone H1 comme transporteur vers le noyau de la cellule qu'il infecte. Il est possible que l'ADN non viral, se fixant naturellement aux histones, puisse être transporté avec elles depuis le lieu de leur traduction, le cytosol, jusqu'au noyau (Trotman et al., 2001; Zuhorn and Hoekstra, 2002).


**Figure 14 – Mécanisme d'importation nucléaire des plasmides via leur fixation à des facteurs de transcription** (Dean et al., 1999).

Des observations par microscopie confocale ont montré que des lipoplexes DOSPA:DOPE peuvent fusionner directement avec la membrane nucléaire (Kamiya et al., 2002), cependant il est généralement admis que l'entrée dans le noyau proprement-dite, hors division cellulaire, se fait via le complexe du pore nucléaire (NPC), dont le diamètre de 30 nm permet le passage de la double hélice d'ADN de 3 nm de diamètre. Cette importation via le NPC peut être favorisé par l'utilisation de séquences NLS. Ainsi, le greffage de la protéine hexon de l'adénovirus Ad5 sur du PEI augmente d'un facteur dix l'expression du transgène par rapport à du PEI non greffé, par un mécanisme dépendant du NPC (Carlisle et al., 2001). Il est intéressant de noter que le taux d'importation nucléaire est dépendant du type cellulaire, ce qui permet d'expliquer au moins partiellement les différents niveaux de transfection observé en fonction du type cellulaire. Il a été observé que des cellules CV-1 et HeLa ayant reçu des complexes DOTAP:DOPE/ADN internalisent une quantité équivalente de plasmides, mais que les HeLa, qui présentent le taux le plus élevé d'expression du transgène, contiennent deux fois plus de plasmides dans leur noyau que les CV-1. Cette variation peut être expliquée par plusieurs facteurs : le taux de division plus élevé des cellules HeLa qui favoriserait le transfert des plasmides au noyau lors de la mitose, mais également la présence de certains facteurs de transcription dans les HeLa qui favoriseraient l'importation nucléaire en se fixant à des séquences spécifiques contenues dans le plasmide (James and Giorgio, 2000).



La Figure 15 présente un bilan des différentes étapes du transfert de gène par les acides nucléiques.

**Figure 15** – **Bilan des différentes étapes du transfert de gènes par les lipides cationiques.** (A) Formation d'un complexe stable entre un liposome cationique et de l'ADN plasmidique. (B) Attachement à la membrane par interaction électrostatique avec les glycosaminoglycanes. (C) Endocytose du complexe. (D) Acidification de l'endosome. (E) Echappement endosomal et dissociation du complexe. (F) Trafic intracellulaire du plasmide. (G) Importation nucléaire. (H) Expression du gène et traduction de la protéine codée par le plasmide.

# 4. Les derives lipidiques d'aminoglycosides (DLA)

Cette partie des **Généralités** est liée à un travail collaboratif ayant fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal Of Controlled Release* en 2012 : Mevel, M., Sainlos, M., **Chatin, B.**, Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Lambert, O., Vigneron, J.P., Lehn, P., Pitard, B., and Lehn, J.M. (2012). **Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies**. J. Control Release *158*, 461-469 (Mevel et al., 2012).

Les aminoglycosides sont une grande famille de molécules à activité antibiotique synthétisées dans la nature par des bactéries de l'ordre des actinomycètes, basées sur des sucres modifiés. Leur activité antibiotique provient de leur capacité à se fixer à l'ARN de la sous-unité 30S des ribosomes bactériens et à induire des erreurs dans la traduction des protéines : la cellule bactérienne meurt suite à l'accumulation de protéines aberrantes. Cette capacité des aminoglycosides à lier les acides nucléiques, alliée à leur importante diversité structurale permettant de nombreuses modifications chimiques, en fait des candidats de choix dans le développement de nouveaux lipides cationiques. Ces molécules sont en effet basées sur un noyau 2-déoxystreptamine, substitué en positions 4 et 5 (4,5-DDS ; ex : paromomycine, tobramycine) ou en positions 4 et 6 (4,6-DDS; ex : néomycine, kanamycine) par des aminosucres. Les nombreuses fonctions amines portées par ces sucres (jusqu'à six dans le cas de la néomycine) permettent, par couplage sélectif avec un groupement hydrophobe (cholestérol ou chaînes d'acides gras), d'obtenir une grande variété de composés amphiphiles. L'équipe de J.M. Lehn a synthétisé les premiers lipides de cette famille à partir de la kanamycine : la kanamycine-cholestérol (KC) et son dérivé tri-guanidylé, la tri-guanidinium-kanamycine-cholestérol (TGKC) (Figure 16 A-B) (Belmont et al., 2002). Leur capacité à délivrer un plasmide dans des cellules en culture et dans les voies aériennes de souris a apporté la preuve de concept que cette nouvelle classe de lipides pouvait être la base de vecteurs efficaces pour le transfert de gène.

Ces résultats encourageants ont amené les auteurs à synthétiser une série de lipides dérivés de la KC en incluant un groupement espaceur entre la tête cationique et la queue hydrophobe, un tel groupement étant susceptible d'améliorer l'efficacité de ces lipides. Entre autres lipides ont été obtenus la kanamycine-caproyl-cholesterol (KCC) et la kanamycine-lysyl-cholesterol (KLC) (Figure 16 C-D) (Sainlos et al., 2005), incluant un bras espaceur dérivé respectivement de l'acide 6-aminocaproïque ou de la lysine.



**Figure 16 Structure de dérivés lipidiques d'aminoglycosides.** (A) KC, (B) TGKC, (C) KCC, (D) KLC, (E) TCC, (F) TLC, (G) PDX, (H) DOSK, (I) DOSP, (J) DOSN, (K) DOST, (L) PCSD, (M) PLSD, (N) DOAPSATA

Ces composés se sont révélés dix fois plus efficaces que la KC pour transfecter des cellules in vitro, le gain étant plus modeste in vivo puisque seule la KLC s'est avérée plus efficace que la KC. Cette étude a également décrit la synthèse et l'activité de transfection d'un lipide basé sur des chaînes d'acides gras au lieu d'un cholestérol, la dioleoyl-succinyl-kanamycine (DOSK) (Figure 16 H). Son efficacité de transfection a conduit à la synthèse d'autres dérivés aliphatiques d'aminoglycosides en variant le motif aminoglycoside, basés sur la paromomycine (DOSP), la tobramycine (DOST) ou la néomycine (DOSN) (Figure 16 I-K).

Ces dérivés aliphatiques d'aminoglycosides ont été étudiés pour leur capacité à transfecter des siRNAs dans des cellules en culture. Les dérivés de la 4,5-DDS (DOSP et DOSN) se sont avérés particulièrement efficaces pour l'inhibition d'un gène rapporteur, tout en étant dénués de toxicité. Il a été suggéré que leur efficacité provient de leur capacité à former avec les siRNAs des complexes de petite taille et organisés en microdomaines, contrairement aux dérivés de la 4,6-DDS qui forment des structures multilamellaires concentriques moins aptes à déstabiliser la membrane endosomale pour relarguer les siRNAs dans le cytosol (Desigaux et al., 2007). Ces dérivés lipidiques d'aminoglycosides n'ayant pas été jusque-là caractérisés quand à leurs propriétés pour le transfert d'ADN plasmidique, un travail collaboratif de notre équipe avec celle de J.M. Lehn a permis de préciser leur activité de transfert de gène in vitro et in vivo ainsi que leurs propriétés physicochimiques. Ce travail sera présenté dans le **chapitre 1 des résultats**.

### 5. Transfert d'acides nucléiques in vivo par les lipides cationiques

Bien qu'efficaces pour délivrer des acides nucléiques in vitro, les lipides cationiques s'avèrent peu efficaces in vivo pour la délivrance de plasmides ou de siRNAs. La charge positive des complexes qu'ils forment avec les acides nucléiques, et qui est le moteur de leur association aux cellules ciblées, déclenche en effet une forte agrégation avec les composants du sérum lorsqu'ils sont injectés dans la circulation systémique. Ces agrégats sont stoppés dans le premier lit capillaire rencontré après une injection intraveineuse : on les retrouve généralement dans le poumon, alors que le taux de transfection des autres organes est bas (Mahato et al., 1998). Les lipides cationiques sont également capables d'activer le système du complément, ce qui amène à l'élimination des complexes par les macrophages et le système réticulo-endothélial (Rao, 2010). Ainsi, suite à une injection de lipoplexes dans la veine caudale, 98 % de ceux-ci sont éliminés de la circulation dans les dix minutes (Tong et al., 2009) L'injection de complexes directement dans un tissu amène également un niveau de transfection décevant : si une monocouche de cellules en culture est facilement accessible aux lipoplexes qui sont déposés dessus, en revanche leur distribution entre des cellules jointives ou séparées par une matrice extracellulaire est limitée.

Une stratégie permettant d'augmenter la stabilité des lipoplexes dans les fluides biologiques consiste à les formuler avec des stabilisateurs stériques de type PEG (polyéthylène-glycol) qui permettent la répulsion des composés susceptibles d'interagir avec eux (Figure 17).

L'inconvénient de ces stabilisateurs étant qu'ils limitent également l'interaction avec les membranes cellulaires, il est possible de les coupler avec un ligand (anticorps, sucres, protéines) qui permet une interaction récepteur-dépendante avec les cellules et autorise le ciblage des lipoplexes vers un type cellulaire donné. Ainsi, le couplage à la transferrine permet de cibler les cellules tumorales qui présentent généralement une expression accrue du récepteur à la transferrine par rapport aux cellules saines (Tong et al., 2009).



**Figure 17 – Système multimodulaire pour la délivrance ciblée d'acides nucléiques in vivo.** Le cœur hydrophobe (jaune) est surmonté d'une couronne de stabilisateurs stériques (bleu) couplée à un ligand permettant le ciblage d'un type cellulaire donné (triangles noirs). Le stabilisateur stérique peut comporter une fonction dégradable (vert) permettant le désassemblage du système une fois internalisé par la cellule ciblée. Adapté d'après Tong et al., 2009

Notre équipe a participé au développement d'un système de délivrance ciblée d'acides nucléiques vers les hépatocytes. Des lipoplexes BGTC/ADN ont été formulée à un rapport de charge proche de la neutralité, permettant d'éviter les interactions électrostatiques non spécifiques avec les composants du sérum ou de cellules non ciblées. Ces lipoplexes neutres ont ensuite été stabilisés par ajout de copolymères à blocs amphiphiles non ioniques (dont les propriétés seront détaillées dans les pages suivantes) qui permettent d'empêcher l'agrégation de ces lipoplexes colloïdalement instables par interaction hydrophobe, et doivent servir de stabilisateurs stériques une fois le système injecté dans la circulation systémique. Ces copolymères portent à leur extrémité un ligand galactose permettant le ciblage du récepteur ASPGR (récepteur aux asialoglycoprotéines) exprimé par les hépatocyte. Les résultats de cette étude ont montré que ces systèmes multimodulaires permettent la transfection spécifique d'hépatocytes en culture par un mécanisme récepteur-dépendant (Letrou-Bonneval et al., 2008).

#### B. Les polymères

## 1. Polymères cationiques

Suite au développement des lipides cationiques à la fin des années 1980, une autre classe de molécules dédiées au transfert de gènes in vitro et in vivo a émergé : les polymères cationiques. Ceux-ci sont également capables de former avec les acides nucléiques des structures supramoléculaires : les polyplexes. Un des premiers polymères développés à cette fin est le polyéthylèneimine (PEI) (Figure 18 A), développé par l'équipe de J.P. Behr et toujours commercialisé sous le nom de Jet-PEI (Boussif et al., 1995; Demeneix and Behr, 2005). Ce polyélectrolyte, qui peut être linéaire ou ramifié, possède de nombreuses fonctions amines protonables qui lui confèrent une forte charge positive à pH physiologique permettant la formation de complexes stables avec les lipides cationiques. Ces fonctions amines sont susceptibles d'être protonées dans l'endosome en cours d'acidification, permettant l'échappement endosomal par un effet d'éponge à protons et conférant au PEI une grande efficacité de tranfert de gènes in vitro et in vivo. Un autre polymère couramment utilisé est la polylysine (PLL) (Figure 18 B) (Wolfert et al., 1999). Elle présente une activité de transfection plus faible que le PEI, probablement du fait de la moindre densité de fonctions protonables qui n'offre pas la possibilité de faire éclater les endosomes par choc osmotique, cependant elle a l'avantage d'être biodégradable de par sa nature polypeptidique, ce qui lui confère une toxicité minimale et élimine le problème du devenir du vecteur dans le cas d'une administration in vivo.



Figure 18 – Structures du PEI linéaire (A) et de la polylysine (B) (Wolfert et al., 1999; Demeneix and Behr, 2005).

# 2. Copolymères à blocs amphiphiles

## a Structure et propriétés

Parallèlement aux polymères cationiques, des polymères non ioniques ont été utilisés pour délivrer des acides nucléiques in vivo. Un des premiers composés de ce type est la polyvinyl-pyrrolidone (PVP) ou Povidone. Développé dans les années 1930 et utilisé comme substitut de plasma sanguin, ce polymère inerte et non toxique est aujourd'hui largement utilisé dans de nombreuses formulations pharmaceutiques, la plus répandue étant la Povidone iodée (Bétadine<sup>®</sup>). Il a été observé dans les années 1990 que l'injection intramusculaire d'un plasmide rapporteur combiné à de la PVP permet un transfert de gène efficace par rapport à l'injection d'ADN nu (Mumper et al., 1996).

Rapidement, d'autres polymères neutres ont montré leur capacité à assurer un transfert de gène très efficace in vitro : les copolymères à blocs amphiphiles, dits Pluronics ou poloxamères. Ces molécules sont constituées d'un bloc de poly-oxyde de propylène (PPO) hydrophobe comportant un nombre variable d'unités, encadré par deux blocs de poly-oxyde d'éthylène (PEO) hydrophiles (Figure 19 A). Il existe une grande variété de Pluronics, caractérisés par leur masse moléculaire et par les longueurs des blocs de PEO et PPO qui définissent le comportement de ces polymères en solution aqueuse. Ce comportement peut notamment être prédit à l'aide de l'échelle HLB (hydrophilic / lipophilic balance) de Davies, qui prend en compte les contributions de chaque groupement d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène pour attribuer au polymère considéré une valeur HLB, faible pour les composés hydrophobes et élevée pour les composés hydrophiles. Diverses nomenclatures ont été établies pour la classification de ces polymères en fonction de leur masse molaire et de leur hydrophobicité. Lorsqu'ils sont désignés sous l'appellation générale de poloxamères, ils sont caractérisés par un code à trois chiffres. Les deux premiers chiffres multipliés par 100 donnent une approximation de la masse molaire du bloc central de poly-oxyde de propylène et le troisième multiplié par 10 donne la proportion d'oxyde d'éthylène dans la structure du polymère. Ainsi, le poloxamère 188 possède un bloc central de poly-oxyde de propylène d'environ 1800 Da et les blocs de poly-oxyde d'éthylène composent 80 % de sa structure. Leur nomenclature est différente lorsqu'ils sont commercialisés sous le nom Pluronics par la société BASF : ils sont désignés par un code à une lettre suivie de deux ou trois chiffres. La lettre définit leur état à température ambiante (F : solide; P : pâte; L : liquide). Le dernier chiffre multiplié par 10 donne toujours le pourcentage d'oxyde d'éthylène, en revanche le premier ou les deux premiers chiffres doivent être multipliés par 300 pour obtenir la masse molaire du bloc central de poly-oxyde de propylène. Ainsi, dans cette nomenclature, le

poloxamère 188 qui se présente sous forme de pastilles solides devient le Pluronic F68. C'est cette nomenclature de BASF qui sera privilégiée dans les pages suivantes.

Leur motif central de PPO permet un auto-assemblage sous forme de micelles, en fonction de la concentration et de la température. Au-delà d'une certaine concentration micellaire critique (CMC), les blocs de PPO centraux s'assemblent pour former le cœur hydrophobe des micelles, surmonté par les chaînes hydrophiles de PEO qui restent hydratées (Figure 19 D). La température influe également sur la formation de ces micelles : de façon paradoxale, une augmentation de la température favorise leur assemblage. En effet, l'état d'hydratation des blocs de PPO diminue avec la température. Au-delà d'un seuil dit température micellaire critique (CMT), ceux-ci s'associent pour former le cœur hydrophobe des micelles. Ces micelles peuvent être utilisées pour encapsuler des composés peu solubles afin de les administrer dans l'organisme. La doxorubicine par exemple, un agent anticancéreux, voit son temps de demi-vie plasmatique et son accumulation dans les tumeurs augmenter lorsqu'elle est combinée à des micelles de SP1017, un mélange des Pluronics L61 et F127 (Batrakova and Kabanov, 2008).



Hydrophilic corona

**Figure** 19 – **Structure et auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles.** (A) Structure générale des poloxamères. (B) Auto-assemblage des polymères en micelles via leurs parties hydrophobes. (C) Structure générale des Poloxamines (Pitard et al., 2004; Batrakova and Kabanov, 2008).

Une autre classe de copolymères à blocs est constituée par la famille des poloxamines ou Tetronics. D'une structure proche de celle des Pluronics, ils sont constitués quatre chaînes alternant un bloc de PEO et un bloc de PPO, qui sont branchées via le bloc PPO sur un motif éthylènediamine central conférant à la molécule une charge positive, faible toutefois en regard de la taille de la molécule entière (Figure 19 C). Ces composés ont donc des propriétés similaires à celles des Pluronics.

La capacité des copolymères à blocs à faciliter le transfert de gènes in vivo, et notamment en intramusculaire, a été observé par l'équipe d'A. Kabanov au début des années 2000 : la combinaison de Pluronics SP1017 formulée à un plasmide permet un transfert de gène dans le muscle dix fois plus efficace que l'injection d'ADN nu, et est également plus efficace que la PVP qui était à l'époque le seul agent non viral permettant une transfection efficace dans le muscle (Lemieux et al., 2000). Cette capacité à améliorer le transfert de gènes intramusculaire, alliée à la faible toxicité des Pluronics et à leur inscription dans les pharmacopées américaine et européenne, a rapidement amené d'autres groupes à se focaliser sur cette nouvelle classe de vecteurs non viraux.

Notre équipe a également observé en 2002 que l'utilisation d'un seul copolymère à blocs non ionique, le PE6400 ou L64 (PEO<sub>13</sub>-PPO<sub>30</sub>-PEO<sub>13</sub>), permet d'augmenter d'un facteur 50 l'expression d'un transgène par rapport à de l'ADN nu dans le muscle squelettique, atteignant un niveau d'expression équivalent à celui observé avec l'électrotransfert. Le L64 est également capable de délivrer un transgène dans le muscle cardiaque, tissu où l'utilisation de l'électroporation est difficilement envisageable (Pitard et al., 2002). Cette efficacité des Pluronics a rapidement amené notre équipe à conduire la première étude du transfert de gène par les poloxamines, combinant les propriétés des Pluronics avec celles d'un vecteur cationique : il s'est avéré que le Tetronic 304 est capable d'améliorer l'expression de gènes rapporteurs dans le muscle squelettique et cardiaque, mais également de gènes ayant un intérêt thérapeutique comme la dystrophine ou l'érythropoïétine (EPO). Il est intéressant de noter que ces vecteur efficaces permettent de réduire la dose d'ADN injectée, et par conséquent de limiter la réaction immunitaire associée à l'expression du transgène, permettant le maintien de l'expression sur plusieurs mois alors qu'elle est habituellement transitoire (Pitard et al., 2004). D'autres travaux ont confirmé cette capacité des copolymères à blocs à transférer efficacement des gènes in vivo dans divers organes (Desigaux et al., 2005; Richard et al., 2005a; Richard et al., 2005b; Piron et al., 2008; Richard-Fiardo et al., 2008).

# b Mécanisme d'action

Cette partie des **Généralités** est liée à un travail collaboratif ayant fait l'objet d'une publication dans la revue *Nucleic Acid Research* : Chèvre,R., Le,B.O., Beilvert,F., **Chatin,B.**, Barteau,B., Mevel,M., Lambert,O., and Pitard,B. (2011). **Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport**. Nucleic Acids Res. 39, 1610-1622. (Chevre et al., 2011).

Contrairement au mécanisme d'action des lipides cationiques, qui sont étudiés depuis un quart de siècle, la manière dont les copolymères à blocs permettent le transfert intracellulaire d'acides nucléiques est mal élucidée. L'incapacité des copolymères à assurer la transfection d'ADN in vitro alors qu'ils sont très efficaces in vivo, et à l'inverse les performances in vivo des lipides cationiques décevantes par rapport à leur activité in vitro, suggère deux mécanismes d'action totalement différents. La physicochimie de ces deux types de vecteurs est probablement à l'origine de cette différence. Alors que les lipides cationiques forment des complexes stables avec les acides nucléiques via une interaction électrostatique forte, la neutralité électrique des copolymères à blocs suggère des interactions faibles, de type liaison hydrogène ou interaction hydrophobe, avec les acides nucléiques, voir une absence d'interaction (Pitard et al., 2002; Batrakova and Kabanov, 2008). De plus, la grande diversité de ces composés quand à leur masse et leur HLB permet d'envisager plusieurs mécanismes intervenant à différentes étapes du transfert des acides nucléiques depuis le milieu extracellulaire jusqu'au cytosol et au noyau des cellules ciblées.

Le niveau élevé d'expression du transgène induit dans les muscles par les copolymères peut s'expliquer par la transfection d'un plus grand nombre de fibres musculaires qu'avec de l'ADN nu. Notre équipe a observé que le polymère PE6400 doit être administré en même temps que le plasmide pour être actif, suggérant l'importance du mélange des deux composés (Pitard et al., 2002), et a ensuite démontré que le Pluronic F68 ou Lutrol (PEO<sub>75</sub>-PPO<sub>30</sub>-PEO<sub>75</sub>) facilite la diffusion du plasmide dans le tissu après l'injection (Bello-Roufai et al., 2007),conduisant à un plus grand nombre de cellules atteintes par le plasmide. Ce mécanisme constitue un premier niveau d'action des copolymères à blocs.

L'équipe d'A. Kabanov a montré que l'endocytose de complexes polymère cationique/ADN est facilitée en présence du polymère P85 (PEO<sub>26</sub>-PPO<sub>40</sub>-PEO<sub>26</sub>) (Astafieva et al., 1996; Yang et al., 2008). Une autre étude a observé que le L64 favorise l'internalisation des acides nucléiques par création de pores. Ces résultats suggèrent que les copolymères à bloc ont une action directe sur la membrane plasmique. Toutefois, ces polymères ont une faible HLB, et des polymères moins hydrophobes sont susceptibles de ne pas agir à ce niveau de l'internalisation des acides.

Une des principales barrières à la délivrance des acides nucléiques par les lipides cationiques étant la membrane endosomale, il est possible que les copolymères à blocs amphiphiles non ioniques agissent à ce niveau en facilitant l'échappement endosomal. Un Pluronic très hydrophobe, le L61 (PEO<sub>2</sub>-PPO<sub>32</sub>-PEO<sub>2</sub>), est capable de favoriser des flip-flops dans des vésicules de lécithine (Krylova et al., 2003), mais cet effet n'est probablement pas en jeu avec des polymères plus hydrophiles.

La facilitation du trafic intracellulaire de l'ADN et de l'expression même du transgène au niveau transcriptionnel a également été proposée pour expliquer le mode d'action de certains polymères. Il a été montré que le P85 provoque l'activation de voies de signalisation de l'inflammation conduisant à l'expression du facteur de transcription NFKB et augmente sélectivement l'expression de plasmides porteurs de sites de fixation de ce facteur dans leur promoteur (type CMV ou P53). NFKB joue un rôle à la fois au niveau de l'importation nucléaire des plasmides sur lesquels il est fixé, et au niveau de l'expression en activant le promoteur contrôlant l'expression du transgène (Yang et al., 2005; Batrakova and Kabanov, 2008; Yang et al., 2008). Cet effet sur les voies de signalisation du P85 a également été observé à l'échelle tissulaire : l'injection d'ADN formulé à ce polymère induit le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes et une forte réponse inflammatoire, qui peut être mise à profit dans le domaine de la vaccination à ADN (Gaymalov et al., 2009).

Ces observations suggèrent que la diversité des copolymères à blocs sous-tend plusieurs mécanismes d'action. Notre équipe a participé à une étude du mode d'action du F68 ou Lutrol, qui a démontré sa capacité à transférer un transgène de manière très efficace dans le tissu musculaire (Richard et al., 2005a; Richard-Fiardo et al., 2008). Ces travaux seront présentés dans le **chapitre 2 des résultats**.

# Chapitre 4 - Délivrance intracellulaire d'ADN et immunothérapie

Si la délivrance intracellulaire d'ADN a pour but originel la thérapie de remplacement génique, depuis quelques années on assiste à l'émergence d'une nouvelle application à cette technique : la vaccination à ADN. Le principe est de faire exprimer par les cellules de l'organisme un antigène donné plutôt qu'injecter cette molécule sous forme protéique. Les avantages sont nombreux : outre le faible coût de l'ADN plasmidique comparé à des antigènes purifiés ou des virus inactivés, l'ADN est stable à température ambiante contrairement aux protéines et permet donc de se passer de moyens de réfrigération coûteux et indisponibles dans certaines zones du monde. D'autre part, l'expression de l'antigène par les cellules humaines garantit sa bonne conformation et sa glycosylation correcte par rapport à ce qui peut être obtenu dans des systèmes d'expression héterologues ou des bactéries. Cependant, ce procédé originellement basé sur l'injection d'ADN nu se heurte à la grande quantité de plasmide nécessaire et à la faible réponse immunitaire obtenue après injection. L'utilisation de vecteurs permettant de diminuer de façon importante la quantité d'ADN nécessaire à cette vaccination est donc d'un intérêt considérable.

L'immunité induite par l'ADN exogène repose sur sa détection au sein de la cellule par des protéines capables de le reconnaître et d'induire une réponse inflammatoire. En effet, l'ADN est en temps normal présent uniquement dans le noyau et les mitochondries des cellules animales et sa présence dans un autre compartiment intracellulaire est le signe d'une infection par un virus ou une bactérie. Au cours de l'évolution, les cellules ont donc acquis les mécanismes nécessaires à la détection de cette molécule en tant que motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMP) pour se protéger de telles infections : aujourd'hui, ce sont ces mécanismes qui sont exploités dans le cadre de l'immunothérapie et de la vaccination à ADN.

# A. Détection intracellulaire de l'ADN exogène

L'ADN introduit dans des cellules de mammifères est reconnu par divers récepteurs spécialisés dans la reconnaissance de motifs moléculaires spécifiques de pathogènes (PRR : pattern recognition receptors). Cette reconnaissance de l'ADN exogène peut être basée soit sur l'identification de particularités absentes de l'ADN génomique de la cellule, soit sur la détection d'ADN dans un compartiment cellulaire qui normalement n'en contient pas. Une fois l'ADN reconnu, deux grandes voies de signalisation peuvent être activées qui

déboucheront sur des réponses cellulaires différentes : l'une est une réponse transcriptionnelle qui conduit à l'expression de gènes pro-inflammatoires et d'interférons, l'autre est une cascade protéolytique qui conduit à l'assemblage de l'inflammasome, un complexe multiprotéique responsable de la secrétion d'interleukines (IL) par la cellule activée (Vilaysane and Muruve, 2009).

# 1. Récepteurs conduisant à l'activation de la transcription

# a TLR9

Les Toll-like receptors ou TLR sont des récepteurs transmembranaires spécialisés dans la reconnaissance de nombreux PAMP comme la flagelline, le lipopolysaccharide ou les acides nucléiques des pathogènes. Ils peuvent être situés au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane endosomale (Takeuchi and Akira, 2010).

Parmi eux, TLR9 est spécialisé dans la reconnaissance de l'ADN bactérien, qui présente la particularité d'être hypométhylé au niveaux d'îlots CpG, l'ADN des eucaryotes étant lui fortement méthylé au niveau de ces séquences. Exprimé principalement par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, TLR9 est localisé dans le réticulum endoplasmique et est transloqué vers les endosomes lorsque de l'ADN est internalisé. L'acidification des endosomes et l'activation des protéases acides lysosomales conduit au clivage de TLR9 qui est alors actif (Figure 20). Sa fixation à des CpG conduit alors au recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 (Myeloid differenciation primary response gene 88). Un complexe multiprotéique est alors formé, impliquant les kinases IRAK 1 et 4 (Interleukin-1 receptor associated kinase). IRAK1 conduit à la phosphorylation du facteur IRF7 (Interferon regulatory factor 7) qui est alors capable de gagner le noyau pour y activer la transcription des gènes des interférons de type I. IRAK4 conduit quand à elle à l'activation du facteur de transcription NFκB responsable de la transcription de gènes de cytokines pro-inflammatoires (Vilaysane and Muruve, 2009).

Bien que TLR9 ait une forte affinité pour l'ADN bactérien hypométhylé, il est également capable de reconnaître l'ADN du soi. Sa localisation endosomale permett une régulation spatiale de son activation, il peut cependant être impliqué dans des maladies autoimmunitaires comme le lupus érythémateux disséminé (Barrat et al., 2005). Son activation par l'ADN plasmidique utilisé pour le transfert de gènes in vivo peut également entraîner l'installation d'une réponse immunitaire contre le transgène, l'utilisation de plasmides ne

contenant pas d'îlots CpG permet donc de limiter ou d'empêcher son activation et d'obtenir une expression soutenue du transgène (Davies et al., 2012b).



Figure 20 – Translocation, activation et voies de signalisation de TLR9 suite à l'internalisation d'ADN hypométhylé par une cellule (Vilaysane and Muruve, 2009).

#### b ZBP1

ZBP1 (Z-DNA binding protein 1) ou DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) est une protéine cytosolique également impliquée dans la reconnaissance de l'ADN exogène. Découverte à l'origine dans le péritoine de souris porteuses d'ascites tumorales et caractérisée par sa capacité à lier la double hélice gauche de l'ADN Z, elle s'est rapidement avérée capable de lier la forme B de l'ADN (majoritaire dans les milieux physiologiques) et d'activer des voies de signalisation suite à cette liaison (Takaoka et al., 2007). Cette reconnaissance de l'ADN double brin est séquence-indépendante mais l'activation de ZBP1 nécessite un fragment d'ADN supérieur à 100 paires de base. ZBP1 est capable de former un complexe avec le facteur IRF3 via la kinase TBK1 (Tank binding kinase 1), ce qui aboutit à la phosphorylation d'IRF3 et à la transcription des interférons de type I (Figure 21). L'expression de ZBP1 étant elle-même inductible par les interférons, une boucle d'amplification du signal puissante se met en place suite à la pénétration d'ADN exogène dans la cellule. ZBP1 active également le facteur NFκB via les protéines RIP1 et RIP3 (Receptor interacting protein) (Vilaysane and Muruve, 2009).



Figure 21 – Reconnaissance de l'ADN exogène par ZBP1 et activation des voies de signalisation conduisant à la production d'interférons et de cytokines pro-inflammatoires (Vilaysane and Muruve, 2009)

#### c DHX

Des études ayant montré qu'une activation des interférons indépendante de TLR9 mais dépendante de MyD88 est possible dans des cellules stimulées par des CpG, deux protéines cytosoliques ont été indentifiées comme responsables de cette activation dans des cellules dendritiques : DHX-9 et DHX-36 ([DExD/H] box helicase). Plus précisément, DHX-9 lie les CpG-B et active NFkB pour aboutir à la production de TNF (tumor necrosis factor) et d'IL-6 alors que DHX-36 lie les CpG-A et active la production d'interférons de type I via IRF7. Ces deux protéines dépendent de MyD88 pour leur signalisation. MyD88 étant indispensable pour les réponses à l'ADN CpG, on peut le considérer comme la clé de voûte d'un système de détection de ce motif moléculaire dont le versant endosomal est constitué par TLR9 et le versant cytosolique par DHX-9 et DHX-36 (Kim et al., 2010b).

## d RIG-I et ARN polymérase III

La protéine RIG-I est un sensor cytosolique de l'ARN simple brin porteur d'un groupement triphosphate en 5', une forme d'acide nucléique fréquemment retrouvée chez les virus. Leur liaison entraîne la dimérisation de RIG-I et la formation d'un complexe multiprotéique avec, entre autres, la protéine IPS-1 (Interferon β promoter stimulator) insérée dans la membrane externe des mitochondries. L'activation du complexe entraîne la secrétion de cytokines pro-

inflammatoires via NFκB et celle des interférons de type I via TBK1 et IRF3/IRF7 Figure 22) (Yoneyama and Fujita, 2009).

Bien que RIG-I soit incapable de lier l'ADN double brin, il a été observé que l'introduction de poly(dAdT) dans des cellules entraîne le déclenchement d'une réponse dépendante de RIG-I. II s'est avéré que l'ARN polymérase III, normalement responsable de la transcription de petits ARN au niveau du noyau, est capable de transcrire dans le cytoplasme de l'ADN double brin porteur d'une extrémité 5'PPP, le ligand optimal de RIG-I. Ce sensor de l'ARN viral est donc indirectement un sensor de l'ADN double brin introduit dans le cytosol (Hornung and Latz, 2010).



**Figure 22 – Détection des acides nucléiques par RIG-I.** Après sa liaison à de l'ARN simple brin, RIG-I se dimérise et forme un complexe avec IPS-1 au niveau des mitochondries pour activer les vois de signalisation en aval. De l'ADN double brin introduit dans le cytosol peut être transcrit par l'ARN polymérase III sous forme d'ARN simple brin 5'ppp capable d'activer RIG-I. Adapté d'après (Yoneyama and Fujita, 2009)

#### 2. Récepteurs conduisant à la formation d'un inflammasome

## a AIM2

Bien que la plupart des voies de reconnaissance de l'ADN intracytosolique aboutissent à la production de cytokines pro-inflammatoires via NFkB et d'interférons via l'activation des IRF, il a également été observé que de l'ADNdb introduit dans des cellules entraîne la production d'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), capable d'induire l'inflammation, et d'IL-18 impliquée dans la mise en place de l'immunité à médiation cellulaire. Ces deux protéines sont généralement exprimées sous forme de pro-protéines qui sont clivées par la caspase-l suite à un stimulus, indiquant qu'une voie de signalisation radicalement différente de celle observée avec les sensors précédemments décrits est également en jeu. La protéine AIM2 (Absent in myeloma 2) a été identifiée comme la responsable de cette activation. Elle est capable de reconnaître de l'ADN double brin cytosolique et de lier et activer la procaspase 1 via la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-related speck-like protein). Ce complexe multiprotéique, ou inflammasome (Figure 23), entraîne la maturation des interleukines 1β et 18 gui sont secrétées par la cellule ciblée. L'assemblage de l'inflammasome AIM2 peut conduire à la pyroptose, une forme de mort cellulaire programmée proche de l'apoptose mais impliquant la perte de l'intégrité membranaire de la cellule contrairement à cette dernière (Vilaysane and Muruve, 2009; Hornung and Latz, 2010)



**Figure 23 – Formation d'un inflammasome suite à la reconnaissance d'ADNdb par AIM2.** AIM2 active la pro-caspase 1 via la protéine ASC (Vilaysane and Muruve, 2009)

Cette description, non exhaustive, de quelques systèmes de reconnaissance de l'ADN exogène introduit dans des cellules de mammifère illustre leur redondance, et montre que l'ADN peut être utilisé comme un puissant activateur de l'immunité innée. Si cette propriété peut s'avérer délétère dans le cadre de la thérapie génique, conduisant à la perte de l'expression du transgène (Arruda et al., 2009), elle peut également être exploitée dans le cadre de la vaccination à ADN pour augmenter l'immunogénicité de l'antigène exprimé par les cellules ciblées.

Cette description non exhaustive des voies de reconnaissance intracellulaires de l'ADN exogène est résumée dans la Figure 24.



**Figure 24 – Schéma de synthèse des voies de reconnaissance de l'ADN exogène par les cellules transfectées.** Cercles bleus : ADN double brin non-CpG. Cercles rouges : ADN double brin CpG.

## B. Vaccination à ADN

Cette partie des **Généralités** est liée à un travail collaboratif ayant fait l'objet d'une publication dans la revue *Human gene therapy* : Beilvert,F., Tissot,A., Langelot,M., Mevel,M., **Chatin,B.**, Lair,D., Magnan,A., and Pitard,B. (2012). **DNA/Amphiphilic Block Copolymer Nanospheres Reduce Asthmatic Response in a Mouse Model of Allergic Asthma**. Hum. Gene Ther. *23*, 597-608 (Beilvert et al., 2012).

Les systèmes de reconnaissance des acides nucléiques exogènes constituent la première ligne de défense des cellules contre des parasites intracellulaires (virus, bactéries...). Leur capacité à induire une réponse adaptative efficace à médiation cellulaire a rapidement été envisagée pour le développement de nouveaux vaccins basés sur l'ADN. En effet, si les vaccins classiques sont généralement évalués sur leur capacité à induire l'expression d'anticorps ciblés contre un antigène donné, dans certaines situations la mise en place d'une immunité à médiation cellulaire apte à détruire des cellules infectées ou anormales est plus souhaitable. On observe justement, dans la mise en place des réactions immunitaires adaptatives consécutives à l'introduction d'ADN dans des cellules de mammifère, la génération de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et de lymphocytes auxilliaires TH1 favorisant la réponse cellulaire. Cette réponse dépend en partie de l'activation de TLR9, mais surtout de l'activation de voies de signalisation impliquant TBK1, illustrant l'importance des systèmes de reconnaissance intracellulaire de l'ADN dans cette situation (Desmet and Ishii, 2012).

Dès 1993, il a été établi que l'injection intramusculaire chez la souris d'un plasmide encodant la nucléoprotéine du virus influenza entraîne la production de la protéine, suivie de l'apparition d'anticorps et de lymphocytes cytotoxiques conférant une immunité antivirale aux souris traitées. L'avantage d'un tel système est que contrairement aux protéines de surface du virus habituellement utilisées dans les vaccins, la nucléoprotéine est très conservée et confère donc une immunité contre plusieurs souches de virus. Cette protéine, présentée dans les CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) des cellules infectées, est en revanche masquée dans le virus mature, rendant l'immunité humorale inefficace contre cette cible. Le développement d'une réponse cellulaire dirigée directement contre les cellules infectées et donc un avantage non négligeable sur les vaccins sous-unitaires (Montgomery et al., 1993). Cependant, la dose de plasmide nécessaire à cette immunisation chez la souris (400 µg) rend cette technique difficile à transposer chez l'homme.

En effet, des protocoles de vaccination à base d'ADN nu testés sur l'homme pour le traitement ou la prévention de pathologies variées (lymphome B, VIH-1, malaria...) ont permis la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique mais insuffisante pour

conférer une protection aux patients traités, malgré les doses très importantes d'ADN mises en œuvre dans ces études (jusqu'à 2,5 mg par injection) (Boyer et al., 2000; Wang et al., 2001; Timmerman et al., 2002) Le développement de vecteurs efficaces permettant l'expression d'un antigène à un niveau suffisant pour entraîner la mise en place d'une réaction immunitaire a depuis permis de diminuer la dose d'ADN nécessaire

Notre équipe a participé à un travail collaboratif sur le développement d'un protocole de vaccination à ADN contre un antigène modèle, la β-galactosidase, chez la souris. Le 704, un copolymère à blocs tétrabranché dont l'efficacité de transfert de gène a été montrée précédemment (Pitard et al., 2004). L'utilisation de ce vecteur a permis de diminuer d'un facteur 50 la dose d'ADN codant nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire efficace par rapport à de l'ADN nu, mais nécessite toutefois la présence d'une quantité non négligeable d'ADN non codant. Cet ADN, un plasmide dépourvu de séquences codantes eucaryotes mais porteur de motifs CpG, agit comme un adjuvant en stimulant les récepteurs intracellulaires des acides nucléiques pour conduire à la mise en place de la réponse. Il est également probable que ce plasmide adjuvant protège partiellement le plasmide codant de la dégradation lors de son trafic extracellulaire en saturant les nucléases présentes dans le milieu interstitiel. Ce système a permis l'inhibition in vivo chez la souris de la croissance de tumeurs hépatiques exprimant la β-gal, illustrant la mise en place d'une immunité anticancéreuse pouvant avantageusement être exploitée dans le développement de vaccins dirigés non pas contre des pathogènes mais contre des cellules du soi modifié (McIlroy et al., 2009). Suite à ces travaux, un protocole de vaccination contre le carcinome hépatocellulaire chez la souris a été développé. Dans 80 % de ces cancers hépatiques, on observe une réexpression de l'AFP (alpha-foetoprotéine) normalement absente chez l'adulte. Cette protéine constitue donc une cible de choix pour le traitement de tels cancers par immunothérapie. De plus, elle constitue un bon marqueur pronostic de la récurrence de tumeurs après ablation. L'apparition de tumeurs a été induite chez des souris par injections de diéthylnitrosamine. Quatre et cinq mois après ce traitement, les souris ont reçu en injection intramusculaire 10 µg de plasmide encodant l'AFP formulé au 704. Ceci a conduit au développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire robuste et à la réduction du nombre et du volume des nodules tumoraux dans le foie des souris vaccinées. Ces résultats confirment la capacité copolymères à blocs amphiphiles à être utilisé comme adjuvants efficaces dans la formulation de vaccins à ADN basés sur de faibles doses de plasmide (Cany et al., 2011).

Plus récemment, notre équipe a participé à une étude sur la diminution des symptômes de l'asthme allergique suite à la vaccination contre un antigène d'acarien effectuée au moyen d'un plasmide formulé au polymère 704. Ces travaux seront présentés dans le **chapitre 3 des résultats**.

# Chapitre 5 - Délivrance intracellulaire de protéines

Cette partie des **Généralités** est liée à un travail collaboratif faisant l'objet d'une soumission dans la revue *Biomaterials* : **Chatin,B**. Mével,M., Lambert,O. and Pitard,B. **Supramolecular assemblies for the intracellular delivery of proteins** et qui sera détaillé dans le **chapitre 4 des résultats**.

Parallèlement aux acides nucléiques, les protéines constituent l'autre grande classe de macromolécules utilisées dans le champ des biothérapies. L'origine de leur utilisation remonte aux années 1920. Trente ans après la mise en évidence de la fonction hypoglycémiante du pancréas par O. Minkovski et J. von Mering, F. Banting isole du pancréas de chiens la protéine qui en est responsable : l'insuline. Rapidement, elle est testée sur l'homme : l'insuline de bœuf permet de traiter sept patients diabétiques (Banting et al., 1922). La production de masse par les laboratoires Eli Lilly l'année suivante fait rapidement passer le statut du diabète de type I de celui maladie mortelle à celui de pathologie chronique (Karamitsos, 2011). D'autres protéines d'origine humaine ou animale seront isolées et utilisées dans les décennies suivantes en médecine humaine comme l'hormone de croissance en 1956 (Blizzard, 2012). La résolution de la structure de l'insuline, première protéine à être séquencée, par F. Sanger en 1953 (Stretton, 2002), puis l'avènement de la biologie moléculaire dans les années 1970, ont amené à la commercialisation de la première insuline recombinante en 1982, évitant le recours à des produits animaux ou humains pouvant présenter des problèmes de sécurité. Aujourd'hui, plus de 120 protéines recombinantes sont autorisées en médecine humaine (Dingermann, 2008). Leurs fonctions et leurs applications sont variées : on y trouve aussi bien des hormones comme l'érythropoïétine ou l'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), utilisées respectivement le traitement des anémies hypoplasiques et de certains retards de croissance (Eschbach et al., 1987; Fintini et al., 2009) que des enzymes comme la DNAse I ou la glucocérébrosidase, utilisées pour pallier à certains déficits génétiques (Fuchs et al., 1994; Aviezer et al., 2009) ou des anticorps monoclonaux destinés au traitement de cancers ou de maladies auto-immunes, comme le Rituximab ou le Trastuzumab (Bange et al., 2001; Maloney, 2012). La plupart de ces protéines à usage thérapeutique visent des cibles extracellulaires, à quelques exceptions près. En effet, tout comme les acides nucléiques, la plupart des protéines ne peuvent pas franchir spontanément les membranes plasmiques du fait de leur masse et de leur charge électrique. Pourtant, la possibilité d'atteindre des cibles intracellulaires offrirait un champ d'application aussi vaste que celui des cibles extracellulaires, en offrant la possibilité d'étudier directement la fonction d'une protéine dans

un but de recherche, mais également d'activer ou d'inhiber des voies de signalisation, de moduler l'expression génétique au moyen de facteurs de transcription, ou de bloquer des cibles intracellulaires au moyen d'anticorps. Des techniques destinées à délivrer des protéines au sein de cellules vivantes constituent donc un outil utile sur le plan de la recherche fondamentale et constitueraient à terme une nouvelle approche thérapeutique de certaines pathologies, offrant notamment une alternative à la thérapie génique dans les cas où l'expression d'un transgène n'est pas utile ou souhaitable sur une longue période.

# A. Vecteurs pour la délivrance intracellulaire de protéines

## 1. Méthodes physiques

# a Micro-injection

La micro-injection constitue la manière la plus directe de délivrer un composé dans le cytoplasme ou le noyau de cellules en culture. Applicable à tout type de molécule, elle permet notamment la délivrance de protéines pour des études fonctionnelles. Ainsi, l'injection dans des fibroblastes de rat d'anticorps bloquants dirigés contre le proto-oncogène c-fos (cellular FJB osteosarcoma virus-like oncogene) a permis de mettre en évidence son implication dans la régulation temporelle du cycle cellulaire (Riabowol et al., 1988). Des protéines naturellement présentes dans les cellules peuvent également être délivrées afin d'étudier leur mécanisme d'action : la délivrance par micro-injection de protéines RACKs (receptors for activated C-kinase) a été utilisée pour observer leur effet sur la translocation et l'activité de la PKC (Smith and Mochly-Rosen, 1992). Si elle est relativement simple à mettre en œuvre sur des cellules en culture, cette technique présente toutefois l'inconvénient de traiter les cellules une par une, empêchant sa mise en œuvre à l'échelle d'un tissu. Elle est en outre traumatisante pour les cellules, surtout lorsqu'il s'agit de cellules primaires ou fragiles : un taux de survie de 50% de neurones micro-injectés est ainsi considéré comme satisfaisant (Komarova et al., 2007). Cette technique est donc utile pour l'étude de la fonction d'une protéine sur un petit nombre de cellules mais est techniquement difficile à mettre en œuvre à l'échelle d'un tissu ou même à l'échelle d'une culture cellulaire conséquente.

## b Electroporation

Cette technique a été développée par E. Neumann au début des années 1980 pour palier au manque de vecteurs efficaces pour la délivrance d'acides nucléiques dans des cellules en culture. Des observations dans la décennie précédente ont montré que sous l'influence d'un champ électrique intense, les membranes biologiques peuvent être perméabilisées de façon transitoire. En se basant sur ces résultats, un protocole a été développé consistant à soumettre des cellules en culture à un champ électrique de 800 kV/m en présence d'ADN. Même si le rendement est faible (0,01 % de cellules transfectées), elle est considérée comme efficace par rapport aux techniques en usage à cette époque (Neumann et al., 1982). Des améliorations concernant le milieu extracellulaire utilisé, la quantité d'ADN appliquée aux cellules et les caractéristiques des impulsions électriques ont permis d'augmenter considérablement la proportion de cellules transfectées, généralement de 15 à 50%, toutefois la mortalité cellulaire causée par le choc électrique reste importante, de l'ordre de 50 à 90% (Guo et al., 2012). Cette technique a également été adaptée au transfert d'ADN dans des cellules procaryotes et est aujourd'hui rapidement répandue en routine dans les laboratoires pour transformer des bactéries (Drury, 1994).

Le mécanisme de l'électrotransfert est encore mal compris car il met en jeu des mécanismes très rapides difficiles à étudier, et plusieurs théories ont été proposées pour expliquer ce phénomène, mais toutes reposent sur la création, l'élargissement puis la fermeture de pores hydrophiles transitoires de 20 à 120 nm dans la membrane sous l'action du champ électrique. Il a été proposé que l'augmentation de la pression dans la membrane, due aux forces électrostatiques, provoque une transition de phase des phospholipides qui adoptent une structure non lamellaire conduisant à l'apparition des pores. Une autre théorie envisage l'existence permanente de nano-pores hydrophobes existant en permanence dans les bicouches lipidiques du fait des fluctuations thermiques des phospholipides, qui seraient élargis par l'application du champ électrique et subiraient une transition vers des pores hydrophiles par ré-orientation des lipides (Ho and Mittal, 1996).

Malgré cette compréhension limitée du phénomène, l'électroporation est aujourd'hui largement utilisée pour délivrer ADN ou siRNAs in vitro, et est également appliquée in situ pour la délivrance intramusculaire de gènes. La transfection des cellules n'ayant lieu qu'entre les électrodes, elle est difficile à mettre en œuvre à l'échelle d'un organe entier dans une optique remplacement de gène, mais est en revanche utile dans le domaine de la vaccination : plusieurs essais cliniques de phase I et II au cours des dernières années ont montré l'efficacité de cette technique pour des vaccins préventifs (VIH, papillomavirus, paludisme) ou curatifs (cancer de la prostate, hépatite C) (Sardesai and Weiner, 2011).

L'électroporation a également été appliquée à la délivrance de protéines dans des cellules en culture. La délivrance d'anticorps notamment a été utilisée pour étudier la fonction de leur cible intracellulaire, par exemple le domaine C-terminal du récepteur à l'insuline humain ou le transporteur du glucose Glut-1 (Campbell et al., 1995). Les limitations de la technique sont cependant les mêmes que dans le cas des acides nucléiques, à savoir une mortalité importante (50-75 %) et un rendement dépendant du type cellulaire mais généralement inférieur à 50 % (Yeo et al., 1994). La délivrance in vivo de protéines par électroporation est encore peu utilisée mais une stratégie basée sur des micro-électrodes a récemment permis la délivrance intracellulaire de BSA et d'ADN (Choi et al., 2012).

# 2. Internalisation spontanée

Parallèlement aux méthodes physiques, des approches basées sur des processus existants dans les cellules ont été développées : certaines protéines d'origine animale, végétale, virale ou bactérienne ont en effet la capacité de traverser les différentes barrières cellulaires pour accéder au cytoplasme. Les mécanismes et les voies qu'elles empruntent ont été détournés pour mettre au point des systèmes de délivrance intracellulaire dont certains sont déjà utilisés en médecine humaine.

## a Immunotoxines

Les immunotoxines, crées par le couplage d'un anticorps et d'une toxine, constituent un cas particulier de système de délivrance intracellulaire de protéines. Il se base sur la capacité qu'ont certaines toxines protéiques comme la ricine, la toxine diphtérique ou la shiga-toxine, dites AB-toxines, d'accéder au cytosol depuis le milieu extracellulaire. De telles protéines sont généralement composées de deux domaines : un domaine de liaison B qui permet l'attachement à la membrane et la translocation vers le cytosol, et un domaine catalytique A dont le rôle est de tuer la cellule en bloquant une cible intracellulaire.

Le cas de la ricine a été particulièrement étudié : cette glycoprotéine issue de *R. communis* est capable de se lier à la surface des cellules de mammifère de façon non spécifique grâce à la fonction lectine de son domaine B qui reconnaît des résidus galactose à leur surface, puis est internalisé par endocytose. La toxine est dirigée vers l'appareil de Golgi par le transport rétrograde des endosomes, puis vers le réticulum endoplasmique (Figure 25). La ricine est alors capable d'accéder au cytosol via la protéine Sec61a du complexe de translocation des protéines (translocon), dont la fonction initiale est d'insérer dans le

réticulum endoplasmique les protéines en cours de traduction ou d'en extraire les protéines mal conformées pour les diriger vers le protéasome (Sandvig and van, 2000). Une fois libéré dans le cytosol, le domaine catalytique A de la ricine provoque la dépurination spécifique d'une adénine en position 4324 de l'ARN ribosomal 28S, conduisant à l'arrêt de la synthèse protéique et à la mort cellulaire (Endo and Tsurugi, 1987). La toxine diphtérique agit selon un schéma similaire malgré des différences dans la voie empruntée : une fois endocytée, elle est soumise à l'acidification des endosomes et est partiellement dénaturée. L'exposition de résidus hydrophobes normalement enfouis dans la structure de la protéine entraîne son insertion dans la membrane, où la chaîne B forme un canal qui facilite l'échappement endosomal de la chaîne catalytique A (Figure 25) (Falnes and Sandvig, 2000). Cette chaîne catalyse la ribosylation du facteur d'élongation 2 (eEF2), ce qui aboutit comme dans le cas de la ricine à la mort de la cellule par arrêt de la traduction des protéines (Holbourn et al., 2006).

La possibilité d'utiliser de telles toxines pour tuer spécifiquement des cellules a été exploitée dès les années 1970, en les couplant à des anticorps permettant le ciblage vers un type cellulaire particulier. La toxine diphtérique couplée chimiquement à des IgG de porcs immunisés contre le virus des oreillons a été utilisée pour lyser spécifiquement des cellules de singe infectées par ce virus (Moolten and Cooperband, 1970). Une décennie plus tard, il a été montré que le couplage de la chaîne catalytique A de la ricine à divers anticorps anti-IgG permet la lyse sélective de lymphocytes produisant les IgG ciblées, offrant la possibilité de traiter des lymphomes B par ce type d'immunotoxine (Krolick et al., 1980).

Les immunotoxines sont aujourd'hui approuvées en médecine humaine, essentiellement dans le domaine de la cancérologie. Le DAB<sub>389</sub>IL-2, ou Denileukin diftitox, est une protéine de fusion combinant le domaine catalytique de la toxine diphtérique et l'interleukine-2 (IL2). Capable de se lier aux cellules exprimant le récepteur à l'IL-2, il est internalisé et la sousunité catalytique est libérée dans le cytosol des cellules ciblées. Autorisé par la FDA en 1999, il est aujourd'hui utilisé dans le traitement de nombreux syndromes prolifératifs comme les lymphomes à cellules B ou T, ou les leucémies associées à une infection par le HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus 1). Malgré des effets secondaires non négligeables (hypersensibilité aigüe et syndrome d'hyper-perméabilité vasculaire suite à l'injection) et l'apparition progressive chez les patients d'anticorps anti- DAB<sub>389</sub>IL-2, il donne des résultats satisfaisants (de 15 à 50 % de rémission complète suivant la pathologie traitée) et son utilisation pour d'autres pathologies (réaction du greffon contre l'hôte, psoriasis ou arthrite rhumatoïde) est aujourd'hui à l'étude (Manoukian and Hagemeister, 2009). A l'heure actuelle, une quarantaine d'immunotoxines sont engagées dans des essais cliniques de phase I à III pour évaluer leur efficacité dans le traitement de lymphomes, de tumeurs solides et de maladies auto-immunes (Pastan et al., 2007; Madhumathi and Verma, 2012).

Les immunotoxines sont des outils puissants mais malgré le greffage d'un anticorps qui permet le ciblage d'un type cellulaire particulier, la partie toxique de la molécule agit généralement sur des cibles ubiquitaires : cette relative absence de spécificité est en partie responsable de leurs effets secondaires. Une approche basée sur la délivrance intracellulaire de protéines humaines pro-apoptotiques, plus spécifiques, est à l'étude. Par exemple, une étude récente a montré que la fusion de la protéine pro-apoptotique Bax (Bcl-2 associated X protein) avec le facteur BlyS (B-lymphocyte stimulator) provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans des lymphomes non hodgkiniens exprimant fortement le récepteur de BlyS. Si les résultats montrent que cette toxine chimérique accède au cytoplasme des cellules après la liaison de BlyS à ses récepteurs de surface, le mécanisme exact d'entrée n'est pas détaillé (Lyu et al., 2012a). Cette stratégie semble cependant prometteuse et d'autres toxines basées sur BlyS ont montré leur efficacité in vivo dans des études précliniques (Wen et al., 2011; Lyu et al., 2012b).



**Figure 25 - Voies d'accès au cytosol de différentes AB-toxines.** La toxine (AB) se un récepteur de surfa ce (Y) via son domaine de liaison (B). Le domaine catalytique (A) est libéré dans le cytosol depuis les endosomes ou depuis le réticulum (ER) après un passage par le réseau transgolgien (TGN). (Falnes and Sandvig, 2000).

En dehors du domaine de la cancérologie, il est possible d'utiliser la spécificité de certaines toxines pour un type cellulaire donné afin d'y délivrer des protéines de façon ciblée. Le domaine de liaison (non toxique) de la toxine tétanique, qui présente un tropisme pour les neurones, a été fusionné à la superoxyde-dismutase 1 (SOD-1) et injecté dans le liquide cérebrospinal de souris. Les résultats de cette étude ont montré que la protéine est délivrée

spécifiquement dans les neurones et conserve l'activité antioxydante de la SOD-1 (Benn et al., 2005). Le trafic intra et extracellulaire de la protéine n'est pas détaillé mais suit probablement celui de la toxine tétanique, à savoir une internalisation récepteur-dépendante et un trafic rétrograde via les endosomes vers le corps cellulaire (Lalli et al., 2003).

### b Domaines de transduction protéique

Une autre stratégie pour la délivrance intracellulaire de protéines est basée sur l'utilisation de séquences peptidiques capables de traverser spontanément la membrane plasmique : les domaines de transduction protéiques (PTD) ou cell penetrating peptides (CPP). Ces séquences ont été mises en évidence il y a une vingtaine d'années, majoritairement dans des facteurs de transcription capables d'entrer dans des cellules pour y exercer leur action. En 1988, il est observé que la protéine TAT (Transcription transactivating protein) du VIH est capable d'entrer spontanément dans des cellules en culture, de s'accumuler dans le noyau et d'y activer le promoteur contenu dans le LTR (long terminal repeat) du VIH. Le fait que la chloroquine améliore l'entrée de la protéine dans les cellules suggère un mécanisme impliquant les endosomes (Frankel and Pabo, 1988). Trois ans plus tard une étude sur la protéine Antennapedia de la drosophile, impliquée dans la morphogénèse, montre que son domaine homeobox de 60 acides aminés est capable d'entrer spontanément dans des neurones en culture et de provoquer leur différenciation (Joliot et al., 1991), et conserve cette activité lorsqu'il est fusionné à un peptide exogène, en faisant un vecteur potentiel pour la délivrance de protéines (Perez et al., 1992). Rapidement, les séquences minimales responsables de ce phénomène ont été isolées. Il s'agit de peptides courts et riches en acides aminés basiques, positivement chargés à pH physiologique : RQIKIYFQNRRMKWKK pour le facteur Antennapedia, YGRKKRRQRRR (TatP) pour la protéine TAT. De nombreux autres peptides présentant cette propriété ont été mis en évidence dans les années suivantes, dérivés de protéines existantes ou totalement synthétiques comme un simple peptide polyarginine (Arg<sub>8</sub>) (Heitz et al., 2009).

La capacité de ces séquences à accéder au cytosol a été mise à profit pour délivrer de nombreux types de macromolécules in vitro comme in vivo. La fusion de PTDs issus de la protéine VP22 du virus de l'herpès avec des protéines cargo a permis la délivrance in vitro de protéines rapportrices de taille nettement plus importante que le PTD lui-même (GFP, β-Gal, HSV-TK) (Ford et al., 2001). Plus intéressant, l'injection intrapéritonéale chez la souris d'une protéine de fusion TatP-β-Gal conduit à l'accumulation de la protéine dans de nombreux tissus, dont le foie, les poumons, les reins et le muscle cardiaque, et également dans le système nerveux central, montrant la capacité de ce système à franchir la barrière

hémato-encéphalique (Schwarze et al., 1999). Les propriétés de ces peptides ont également été utilisées pour la délivrance de facteurs de transcription afin d'obtenir des cellules souches pluripotentes induites (iPSc). Ces cellules sont obtenues à partir de cellules adultes par transfection de facteurs de transcription spécifiques qui les ramènent à un état de différenciation proche de cellules souches embryonnaires. Les gènes codant ces facteurs ont tendance à s'intégrer dans le génome des cellules traitées, interdisant leur utilisation chez l'Homme dans des thérapies de remplacement cellulaire : la possibilité d'introduire ces facteurs dans les cellules directement sous forme protéique est donc un enjeu majeur dans le domaine des iPSc. L'équipe de K.S. Kim a montré que la fusion des facteurs Oct3/4, Sox2, KIf-4 et c-Myc avec un peptide composé de neuf arginines permet leur délivrance dans des fibroblastes humains en culture. Ces facteurs s'accumulent dans le noyau des cellules traitées et permettent l'induction de la pluripotence, avec toutefois un rendement faible (0,001 %) et une toxicité non négligeable, démontrant la possibilité de reprogrammer des cellules somatiques sans intervention génomique (Kim et al., 2009).

Le mode d'action de cette nouvelle classe de vecteurs est encore mal compris. La charge positive de ces peptides leur permet d'interagir avec la membrane des cellules ciblées, et dans le cas de TatP le rôle des protéoglycanes dans l'attachement à la membrane semble essentiel. Par ailleurs, cette charge positive semble être l'élément clé du processus d'internalisation puisque les peptides issus de TAT et d'Antennapedia apparaissent déstructurés et que l'introduction de prolines dans leurs séquences, qui provoquent des courbures de la chaîne peptidique, n'a pas d'influence sur leur capacité à entrer dans les cellules (Schwarze et al., 2000), indiquant que les propriétés physicochimiques de ces peptides sont plus importantes que leur structure tridimensionnelle pour leur fonction. Les premières études sur les PTD ont suggéré une entrée directe dans le cytosol par perturbation de la membrane plasmique : la charge positive de ces peptides leur permet d'interagir avec les phospholipides négativement chargés de la membrane et d'induire la formation de micelles inverses ou de pores hydrophiles. Ce modèle n'est toutefois pas satisfaisant pour expliquer l'internalisation de PTD couplés à des protéines de masse importante comme la β-Gal (Lundberg and Langel, 2003). Plus récemment, de nombreuses études ont mis en évidence l'importance de l'endocytose dans le processus d'internalisation de conjugués PTD-protéine cargo : il semble que si l'entrée directe dans le cytosol est possible, elle n'intervient que pour des concentrations de peptide importantes au niveau de la membrane plasmique (jusqu'à 10 µM) et ne permet pas d'expliquer l'entrée de peptides conjugués à TatP dans des cellules à des concentrations nettement inférieures (5 nM). Les voies d'endocytose en jeu dans le processus d'internalisation de ces complexes sont discutées et les différentes études sur le sujet ne permettent pas de trancher entre

macropinocytose, endocytose clathrine-dépendante ou endocytose cavéole-dépendante. Il est probable que les voies d'entrée soient dépendantes de la nature du PTD, de son cargo et du type cellulaire ciblé, et que plusieurs voies d'entrée coexistent pour un même PTD. Dans le cas de TatP cependant, il semble que la macropinocytose soit la voie principale d'internalisation : le suivi par microscopie confocale de peptides TatP couplés à des quantum dots (QD) a montré que la liaison du peptide aux protéoglycanes de surface de cellules HeLa provoque le recrutement et l'activation de la protéine Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) qui induit une réorganisation du réseau d'actine sous-membranaire conduisant à l'internalisation de TatP dans une vésicule de macropinocytose (Suzuki, 2012). L'entrée dans la cellule par endocytose implique que ces vecteurs sont capables de promouvoir l'échappement endosomal afin d'accéder au cytosol. Là encore, plusieurs modalités semblent entrer en jeu selon le peptide considéré. Dans le cas de la sous-unité HA2 de la protéine HA (hémagglutinine) du virus influenza, la protonation des acides glutamique et aspartique lors de l'acidification de l'endosome provoque un changement de conformation vers une structure en hélice hydrophobe capable de s'insérer dans la membrane et de la déstabiliser (El Sayed et al., 2009; Varkouhi et al., 2011). Le cas de TatP est sujet à controverse : si les premières études ont montré qu'il est capable de franchir la barrière endosomale, des études récentes ont suggéré que cet effet est en réalité un artefact de fixation et que l'utilisation d'agents lysomotropiques comme la chloroquine est nécessaire pour promouvoir cette étape essentielle dans la transduction du peptide et de son cargo (Caron et al., 2004; Chauhan et al., 2007).



**Figure 26** – **Mécanisme de délivrance intracellulaire d'une protéine exogène couplée à un PTD.** (a) Attachement à la membrane par interaction électrostatique. (b) Passage de la membrane plasmique (hypothèse d'une délivrance directe dans le cytosol) ou passage de la membrane endosomale dans le cas d'un mécanisme d'entrée par endocytose. (c) Repliement de la protéine exogène sous sa conformation active par les chaperonnes intracellulaires (Schwarze et al., 2000).

Il a été observé que le processus d'internalisation médié par les PTD implique la dénaturation de la protéine cargo, probablement lors du passage dans l'environnement hydrophobe de la membrane dans le cas d'une délivrance directe ou bien suite à l'acidification des endosomes dans le cas d'une entrée par endocytose. La protéine cargo doit donc être repliée sous sa conformation active par les chaperonnes présentes dans le cytosol (Figure 26). Cette étape paraît être un des facteurs limitants du processus de délivrance : si l'incubation d'une protéine de fusion TatP-GFP avec des cellules en culture conduit à l'internalisation d'une quantité importante de GFP dans le cytosol, une fraction seulement de celle-ci est sous sa forme active (fluorescente), le reste étant dénaturé (Bonifaci et al., 1995; Schwarze et al., 2000).

Si les PTD présentent un grand intérêt dans le domaine de la délivrance intracellulaire de protéines, ils peuvent également être couplés à d'autres types de cargos comme des siRNAs ou des oligonucléotides antisens (van den Berg and Dowdy, 2011). Il a également été montré que ces peptides sont capables de délivrer des plasmides de masse moléculaire importante in vitro et in vivo : le couplage du domaine de transduction du facteur de transcription humain Hph1 avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4 de la levure a permis la transfection de cellules en culture avec une efficacité comparable à celle de la Lipofectamine, mais également le tissu pulmonaire après instillation intranasale chez la souris (Kim et al., 2010a).

#### c Virus recombinants

Les PTD, souvent issus de protéines virales, permettent la délivrance de protéines et d'autres composés dans des cellules vivantes. Toutefois, leur efficacité est limitée par leur faible échappement endosomal. Une stratégie proche est basée sur l'utilisation de pseudoparticules virales (VLP) qui combinent les capacités d'internalisation et d'échappement endosomal des virus. Il a été montré que la fusion d'une protéine cargo avec un mutant de la protéine Nef du VIH-1 permet son incorporation dans l'enveloppe de particules virales vides. Le traitement de cellules en culture avec ces VLP recombinantes a permis la délivrance de GFP dans des cellules en culture, mais également de la protéine HSV-TK sous forme fonctionnelle, montrant que la protéine cargo est effectivement délivrée dans le cytosol des cellules traitées (Peretti et al., 2005; Muratori et al., 2010). La présence potentielle de transcriptase inverse et d'intégrase dans ces VLP issues de lentivirus amenant un risque de mutagénèse dans les cellules traitées par ce système a amené à la mise au point de VLP dérivées de virus aviaires ne contenant pas ces enzymes. Ces VLP aviaires ont été utilisées pour délivrer la caspase-8 et la CRE-recombinase sous forme active dans des cellules en culture de manière efficace et de façon ciblée. Il est à noter que la même étude n'a pas pu mettre en évidence la délivrance de la CRE-recombinase par le peptide TatP, probablement à cause de l'échappement endosomal limité de ce système de délivrance (Kaczmarczyk et al., 2011). Malgré leur efficacité, ces systèmes basés sur les VLP présentent l'inconvénient d'être complexes à mettre en œuvre car ils nécessitent la fusion du gène de la protéine cargo avec celui d'une protéine virale pouvant résulter dans une perte de fonction de la protéine cargo, suivie de l'assemblage des VLP dans des cellules productrices puis de leur purification. De plus, comme dans le cas de la délivrance d'acides nucléiques par les vecteurs viraux, la taille du cargo est ici limitée : les VLP dérivées du VIH-1 peuvent prendre en charge une protéine de 630 acides aminée au maximum, ce qui correspond à environ 70 kDa (Muratori et al., 2010) et limite donc le champ d'application de ces systèmes de délivrance.

### 3. Vecteurs synthétiques

Parallèlement aux méthodes physiques et aux techniques reposant sur l'internalisation spontanée de certaines protéines, des vecteurs synthétiques ont été développés pour la délivrance intracellulaire de protéines. Ceux-ci sont inspirés des vecteurs pour la délivrance d'acides nucléiques qui ont été développés depuis la fin des années 1980 et reposent généralement sur les mêmes composés, avec des mécanismes d'action similaires.

#### a Polymères

Les copolymères à blocs amphiphiles non ioniques, dont l'utilisation comme vecteurs pour la délivrance d'acides nucléiques a été détaillée précédemment, peuvent être utilisés comme agents pour la délivrance intracellulaire de protéines. L'équipe de A. Kabanov a travaillé à la mise au point de méthodes de couplage de Pluronics avec une protéine modèle, la HRP (horse radish peroxidase) via une liaison chimique. Leurs observations ont montré que la HRP conjuguée au P85 ou au L81 s'accumule dans des cellules en culture quatre à cinq fois plus efficacement que la HRP libre. Le mode d'action de ce système n'est pas détaillé, cependant la longueur du bloc hydrophobe joue une importance cruciale puisque le P85 et le L81 (40 unités PPO) sont nettement plus efficaces que le L121 et le P123 (70 unités PPO), la longueur des blocs hydrophiles ayant peu d'influence. Ceci suggère un mode d'action indépendant de l'insertion de la partie hydrophobe du polymère dans la membrane plasmique (Yi et al., 2008). Ces résultats ont conduit la même équipe à délivrer des

protéines ayant un effet fonctionnel afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de ce système. La conjugaison de la SOD-1 avec le P85 ou le L81 a permis sa délivrance dans des neurones en culture sans signe de toxicité apparente, et l'enzyme y exerce son activité antioxydante. Cette approche pourrait être utilisée dans le traitement de l'hypertension induite par l'angiotensine II (dont les voies de signalisation intra-neuronales impliquent l'ion superoxyde O<sub>2</sub>) et plus généralement dans l'approche de pathologies liées à un stress oxydatif excessif (Yi et al., 2010). De tels conjugués Pluronics-protéines sont également actifs in vivo. Il a notamment été montré que le couplage de la leptine (hormone régulant la sensation de satiété) au P85 permet sa délivrance dans le système nerveux central après passage de la barrière hémato-encéphalique. S'il ne s'agit pas dans ce cas précis de délivrance intracellulaire stricto-sensu, puisque le récepteur de la leptine est situé à la surface des neurones ciblés, la traversée de la barrière hémato-encéphalique s'effectue par transcytose et implique donc l'entrée du conjugué P85-leptine dans les cellules qui la constituent avant d'être relarqué dans le milieu interstitiel du tissu nerveux. L'injection intraveineuse de ce composé permet de réduire efficacement la prise alimentaire des animaux traités, montrant que la leptine est délivrée sous forme active au niveau de son récepteur (Banks et al., 2011). D'autres polymères aux propriétés proches des Pluronics peuvent également être utilisés pour la délivrance intracellulaire de protéines, comme des copolymères à blocs de poly(2-oxazoline) (Tong et al., 2010).

Ces approches basées sur les copolymères à blocs amphiphiles, composés non ioniques par définition et donc incapables de former des liaisons électrostatiques fortes avec la protéine cargo, reposent sur la création de liaisons covalentes entre le polymère et la protéine, ce qui peut empêcher leur application à certaines protéines sensibles à la dénaturation ou aux modifications chimiques. Une méthode permettant la délivrance d'une protéine cationique, la RNAse A, à l'aide de Pluronics sans couplage à la protéine a été proposée : elle repose sur le polymère F127 chimiquement couplé à de l'héparine. La forte charge négative de l'héparine lui permet d'établir des liaisons électrostatiques avec la RNAse A. Le complexe F127-héparine : RNAse A est soluble à 4°C mais forme spontanément des assemblages supramoléculaires (nanogels) à 37°C par déshydratation et assemblage des blocs de PPO du F127. De tels nanogels ont une taille de l'ordre de 100 nm compatible avec une entrée par endocytose et ont permis de délivrer la RNAse A sous forme active dans des cellules HeLa. La mort des cellules ciblées, induite par la dégradation des ARN cytosoliques et nucléaires fait de ce nanogel un potentiel agent anticancéreux (Choi et al., 2010)

Une approche prometteuse basée sur des polyamidoamines a permis la délivrance d'une protéine modèle, l'albumine sérique humaine (HSA), in vitro dans des cellules intestinales

sécrétrices de mucus, un type de cellules habituellement difficiles à cibler. Les polyamidoamines sont des polymères cationiques capables de former un complexe supramoléculaire avec des composés anioniques, et elles ont été utilisées auparavant pour la délivrance de drogues, d'acides nucléiques et de protéines. Elles possèdent des amines tertiaires protonables qui leur permettent de favoriser l'échappement endosomal après endocytose des complexes par un mécanisme d'éponge à protons. Leurs propriétés les rapprochent donc de polymères cationiques plus couramment utilisés comme le PEI, tout en étant biodégradables et peu toxiques. L'originalité de cette étude tient en l'utilisation d'une polyamidoamine riche en ponts disulfure qui remplissent deux fonctions : ils permettent d'une part un temps de résidence prolongé des complexes au niveau de la couche de mucus entourant les cellules ciblées par la création de liaisons avec les groupements thiols et les ponts disulfure présents en grande quantité dans le mucus, favorisant ainsi leur contact avec les cellules et leur internalisation, et permettent d'autre part une dissociation efficace des complexe une fois situés dans le milieu intracellulaire réducteur. De tels composés permettent d'envisager la délivrance intracellulaire de protéines in vivo au niveau des mugueuses digestives, voir pulmonaires (Cohen et al., 2012).

Si la plupart des systèmes de délivrance intracellulaire de macromolécules ont pour but de véhiculer leur cargo jusqu'au cytosol et sont donc conçus pour favoriser l'échappement endosomal, il peut être dans certains cas utile de vectoriser une protéine vers les lysosomes, notamment dans pour le traitement des déficits en enzymes lysosomales. Une étude récente a montré qu'un polysaccharide modifié, le triméthyl-chitosan (TMC), forme des complexes positivement chargés de 200 nm de diamètre avec l'alpha-galactosidase (α-gal), l'enzyme déficiente dans la maladie de Fabry. Ces complexes sont endocytés et subissent l'acidification des endosomes. Le pouvoir tampon du TMC est insuffisant pour provoquer l'échappement endosomal par effet d'éponge à protons et ils sont donc dirigés vers les lysosomes. L'abaissement du pH amène en revanche l' $\alpha$ -gal à l'électroneutralité et stabilise sa structure, ce qui provoque la dissociation du complexe et le relargage de l'enzyme sous forme active dans le compartiment lysosomal (Giannotti et al., 2011). Une telle approche est prometteuse dans le traitement de la maladie de Fabry, qui repose à l'heure actuelle sur l'injection intraveineuse d'α-gal en quantité importante entraînant l'apparition d'anticorps anti- $\alpha$ -gal et occasionnant un coût de traitement élevé, et pourrait être appliqué à d'autre déficits en enzymes lysosomales (Schiffmann and Brady, 2006)

### **b** Vecteurs lipidiques

La plupart des vecteurs dédiés à la délivrance intracellulaire de protéines sont inspirés de ceux développés à l'origine pour le transfert d'acides nucléiques. Cependant, dans le domaine des vecteurs lipidiques, les premières macromolécules cargos ont été des protéines. En effet, si les premiers rapports concernant la délivrance d'acides nucléiques par des vésicules lipidiques remontent à la fin des années 1970 (Dimitriadis, 1978; Wilson et al., 1979; Fraley et al., 1980), des équipes se sont intéressées dès le début de la décennie à l'encapsulation d'enzymes. En 1971, l'équipe de B. Ryman a décrit la formulation d'une protéine modèle, l'albumine sérique humaine, et d'une enzyme, l'amyloglucosidase, avec des vésicules de lécithine:cholestérol:dicétyl phosphate. Le but de cette étude n'était pas de délivrer l'enzyme au sein de cellules vivantes mais d'améliorer sa biodistribution suite à une injection intraveineuse pour le traitement de déficits enzymatiques liés au métabolisme du glycogène. Les formulations proposées permettent une encapsulation de 5 à 10 % de la quantité initiale de protéine dans des vésicules multilamellaires et bien que cette étude ne comporte aucune donnée biologique, elle semble être une des premières à envisager la délivrance de protéines au moyen de vecteurs lipidiques (Gregoriadis et al., 1971). Peu après, l'équipe de K. Cherian a étudié l'interaction de liposomes cationiques de sphingomyéline:cholestérol:stéarylamine contenant l'enzyme HRP avec des cellules HeLa en culture. Leurs observations montrent que les liposomes augmentent d'un facteur 300 l'internalisation de la protéine par rapport à sa forme libre. Cependant, la protéine délivrée par ce vecteur n'est pas répartie dans le cytosol mais contenue dans des structures membranaires, indiquant soit un défaut d'échappement endosomal, soit un défaut de dissociation des liposomes (Magee et al., 1974). C'est dans la décennie suivante que la délivrance d'une protéine dans le cytosol de cellules en culture au moyen d'un vecteur lipidique sera rapportée. Reisine et al. ont utilisé des phospholiposomes pour introduire une protéine de 10kDa, l'inhibiteur de la protéine kinase A (PKI), dans des cellules de tumeur pituitaire AtT-20. Pour favoriser l'interaction de ces liposomes ave les cellules AtT-20 exprimant N-CAM (Neural cell adhesion molecule), les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-N-CAM et les liposomes, après encapsulation du PKI, ont été chimiquement couplés à la protéine A de S. aureus capable de se lier fortement au fragment Fc des immunoglobulines. L'internalisation de tels complexes liés à des protéines de surface repose probablement sur une endocytose récepteur-dépendante. Le PKI délivré de cette manière a permis de bloquer la sécrétion d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) induite dans ces cellules par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), indiquant que ce système est capable de délivrer la protéine cargo dans le cytosol des cellules traitées, entraînant l'inhibition de la PKA responsable de la sécrétion d'ACTH (Reisine et al., 1985; Reisine et al.,

1986). Malgré son efficacité, la complexité de ce système et l'impossibilité de le transposer à des applications in vivo ont probablement limité son développement ultérieur.

Les lipides cationiques développés à la fin des années 1980 ont permis une rupture dans le domaine de la vectorisation d'acides nucléiques (Felgner et al., 1987) et ont rapidement été mis à profit dans le domaine de la délivrance intracellulaire de protéines, en permettant de se passer des systèmes complexes d'attachement aux cellules développés précédemment. Des liposomes de DOTMA ont été utilisés pour délivrer dans des cellules en culture un fragment de 149 résidus du récepteur aux glucocorticoïdes possédant une activité de facteur de transcription. Après 30 minutes d'exposition, la protéine est localisée dans les noyaux de 20 % des cellules traitées. Si seulement 0.2 % de la quantité initiale de protéine (125 µg) est effectivement internalisée en utilisant ce système, ceci est suffisant pour activer la transcription d'un plasmide rapporteur délivré simultanément ou séparément dans les cellules par le même système de vectorisation. Ces résultats indiquent que le facteur de transcription atteint le cytosol puis le noyau où il exerce son activité. Il n'est cependant pas certain que la DOTMA seule puisse promouvoir l'échappement endosomal des complexes puisque ces expériences ont été réalisées en présence de chloroquine. Étonnamment, des liposomes de DOTMA:DOPE particulièrement efficaces dans le cas de la délivrance d'acides nucléiques se sont avérés nettement moins performants que la DOTMA seule pour délivrer le facteur de transcription, indiguant que les paramètres de formulation optimaux établis pour les acides nucléiques ne sont pas transposables à la délivrance de protéines (Debs et al., 1990). A la même époque, la découverte des PTD et de leur capacité à transporter des protéines jusqu'au cytosol de cellules vivantes semble avoir éclipsé le potentiel des lipides cationiques dans ce domaine, et il faudra une dizaine d'années pour que de nombreux groupes de recherche se consacrent à la mise au point de formulations lipidiques pour la vectorisation de protéines.

L'équipe de C. Férec a décrit en 2000 la délivrance intracellulaire de  $\beta$ -gal dans des cellules primaires pulmonaires de souris par le GLB73 (Figure 27), un phosphonolipide cationique initialement développé pour le transfert de gènes. Plus intéressant, l'administration intratrachéale de  $\beta$ -gal formulée au GLB73 chez la souris a conduit à la délivrance de l'enzyme dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium bronchique, son activité y étant détectable quatre jours après le traitement. Des observations en microscopie électronique ont montré que la protéine et le lipide forment un complexe multilamellaire peu condensé, probablement par le biais d'interactions électrostatiques. Il est à noter que le GLB43, un composé différent du GLB73 par la longueur de sa chaîne hydrocarbonée et la présence d'une insaturation (Figure 27) et inefficace pour le transfert de gènes, s'est également avéré incapable de délivrer la  $\beta$ -gal dans les poumons, illustrant l'importance cruciale des
propriétes physicochimiques du vecteur pour la délivrance intracellulaire de protéines comme d'acides nucléiques (Guillaume et al., 2000).



**Figure 27 – Structure générale des phosphonolipides cationiques** GLB43 (R =  $C_{18:1}$ ; R1 = CH<sup>3</sup>; X<sup>-</sup> = I) et GLB73 (R =  $C_{14:0}$ ; R1 = CH<sup>3</sup>; X<sup>-</sup> = I) (Guillaume et al., 2000)

L'équipe de J.P. Behr a mis au point un système de délivrance intracellulaire de protéines anioniques basé sur la DOGS, précédemment développée par le même groupe pour le transfert d'acides nucléiques (Behr et al., 1989). Cette formulation a permis la délivrance de divers types de protéines dont des anticorps et des enzymes. Cette étude suggère que l'adhésion des complexes lipide cationique/protéine aux cellules se fait via une liaison aux syndécans, des protéines porteuses de glycosaminoglycanes situées dans des régions riches en cholestérol de la membrane, puisque la déplétion des cellules en cholestérol par un traitement à la cyclodextrine inhibe la délivrance des protéines par ce système. Au vu de ces résultats, il est également probable que l'internalisation de tels complexes se fasse par endocytose cavéole-dépendante puisque les cavéoles sont également situées au niveau de radeaux lipidiques riches en cholestérol. Les auteurs se sont attachés à l'étude des paramètres optimaux de formulation des complexes lipide cationique/protéine. Dans le cas de la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques, le paramètre clé est le rapport de charge +/- entre les charges positives du lipide cationique et les charges négatives portées par les phosphates de l'acide nucléigue, généralement situé entre 2 et 5 dans le cas de la transfection d'ADN plasmidique. Dans le cas de la délivrance de protéines avec la DOGS, les formulations optimales ne permettent pas de mettre en évidence un rapport de charge optimal mais plutôt un rapport de surface optimal (Figure 28) correspondant à environ 5 molécules de DOGS par nm<sup>2</sup> de surface de protéine, suggérant que dans ce cas la formation du complexe se fait par "recouvrement" de la protéine par le lipide cationique (Dalkara et al., 2004).

Protein	MW (kDa)	Protein surface (nm <sup>2</sup> )	Protein charge at pH 7 <sup>a</sup>	DOG5/protein molecule <sup>b</sup>	DOGS/protein charge ratio (+/)	DOGS/nm <sup>2</sup> of protein surface
Bovine serum albumin-FITC10	66	95	-40	500	37.5	5.3
IS-Galactosidase	465	349 <sup>±</sup>	-132	1400	32	4.0
IgG (anti-actin)-FITCs	150	164	-8	750	281	4.6
IgG (anti tubulin)-FITC <sub>3</sub>	150	164 <sup>c</sup>	-2	750	1125	4.6
R-phycoerythrin	240	218°	-5	1200	720	5.5
One DNA base pair	0.66	2 <sup>d</sup>	-2	4	6	2

\*Calculated according to www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcaci with an additional contribution of ~2.75 for each RTC molecule [16].

\*Number of DOCS molecules leading to optimal intracelular delivery after 8 h (± 50%).
\*Relative to the crystal structure dimensions of 85A, assuming surface area to be proportional to (MMV)<sup>2/3</sup>.

"Estimated as a 0.34-nm slice of a 3-nm cylinder.

Figure 28 –	- Propriétés	physicochimiques	de protéines	anioniques e	et de leurs	formulations	optimales	avec la	DOGS
(Dalkara et a	al., 2004)								

Le groupe de P.L. Felgner a décrit l'utilisation d'un lipide cationique, le DODAPL (Dioctadélylaminopropylamine-lysine) pour délivrer dans de nombreux types cellulaires des protéines fonctionnelles pro-poptotiques (caspases, granzyme B, cytochrome C). L'avantage de ces protéines est qu'elles permettent d'établir de façon non ambigüe sur leur délivrance sous forme active dans le cytosol, contrairement à des protéines rapportrices fluorescentes qui peuvent être présentes dans le cytosol mais mal conformées, ou des enzymes dont le dosage a posteriori ne permet pas de préciser la localisation intracellulaire. Le DODAPL couplé à la DOPE s'est avéré un vecteur puissant capable de délivrer dans des cellules en culture des protéines pro-apoptotiques et d'y induire la mort des cellules. Il est intéressant de noter que ce système peut être appliqué à des protéines négativement chargées, susceptibles de former un complexe avec le lipide cationique, mais également des protéines positives puisque le granzyme B, porteur d'une charge de + 16 à pH = 7. Les auteurs attribuent cet effet à la présence de régions hydrophobes dans la structure du granzyme B, permettant l'association de cette protéine avec les lipides malgré leurs charges de même signe. A l'inverse, le DODAPL:DOPE s'est avéré incapable de transporter dans les cellules traitées le cytochrome C, porteur d'une charge positive mais dénué de régions hydrophobes. Ces travaux illustrent bien l'importance des propriétés physicochimiques des protéines cargo, en plus de celles du vecteur, dans l'efficacité d'un tel système de délivrance (Zelphati et al., 2001).

Les lipides cationiques s'avérant être des vecteurs efficaces à la fois pour la vectorisation d'acides nucléiques et de protéines, des groupes de recherche ont étudié la possibilité de délivrer ces deux types de macromolécules conjointement afin d'obtenir une synergie dans leurs effets sur les cellules ciblées. La capacité des papillomavirus humain (HPV) à induire des cancers cervicaux est en partie due à la capacité de leur oncoprotéine E6 à neutraliser la protéine pro-apoptotique p53 dans les cellules qu'ils infectent. La délivrance par une formulation commerciale de lipide cationique (HiPerFect) dans des cellules de cancer cervical d'un siRNA ciblant E6 et d'un anticorps neutralisant dirigé contre cette même

protéine a permis d'obtenir l'arrêt de la prolifération des cellules ciblées de manière plus efficace qu'avec la délivrance du siRNA seul ou de l'anticorps seul, montrant un effet synergique entre le blocage de l'oncoprotéine E6 par l'anticorps et l'inhibition de sa synthèse par le siRNA. Dans cette étude, la formation des complexes était obtenue en ajoutant le siRNA au mélange lipide cationique/protéine. Il est intéressant de noter que la délivrance de l'anticorps était augmentée par la présence dans la formulation d'un peptide dimérisable comportant la séquence de l'épitope reconnu par l'anticorps, suggérant que la réticulation des anticorps par ce peptide conduit à la formation d'un complexe plus efficace (Courtete et al., 2007). Un système similaire a permis l'induction de l'apoptose dans des cellules de mélanome B16(F10) par délivrance d'un peptide pro-apoptotique et d'un oligodésoxynucléotide antisens dirigé contre la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au moyen de liposomes de DOTAP:DOPE. Dans ce cas précis, la charge positive nette du peptide délivré (D-(KLAKLAK)<sub>2</sub>) ne permettant pas la formation d'un complexe directement avec le lipide cationique, la formulation du système a été effectuée de façon séguentielle. Dans un premier temps, le peptide a été formulé avec l'oligonucléotide afin de former un complexe négativement chargé. Une solution de ces complexes a été utilisée pour réhydrater un film de DOTAP:DOPE, conduisant à leur encapsulation dans les liposomes cationiques ainsi formés. Ces liposomes se sont avérés capables de restaurer l'activité des caspases 3 et 7 dans les cellules ciblées et d'y induire l'apoptose. Plus intéressant, ces complexes injectés dans des tumeurs B16(F10) greffées en sous-cutané chez la souris ont permis d'obtenir une diminution de la croissance de ces tumeurs associés avec une apoptose importante des cellules tumorales (Ko et al., 2009).

Malgré le potentiel important des lipides cationiques pour la délivrance intracellulaire de protéines, il existe peu de données concernant les propriétés physicochimiques des complexes lipide cationique/protéine. Il a pourtant été observé dans le cas de la vectorisation d'acides nucléiques que ces propriétés jouent un rôle crucial dans l'efficacité de tels vecteurs et il est donc nécessaire de définir leurs propriétés optimales pour la délivrance intracellulaire de protéines. C'est pourquoi l'étude de ces propriétés tient une place importante dans le travail de développement de nouveaux vecteurs lipidiques dédiés aux protéines qui est présenté dans le **chapitre 4** des résultats.

# Matériels et méthodes

# Matériels et méthodes

## 1. Lipides cationiques et colipides – Formulations lipidiques

Les synthèses des lipides cationiques utilisés dans cette étude ont été décrites dans des études précédentes: DOSP et DOSN (Mevel et al., 2012), KC et TGKC (Belmont et al., 2002), KCC, KLC et DOSK (Sainlos et al., 2005), BGTC (Vigneron et al., 1996). Les synthèses des autres dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont été décrites par M. Sainlos (Sainlos, 2004). La synthèse du MM27 a été décrite par M. Mével (Mevel et al., 2008). La DOPE provient d'Avanti Polar Lipids.

Les solutions micellaires ont été obtenues en dissolvant les lipides cationiques dans de l'eau ultrapure et en soniquant la suspension durant 10 minutes. Les suspensions liposomales ont été obtenues en dissolvant le lipide cationique et le colipide dans du chloroforme. Après évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif, les films lipidiques obtenus ont été réhydratés une nuit à 4°C dans de l'eau ultrapure, vortexés puis soniqués jusqu'à l'obtention de liposomes de 100-150 nm de diamètre dont la taille a été contrôlée sur un Zetasizer 300HSA (Malvern Instruments). Sauf mention contraire, la proportion de lipide cationique et de colipide dans les formulations liposomales était de 1:1 (mol/mol).

## 2. Protéines – Formulation des complexes lipide cationique / protéine

Les protéines utilisées dans cette étude sont la β-galactosidase d'E.coli (Roche Applied Science), l'histone H1 de thymus de veau conjuguée à l'Alexa 488 (Life Technologies), les anticorps monoclonaux anti-cytokératine 8 C-term spécifique conjugué au FITC (ab87010) et N-term spécifique (ab51152) (Abcam), l'anticorps monoclonal anti-β-tubuline conjugué au FITC (Sigma Aldrich) et la caspase-3 humaine active (Sigma Aldrich).

Pour formuler les complexes lipide cationique / protéine, les protéines et les solutions-mères de lipides cationiques ont été diluées soit respectivement dans des volumes égaux (50µL) de NaCl 240mM + HEPES 40mM pH 7,4 et d'eau, soit dans des volumes égaux (50µL) de milieu OptiMEM ou DMEM (Life technologies), à différents rapports molaires. Après dilution, les solutions de protéine et de lipide cationique ont été combinées par aller-retour à la pipette automatique et le mélange résultant a été incubé 15 minutes à température ambiante pour permettre la complexation des lipides et des protéines.

## 3. Mesure de taille des complexes lipide cationique/protéine

La taille des complexes lipide cationique/protéine a été mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière sur un Zetasizer 300HSA (Malvern Instruments). Les protéines (1µg) ont été formulées au lipide cationique à différents rapports molaires dans un volume total de 100µL de NaCl 120mM + HEPES 20mM pH 7,4 ou de milieu OptiMEM. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, 900µL de NaCl 120mM + HEPES 20mM pH 7,4 ont été ajoutés pour obtenir un volume total de 1mL et la mesure de taille effectuée.

## 4. Electrophorèse des complexes lipide cationique/protéine

Les complexes BGTC:DOPE/protéine ont été préparés à partir de 10µg de protéine formulée à différents rapports molaires dans du NaCl 120mM + HEPES 20mM pH 7,4 ou du milieu OptiMEM (volume final 50µL). Dans le cas de la  $\beta$ -gal, 5µL de complexes ont été additionnés de 5µL de tampon de chargement non dénaturant Blue-Orange load buffer (Promega) et déposés directement sur un gel de polyacrylamide non dénaturant (stacking 5%, resolving 7%). Dans le cas de l'histone, après la formation des complexes lipide cationique / protéine, la préparation a été centrifugée 10 minutes à 17 900xg pour culotter d'éventuels complexes. Un aliquot de 20µL de surnageant a été incubé 5 minutes à 95°C dans du tampon de Laemmli (Laemmli, 1970) puis déposé sur un gel de polyacrylamide dénaturant (stacking 5%, resolving 7%). Après 2h de migration à 80V, les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie (Fixateur : éthanol 50%, acide acétique 10%. Solution de lavage : méthanol 50%, acide acétique 10%).

## 5. Culture cellulaire

Les cellules HeLa (adénocarcinome cervical, *H. sapiens*), H1299 (carcinome pulmonaire non à petites cellules, *H. sapiens*) et C2C12 (myoblastes, *M. musculus*) ont été cultivées dans le milieu DMEM. Les cellules CHO-K1 (cellules ovariennes, *C. griseus*) ont été cultivées dans le milieu F12-K. Les cellules souches mésenchymateuses de souris ont été cultivées dans du milieu α-MEM comme décrit précédemment (Leblond et al., 2009). Tous les milieux étaient supplémentés en sérum de veau fœtal (10%), L-glutamine (2mM), streptomycine (10µg/mL) et pénicilline (100U/mL). Les cellules HeLa exprimant les variants de CFTR et la

GFP (Jungas et al., 2002), fournies par A. Edelman, étaient maintenues sous pression de sélection par 250µg/mL de zéocine. Tous les milieux et réactifs provenaient de Life technologies. Les cultures ont été réalisées à 37°C en atmosphère humidifiée et à 5% de CO<sub>2</sub>.

## 6. Délivrance intracellulaire des protéines

Pour les expériences de délivrance de la  $\beta$ -gal, les cellules ont été ensemencées 24h avant la délivrance des protéines, dans des plaques 24 puits (Techno Plastic Products) à 70 000 cellules/puits de manière à obtenir une confluence de 70-80% au moment de l'application des protéines. Les puits contenaient des lamelles de verre de 12mm de diamètre pour les expériences de microscopie. Les internalisations ont été réalisées en déposant sur les cellules 100µL de suspension de complexes lipide cationique / protéine dans 400µL de milieu de culture sans sérum (sauf mention contraire) ni antibiotiques susceptibles d'interférer avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides, la streptomycine étant elle-même un aminoglycoside. Après 4 heures d'incubation à 37°C – 5% CO<sub>2</sub>, le milieu a été remplacé par 500µL de milieu complet et l'incubation a été prolongée de 4 heures (sauf mention contraire) avant la lyse des cellules pour le dosage de l'activité  $\beta$ -gal.

L'internalisation de caspase 3 a été effectuée selon les mêmes modalités que pour la β-gal, en parallèle d'une gamme de cellules servant de référence pour le calcul du taux de survie. Après 4h d'incubation dans le milieu sans sérum, l'incubation a été prolongée jusqu'à 48 heures avant mesure du taux de survie cellulaire par un test MTT.

Les internalisations d'anticorps monoclonaux et d'histone H1 ont été effectuées selon les mêmes modalités que pour la β-gal, les cellules étant ensemencées sur lamelles de verre de 12mm de diamètre. Après 4h d'incubation dans le milieu sans sérum, les cellules étaient directement fixées pour observation au microscope.

Les internalisations d'anticorps anti-cytokératine 8 préalables aux mesures de flux d'iode en MEQ ont été effectuées sur 120 000 cellules ensemencées en boîtes de 34mm de diamètre sur lamelle de verre de 14mm de diamètre. Les cellules ont reçu 1,5 µg d'anticorps complexé à la DOSP:MM27 au rapport molaire de 1000.

## 7. Quantification de la β-gal internalisée

Après incubation des cellules avec les complexes, celles-ci ont été rincées 3 fois par 1mL de tampon PBS (NaCl 138mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76mM, pH 7,4). Trois cent microlitres de Reporter Lysis Buffer (Promega) additionné d'une tablette de cocktail d'antiprotéases Complete Mini (Roche Applied Science) pour 50mL de tampon ont été ajoutés à chaque puits avant que les cellules ne subissent un cycle de congélation/décongélation (-80°C/20°C) pour assurer une lyse complète. Les lysats ont été centrifugés 5 minutes à 9000xg et l'activité ß-gal dosée sur un aliquot de surnageant parallèlement à une gamme-étalon en utilisant le kit β-Glo Assay Kit (Promega). Ce kit est basé sur l'hydrolyse par la β-gal du substrat 6-O- β-galactopyranosyl-luciférine : la luciférine libérée par la réaction est oxydée en présence d'ATP par une luciférase contenue dans le réactif, émettant un signal lumineux proportionnel à la concentration de β-gal active présente. Ce test hautement sensible permet la détection de quantités de  $\beta$ -gal de l'ordre du nanogramme. La lumière produite par la réaction a été enregistrée sur un lecteur de plaques Victor X-3 (Perkin-Elmer). Les expériences ayant été réalisées en triplicate, les résultats présentés correspondent à la moyenne des trois puits ± déviation standard.

Pour observer la localisation intracellulaire de la  $\beta$ -gal, les cellules ont été rincées 3 fois par 1mL de PBS, fixées au paraformaldéhyde 3,7% 15 minutes à température ambiante puis traitées avec une solution de coloration au X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) : X-Gal 400 µg/mL, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 4 mM, K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 4 mM. Les cellules ont été montées au PBS/glycérol (50% v/v) avant observation sous microscope optique. Les comptages ont été effectués à l'aide du logiciel ImageJ 1.42q (plugin Cell Counter) sur deux lames différentes (n=115 cellules minimum).

## 8. Observation de l'histone et des anticorps internalisés

Après internalisation des protéines fluorescentes, les cellules ont été rincées 3 fois par 1mL de PBS et fixées au paraformaldéhyde 3,7% 15 minutes à température ambiante avant marquage des noyaux au DAPI (300nm, 5 min) dans le cas d'observations en épifluorescence ou au ToPro-3 (1µM, 45 min) dans le cas d'observations en microscopie confocale. Pour le marquage des contours cellulaires, les cellules ont été incubées 10 minutes avec de l'iodure de propidium (10µg/mL, 10 min). Les lamelles ont été montées sur lame au Prolong Gold antifading Reagent après un bref rincage à l'eau distillée et incubées 24h à température ambiante et à l'abri de la lumière avant observation. Tous les réactifs provenaient de Life Technologies. Les préparations ont été observées sous un microscope à

épifluorescence Zeiss Axiovert 200M, ou sous un microscope confocal à balayage laser Leica TCS-SP1. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ 1.42q équipé de la suite LOCI Tools et les cellules quantifiées à l'aide du plugin Cell Counter.

## 9. Cryo-TEM

Les échantillons de β-gal ont été préparés à partir de 5, 10 ou 20 µg de protéine complexée à 18 nmol de lipide cationique pour obtenir des rapports molaires de 1500, 750 et 375 respectivement, dans un volume de 80µL. Les quantités de lipide ont été fixées afin d'avoir la même densité finale de complexes sur la grille du microscope. Les échantillons d'anticorps anti-K8 ont été préparés à partir de 8µg de protéine complexée au rapport 375 à la DOSP:MM27 dans un volume final de 80µL. Ces échantillons ont été traités comme précédemment décrit (Pitard et al., 2004).

## 10. Mesure de flux d'iode par vidéomicroscopie

Quatre heures après le traitement des cellules par les complexes DOSP:MM27/anticorps, les cellules ont été rincées par une solution physiologique d'iodure de sodium (Nal 138mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,4mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8mM, HEPES 10mM, CaSO<sub>4</sub> 1mM, D-Glucose 10mM, pH 7,4). Les cellules ont été chargées en MEQ par un choc hypotonique de 2 minutes dans la même solution diluée au 4/5<sup>e</sup> avec de l'eau purifiée (MEQ 10mM, Nal 110mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,92mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,64mM, HEPES 8mM, CaSO<sub>4</sub> 0,8mM, D-Glucose 8mM, pH 7,4) puis incubées à nouveau 15 minutes à 37°C dans la solution d'iodure de sodium pour permettre aux cellules ont ensuite été montées sur une chambre à perfusion et installées sous l'objectif d'un microscope Leica DMI6000B équipé d'un contrôle environnemental, sous perfusion continue de la solution d'iodure de sodium. L'enregistrement de la fluorescence du MEQ a été réalisé par intervalles de 15 secondes via le logiciel MetaFluor (Molecular Devices).

Après 120 secondes de perfusion d'iodure de sodium afin d'obtenir le niveau basal initial de fluorescence, les cellules ont été perfusées durant 120 secondes par une solution physiologique similaire où l'iodure était substitué par l'ion nitrate (NaNO<sub>3</sub> 138mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,4mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8mM, HEPES 10mM, CaSO<sub>4</sub> 1mM, D-Glucose 10mM, pH 7,4) afin d'enregistrer les flux d'anions indépendants de CFTR. Pour déclencher l'activation de CFTR, les cellules ont été perfusées durant 210 secondes par la même solution de nitrate de sodium additionnée d'un cocktail destiné à augmenter le taux intracellulaire d'AMPC

(cptAMPc 500µM, forskoline 25µM, IBMX 100µM). Le cptAMPc est une forme perméante de l'AMPc qui active directement la PKA, la forskoline est un activateur de l'adénylate cyclase et l'IBMX est un inhibiteur des phosphodiestérases. Les cellules ont ensuite à nouveau été perfusées durant 120 secondes par la solution d'iodure de sodium additionnée de cocktail AMPc pour permettre le quenching de la sonde et l'obtention du niveau basal final de fluorescence (différent du niveau initial du fait du photoblanchiment de la sonde).

Les valeurs de fluorescence du MEQ ont été enregistrées sur les cellules exprimant fortement la GFP, après soustraction du bruit de fond. Les courbes de variation de fluorescence ont été obtenues après compensation du photoblanchiment et normalisation par la formule F/Fi-1, F étant la fluorescence du MEQ à tout moment et Fi la fluorescence basale initiale enregistrée à la fin de la première perfusion d'iodure de sodium. Les cellules ne répondant pas à l'AMPc (en moyenne 35% par champ) n'ont pas été incluses dans le calcul des pentes de quenching.

# Résultats

Chapitre 1 - Délivrance intracellulaire d'ADN par des dérivés lipidiques d'aminoglycosides

# Chapitre 1 - Délivrance intracellulaire d'ADN par des dérivés lipidiques d'aminoglycosides

Les lipides cationiques dérivés de la kanamycine se sont révélés être des vecteurs particulièrement efficaces pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques in vitro et ont également montré leur capacité à délivrer un transgène in vivo chez la souris (Belmont et al., 2002; Sainlos et al., 2005). Ces résultats ont amené l'équipe de J.M. Lehn à développer des lipides cationiques basés sur d'autres aminoglycosides, la paromomycine et la néomycine. Parmi ces nouveaux composés, la DOSP et la DOSN ont été particulièrement étudiées pour leur capacité à vectoriser des siRNAs dans des cellules en culture (Desigaux et al., 2005). Cependant, leur potentiel de transfection d'ADN plasmidique et les propriétés physicochimiques des complexes qu'elles forment avec l'ADN ont été peu explorées jusque-là, contrairement aux dérivés de la kanamycine. Nous avons contribué à une étude collaborative avec les équipes de J.M. et P. Lehn consistant à décrire la synthèse de ces composés et leurs propriétés.

D'autres lipides dérivés de la 4,5-DDS ont été syntétisés en plus de la DOSP et de la DOSN : des composés basés sur un groupement cholestérol (Paromo-Chol : PC et Néo-Chol : NC), des composés proches de la DOSP possédant des bras espaceurs dérivés de la lysine (DOSLP) ou de l'acide caproïque (DOSCP) et un dérivé "dimérique" de la DOSP possédant deux groupements paromomycine ont été inclus dans cette étude. Nos résultats ont confirmé l'efficacité de ce type de composés pour délivrer un plasmide dans des cellules en culture tout en ayant une toxicité minimale. Nous avons observé que les dérivés aliphatiques d'aminoglycosides sont plus efficaces que les dérivés cholestérol, ce qui découle probablement de leur capacité à former des couches lipidiques en solution dans l'eau alors que les dérivés cholestérol en sont incapables. D'ailleurs, la formulation de la NC et de la PC avec le colipide DOPE, capable de former des bicouches lipidiques, améliore sensiblement leur activité de transfection alors qu'elle n'a aucun effet sur les lipides dérivés d'acides gras. Cette étude a par ailleurs confirmé que l'inclusion d'un bras espaceur entre la tête cationique et la partie hydrophobe de ces lipides a un effet sur la transfection, cet effet étant toutefois plus modeste que ce qui a été observé précédemment avec les dérivés de la kanamycine (Sainlos et al., 2005) et dépendant du type cellulaire transfecté. Ainsi, si l'inclusion d'un bras espaceur lysine dans la structure du lipide a un effet bénéfique sur la transfection de cellules HEK293, elle a un effet négatif lorsque le lipide est utilisé sur des cellules HeLa. Ces résultats montrent que les lipides cationiques doivent être choisis en fonction du type cellulaire ciblé, mais les DLA offrant une grand variété structurale, ils

constituent une classe de vecteurs de choix pouvant être adaptés à de nombreuses conditions d'utilisation. L'observation des propriétés des complexes DOSP/ADN a montré que ce lipide est capable de former avec un plasmide des lipoplexes positivement chargés de 120 nm de diamètre compatibles avec l'entrée dans la cellule par endocytose, formés de structures multilamellaires alternant des couches de lipide entre lesquelles l'ADN est condensé. Ces structures, même si elles semblent plus organisées que celles qui ont été précédemment observées dans les complexes DOSP/siRNA (Desigaux et al., 2007), semblent toutefois aptes à déstabliser les membranes endosomales plus efficacament que des structures concentriques observées avec des lipides moins efficaces comme le BGTC (Pitard et al., 1999), ce qui peut expliquer partiellement son efficacité pour le transfert de gènes. Enfin, la formulation de ces lipides avec de la DOPE et des stabilisateurs stériques a permis la transfection d'un gène rapporteur dans les voies aériennes de souris, indiquant que ces vecteurs peuvent avoir des applications potentielles dans le traitement de pathologies de l'appareil respiratoire comme la mucoviscidose. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de la publication suivante dans la revue *Journal of Controlled Release*.



## Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: Synthesis and transfection studies

Mathieu Mével a, b, 1, Matthieu Sainlos c, d, 1, Benoît Chatin a, b, Noufissa Oudrhiri e, Michèle Hauchecorne e, Olivier Lambert <sup>f</sup>, Jean-Pierre Vigneron <sup>g</sup>, Pierre Lehn <sup>e,h</sup>, Bruno Pitard <sup>a,b,i,\*</sup>, Jean-Marie Lehn <sup>j,\*</sup>

- <sup>e</sup> Université de Bordeaux, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France
- <sup>4</sup> OURS, Institut Interdiscipilinaire de Neurosciences, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France \* INSERM, U763/U458, Hőpital Robert Debré, Paris, F-75019 France
- <sup>1</sup> CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux 1-IPB, Allée Goeffroy Saint Hilaire, Pessac, F-33600 France
- \* Collège de France, 11 place Marcelin Berthelor, Paris, F-75005 France
- <sup>11</sup> INSERM, U613, Université de Bretagne Occidentale, Brest, F-29200 France
- IN-CELL-ART, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, F-44093 France
- <sup>1</sup> ISIS, Université de Strasbourg, 8 allée Gaspard Monge, F-67000 Strasbourg, France

#### ARTICLE INFO

#### Article history: Received 23 September 2011 Accepted 17 December 2011 Available online 29 December 2011

Keywords; Transfection Cationic lipids Liposames Aminoglycoside Paromomycin Neomycin B

#### ABSTRACT

Cationic lipid-based nonviral gene delivery is an attractive approach for therapeutic gene transfer. Basically, gene transfection can be achieved by using synthetic vectors that compact DNA, forming cationic lipoplexes which can interact with the cell plasma membrane by electrostatic interactions. Among the basic components of any cationic lipid, the type of cationic headgroup has been shown to have a major role in transfection efficiency. We have previously reported the DNA transfection potential of vectors characterized by a kanamycin A headgroup. The encouraging transfection results obtained with these compounds prompted us to evaluate the potential of cationic lipids bearing headgroups based on other aminoglycosides. Thus, we herein report the synthesis and gene transfection properties of novel cationic lipids consisting of cholesteryl or dioleyl moieties linked, via various spacers, to paromomycin or neomycin B headgroups. Our results confirm that these new aminoglycoside-based cationic lipids are efficient for gene transfection both in vitro and into the mouse airways in vivo. We also investigated physico-chemical properties of the DNA complexes formed by this particular type of synthetic vectors in order to better understand their structure-activity relationships. © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

The search for an efficient alternative to recombinant viruses for gene transfer has resulted, during the last decade, in the development

(J-M, Lehn). 1 These authors have contributed equally to this work of a variety of synthetic gene delivery systems [1-5]. Among these nonviral systems, cationic lipids are especially attractive as their overall structures are relatively simple. A cationic lipid is indeed basically composed of a cationic headgroup connected via a linker to a lipophilic moiety. Thus, series of well-characterized reagents can be synthesized and evaluated [6-11]. Cationic lipids interact electrostatically with the negatively charged DNA and condense it into lipid/DNA aggregates, named lipoplexes, which can be taken up by the target cells via an endocytosis mechanism, involving the interaction of residual positive charges on the lipoplexes with negatively-charged cell membrane residues [12]. Cationic lipids are often formulated as stable liposomes with the neutral colipid DOPE, which is presumed to enhance transfection via its fusogenicity properties [13,14]. More recently cationic lipids have also been formulated with new synthetic neutral colipids, in replacement of the neutral colipid DOPE, for a better gene expression [15-17].

Despite some positive results, the clinical trials performed until now with current, commercially available, cationic lipids have however clearly demonstrated that new, more efficient vectors are required.

<sup>\*</sup> INSERM 1015 Number F-44000 France

Université de Nantes, Faculté de Médecine, Institut du Tharax, Nantes, F-44000 France

Abbreviations: Boc, tertbutyloxycarbonyle; CholNeo, cholesterol-neomycin; Chol-Paromo, cholesterol-paromomycin; DOPE, dioleoyl-1-cc-phosphatidylethanolamine; DOSCP, dioleyl-succinyl-caproic-paromomycin; DOSLP, dioleyl-succinyl-lysineparomomycin: DOSN, dioleyl-succinyl-neomycin: DOSP, dioleyl-succinyl-paromomycin; DIS, dynamic light scattering: DSC, differential scanning calorimetry; EDC, N-(-3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride; HOAt, 1-hydroxy-7azabenzotriazole; LF, Lipofectamine®; TEA, triethylamine: Teoc, trimethylsilylethoxycarbonyle; TFA, trifluoroacetic acid.
\* Correspondence to: B. Pitard, IRTUN, l'institut du thorax—UMR \$\_915, 8 quai

Moncousu, BP 70721, 44007 NANTES Cedex, France. Tel.: + 33 2 28 08 01 28: fax: + 2 28 08 01 30

<sup>\*\*</sup> Correspondence to: J.-M. Lehn, ISIS-Université de Strasbourg 8 allée Gaspard Monge F-67000 Strasbourg, France. Tel.: + 33 3 68 85 51 45; fax: + 33 3 68 85 51-40. E-mail addresses: bruno.pitard@univ-nantes.fr (B. Pitard), lehn@isis.u-strasbg.fr

<sup>0168-3659/\$ -</sup> see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.019

GENE DELIVERY

462

M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 461-469

#### 2. Materials and methods

With a view to the design of improved vectors, cationic lipids offer the advantage that each of their constituent parts can be modified, thereby facilitating the elucidation of structure–activity relationships. In particular, it is generally agreed that the nature of the positive headgroup strongly impacts on the transfection activity [18-20], the efficacy of a given cationic lipid system depending *in fine* on the properties of the self-assembled supramolecular lipid/DNA bioassemblies [21-23].

Thus, over the last several years, we have directed our research efforts towards the development of a novel family of cationic lipids characterized by cationic headgroups consisting of aminoglycosides [24-26]. Basically, we reasoned that aminoglycosides should constitute cationic moieties of great interest because of their natural affinity for nucleic acids as well as their structural variety and multifunctionality [27-29]. First, aminoglycosides, which form a large family of polycationic compounds already widely used as antibiotics [30,31], are indeed known to bind to three-dimensional RNA substructures [32,33], their antibiotic activity resulting actually from binding to the rRNA of bacteria [34]. Next, the natural aminoglycosides exhibit an important structural diversity as they consist of one six-carbon aminocyclitol (generally a 2-deoxystreptamine ring) joined through a glycosidic linkage to one or several aminosugars, the 2-deoxystreptamine moiety being either monosubstituted (neamine), 4,5-disubstituted (paromomycin and neomycin-type compounds) or 4,6-disubstituted (kanamycin, tobramycin and gentamycin-type compounds). Finally, aminoglycosides are multifunctional compounds containing up to 6 amine groups as well as several hydroxyl functions. Thus, selective acylation of one or several of these groups should provide the aminoglycosides with the lipophilic properties required for their use as vectors for gene transfection, their multifunctionality providing in addition a favorable scaffold for the synthesis of a variety of reagents.

Along these lines, we have first synthesized and evaluated the DNA transfection activity of CholKana (previously termed KanaChol), a cholesterol derivative of kanamycin A [24,25], whose structure has been described in Fig. 1 in Ref. [24]. This initial study clearly demonstrated the feasibility of using an aminoglycoside as headgroup of a cationic lipid. CholKana was indeed found to be efficient for gene transfection into a variety of mammalian cell types in vitro. In addition, CholKana/DOPE lipoplexes, sterically stabilized with lipidic poly(ethyleneglycol) (PEG) derivatives, were efficient for DNA transfection into the mouse airways in vivo. These positive results invited us to undertake an optimization study in which we evaluated the DNA transfection potential of a series of kanamycin A derivatives characterized by various spacer and lipidic moieties. This second study allowed us to identify kanamycin A-based vectors of various structures significantly more efficient than our initial compound CholKana and provided us with some important insights into the physicochemical mechanisms underlying gene transfection by such vectors [26]. In the present work, we have further investigated the DNA transfection potential of cationic lipids formed by lipidic derivatives of aminoglycosides. Our goal was chiefly to explore whether aminoglycosides other than kanamycin A can be used as cationic headgroups and to gain further insights into the structure-activity relationships of this particular type of synthetic vectors. We herein report the synthesis and the in vitro and in vivo gene transfection properties of a series of lipidic derivatives of the aminoglycosides paromomycin and neomycin B.



Fig. 1. Structure of Cholikana.

All commercially available chemicals were reagent grade and were used without further purification. Unless otherwise indicated, all the reactions were performed at room temperature. Flash chromatography employed Merck silica gel (Kieselgel-60, 0.040-0.063 mm). Analytical TLC was performed with 0.2 mm silica-coated aluminum sheets, visualization by UV light or by spraying with either a solution of ninhydrin (0.3% in weight in n-butanol containing 3% acetic acid in volume) or an iodine solution (0.1 M in 10% sulphuric acid aqueous solution). 'H and "C NMR spectra were recorded on Bruker Avance300 or Bruker AC200 spectrometers unless otherwise specified. MALDI/TOF stands for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization coupled with Time of Flight mass spectroscopy. MALDI mass spectra were performed by Jean-Claude Blais (Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France). Highresolution mass spectra (HRMS) were recorded with a Thermofisher hybrid LTQ orbitrap spectrometer (ESIb) and with a Bruker Autoflex III SmartBeam spectrometer (MALDI).

Neomycin B and paromomycin free bases were prepared from the corresponding sulfate salts (purchased from Aldrich Chemical Co.) by use of Amberlite IRA 400 (OH<sup>-</sup>) strongly basic ion-exchange resin. Compounds 1 [35] 10 [36] and 15 [37] have previously been reported. Detailed syntheses are reported in supplementary data.

#### 2.1. Plasmids

The plasmid pCMV-Luc (kindly provided by B. Demeneix, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris) used for *in vitro* transfection has been described previously [19,21]. In plasmid pCMV-GFP (Clontech, Palo Alto, CA) the green fluorescent protein (GFP) reporter gene is under the transcriptional control of the human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter. Plasmid pCIK-CAT, which was used for the *in vivo* studies, was obtained from D. Gill (Oxford, UK). Briefly, pCIK-CAT was constructed by subcloning the *Escherichia coli* chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene (equipped with a Kozak translation sequence) into a pCI backbone (Promega). All plasmids were amplified in *E coli* and purified using standard techniques.

#### 2.2. Preparation of cationic lipid formulations

For use as an aqueous solution without liposomal formulation, reagents CholParomo (3) and CholNeo (12) were dissolved in 20 mM Hepes buffer solution (pH 7.4) at a concentration of respectively 17.37 and 23.33 mM of nitrogen.

For preparation of paromomycin and neomycin B derivatives-based liposomes, each cationic lipid in CHCl<sub>3</sub> was evaporated under vacuum and resuspended in a 20 mM Hepes buffer solution (pH 7.4). The final lipid concentration was 5 mg/mL. The mixture was sonicated for 10 min using a sonicator probe (sonifier cell disruptor B-30 terminal equipped with a Branson sonifier 450) to form liposomes. The resulting solution was allowed to cool to room temperature before filtering through a 0.22 µm filter (Millex GS, Millipore).

#### 2.3. Preparation of lipoplexes

For in vitro transfection experiments, lipoplexes were prepared as previously described [9,38]. Preparation of colloidally stable lipoplexes for in vivo gene transfection into the mouse airways has also been described previously [39]. Schematically, colloidally-stable aminoglycoside derivative/DOPE/DNA lipoplexes were obtained in hypotonic medium by adding the steric stabilizer Chol-PEG (kindly provided by C, Masson, Paris, France), which is composed of a PEG chain of approximately 100 oxyethylene units linked to a hydrophobic anchor composed of a cholesterol molecule, to the aminoglycoside derivative/DOPE

#### M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 461-469

liposomes (in 20 mM Hepes buffer) immediately prior to mixing with pCIK-CAT DNA in water.

#### 2.4. Dynamic light scattering

The size distribution of liposomes and lipoplexes was evaluated by dynamic light scattering analysis (at an angle of 90°) using a laser light scattering apparatus (Autosizer 4700; Malvern Instruments, Orsay, France). Lipoplexes samples were prepared at a DNA concentration of 10 µg/mL and N/P ratio of 10.5 for DOSCP, 9.6 for DOSLP, 7 for CholNeo, 8 for DOSN and 11.4 for P2. The mean particle diameter was determined by multimodal fit analysis.

#### 2.5. Zeta potential

Liposomes of CholParomo (3), DOSP (5), CholNeo (12) and DOSN (14) have been made in deionized water at respectively 6.25, 7.5, 8.75 and 6.66 mM of nitrogen, before measuring zeta potential with a Malvern Zetasizer® (Nano Series ZS, Malvern Instruments SA., Worcestershire, UK) at 25 °C. All measurements were performed in triplicate and with similar conductivity values.

#### 2.6. Surface pressure-area isotherms

All the surface pressure-area isotherms were measured using a Langmuir-Wilhelmy film balance (NIMA 611A) equipped with a temperature controller set at 20 °C. Lipid solutions were prepared in a chloroform/methanol mixture (95/5) at a concentration of 1 mg/ml. Using a microsyringe, drops of lipid solutions were spread on tridistilled water contained in a trough made of Teflon. After total evaporation of the organic solvent (approximately 10 min), the surface layer was compressed using two symmetrical barriers to obtain the isotherms; the surface pressure was measured by the Wilhelmy method.

#### 2.7. Cryo-TEM micrography

DOSP/DNA lipoplexes were prepared at 10 µg DNA/mL with the appropriate amount of cationic lipid to give N/P ratio of 7.5. A 5 µL sample was deposited onto a holey carbon-coated copper grid; the excess was blotted with a filter paper, and the grid was plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen (Leica EM CPC). Specimens were maintained at a temperature of approximately -170 °C using a cryo holder (Gatan), and were observed with a FEI Tecnai F20 transmission electron microscope (TEM) operating at 200 kV and at a nominal magnification of 50,000× under low-dose conditions. Images were recorded with a ZK×2K Gatan slow scan CCD camera.

#### 2.8. Cell and culture conditions

The in vitro transfection activity of the various vectors was evaluated in transient transfection experiments with two different human cell lines. The cell lines tested were the HeLa cell line, which is derived from a human epithelioid cervical cancer and HEK293 cells which are adenovirus-transformed human embryo kidney cells. All cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal call serum and antibiotics and routinely maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air containing atmosphere.

#### 2.9. Flow cytometry experiments

Twenty four hours after transfection, samples of cells (10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup>) were collected and re-suspended in phosphate-buffer saline (PBS). Cells were transfected, in 24 wells plates, with 0.5 µg of pCMV-GFP plasmid, per well, complexed with DOSP at N/P ratio of 7.5. Lipofectamine® (Life Technologies, NY) was used according to manufacturer's recommendations. The resulting cell suspension was assayed for the expression of GFP by flow cytometer analysis using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The percentage of GFP-positive cells was determined using the flow cytometer program. All measurements were performed in triplicate.

#### 2.10. Cell viability

Twenty four hours prior to transfection, HeLa cells were seeded in 24-well culture plates at a density of 75,000 cells per well, in 1 mL of complete medium (DMEM, 10% fetal calf serum, 50 U/mL of penicillin and 50 µg/mL of streptomycin) and incubated at 37°, 5% humidified CO2. Before transfection, medium was removed and replaced by 400 µL of fresh complete medium. Each well received 0.2 µg of pCMV-Luc plasmid complexed with DOSP at N/P ratios of 4.5, 7.5 and 10.5, and with DOSN at N/P ratios of 4, 6.6 and 9.3. As a control, Lipofectamine® (Life Technologies, NY) was used according to manufacturer's recommendations. Cells on the standard plate received only vehicle (OptiMEM). After 24 h of incubation at 37 °C, 5% humidified CO2, cytotoxicity was measured using the Cell Titer 96 Non Radioactive Cell Proliferation Assay, Briefly, each well received 30 µL of dve solution and cells were incubated 4 h at 37°, 5% humidified CO2. Then each well received 300 µl. of solubilization/stop solution. After solubilization of the formazan crystals, optical density was read at 570 nm using a Victor X-3 multilabel plate reader. Cell survival in the treated samples was calculated using a regression curve established from the untreated standard serial dilutions of the cell suspension. All measurements were performed in triplicate.

#### 2.11. In vitro transfection, luciferase assay

Twenty four hours prior to transfection, HeLa and HEK cells were seeded in 24-well culture plates at a density of 75,000 cells per well, in 1 mL of complete medium (DMEM, 10% fetal calf serum, 50 U/mL of penicillin and 50 µg/mL of streptomycin) and incubated at 37", 5% humidified CO2. Lipoplexes were prepared by mixing two equal solutions containing respectively 0.2 or 0.5 µg of plasmid DNA and the lipidic vector at various N/P ratios. Lipofectamine® (Life Technologies, NY) was used according to manufacturer's recommendations. Before transfection, medium was removed and replaced by 400 µL of fresh complete medium. After 24 h of incubation at 37 °C, 5% humidified CO2, cells were washed and lysed in Reporter Lysis Buffer 1× (Promega, WI) supplemented with 1 tablet per 50 mL of complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Sciences, Penzberg, Germany) according to manufacturer's recommendations. Cell lysates were centrifuged at 9,000g, 5 min, 4 °C. Luciferase activity was measured on an aliquot of supernatant using the Luciferase Assay System kit (Promega) according to manufacturer's recommendations. Luminescence was recorded on a Victor X-3 multilabel plate reader (Perkin Elmer, MA). Total protein concentration was measured on an aliquot of supernatant using the BCA Protein Assay (Thermo Scientific, MA) according to manufacturer's recommendations. Optical density was recorded on a Victor X-3 multilabel plate reader. All measurements were performed in triplicate.

#### 2.12. In vivo gene delivery to mouse airways

90

Female BALB/c mice (30 g body weight) were purchased from Charles River (Saint-Aubin-Les-Elbeuf, France). Intranasal administration of the lipoplexes was as previously described [39]. Schematically, the mice were briefly anesthetized with halothane (Belamont, Paris, France) and instilled intranasally with 50 µL of Chol-PEG-stabilized lipoplexes characterized by N/P ratios of 6 for DOSLP and 4,37 for CholNeo, and a Chol-PEG/DNA (w/w) ratio of 2; each animal received three doses (about 4 h apart), a total amount of 100 µg of pCIK-CAT being administered. GENE DELIVERY

GENE DELIVERY

#### 464

M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 461-469

At 48 h after instillation, the animals were killed by an intraperitoneal (Lp.) overdose of pentobarbital and the lungs were removed for analysis. CAT expression *in vivo* was evaluated as previously described [39]. Briefly, tissue pieces were placed in TEN buffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.8) and disrupted on ice for about 30 s using an Ultra-Turrax T25 homogenizer (Fischer Bioblock Scientif-

30's using an olira-i urrax L25 homogenizer (Pischer Bioloock Scientiic, Strasbourg, France). Cells were lysed by three freeze-thaw cycles and cleared supernatant was obtained by centrifugation. CAT concentration was determined using a CAT ELISA assay performed according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim). CAT levels were expressed as ng of CAT protein per 100 mg of total protein, the protein concentration being determined using the Bio-Rad assay.

#### 3. Results and discussion

2.13. CAT expression in vivo

#### 3.1. Synthesis of aminoglycoside-derived cationic lipids

Two aminoglycosides were chosen to be used as cationic headgroups: paromomycin and neomycin B. Paromomycin and neomycin B are both characterized by a four-ring system and a 4,5-linkage of the 2-deoxystreptamine unit which confers them a geometry significantly different from that of kanamycin A (which contains only three rings and has a 4,6-linkage). Two different synthetic strategies were used to generate the functionalizable intermediates. The first approach was similar to what had been developed for the kanamycin A derivatives (Fig. 1) and relied on a key structural feature shared by all these aminoglycosides: the unicity (or duplicity in the case of neomycin B) of an amino function separated from the ring via a methylene group.

This less hindered aminomethyl function enables chemical distinction from the other amino functions with mildly activated acylating agents. Nbenzyloxycarbonyloxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide was hence used to selectively monoprotect paromomycin on position 6'' [40]. As previously described, for each of these intermediates, the other amino functions were next protected with the Teoc group. Amino compounds were obtained by catalytic hydrogenolysis (Fig. 2).

The use of a different approach was motivated by the interesting properties of neomycin B. With 6 amino groups, neomycin B is the natural aminoglycoside containing the most amino functions and it has been shown to induce a conformational change of DNA - from form B to A - which makes the DNA less sensitive to nucleases [41]. The potential interests of the development of single anchored derivatives of this polyamino compound prompted us to also consider other synthetic routes leading to an intermediate presenting a single amino function. Previous work on neomycin B by different groups showed that such an intermediate could be obtained by exploiting the presence of a unique primary hydroxyl function (5"-OH). Given the size of the aminoglycoside, we favored a route where the amino functional group required for the coupling step would be introduced via a spacing unit after activation of the primary hydroxyl functional group over the direct transformation of the 5" position. We therefore used a synthetic path recently reported by the group of Y. Tor to obtain a single amino derivative of neomycin B [36]. Briefly, the neomycin B free base was first fully protected with the Boc group and then regioselectively activated on the 5" position with a sterically hindered sulfonyl chloride (triisopropylbenzylsulfonyl chloride) in order to finally introduce the amino functional group via substitution with the aminoethanethiol (Fig. 3).

At the end, two intermediates leading to new headgroups were obtained to carry this comparative study on aminoglycoside-derived cationic lipids.

The functional intermediates described above were then used to generate the new cationic lipids derived from paromomycin and neomycin B. For comparative purposes, hydrophobic moieties and spacer units were chosen in order to be identical to those previously



Fig. 2. Synthesis of the paromomycine derivative 1. (i) N-Benzyloxycarboxyloxy-5-norbornene-23-dicarboximide, TEA, H\_0.0DMSD (1/10), 12 h; (ii) 2-(trimethylsilyl()ethyl pnitrophenyl carbonate, TEA, dioxane/H<sub>2</sub>O (3/1), 55 °C, 48 h; (iii) H<sub>2</sub>, Pd,C(108), MeOH (108 H<sub>2</sub>O), t h.

used with kanamycin A. It is important to point out that not all combinations of headgroup/spacer/hydrophobic unit were synthesized. Priority was given both to the optimization of the transfection activity and the verification of trends observed with the kanamycin A series. Therefore, taking into consideration preliminary DNA transfection results as well as the conclusions from our previous studies, synthesis of certain compounds was favored over others. Briefly, we favored the use of long spacer units and/or of unsaturated alkyl chains, as they appeared to lead to higher gene transfection efficiencies.

The general synthetic approach was similar to what had been developed for the kanamycin A series: Cbz N-protected spacing



Fig. 3. Synthesis of the neomycin derivative 10. (i) Ditertbutyldicarbonate, TEA, H<sub>2</sub>0/ DMF (1/5), 60 °C, 6 h; (ii) 2.4,6 triisopropylbenzenesulfonyl chloride, pyridine, 48 h; (iii) 2-aminoethanethiol, NaOEr/EtOH, 12 h,

**GENE DELIVERY** 

#### M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 461-469

unit to preserve the orthogonality of the amino protecting groups, introduction of the cholesteryl unit viz a chloroformate function and the alkyl chains viz their carboxylic acid. The importance of the lipidic part was already reviewed by Yu et al. [42].

Therefore, cholesterol derivatives of paromomycin and neomycin B were synthesized by first coupling the amino intermediates with cholesteryl chloroformate and, after purification of the fully protected conjugates, deprotecting the Teoc- or Boc-protected amino functional groups with trifluoroacetic acid to yield CholParomo (3) and CholNeo (12), respectively the paromomycin-cholesterol and neomycin Bcholesterol derivatives (Figs. 4 and 5).

Alkyl chains conjugates were obtained by a slightly different procedure as the hydrophobic groups were introduced via their carboxylic acid function. The coupling resulted from the reaction of the various amino intermediates with the lipidic acid N-succinyl-dioleylamine in presence of EDC and HOAt [26]. The final compounds were isolated as trifluoroacetate salts by deprotection of the amino functional groups of the aminoglycoside moiety with trifluoroacetic acid. Two dioleyl aminoglycoside derivatives were thus obtained: DOSP (5), DOSN (14) (Figs. 4 and 5).

Our previous work clearly established that long spacing units (such as 6-aminocaproic acid or lysine) improved the transfection efficiency of CholKana, the cholesterol derivative of kanamycin A. Accordingly, we chose here to pursue this approach by evaluating the impact of long spacers on aliphatic derivatives. Thus, we incorporated both a 6-aminocaproic acid and a lysine unit into the paromomycin derivative. The synthesis consisted in coupling of the N-protected amino acids followed by a selective deprotection of the Cb2-protected amino functional group of the linking unit to allow the introduction of the cholesterol or dioleyl moieties as described above. In the 4,5disubtituted series, the linkers were used as spacing units for dioleyl chains with two analogs of DOSP (5): DOSCP (9a) and DOSLP (9b) (Fig. 4).

Finally, a "dimeric" aminoglycoside derivative was synthesized in order to evaluate the impact of the size of the cationic headgroup. For this purpose, we chose to use an intermediate of paromomycin (**8b**) bearing a single unprotected amino functional group for the coupling and a



Fig. 4. Synthesis of the paramomycin derivatives. (1) a) Cholesteryl chloroformate, TEA, THF/DMF (8;2), 24 h (2: 598), b) TEA, T-0 °C, 45 min (3–CholParome: 98%); (ii) a) N-succinyl-diolegdamine, HOAt/EDC, DMF/DCM (2/1), 12 h (4: 768), b) TEA, T-0 °C, 45 min (5–DOCF: 98%); (ii) HOAt/EDC, DMF, 12 h (6a: 6-N-(bestylooycarbonyl)-hexanotc acid, 86%; **6b**:  $N_{\alpha}$ -Boc- $N_{c}$ -Ciz-t-lysine, 84%); (iv) H<sub>2</sub>, Pd/C(10%), MeOH (10% H<sub>2</sub>O), 1 h (7a: 96%; **7b**: 98%); (v) a) N-succinyl-diolegtamine, HOAt/EDC, DMF/ DCM (2/1), 12 h (8a: 78%; **8b**: 91%), b) TEA, T-0 °C, 45 min (9a–DOSCP; 94%); 9b– DOSID: 994).



Fig. 5. Synthesis of the neomycin B derivatives. (i) a) Cholesteryl chloroformate, TEA, THE/DMF (6/2), 24 h (11: 52%), b) TEA, T<0°C, 45 min (12—CholNeo; 95%); (ii) a) Nsoccinyl-dioleylamine, HOAH/EDC, DME/DCM (2/1), 12 h (13: 55%), b) TEA, T<0°C, 45 min (14—DOSN: 72%).

long spacing unit with a view to reduce the possible steric hindrance between the two aminoglycosides. Two equivalents of **8b** were thus coupled to N-(carbobenzyloxy)-t-glutamic acid [37] to yield the fully protected "dimeric" headgroup unit. A series of deprotection/coupling reactions allowed good retrieval of a diamino intermediate (**19**) via a lysine unit which was subsequently used to introduce, with the same procedure as described above, two dioleyi chains. Indeed, we reasoned that keeping a balance (between the paromomycin and hydrophobic units) similar to that of compounds already synthesized such as DOSLP **9b**, would be more adequate for studying the effects of the "dimerization." Finally, a deprotection step in trifluoroacetic acid yielded the "dimeric" paromomycin derivative bearing two aminoglycosides units and two dioleyl chains (P2, **21**) (Fig. 6).



Fig. 6. Synthesis of the +dimeric> derivative of paromounycin 21–P2. (i) 7b, HOAE/EDC, DMF, 12 h (87/k); (ii) H<sub>2</sub>, Pd/C(10%); MeOH (10% H<sub>2</sub>O), 2 h 30 min (96%); (iii) N<sub>6</sub>,N<sub>6</sub>-di-Cbe-t-lysine, HOAE/EDC, DMF, 12 h (76%); (iv) H<sub>2</sub>, Pd/C(10%), MeOH (10% H<sub>2</sub>O), 2 h 30 min (85%); (v) a) N-succinyl-dioleylamine, HOAE/EDC, DMF/DCM (2/1), 24 h (20: 57%), b) TFA, T=0 °C, 45 min (21–P2; 99%).

#### M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 467-469

3.1.1. Physico-chemical characterization of the aminoglycoside-derived cationic lipids

The paromomycin- and neomycin B-derived cationic lipids were next characterized with respect to their physico-chemical properties, as previously performed for the kanamycin A derivatives. Assembling properties of the lipids were thus evaluated with Langmuir monolavers (Fig. 7). The results obtained from that study showed that lipidic aminoglycoside derivatives studied here could actually be classified into two groups according to their ability to form monolayers. As regards CholParomo (3) and CholNeo (12), they were not forming monolayers at the air-water interface. The presence of four pseudosaccharide rings as well as of four and six amino functional groups in the paromomycin and the neomycin B derivative, respectively, may indeed confer those cholesterol-based cationic lipids an important water solubility which probably favors the formation of micelles rather than monolayers. In contrast, all the other compounds were found able to form lipid monolayers. From a general point of view, the cationic lipids harboring dioleyl chains presented similar properties with an area per molecule and slope of the curve within the same range. For the dimer (P2, 21), its area is roughly twice that of the corresponding monomer. These results suggest that the dimer might be considered as two monomers in terms of selfassembling properties into monolayers. Finally, the effect of the linker in the paromomycin (DOSP (5), DOSLP (9b)) series appears very limited in comparison to what was previously observed with the cholesterol derivatives of kanamycin A. Nevertheless, the 6-aminocaproic acid unit in DOSCP (9a) seems to lead to somewhat more fluid lipid layers than those obtained with its lysine-containing counterpart DOSLP (9b).

Another aspect of the assembling properties of the aminoglycosidederived lipids was the evaluation by dynamic light scattering (DLS) of the size of the liposomes and the lipoplexes formed with DNA (Table 1). As concerns liposomes, the paromomycin derivatives were characterized by diameters ranging between 40 and 70 nm, whereas the neomycin B derivatives formed liposomes with diameters slightly above 100 nm. This difference might be attributed to the global shape of the vectors in relation to the nature of the headgroup: our neomycin B monosubstituted vectors appear indeed rather "T-shaped," while our paromomycin derivatives tend to be more linear. Such a significant difference in size was however not observed for the lipoplexes, as all cationic lipids studied formed supramolecular DNA complexes generally around 100 nm of diameter. The comparison of these results with those previously obtained with kanamycin A derivatives indicates that aminoglycoside-derived cationic lipids exhibit very similar properties with respect to the overall features of the complexes they form with DNA, as can be estimated by DLS. We also evaluate the zeta potential of these aminoglycosides lipids derivatives. These values around + 70 mV



Fig. 7, Surface pressure-area isotherms (20 °C) for the varioes cationic lipids derived from neorrycin II (CholNeo and DOSN) and paromomycin (CholParomo, DOSP, DOSCP, DOSLP and P2) in tridistilled water.

#### Table 1

Values of the zeta potential  $(\zeta)$ , the diameters  $(\Phi)$  and of liposomes and the diameters  $(\Phi)$  of lipoplexes at N-P ratio of 10.5 for DOSCP, 9.6 for DOSLP. 7 for CholNeo, 8 for DOSN and 11.4 for P2, formed by the various cationic lipids derived from neutrycin B (CholNeo and DOSN) and paromomycin (CholParomo, DOSP, DOSCP, DOSLP and P2) as estimated by dynamic light scattering. For the diameters of the liposomes and the lipoplexes, the polydispersity index is under bracloct.

Vector	Liposome	Liposome	Lipoplex	
	Φ (nm)	š (mV)		
CholNeo	6.63.4	$103 \pm 2.1$	107±38 (0.252)	
CholParomo	0.m.*	$68.7 \pm 6.2$	n.m. <sup>4</sup>	
D06N	137±48 (0.152)	$94.1 \pm 2.4$	126±45 (0.213)	
DOSP	34±8(0.245)	$67.1 \pm 5.6$	n.m.*	
DOSCP	76±19(0.223)	n.m.*	$62 \pm 18 (0.303)$	
DOSLP	38±11 (0.112)	n.m.*	38±11 (0.243)	
92	$42 \pm 13 (0.200)$	n.m.*	64±21 (0.112)	

4 n.m.; not measured.

for the paromomycin derivatives CholParomo and DOSP and + 100 mV for the neomycin derivatives CholParomo and DOSN, show the positive charge of these assemblies after formulation and attest the protonation of the amines in these conditions. The zeta potential of the neomycin derivatives is superior to these of the paromomycin derivatives due to the difference of positive charges, 6 for the neomycin derivatives Chol-Neo and DOSN and 4 for the paromomycin derivatives CholParomo and DOSP. These differences of the zeta potential have already been shown in mono or dicationic lipophosphoramidates [43].

#### 3.1.2. Characterization of DOSP/DNA lipoplexes by CryoTEM

Here, in order to get some further insight into the morphological features of the lipoplexes, we used cryoTEM to study the lipoplexes obtained by mixing DOSP with plasmid DNA (Fig. 8a). In cryoTEM,



Fig. 8. DOSP/DNA lipoplexes, at N/P ratio of 7.5, observed by cryo-electron microscopy. a) Field of view of lipoplexes. Scale bar: 1 µm, b-d), Gallery of lipoplexes at high magnification revealing a multilayered lipid-DNA structure, Scale bar: 50 nm.

#### M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 461-469

these lipoplexes appeared as large and heterogeneous assemblies of approximately 200 nm in size, which exhibit a tendency to form grapes of small condensed structures of about 50 nm. These "elementary" structures appeared to be made of a stack of several lipid layers separated by electron-dense layers that likely correspond to DNA molecules (Fig. 8b-d). Measurement of a spacing of 7 nm strongly suggests that such a spacing distance may indeed correspond to the thickness of a lipid bilayer and a monolayer of double-stranded DNA molecules.

3.1.3. In vitro gene delivery of paromomycin and neomycin B derivatives The aminoglycoside-derived cationic lipids were next tested for their efficiency to transfect a plasmid expressing the luciferase reporter gene into two different human cell lines (HeLa and HEK293). Here, for each vector, we established a dose-response curve where the observed luciferase activity was plotted as a function of the N/P ratio of the lipoplexes. The results shown in Fig. 9 indicate the highest luciferase values obtained for each vector at its optimal charge ratio (N/P lipoplexes ratio is generally between 5.8 and 19 but depending on the cationic lipid used).

With the exception of CholParomo, all our other aminoglycosidederived cationic lipids led to luciferase levels ranging from 10<sup>6</sup> to 10<sup>8</sup> RUJ per mg of protein (for comparison, under the same experimental conditions, the most efficient kanamycin A derivatives led to luciferase expression values between, respectively, 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> and 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> RLU, depending on the cell line used). Overall, the results of the present studies clearly indicate that aminoglycosides other than kanamycin



Fig. 9. Transfection efficiency in vitro of the various cationic lipids derived from neomycin B (CholNeo and DOSN) and paromomycin (CholParomo, DOSP, DOSCP, DOSLP and P2). Luciferase reporter gene expression is indicated as the maximum value obtained from the dose-response curves at the optimal N/P ratio for each lipoplexe. This corresponded to N/P ratio between 5.8 and 19, depending on the vector tested. Cell lines were transfected as described in Materials and methods using lipoplexes prepared by mixing luciferase-expressing plasmid DNA with the required amounts of lipid. Data are expressed as relative lights units (RUJ) per mg of cell protein (mean ± SD).

A can also constitute efficient vectors for gene delivery when derived with hydrophobic moieties.

The effects of the addition of the co-lipid DOPE were similar to what had previously been observed with the kanamycin A series. Indeed, the formulation of the cholesterol derivatives CholNeo and CholParomo with DOPE increased their *in vitro* transfection efficiency; this was observed with both cell lines and especially in the case of CholParomo which was the least efficient when used alone (data not shown). Considering the fact that these two vectors were unable to form monolayers at the air/water interface (see above), the bilayer-forming co-lipid DOPE is likely to contribute to the efficient organization of the hydrophobic layers of the lipoplexes. As previously discussed for the kanamycin A series [21], the unsaturated co-lipid may also contribute in the two cases to the fluidity of the hydrophobic layer. This would be in agreement with the fact that DOPE does not enhance the gene delivery properties of dioleyl derivatives such as DOSP, DOSLP or DOSCP.

The most uncommon vector, the paromomycin dimer P2, did not yield any improvement of gene transfection when directly compared to the more common vectors derived from the same aminoglycoside, i.e. monosubstituted paromomycin derivatives. These results correlate with a higher area per molecule (Fig. 7) and could indicate that such structures may interfere negatively with the supramolecular properties of the liposomes and more importantly lipoplexes. Furthermore, hydroxyl functions could also play – in parallel to amino groups – a significant role in the resulting efficiency of the vectors. Their ability to form hydrogen bonds with nucleic acids could provide part of the structural organization required for efficient compaction, protection and transport of the DNA while still being easier to break than more ionic interactions resulting from charged amino groups.

In addition, a direct comparison could be established for the dioleyl derivatives (DOSK [26], DOSN and DOSP). With HeLa and especially with HEK-293 cells, the paromomycin derivative proved to be more efficient than the kanamycin A and Neomycin B derivatives. Once again, this result might be attributed to the inversion of amino and hydroxyl functions. Within the same family (4,5- or 4,6-linkage) adding more potential charges at the expense of hydroxyl functions seems to diminish the gene delivery efficiency, even though in the case of paromomycin and neomycin B the different anchoring position of the hydrophobic moieties could also affect their properties.

Introducing spacing units in the paromomycin series with dioleyl chains led either to an increase in reporter gene expression with HEK-293 cells or to a slight decrease in transfection efficiency with HeLa cells for the lipidic derivative that contains an additional positive charge due to the lysine in the spacer. These results further confirm that transfection efficiency of a given vector is influenced by the nature of the cell line.

Finally, we also evaluated the transfection efficiency by measuring, by FACS analysis, the percentage of transfected cells. Thus, we here formulated plasmids encoding GFP with DOSP, as DOSP displayed a



Fig. 10. Percentage of transfected cells with DOSP or Lipofectamine® formulations. Hela and HER293 cells were transfected with 0.5 µg of pCMV-GPP plasmid complexed with DOSP at N/P ratio of 7.5, or with Lipofectamine® as recommended by the manufacturer (Invitrgen), GFP-positive cells were counted by flow cytometry 24 h after transfection 6

# GENE DELIVERY

#### 468

M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 461-469

high transfection efficiency in the luciferase transfection experiments (Fig. 9). The results show that 75% and 40% of HeLa and HEK cells, respectively, were transfected with DOSP/DNA lipoplexes (Fig. 10). In comparison, the commercially available transfection reagent Lipofectamine® (LF), used under the same experimental conditions and as recommended by the manufacturer, led to transfection rates of 55% and 40% with HeLa and HEK293 cells, respectively.

#### 3.1.4. Cell viability

The aminoglycoside-derived cationic lipids, DOSP and DOSN, that show the highest transfection efficiency on HeLa cells, were next tested for their toxicity into this cell line (Fig. 11). Results show that DOSP and DOSN are more efficient for gene expression and less toxic for the cells than Lipofectamine®. Indeed, even if DOSN has the same level of transfection than Lipofectamine®, DOSP has transfection efficiency 2.5 times more important than Lipofectamine®. Moreover, the percentage of cell viability around 70% for DOSP and DOSN is more important than the one for Lipofectamine, which is around 40%. Taken together these results clearly support that the novel class of cationic lipids described herein do satisfy the important requirements of efficiency and safety of nonviral vectors.

#### 3.1.5. Gene delivery in vivo

Finally, we also investigated the efficiency of two of the aminoglycoside-derived cationic lipids presented herein for transfection of the mouse airways in order to get some insight into the potential usefulness of our novel vectors for gene transfection in vivo. Thus,



Fig. 11. Percentage of cell survival and transfection efficiency of DOSN, DOSP and Lipofectamine® on HeLa cell line. Cells were transfected with 0.2 µg of pCMV-GFP plasmid complexed with DOSP at N/P ratios of 4.5, 7.5 and 10.5, with DOSN at N/P ratios of 4, 6.6 and 9.3 or with Lipofectamine® as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Cell line was transfected as described in Materials and methods using lipoplexes prepared by mixing luciferase-expressing plasmid DNA with the required amounts of lipid. Data are expressed as relative count per seconds (CPS) per mg of cell protein (mean  $\pm$  SD). Cytotoxicity was done as described in Materials and methods, and was measured using the Cell Titer 96 Non Radioactive Cell Proliferation Assay.

#### Table 2

CAT expression in mouse airways following intranasal instillation of Chol-PEG stabilized lipoptexes of CholNeo/DOPE and DOBAP/DOPE. Chol-PEG-stabilized CholNeo/DOPE/DNA and DOSAP/DOPE/DNA lipoptexes (characterized by N-P ratios of 4.37 and 5 respectively, and a Chol-PEG/DNA (w/w) ratio of 2) were used to deliver a total dose of 160 µg of CATexpressing plasmid DNA. Intranasal instillation was performed; lungs of the treated mice were harvested, processed and assayed for CAT expression as previously described [39]. Data are expressed as ng of CAT expression 100 mg of total cell protein (mean  $\pm$  SD).

Type of vector	CAT expression in lungs (ng/100 mg protein)		
CholNeo/DOPE	$2.61 \pm 1.45$		
DOSLP/DOPE	$2.88 \pm 1.02$		
"naked" DNA	$0.15 \pm 0.16$		

CholNeo (12) and DOSLP (9b) were both formulated with DOPE and Chol-PEG-stabilized lipoplexes were administered intranasally as indicated in Materials and methods and previously described [19,21,34]. The lungs were removed from the treated mice and assayed for chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene expression. Table 2 shows the levels of CAT expression in the lung homogenates. Both vector yielded CAT values in the lungs slightly lower than 3 ng per 100 mg of proteins. These values are in the range of what had been previously observed with other aminoglycosidebased vectors derived from kanamycin A [26]. Finally, Table 2 also shows that only very low levels of CAT expression were observed in the lungs following administration of control "naked" (uncomplexed) CAT-expressing plasmid. Taken together, these results clearly indicate that our novel aminoglycoside-based cationic lipids CholNeo and DOSLP can mediate efficient gene transfection into the mouse airways and they strongly invite to further evaluate the in vivo potential of such vectors.

#### 4. Conclusion

The results obtained here with our novel paromomycin and neomycin B lipid derivatives demonstrate that aminoglycosides other than kanamycin A can also be used for the design of efficient gene delivery vectors. The alkyl conjugates, as well as the cholesterol derivatives when they are formulated with DOPE, did indeed mediate high transgene expression both in vitro in different cell lines and in vivo in the mouse airways. Furthermore, the results obtained with the various series of compounds confirmed some of the results previously observed within the kanamycin A series. Comparing DOSP and DOSN with the same set of hydrophobic moiety and linker indicated that increasing the number of amino functions at the expanse of hydroxyl functions could reduce the efficiency of the resulting vectors. Generally speaking, aminoglycosides are first of all natural binders of RNA (ribosome, ribozyme, RRE, aptamers...) as they tend to have a better affinity for form A nucleic acids. Indeed, the complexation, protection and transport properties of the vectors as well as the favorable interactions of the aminoglycoside headgroups with siRNA have proven to be of prime importance for the efficient and safe delivery of siRNA for gene silencing [44].

#### Acknowledgements

We are very grateful to Samia Zertal-Zidani and Abderrahim Aissaoui for helpful discussions and to Sabrina Pengam for help with the analysis of transfection efficiency by FACS. This work was supported by Grant # 018 716 from the European Union (strep: Synthe-GeneDelivery) and by special grants from the "Association Française contre les Myopathies" (Evry, France), from "Vaincre La Mucoviscidose" (Paris, France) and from "Fondation de France" (Paris, France).

#### M. Mével et al. / Journal of Controlled Release 158 (2012) 461-469

M. Mével is recipient of a post-doctoral fellowship from "Association Française contre les Myopathies."

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10. 1016/j.jconrel.2011.12.019.

#### References

- F. Kihara, H. Arima, T. Tsutsumi, F. Hirayama, K. Uekama, Effects of structure of polyamidoamine dendrimer on gene transfer efficiency of the dendrimer conjugate
- with alpha-cyclodextrin, Bioconjog, Chem, 13 (6) (2002) 1211–1219.
   P. Richard, F. Bossard, L. Desigaux, C. Lanctin, M. Bello-Roufai, B. Pitard, Amphiphilic block copulymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles, Hum. Gene Ther, 16 (11) (2005) 1318–1324. R. Namgung, J. Kim, K. Singha, C.H. Kim, W.J. Kim, Synergistic effect of low cytotoxic
- linear polyethylenimine and multiarm polyethylene glycol: study of physico-chemical properties and in vitro gene transfection, Mol. Pharm. 6 (6) (2009) 1826-1835.
- [4] M. Abbasi, H. Lludag, V. Incani, C.Y. Hsu, A. Jeffery, Further investigation of lipid-substituted poly(i-4ysine) polymers for transfection of human skin fibroblasts, Biomacromolecules 9 (6) (2008) 1618–1630.
- [5] P. Midoux, M. Monsigny, Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes, Bioconjug. Chem. 10 (3) (1969) 406–411.
- [6] M. Mevel, N. Kamaly, S. Carmona, M.H. Oliver, M.R. Jorgensen, C. Crowther, F.H. Salazar, P.L. Marion, M. Fujino, Y. Natori, M. Thanou, P. Arbuthnot, J.J. Yaouanc, P.A. Jaffres, A.D. Miller, DODAG; a versatile new cationic lipid that mediates efficient delivery of pDNA and siRNA, J. Control. Release 143 (2) (2010) 222-232. [7] R. Labas, F. Beilvert, B. Barteau, S. David, R. Chevre, B. Pitard, Nature as a source of

- J. K. Jahnis, F. Dervert, G. Barreau, S. David, R. Chevre, B. Flatti, Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis, Geneticia 138 (2) (2009) 153–168.
   X. Guo, F.C. Szoka Jr., Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery, Acc. Chem. Res. 36 (5) (2003) 335–341.
   J.P. Vigneron, N. Oudrhin, M. Faoquet, L. Vergely, J.C. Bradley, M. Basseville, P. Lehn, J.M. Lehn, Guandinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (18) (1996) appendence. 687-9686
- [10] M.A. Mintzer, E.E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery, Chem. Rev. 109 (2)
- (2009) 259-302. [11] X. Guo, L. Huang, Recent advances in non-viral vectors for gene delivery. Acc
- Chem Res (in press) (doi:10.1021/ar200151m).
  [12] A. Elouahabi, J.M. Ruysschaert, Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes, Mol. Ther. 11 (3) (2005) 336–347.
- [13] S.W. Hu, M. Langner, Y.L. Zhao, P. Ross, F. Hurley, K. Chan, The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer, Biophys. J. 71 (2) (1996) 590–599.
- K.W. Mok, P.R. Cullis, Structural and fusogenic properties of cationic liposomes in the presence of plasmid DNA, Biophys. J. 73 (5) (1997) 2534-2545.
   S. Fletcher, A. Ahmad, E. Perouzel, M.R. Jorgensen, A.D. Miller, A dialkynoyl analogue
- of DOPE improves gene transfer of lower-charged, cationic lipoplexes. Org. Biomol. Chem, 4 (2) (2006) 196–199.
  [16] C.A. Prata, Y. Li, D. Lun, T.J. McIntosh, P. Barthelemy, M.W. Grinstaff, A new helper
- phospholipid for gene delivery, Chem. Commun. (13) (2008) 1566–1568 (Camb).
  [17] P. Midoux, C. Pichon, J.J. Yaouane, P.A. Jaffres, Chemical vectors for gene delivery. a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazele as nucleic acids carriers, Br. J. Pharmacol. 157 (2) (2009) 166–178.
  [18] E. Guenin, A.C. Herve, V.V. Floch, S. Loisel, J.J. Yaouanc, J.C. Clement, C. Ferec, H. des
- [16] E. Guenni, C.C. Hervy, V.F. Hoch, S. Lober, J. Fabrahe, J.C. Cleanen, C. Ferter, H. des Abbayes, Cationic phosphonolipids containing quaternary phosphonium and arsonium groups for DNA transfection with good efficiency and low cellular toxicity<sup>es</sup>, Angew. Chem. Int. Ed Engl. 39 (3) (2000) 629–631.
   [19] M.A. Ilies, W.A. Seitz, I. Ghiviriga, B.H. Johnson, A.Miller, E.B. Thompson, A.T. Balaban, Buddham enhance their budd back address and distance to the second second second.
- Pyridinium cationic lipids in gene delivery: a structure-activity correlation study, J.
- Med. Chem. 47 (15) (2004) 3744-3754. [20] S. Khiati, N. Pierre, S. Andriamanarivo, M.W. Grinstaff, N. Arazam, F. Naller, L. Navailles, P. Barthelenny, Anionic nucleotide-lipids for in vitro DNA transfection, Bioconjug, Chem. 20 (9) (2009) 1765–1772.
  [21] B. Pitard, O. Aguerre, M. Airiau, A.M. Lachages, T. Boukhnikachvili, G. Byk, C. Dubertrer,
- C. Hervico, D. Scherman, J.F. Mayaux, J. Crouzet, Virus-sized self-assembling lamelar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (26) (1997) 14412–14417.

- [22] P. Kreiss, B. Cameron, R. Rangara, P. Mailhe, O. Aguerre-Charriol, M. Airiau, D. Scherman, J. Crouzet, B. Pitard, Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency, Nucleic Acids Res. 27 (19) (1999) 3792-3798.
- (19) (1999) 3792–3798.
  [23] J. Turek, C. Dubertret, G. Jaslin, K. Antonakis, D. Scherman, B. Pitard, Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfertion, J. Gene Med. 2 (1) (2000) 32–40.
  [24] P. Belmont, A. Aissaoni, M. Hauchecome, N. Oudrhiri, L. Petit, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, R. Lehn, Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection in vitro and in vivo, J. Gene Med. 4 (5) (2002) 517–526.
  [25] M. Sainlos, P. Belmont, J.P. Vigneron, P. Lehn, J.M. Lehn, Aminoglycoside-derived cationic lipids in the sene transfection synthesis of knamecin A derivative. Enc.
- cationic lipids for gene transfection: synthesis of kanamycin A derivatives, Eur. J. Org. Chem. 15 (2003) 2764–2774. M. Sainlos, M. Hanchecorne, N. Oudrhiri, S. Zertal-Zidani, A. Aissaoui, J.P. Vigneron,
- 1261 M. Lehn, P. Lehn, Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfec-tion, Chembiochem 6 (6) (2005) 1023–1033.
   D.P. Arya, R.L. Coffee Jr., B. Willis, AJ. Abramovitch, Aminoglycoside-nucleic acid
- nteractions: remarkable stabilization of DNA and RNA triple helices by neomycin, , Am, Chem, Soc. 123 (23) (2001) 5385-5395.
- K. Rege, S. Hu, J.A. Moore, J.S. Dordick, S.M. Cramer, Chemoenzymatic synthesis and high-throughput screening of an aminophycoside-polyamine library: identification of high-affinity displacers and DNA-binding ligands, J. Am. Chem. Soc. 126 (39) 281 (2004) 12306-12315.
- K. Rege, A. Ladiwala, S. Hu, C.M. Breneman, J.S. Dordlick, S.M. Cramer, Investigation of DNA-binding properties of an aminoglycoside-polyamine library using quantitative structure-activity relationship [QSAR] models, J. Chem. Inf. Model, 45 (6) [2005] 1854-1863.
- [30] S. Bera, G.G. Zhanel, F. Schweizer, AntExacterial activities of aminoglycoside antibiotics-derived cationic amphiphiles. Polyol-modified neomycin B-, kanamycin A-, amikacin-, and neamine-based amphiphiles with potent broad spectrum antibacterial activity, J. Med. Chem. 53 (9) (2010) 3626-3631. [31] M.D. Disney, O.J. Barrett, An aminoglycoside microarray platform for directly monitor-
- ing and studying antibiotic resistance, Biochemistry 46 (40) (2007) 11223–11230. [32] M. Hendrix, E.S. Priestley, G.F. Joyce, C.H. Wong, Direct observation of aminoglycosid
- RNA interactions by surface plasmon resonance, 1 Am. Chem. Soc. 119 (16) (1997) 1641-3648
- [33] J.R. Thomas, P.J. Hergenrother, Targeting RNA with small molecules, Chem. Rev. (2008) (4) (2008) 1171–1224.
   Hermann, E. Westhof, Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds, J. Med. Chem. 42 (7) (1999) 1250–1261.
- [35] M. Kaiser, M. Sainlos, J.M. Lehn, S. Bombard, M.P. Teulade-Fichou, Aminoglycoside-quinacridine conjugates: towards recognition of the P6-1 element of telomerase
- RNA, Chembiochem 7 (2) (2006) 321–329.
   [36] S.R. Kirk, N.W. Luedtke, Y. Tor, Neomycin-acridine conjugate: a potent inhibitor of Rev–RRE binding, J. Am. Chem. Soc. 122 (5) (2000) 980–981.
- [37] C.S. Esslinger, KA Cybulski, J.F. Rhoderick, Ngamma-aryl glutamine analogues as probes of the ASCT2 neutral amino acid transporter binding site, Bioorg. Med. Chem, 13 (4) (2005) 1111-1118.
- Chiem, 13 (4) (2005) 1111–1118. M. Patel, E. Vivien, M. Hauchecorne, N. Oudrhiri, R. Ramasawmy, J.P. Vigneron, P. Lehn, J.M. Lehn, Efficient gene transfection by bisguanylated diacetylene lipid formulations, Biochem, Biophys. Res. Commun. 281 (2) (2001) 536–543. B. Hrant, N. Oudrhiri, O. Lambert, E. Vivien, C. Masson, B. Wetzer, M. Hauchecorne, D. Scherman, J.L. Rigaud, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, P. Lehn, Sterically stabilized BCTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways in vivo. J. Gene Med. 3 (5) (2001) 478–487. [39]
- W. Streicher, H. Lobmer, J. Hildebrandt, F. Turnowsky, Synthesis and structure activity relationships of new guaritino derivatives of annioglycoside antibiotics, Drug Exp. Clin. Res 9 (8–9) (1983) 591–598.
- M. Woegerbauer, H. Burgmann, J. Davies, W. Graninger, DNase 1 induced DNA degradation is inhibited by neonsycin, J. Antibiot. (Tokyo) 53 (3) (2000) 276-285. [41]
- D. Zhi, S. Zhang, B. Wang, Y. Zhao, B. Yang, S. Yu, Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery, Bioconjug, Chem. 21 4) (2010) 563-577.
- M. Mevel, T. Montier, F. Lamarche, P. Delepine, T. Le Gall, J.J. Yaouanc, P.A. Jaffren, D. Cartier, P. Lehn, J.C. Clement, Dicationic Lipophosphoramidates as DNA carriers.
- Bioconjag, Chem, 18 (5) (2007) 1604–1611.
  L. Desigaux, M. Sainlos, O. Lambert, R. Chevre, F. Letrou-Bonneval, J.P. Vigneron, P. Lehn, J.M. Lehn, B. Pitard, Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (42) (2007) 16534–16539.

469

DELIVERY

ENE

Chapitre 2 - Etude du mode d'action du copolymère à blocs amphiphile F68 pour la délivrance intracellulaire d'ADN\_

# Chapitre 2 - Etude du mode d'action du copolymère à blocs amphiphile F68 pour la délivrance intracellulaire d'ADN

Le copolymère à blocs amphiphile non ionique F68 ou Lutrol est un vecteur efficace pour la délivrance d'ADN in vivo (Desigaux et al., 2005; Richard et al., 2005a; Richard-Fiardo et al., 2008). Cependant, son mode d'action est inconnu et s'il a été suggéré que certains copolymères de la famille des Pluronics, comme le P85, augmentent l'expression d'un transgène en agissant sur sa transcription (Batrakova and Kabanov, 2008), la faible hydrophobicité du Lutrol par rapport au P85suggère un mécanisme d'action différent.

Nous avons observé que ce vecteur est inefficace in vitro, ce qui suggère que l'environnement cellulaire est un facteur important de son efficacité. Il a été montré auparavant que le Lutrol améliore la diffusion intra-tissulaire des plasmides injectés (Bello-Roufai et al., 2007) mais ce phénomène n'est pas suffisant pour expliquer son efficacité. Contrairement au P85, nettement plus hydrophobe que le F68, il n'existe pas de dépendance au promoteur utilisé pour contrôler l'expression du transgène, suggérant que le Lutrol n'agit pas en facilitant l'importation nucléaire du plasmide ou son taux de transcription mais plutôt au niveau des premières étapes de l'internalisation du transgène ou de l'échappement endosomal.

Nous avons donc focalisé notre étude sur le rôle de ce copolymère au niveau de ces premières étapes ; son absence d'activité in vitro ne permettant pas observation directe, un modèle a été développé pour observer son effet non pas sur de l'ADN nu, mais sur de l'ADN complexé à des vecteurs cationiques. Nos résultats ont montré que le Lutrol augmente l'activité de transfection de ces vecteurs indépendamment du vecteur cationique utilisé (lipide ou polymère) et du type cellulaire tout en n'ayant aucune influence sur le taux de transcription, confirmant que son action n'a pas lieu au niveau des étapes finales de la transfection. Pour éliminer l'hypothèse d'une amélioration de l'importation nucléaire, nous avons comparé son influence sur le transfection d'ADN ou de siRNAs, le premier devant être transporté jusqu'au noyau alors que le second doit être délivré uniquement dans le cytoplasme. Le Lutrol ayant un effet dans les deux cas de figure, son action se situe en amont, au niveau de l'étape d'internalisation cellulaire ou de l'échappement endosomal. Finalement l'observation en cryo-TEM de cellules traitées au F68 a montré que ce vecteur est incapable de promouvoir l'échappement endosomal lorsqu'il n'est pas combiné à des lipides cationiques, suggérant que son rôle dans la transfection est de faciliter l'interaction des complexes vecteur cationique/ADN avec la membrane plasmique. Utilisé seul in vivo, et

notamment en intramusculaire, le Lutrol agit donc probablement comme un facilitateur de la diffusion des plasmides à travers la membrane plasmique, par un mécanisme indépendant de l'endocytose, suggérant une délivrance directe de l'ADN dans le cytosol des cellules ciblées. Ces résultats ont fait l'objet de la publication suivante dans la revue *Nucleic Acids Research*.

1610-1622 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4 doi:10.1093/nar/gkq922

# Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport

Raphaël Chèvre<sup>1,2</sup>, Olivier Le Bihan<sup>3</sup>, Fanny Beilvert<sup>1,2</sup>, Benoit Chatin<sup>1,2</sup>, Benoit Barteau<sup>1,2,4</sup>, Mathieu Mével<sup>1,2</sup>, Olivier Lambert<sup>3</sup> and Bruno Pitard<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U915, <sup>2</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, <sup>3</sup>CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux 1-ENITAB, Avenue des Facultés, Talence, F-33405 and <sup>4</sup>IN-CELL-ART, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, F-44093, France

Received June 17, 2009; Revised September 24, 2010; Accepted September 26, 2010

#### ABSTRACT

Amphiphilic block copolymers have been developed recently for their efficient, in vivo transfection activities in various tissues. Surprisingly, we observed that amphiphilic block copolymers such as Lutrol<sup>®</sup> do not allow the transfection of cultured cells in vitro, suggesting that the cell environment is strongly involved in their mechanism of action. In an in vitro model mimicking the in vivo situation we showed that pre-treatment of cells with Lutrol<sup>®</sup>, prior to their incubation with DNA molecules in the presence of cationic lipid, resulted in higher levels of reporter gene expression. We also showed that this improvement in transfection efficiency associated with the presence of Lutrol® was observed irrespective of the plasmid promoter. Considering the various steps that could be improved by Lutrol®, we concluded that the nucleic acids molecule internalization step is the most important barrier affected by Lutrol<sup>®</sup>. Microscopic examination of transfected cells pre-treated with Lutrol<sup>®</sup> confirmed that more plasmid DNA copies were internalized. Absence of cationic lipid did not impair Lutrol<sup>®</sup>-mediated DNA internalization, but critically impaired endosomal escape. Our results strongly suggest that in vivo, Lutrol<sup>®</sup> improves transfection by a physicochemical mechanism, leading to cellular uptake enhancement through a direct delivery into the cytoplasm, and not via endosomal pathways.

#### INTRODUCTION

Gene transfer in cultured cells is, at present, in the vast majority of cases achieved using cationic lipids or polymers. However, despite having been widely used for more than 10 years for in vitro transfection applications, the use of these molecules has not yet been translated to application in humans because of low in vivo transfection efficiencies and toxicity issues. In this context, a new class of non-viral vectors has emerged for in vivo gene delivery, based on amphiphilic block copolymers consisting of hydrophilic blocks of poly(ethylene oxide) (PEO) and hydrophobic blocks of poly(propylene oxide) (PPO), covalently linked together in various structures. Linear non-ionic block copolymers form an A-B-A or B-A-B tri-block structure of PEO-PPO-PEO or PPO-PEO-PPO, whilst tetra-functionalized, slightly positively charged block copolymers form an X-shaped structure composed of four PEO-PPO moieties linked by the hydrophobic extremity to a central ethylenediamine core (1). Linear and X-shaped block copolymers have been used successfully to increase the deliver reporter and therapeutic genes in various rodent organs including physiological skeletal and cardiac muscle, lung and eyes (2-6) compared to that achieved with the naked DNA approach pioneered by Wolff and colleagues (7-9). Block copolymers have also been used to deliver genes to express proteins of local or systemic therapeutic interest in mouse models of human pathologies including erythropoietin (EPO) to treat anaemia in kidney failure or dystrophin in Duchenne muscular dystrophy (DMD) (10,11). More recently, an X-shaped block copolymer led to a dramatic improvement in DNA vaccination for prophylactic and therapeutic applications by reducing the amount of injected DNA by a factor of at least 50. This rendered the effective DNA dosage more compatible with human use than that achieved with naked DNA, where high amounts of DNA in the milligram range were injected, with disappointing humoral and cellular responses.

Amphiphilic block copolymers used in these various reports belong to a wide chemical family generated by

C The Author(s) 2010. Published by Oxford University Press.

<sup>\*</sup>To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 228 080128; Fax: +33 228 080130; Email: bruno.pitard@univ-nantes.fr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/ by-nc/2.5), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

the degree of polymerization of the ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) units, leading to polymers of molecular weight ranging from 200 to 20000 g/mol and of amphiphilic character measured by the hydrophilic/ lipophilic balance (HLB) ranging from 1 to 24, corresponding to a percentage of PEO of 10 to 80%, respectively. These polymers are also characterized by their critical micellar concentration (CMC) and critical micellar temperature (CMT). These factors govern the self-assembly of these amphiphilic molecules in solution, with unimers formed below the CMC and CMT and, above the CMC and CMT, supramolecular structures including micelles with a hydrophobic core of PPO blocks surrounded by a hydrophilic corona of PEO and also lyotropic liquid crystalline mesophases of varying morphology. The physicochemical properties of block copolymers govern not only the morphology of self-assembly, but also the toxicity, which is inversely related to the percentage of PEO present in the copolymer (12). By contrast, linear PEO-PPO-PEO tri-block copolymers containing a high percentage of PEO are approved by the FDA for intravenous, oral and topical administration. Linear and X-shaped block copolymers, which have been reported to deliver genes in vivo, usually have a molecular weight below 15000 g/mol, a percentage of OE ranging from 10 to 80% and are used at a dose ranging from 0.01 to 5% (w/w).

Some studies have been reported which have aimed to understand the mechanism of action of this novel class of non-viral vectors, at the physicochemical level, by investigating the interaction between block copolymers and DNA molecules, and at the physiological level by studying their biological impact on cell physiology. These studies showed that the physicochemical characterization of block copolymer/DNA complexes was not performed easily with the same techniques that have been used to describe the physicochemical properties of complexes resulting from the interaction of DNA molecules with cationic lipids and polymers. This highlights a difference in the way that DNA interacts with either block copolymers, or highly-positively-charged cationic lipids or polymers. Interactions of DNA with block copolymers probably occur mainly through hydrogen bonding, hydrophobic and some ionic interactions, but not via strong ionic interactions. On the contrary, strong ionic interactions are observed to occur between DNA and cationic lipids or polymers (13). It has also been reported that block copolymers interact with lipidic film, leading to ionic permeabilization of the reconstituted artificial membrane (14). More recently, it was reported that a linear tri-block copolymer with 50% PEO acted as a biological modifier, activating the NFxB inflammation cellular pathway leading to the enhancement of transfection efficiency by the recruitment of transcription factors on the cytomegalovirus promoter, which was used to control the transgene expression (15-17). In fact, we showed previously that PE6400, composed of 40% PEO, promoted DNA trafficking into the nucleus and increases gene expression when microinjected into the cell cytoplasm (4). Nevertheless, this mechanism for linear block copolymer of a low PEO percentage, which is associated

#### Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4 1611

with toxicity, does not necessarily apply to other linear tri-block copolymers consisting of a higher PEO percentage which have been reported as non-toxic and efficient for gene transfer.

In this study, we report that Lutrol®, a linear tri-block copolymer with 80% PEO and a molecular weight of 8600 g/mol, which has been reported to deliver therapeutic genes in mouse models of human diseases with a very good safety profile (10), mediates the increase of cellular internalization of DNA and siRNA molecules by a different pathway to that used by cationic lipids or polymers. The incapacity of lutrol to perform efficient transfection in cationic lipids-free in vitro cells strongly supports its inability to perform endosomal escape, and strongly suggest that Lutrol® acts in vivo via an endocytosis-independent internalization pathway. Our results obtained in vitro revealed Lutrol® general abilities concerning cell membrane interactions that are certainly applicable to its in vivo mechanism. We propose that 80% PEO linear tri-block copolymers do not promote gene transfer by the activation of inflammation cellular pathways, but rather enhance cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport.

#### MATERIALS AND METHODS

#### Plasmids, siRNA, amphiphilic block copolymers and cationic vectors

pCMV-Luc (18) and Gwizz-Luc (Genlantis, San Diego, CA) are plasmids encoding the luciferase reporter gene under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. pGL3 (Promega, Madison, WI) is a plasmid encoding the luciferase reporter gene under the control of the SV40 immediate-early gene promoter. pCMV-GFP (Clontech, Palo Alto, CA) is a plasmid encoding green fluorescent protein reporter gene, under the control of the human cytomegalovirus promoter. immediate-early gene Plasmids were purified from recombinant Escherichia coli by means of Endofree plasmid purification columns (Qiagen, Chatsworth, CA). Human anti-Lamin A/C siRNA was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Negative control siRNA (AllStars Negative Control, sense sequence: UUCUCCGAACGU GUCACGU) was provided by Qiagen (Chatsworth, CA).

F38 [80% poly(ethyleneoxide), molecular weight (MW) 4700], F68 [80% poly(ethyleneoxide), MW 8400] and F108 [80% poly(ethyleneoxide), MW 14 600] were generously provided by BASF (Mount Olive, NJ). For *in vitro* experiments, solutions of block copolymers were prepared at the given weight-to-weight (w/w) concentration in high glucose DMEM (Invitrogen) (4.5 g/l) supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 10 µg/ml streptomycin, 100 µg/ml penicillin. For *in vivo* experiments, stock solutions of block copolymers were prepared at the given weight-to-weight (w/w) in sterilized water. Solutions were stored at 4°C.

DOSP and BGTC were synthesized as previously described (19-22) and provided by IN-CELL-ART (Nantes, France). DOPE was obtained from Avanti 1612 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4

Polar Lipids (Alabaster, AL). JetPEI<sup>®</sup> was obtained from Polyplus (Illkirch, France). ICAFectin<sup>®</sup> 442 was obtained from IN-CELL-ART (Nantes, France). DOSP/DOPE (1/1, mol/mol) and BGTC/DOPE (2/3, mol/mol) cationic liposomes were prepared as previously described (23).

# In vivo plasmid DNA formulations and animal experiments

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Eight-week-old female CD1 mice were obtained from Charles River (Chatillonsur-Chalaronne, L'Arbresle, France). At least five mice were injected in each experimental group and each experiment was repeated two times. For intramuscular injections, mice were anaesthetized with Hypnomidate (40 mg/kg, intraperitoneal injection, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France). Fifty microliters of block copolymer/DNA formulations, cationic lipid/DNA lipoplexes or naked DNA were injected into shaved tibial anterior muscles at a single site, using a microfine syringe (U100; Becton Dickinson, Rungis, France).

#### In vitro formulation

DNA lipoplexes were formulated at a positive charge ratio of four with 1µg plasmid. Complexes of DNA with cationic lipids were prepared by mixing equal volumes of cationic lipids in water with plasmid at the desired concentration in 300 mM NaCl. Complexes of siRNA (37.5 ng) with ICAFectin<sup>®</sup> 442 were prepared as described by the manufacturer. Hybrid DNA/siRNA lipoplexes were formulated at a charge ratio of four with 500 ng DNA mixed with 500 ng siRNA. Complexes of DNAsiRNA with DOSP-DOPE were prepared by mixing equal volumes of cationic lipids in water with nucleic acids at the desired concentration in 300 mM NaCl. In cell conditions, lipoplexes were incubated at room temperature for 15–20 min before transfection.

#### Cell culture, block copolymer incubation and transfection

HeLa, mouse muscle C2C12, COS-7 green monkey kidney fibroblast and H1299 human lung cancer cells were grown at 37°C in 5% CO2/humidified atmosphere in high glucose DMEM medium (4.5 g/l) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 µg/ml streptomycin, 100 µg/ml/ml penicillin (GIBCO and Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and with 10% FBS (Eurobio, Courtaboeuf, France). CHO and CHO-2241 heparan sulfate depleted (CHO HS<sup>-</sup>) cells (a generous gift from P. Fender, Grenoble, France) were grown in the same conditions, replacing DMEM medium by Kaighn's F12 medium (GIBCO, Carlsbad, CA). One day before transfection, cells were transferred into 24-well culture plates, at 60 000 cells per well, resulting in 70-80% confluence 24 h later. Two hours before transfection, cells were incubated with block copolymers at the given w/w concentration in DMEM serum-supplemented medium or Kaighn's F12 serum-supplemented medium for CHO and CHO HS7 cells, respectively. Transfection was performed by adding 50 µl DNA complexes or siRNA/DNA complexes in

450 µl serum-free medium or 107 µl siRNA complexes in 500 µl serum-free medium to each well. For CHO and CHO HS<sup>-</sup> transfection, 100 µl lipoplex, complexed or not with Lutrol<sup>®</sup>, was added in 450 µl serum-free medium. After 2 h, the transfection medium was replaced by 500 µl fresh serum-supplemented medium. Cells were cultured for an additional 20 h before gene expression was determined. Transfection experiments were performed in duplicate.

#### Luciferase and GFP assays

One day after transfection, cells were rinsed with 300 µl phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with 300 µl reporter lysis buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Complete lysis was assured by one freeze-thaw (-80°C/20°C) cycle. Samples were then centrifuged at 10000 rpm for 5 min at 4°C. Luciferase activity was measured using the Promega Luciferase Assay system (Promega, Madison, WI). Luciferase activity was measured from an aliquot of supernatant with a VICTOR<sup>2</sup> multilabel counter (Perkin Elmer, Les Ulis, France). Luciferase activity was assayed by measuring light emission after addition of 100 ul luciferase substrate to 20 µl supernatant. Luciferase activity was normalized to the total protein concentration of the sample. Protein content was measured with a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL).

GFP fluorescence measurements were performed on a 180 µl aliquot of supernatant using a Victor2 apparatus (PerkinElmer, Les Ulis, France). Fluorescence was normalized to the total protein concentration of the sample.

#### Flow cytometry experiments

Twenty hours after transfection, samples of cells  $(10^5-10^6)$ were collected and re-suspended in PBS. The resulting cell suspension was assayed for the expression of GFP by flow cytometer analysis using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The percentage of GFP-positive cells was determined by the flow cytometer programme.

Quantification of YOYO-1 labelled plasmid internalization was performed with luciferase encoding plasmid. Plasmid was added to a solution of YOYO-1 (0.1 mM) in dimethyl sulfoxide (DMSO) at the dye/base pair ratio 1/150. This mixture was incubated at room temperature for 10 min before self assembly of DOSP/DOPE-DNA lipoplexes at a DOSP-DNA charge ration of 4 ( $\pm$ ). Then, HeLa cells were pre-incubated in the presence or in the absence of 3% Lutrol<sup>®</sup> for 1 h before transfection with labelled lipoplexes. Twenty four hours post-transfection, cells were analyzed for their YOYO fluorescence content by flow cytometer analysis as described above.

#### Real-time, quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from transfected cells by TRIzol<sup>®</sup> treatment. Reverse transcription was performed with total RNA using oligo(dT)20 primers and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The expression of lamin A/C was quantified by real-time PCR (ABI prism7000, Applied Biosystems, Foster City, CA). Experiments were performed using PCR Master Mix (Applied Biosystems) with 300 nM each primer and 250 nM TaqMan MGB probes. Primers were obtained from Applied Biosystems. The cycling conditions included a hot start at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min. Results were normalized to the endogenous hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1) control gene and expressed according to the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (24).

#### Labelling of lipoplexes

The labelling procedure of lipoplexes with 15 nm aminated  $\gamma Fe_2O_3@SiO_2$  nanoparticles (Nps) is described in detail elsewhere (25). Briefly,  $3.68 \times 10^{11}$  Nps and  $0.5 \,\mu g$  pCMV-Luc were mixed at a ratio Np/pDNA of 5 (mole/mole) in 300 mM NaCl. Then an equal volume of cationic liposome in pure water was added, to a final lipoplex charge ratio ( $\pm$ ) of four. The formulation was prepared in a 150  $\mu$ l final volume for each well.

#### **Conventional TEM**

Cells were processed for ultramicrotomy according to standard procedures. Briefly, after trypsin treatment, cells from eight wells were pooled, pelleted and fixed for 2 h in a mixture of 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4). Sample pellets were then post-fixed for 1 h at 4°C with 1% osmium tetroxide in the same buffer and were dehydrated with ethanol before embedding in Epon-Araldite. Thin sections (65 nm thick) were stained Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4 1613

successively with 5% uranyl acetate and 1% lead citrate, unless stated in the text. TEM observation was performed with a FEI tecnai F20 operated at 200 kV under low-dose conditions.

#### Quantification of labelled lipoplexes within cell sections

The measurement of Np areas was carried out on images of unstained sections using image J software. Np densities were selected after a manual threshold. The area corresponding to these densities was determined with the 'analyse particles' function providing a surface of Nps. To determine the area of cell sections, we drew the cell contour manually and measured the area with the 'analyse particles' function. The ratio of Np surface to cell section surface allowed the estimation of the amount of Nps per cell, considering that the 65 nm cell section is in the order of magnitude of Np size. This analysis was performed on 158 cell sections from 13 grid squares in total.

#### RESULTS

#### Amphiphilic block copolymers promote high gene transfer in muscular cells in vivo but not in vitro

In order to assess the impact of the cell environment on transfection efficiency, plasmid DNA either naked or complexed either with Lutrol<sup>®</sup>, an amphiphilic block copolymer of 80% PEO, or with cationic liposomes of DOSP/DOPE, was injected into mouse tibial anterior muscle (Figure 1) or incubated, *in vitro*, with C2C12 mouse muscle cells (Figure 1). Luciferase reporter gene expression in C2C12 and in tibial anterior muscle was evaluated 24 h and 7 days after transfection, respectively.



Figure 1. In vivo and in vitro transfection efficiency of amphiphilic block copolymers, cationic lipids and naked DNA. A luciferase gene expression assay was performed to compare the transfection efficiencies of an amphiphilic block copolymer, Lutrol<sup>®</sup> and cationic liposomes of DOSP-DOPE, either in vivo in mouse tibial anterior muscle 7 days after transfection (black bars) or in vitro in the C2C12 mouse muscle cell line 24h after transfection (white bars). The luciferase gene-encoding plasmid was either naked or complexed with 3% Lutrol<sup>®</sup> or with DOSP-DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ . The amount of plasmid transfected in vitro and in vivo was, respectively, 1 and 10 µg.

1614 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4

Injection of 10 µg plasmid DNA complexed with 3% Lutrol<sup>®</sup> led to high luciferase expression in mouse tibial anterior muscle, compared with the very low luciferase expression achieved with naked DNA or DOSP/DOPE-DNA lipoplexes. By contrast, transfection of cultured C2C12 with 1 µg of pCMV-Luciferase complexed with Lutrol<sup>®</sup> did not allow luciferase expression, whereas cationic liposomes of DOSP/DOPE led to a dramatic increase in luciferase expression. These results strongly suggest that the cell environment plays an important role in amphiphilic block copolymer and cationic liposome transfection efficiency.

#### Lutrol<sup>10</sup> and other 80% PEO amphiphilic block copolymers promote efficient muscular gene transfer irrespective of the plasmid promoter

Next, we investigated a possible role of amphiphilic block copolymers with the 80% PEO used in this study, in the activation of some transcription factors, as has been previously described for block copolymers containing 50% PEO (15,16). For this purpose, we compared transfection efficiencies in tibial anterior muscle using two different plasmids encoding luciferase, controlled either by the CMV or SV40 promoter. These two promoters contain different transcription factor binding sites (Table 1). The three polymers tested were all composed of 80% PEO but with various molecular weights, ranging from 4700 to 14700 Da. Figure 2 shows that similar luciferase expression was obtained after intramuscular injection of both plasmids complexed with the various block copolymers,

These data suggest that the mechanism of action of amphiphilic block copolymers of 80% PEO does not depend on the activation of specific transcription factors, unlike that of 50% PEO copolymers.

#### In vitro model to study the in vivo mechanism of amphiphilic block copolymers

As studying the mechanism of action of block copolymers in vivo is very difficult, we decided to set up an in vitro model allowing variation of several parameters, to understand how block copolymers dramatically increased

Table 1. Transcription factor binding sites in the CMV and SV40 promoters [based on Promega data (15)]

Transcription factor binding sites	CMV Promotor	SV40 Promotor
Octamer-binding factor1	+	+
Activator protein 1 (AP1)	+	+
Zinc finger-containing protein SPI	+	+
NF-E2 p45	-	+
GC box elements	(11) (11) (11) (11) (11) (11) (11) (11)	+
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	+	-
cAMP-responsive element binding protein	+	-
NFxB	+	
c-Rel	+	-
AvianC-type LTR TATA box	+	-
Cellular and viral TATA box elements	+	
E4BP4, bZIP domain, transcription repressor	+	
Activating transcription factor	+	-

gene expression *in vivo*. To this end, since block copolymers as naked DNA alone did not transfect cells *in vitro*, we studied the influence of block copolymers on reporter gene expression by first treating cultured cells with the optimized *in vivo* concentration of block copolymers before the addition of DNA molecules complexed with cationic vectors.

C2C12 cells were pre-treated with Lutrol® and then transfected with 1 µg plasmid DNA encoding luciferase complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four (±). Pre-treatment with 3% Lutrol® led to the enhancement of luciferase expression in C2C12 transfected cells compared with untreated cells (Figure 3A). Cell treatment with Lutrol<sup>®</sup> during 0.5 to 2h before transfection, at various concentrations ranging from 0.5 to 3% led to a similar enhancement of transfection efficiency (data not shown). Of note the same optimal Lutrol® concentration was observed both in vitro and in vivo. This improvement in transfection efficiency was also observed with a plasmid encoding another reporter gene; i.e. GFP (Figure 3A). Pre-treatment with Lutrol® of various cell lines, including COS-7, C2C12, HeLa and H1299 cells, also led to a similar enhancement of transfection efficiency (Figure 3B). Various types of cationic lipids were also used and led to the same increase in reporter gene activity after pre-treatment with Lutrol<sup>®</sup> (Figure 3C). Transfection of H1299 cells with JetPEI® was also enhanced by pre-treatment with Lutrol® (Figure 3D). No toxicity was detected in the in vitro model as assessed by MTT experiments (Supplementary Figure S1) and by analysis of NFkB and P53 transcription activation (Supplementary Figure S2).

Altogether, these data suggest that the enhancement of transgene expression mediated by pre-treatment with Lutrol<sup>®</sup> did not depend on neither the reporter gene, the cell line, nor the cationic vector used.



Figure 2. Plasmid promoter influence on transfection efficiency of block copolymers in mouse tibial anterior muscle as a function of the block copolymer molecular weight. Shaved tibial anterior muscles of CD1 mice were injected with 10 µg plasmid encoding luciferase under control of the CMV promoter (black bars) or SV40 promoter (white bars). Before injection, plasmid was formulated with 1% F38, 3% Lutrol<sup>®</sup> or 1% F108 in tyrode. Luciferase gene expression assay was performed 3 days after injection.





Figure 3. Effect of amphiphilic block copolymers on *in vitro* transfection efficiency, as a function of (A) the reporter gene, (B) the cell line, (C) the cationic lipid and (D) the chemical structure of the cationic vector. Reporter gene expression assay was performed in transfected cells after Lutrol<sup>®</sup> treatment (gray bars) or without Lutrol<sup>®</sup> treatment (white bars). Treated cells were incubated with Lutrol<sup>®</sup> diluted at optimized concentration in culture medium for 2h before transfection. (A) C2C12 cells were transfected with 1 µg luciferase or GFP encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ . (B) COS-7, C2C12, HeLa or H1299 cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four ( $\pm$ ). (C) HeLa cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four ( $\pm$ ). (D) H1299 cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four ( $\pm$ ). (D) H1299 cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four ( $\pm$ ). (D) H1299 cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four ( $\pm$ ). (D) H1299 cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four ( $\pm$ ) or with JetPEI<sup>®</sup> according to manufacturer's instructions.

#### Amphiphilic block copolymers enhanced *in vitro* transgene expression, irrespective of their molecular weight and the plasmid promoter

Next, in order to validate our in vitro model and to provide an insight into the in vivo mechanism of action of block copolymers, we investigated the influence of the plasmid DNA promoter and the molecular weight of the block copolymer on transfection efficiency in cultured cells. Figure 4 shows that, as observed in vivo (Figure 2), pre-treatment of cultured cells with block copolymers of various molecular weights led to a similar increase in luciferase expression (Figure 4A). We also showed that either CMV or SV40 promoters led to similar reporter gene expression enhancement in cells pre-treated or not with Lutrol® (Figure 4B). These data strongly suggest that, as observed in vivo, Lutrol® and other 80% PEO block copolymers did not activate promoter-specific transcription factor signalling pathways, but increased gene expression by another mechanism.

# $Lutrol^{\oplus}$ enhanced DNA cellular transport and not reporter gene expression

To investigate a possible role of amphiphilic block copolymers in the stimulation of transcription and translation, cells were treated with Lutrol<sup>®</sup> after the intracellular internalization of DNA molecules had occurred. Figure 5A shows that enhancement of luciferase expression was observed only when cells were pre-treated with Lutrol<sup>®</sup>, suggesting that Lutrol<sup>®</sup> did not promote reporter gene expression stimulation at the transcription or translation level, but rather stimulated steps involved in DNA internalization, endosomal escape or nuclear targeting.

To strengthen this hypothesis, we studied the influence of temperature on luciferase expression obtained after pre-treatment of cells with Lutrol<sup>®</sup>. As expected, in the absence of pre-treatment with Lutrol<sup>®</sup>, we observed that cationic lipid-mediated transfection was partially inhibited at 4°C. By contrast, transfection enhancement by Lutrol<sup>®</sup> was not affected by the transfection temperature, suggesting that the main mechanism of block copolymers is probably due to the improvement of the different steps involved in DNA transfection by a physicochemical process (Figure 5B).

#### Did Lutrol<sup>®</sup> increase cytoplasmic or nuclear delivery?

To analyse the contributions of endosomal escape and nuclear import in the enhancement of transgene expression after cell pre-treatment with Lutrol<sup>®</sup>, we studied the



1616 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4

Figure 4. Effect of amphiphilic block copolymers on *in vitro* transfection as a function of (A) the block copolymer molecular weight or (B) the plasmid promoter used. Cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ . Transfection was performed after block copolymer treatment (gray bars) or without block copolymer treatment (white bars). Luciferase reporter gene assay was performed 24h after transfection. (A) Treated cells were incubated with F38, Lutrol<sup>®</sup> or F108 diluted at optimized concentration in culture medium for 2 h before transfection. (B) Cells were incubated with 3% Lutrol<sup>®</sup> diluted in culture medium for 2 h before transfection with two different plasmids with a CMV or SV40 promoter.

influence of cell pre-treatment with Lutrol<sup>®</sup> on gene silencing efficiency (Figure 6). Indeed, gene silencing occurs after the delivery of siRNA in the cell cytoplasm and not in the nucleus. Thus, if Lutrol® pre-treatment increases nuclear import of the transfected nucleic acids, efficiency of gene silencing, i.e. the residual lamin A/C expression would not be modified by Lutrol®. On the contrary, if nuclear import is not the limiting step overcome by Lutrol®, but rather the common steps of plasmid and siRNA transfection, i.e. cellular internalization or endosomal escape, Lamin A/C inhibition would also be enhanced by Lutrol® pre-treatment. H1299 cells were pre-treated with Lutrol® and then transfected with anti-lamin A/C siRNA complexed with ICAFectin<sup>®</sup> 442 Reagent, in conditions that partially inhibited lamin A/C expression. In the absence of Lutrol® pre-treatment, RT-PCR results showed that the percentage of lamin A/ C inhibition was 31%, whereas Lutrol® pre-treatment led to a percentage of inhibition of 58%, supporting the notion that Lutrol® also enhanced the siRNA transfection process. Next, we decided to study in a single experiment the effect of Lutrol<sup>®</sup> pre-treatment on both siRNA and DNA transfection using particles similar to the one used for plasmid DNA experiments. In this condition using



Figure 5. Effect of amphiphilic block copolymers on *in vitro* transfection as a function of (A) the block copolymer treatment period or (B) the transfection temperature. Cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ , Transfection was performed with Lutrol<sup>®</sup> treatment (gray bars) or without Lutrol<sup>®</sup> treatment (white bars). Luciferase reporter gene assay was performed 24h after transfection. (A) Cells were treated with Lutrol<sup>®</sup> diluted at optimized concentration in culture medium for 2h before or after addition of DOSP/DOPE–DNA lipoplexes. (B) Cells were incubated for 2h at 37 or 4°C, just after the addition of DOSP/DOPE–DNA lipoplexes.



Figure 6. Effect of block copolymers on gene silencing. Anti lamin A/C siRNA transfection was performed on cells after Lutrol<sup>8</sup> treatment (gray bars) or without Lutrol<sup>#</sup> treatment (white bars). Treated H1299 cells were incubated with Lutrol<sup>#</sup> diluted at optimized concentration in culture medium for 2h before transfection. H1299 cells were transfected either with 37.5 ng siRNA complexed with ICAFectin<sup>#</sup> 442, or with 500 ng siRNA mixed with 500 ng plasmid DNA complexed with DOSP-DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ . Real-time quantitative RT-PCR analysis of human lamin A/C mRNA was performed 24h after transfection. Values were normalized to hypoxanthine guanne phosphoribosyltransferase (HPRT1). Values are relative to cells transfected under the same experimental conditions with a control siRNA.

mixed particles would allow us to compare Lutrol<sup>®</sup> impact on gene silencing and reporter gene expression using a single particle containing DNA and siRNA molecules. To this purpose, 500 ng siRNA were mixed with 500 ng plasmid DNA to obtain a total dose of 1 µg nucleic acids, complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of four  $(\pm)$ . H1299 cells were pre-treated with Lutrol<sup>®</sup> and then transfected with hybrid siRNA/DNA particles. The results showed that anti-lamin siRNA transfection allowed an inhibition of lamin RNA expression of 18% and, most importantly, Lutrol<sup>®</sup> pre-treatment increased this inhibition to 41%. We also observed that luciferase expression was enhanced by Lutrol<sup>®</sup> pre-treatment (data not shown).

These data strongly suggest that Lutrol<sup>®</sup> enhanced the common steps of plasmid DNA and siRNA transfection, i.e. cellular internalization and endosomal escape, and did not enhance the terminal steps of plasmid transfection, including nuclear import, transcription and translation.

#### Did Lutrol<sup>®</sup> increase the transfected cell number?

To confirm that block copolymers enhance transfection by DNA molecule internalization and/or endosomal escape, we measured the percentage of transfected cells by FACS analysis using plasmid DNA encoding GFP. FACS analysis showed a similar percentage of GFP-expressing cells in the presence or absence of Lutrol® pre-treatment (Figure 7). As a control, luciferase expression was strongly enhanced after pre-treatment with Lutrol® during the same experiment (Figure 7). These results were also in good agreement with the experiment using β-galactosidase as a reporter gene, as shown by the presence of the same number of blue cells (data not shown) irrespective of pre-treatment with Lutrol®. However, in these two experiments, we noticed that cells pre-treated with Lutrol® expressed the reporter gene at a higher level, as shown by the blue intensity of the cells (data not shown).



Figure 7. Effect of block copolymers on the percentage of transfected cells. C2C12 cells were transfected after Lutrol<sup>®</sup> treatment (gray bars) or without Lutrol<sup>®</sup> treatment (white bars). Treated cells were incubated with Lutrol<sup>®</sup> diluted at optimized concentration in culture medium for 2 h before transfection. One µg of GFP or luciferase encoding plasmid was complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of  $\pm 4.$ GFP expressing cells were counted by flow cytometry and a luciferase gene expression assay was performed 24h after transfection.

Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4 1617

The same observation was made in GFP-transfected cells pre-treated with Lutrol<sup>®</sup> (data not shown). These results strongly suggest that, even if the same number of cells were transfected in the presence of Lutrol<sup>®</sup>, the number of plasmids entering each cell would certainly be increased.

# Lutrol® enhanced DNA cellular uptake: lipoplex labelling and TEM imaging

Next, we investigated if the transfection enhancement observed after lutrol\* pre-treatment was associated with an increase in lipoplex internalization. In order to detect DNA cellular uptake by TEM, lipoplexes were labelled with NPs. Cells were incubated for 2 h in the presence of labelled lipoplexes and then submitted to a fixation procedure. Labelled lipoplexes were observed in both untreated and treated cells and possessed similar morphological aspects indicating that Lutrol® treatment did not modify lipoplex structure (Figures 8C and F). To quantify the cellular uptake of lipoplexes in both conditions, we estimated the Np amount per cell by measuring the Np surface per cell surface (see 'Materials and methods' section). The analysis was performed on 158 cell sections from 13 grid squares. Our quantitative analysis revealed an increase of DOSP-lipoplex uptake by treated cells, as shown in Figure 8E and I. This result suggests that Lutrol<sup>®</sup> promoted an enhanced DNA internalization through the cell membrane. As a control, cells transfected with labelled and unlabelled lipoplexes showed similar luciferase activities (data not shown). Moreover, a strong transfection enhancement after cell treatment with Lutrol® was also observed with labelled lipoplexes (data not shown), indicating that Nps did not influence transfection efficiency, confirming findings of Le Bihan (25). In addition, for both untreated and treated cells, we also determined that the surface of cells containing Nps represented 30% of the total area of cells, which corresponds to the percentage of transfected cells as indicated by FACS analysis and microscopy on GFP transfected cells. We also analysed the lipoplexes internalization by means of YOYO-1-labelled DNA. Flow cytometry analysis showed that cells pre-treated with Lutrol<sup>®</sup> exhibit a 2-fold increase in fluorescence intensity compare to cells that were not pre-incubated with Lutrol® (Figure 9). Altogether, these results indicated clearly that Lutrol® enhanced the cellular uptake of nucleic acids.

#### Lutrol<sup>®</sup> promoted DNA interaction with cell membranes

As efficient, cationic vector-mediated transfection requires the condensation of DNA in positively charged particles, it has been inferred that anionic proteoglycans are potential receptors (26). Direct evidence for the involvement of heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) in transfection has been obtained by several groups (27,28). Figure 10 shows clearly that transfection of heparan sulfate-deficient CHO (CHO HS<sup>-</sup>) cells by DOSP/DOPE-DNA lipoplexes was strongly decreased compared with that obtained in normal CHO cells. By contrast, CHO HS<sup>-</sup> transfected by lipoplexes in the presence of Lutrol<sup>®</sup> exhibited an enhanced luciferase expression. These data strongly



1618 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4

Figure 8. TEM visualization of H1299 cells cellular uptake of DOSP-DOPE/plasmid/Nps (A–C) and after a Lutrol<sup>®</sup> treatment (D–F) observed 2 h after transfection. Cells were transfected with luciferase encoding plasmid complexed with Nps (1/5) and with DOSP-DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ . Ultrathin sections were observed at low (A, D), medium (B, E) and high (C, F) magnification and revealed the presence of labelled lipoplexes containing electron-dense Nps (black arrows). Cell sections were screened for the presence of Nps (asterisks in A and D). Labelled lipoplexes were observed within the cytoplasm and formed multilamellar assemblies (C, F enlargement of marked areas with black squares in B and E). The measurement of Np amount per cell section was performed on unstained sections (G) and analysed after threshold (H). The result is expressed as the ratio of Np surface per cell surface. This ratio increased after Lutrol<sup>®</sup> treatment (I). Scale bars are 10  $\mu$ m (A, D) 500 nm (B, E) and 50 nm (C, F). Nu Nucleus, M Mitochondria. The analysis was performed on 158 cell sections from 13 grid squares.





Figure 9. Cellular uptake of DNA in the presence or in the absence of Lutrol<sup>®</sup> pre-treatment. DNA molecules were labelled with YOYO-1 (one molecule every 150 base pair). Hela cells were transfected after 1h 3% Lutrol<sup>®</sup> treatment or without Lutrol<sup>®</sup> treatment. One µg of labelled luciferase encoding plasmid was complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ . Then, cells were analysed by FACS 24h after transfection.

Figure 10. Effect of block copolymer complexation on lipoplex transfection efficiency. CHO cells and heparan sulphate-deficient CHO-2241 cells (CHO HS<sup>-</sup>) were transfected with 1 µg luciferase-encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of  $\pm 4$ . Lipoplexes were formulated with Lutrol<sup>®</sup> (gray bars) or without Lutrol<sup>®</sup> (white bars). After 24 h, the luciferase gene expression assay was performed.

suggest that Lutrol<sup>®</sup> enhanced the interaction of DNA particles with the cell membrane, improving their uptake.

# Lutrol<sup>10</sup> promoted DNA internalization but not endosomal escape in vitro

To study whether Lutrol® allows DNA internalization in cultured cells without cationic lipids, we labelled DNA molecules with NPs and observed cell section by TEM. Thus, H1299 cells were incubated with labelled DNA complexed with Lutrol<sup>®</sup>. After 3h cells were fixed and submitted to the resin embedding method. TEM visualization of cell sections shows that labelled DNA was localized inside endosomal/lysosomal vesicles (Figure 11C and D) but not in the cell cytoplasm. TEM visualization was repeated 24 h after transfection and never revealed free DNA molecules in the cell cytoplasm (data not shown). However, as presented in the companion paper (25) labelled DNA molecules could be observed in the cell cytoplasm only in the presence of cationic lipids. Of note, identical observations were made on two different cells lines (data not shown), These results strongly suggest that Lutrol® acts as an enhancer of nucleic acids cell-entry in vitro as well as in vivo. The incapacity of Lutrol\* to perform efficient transfection in cationic lipids-free in vitro cells strongly support its inability to perform endosomal escape, and strongly suggest that Lutrol<sup>®</sup> acts in vivo via an endocytosis-independent internalization pathway.

#### DISCUSSION

Amphiphilic block copolymers consisting of EO and PO represent a novel class of non-viral vectors for *in vivo* nucleic acid transfer into various organs. Indeed, numerous studies have shown clearly that *in vivo* injection of DNA complexed with various linear non-ionic block copolymers including Lutrol<sup>®</sup> and PE6400, or tetrafunctionalized X-shaped block copolymers, leads to a dramatic increase in transgene expression, using either a reporter or therapeutic gene, in skeletal and cardiac

#### Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4 1619

muscle and in lung, as well as in the corresponding pathological tissues such as DMD muscles and cystic fibrosis lungs (4,6,11,29). Proof of the effectiveness of PEO/ PPO-based formulations was also reported previously by Lemieux et al., who described the mixture of L61 and F127-named SP1017-for the transfection of skeletal muscle (2). More-recently, P85 was also reported to increase transfection in muscle successfully (15), and F68/DNA formulations were shown to efficiently transfect eyes by drop delivery (3). Despite the great interest of these block copolymers when applying gene transfer in vivo setting, their mechanism of action is still ill defined. Even if it is tempting to assume that needle play a role in DNA transfection in the muscle since muscle cells form a specific anasthamosis cell tissue network, this hypothesis cannot be applied to the mechanism of action of the used block copolymers. Indeed, we also described the large improvement of block copolymer over naked DNA in other organs including heart and most importantly lungs (6) where the injection is performed without needle, just by microspraying the solution containing polymer/DNA complexes. Therefore, even if we cannot definitively rule out that needle could play a role in muscle transfection, it is likely that block copolymers molecules could also act by themselves as vectors improving the in vivo internalization process of DNA molecules.

In the present study, we aimed to elucidate the precise mechanism underlying amphiphilic block copolymer transfection efficiency, which would facilitate an understanding of the differences in transfection abilities *in vitro* and *in vivo*. In vivo, cells have at their disposal a vascular system that brings them essential nutrients, whilst highly dividing cell lines *in vitro* need to develop a strong endocytotic activity to internalize culture medium nutrients to sustain their rapid growth. This particular behaviour of *in vitro* cell lines leads to the facile, non-specific internalization of DNA/cationic lipid or polymer complexes. The cationic vectors currently used—cationic lipids or cationic polymers—complex DNA to form stable and positively charged particles, which interact



Figure 11. TEM visualization of H1299 cells cellular uptake of Lutrol<sup>®</sup>/labelled-NpDNA observed 3 h after incubation. Cells were transfected with luciferase plasmid complexed with Nps (1/5) and with Lutrol<sup>®</sup> at 3%. Ultrathin sections were observed at low (A), medium (B) and high (C and D) magnification and revealed the presence of labelled complexes containing electron-dense Nps (black points). Labelled DNA were observed within endosomal/lysosomal structures (C and D). Scale bar represents 1 µm, 500 and 100 nm in A, B and C–D respectively.
1620 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4

electrostatically with negatively charged molecules such as proteoglycans present at the surface of plasma membranes, and are internalized by adsorptive endocytosis. DNA molecules, then, escape from the endosomes by mechanisms which have been proposed to be dependant of the cationic vector used. Cationic lipids would promote endosomal membrane disruption by a 'flip-flop' mechanism, as has been proposed by Xu and Szoka (30). Cationic polymers such as poly(ethylenimine) (PEI) would promote endosome escape by over-acidification, ultimately leading to rupture of endosome membranes by a proton sponge mechanism (31). After endosomal escape, DNA molecules present in the cell cytoplasm reach the nucleus to be transcribed and translated.

In order to attempt to understand the in vivo mechanism of action of amphiphilic block copolymers, we designed an in vitro model that consisted of treating cultured cells with various amphiphilic block copolymers of different molecular weights, but with a constant percentage of EO. After incubation with block copolymers, DNA molecules were added with a cationic lipid to ensure efficient endosomal escape, one of the main barriers to transfection. We chose the amphiphilic block copolymer subfamily of 80% PEO because of its high in vivo transfection efficiency and good tolerance (10,12). We showed by electron microscopy studies and flow cytometry analysis that cell pre-treatment with Lutrol® dramatically increased DNA molecule internalization into each transfected cell, subsequently leading to an overall increase in transgene expression for a constant percentage of transfected cells. Lutrol® allowed enhancing transfection efficiency for concentration lower than 5%, corresponding also to the efficient in vivo concentration dose. As increasing concentration of amphiphilic block copolymers leads to the formation of micelles, transfection enhancement is probably related to the presence of unimers in vivo as well as in vitro. Interestingly, toxicity assays showed that optimized Lutrol<sup>®</sup> concentration do not affect cell survival in vitro, confirming its in vivo good tolerance. In addition the observed transfection enhancement was not restricted to DNA molecules, as lower molecular weight nucleic acids displaying the A conformation, such as siRNA, also led to a better gene expression inhibition in Lutrol® pre-treated cells. These results strongly support a role of Lutrol<sup>®</sup> in the enhancement of the common step of DNA and siRNA transfection, which is cellular internalization, and not in the processes of intracellular trafficking or transcription and translation, as siRNA has to be located in the cytoplasm and DNA in the nucleus in order to be active.

This is in contrast with the report of Yang *et al.* (15), using P85 [poly(ethyleneoxide)<sub>26</sub>-poly(propyleneoxide)<sub>40</sub>poly(ethyleneoxide)<sub>26</sub>] containing 50% PEO, which activated the NF $\kappa$ B signalling pathway and promoted DNA transfection in a promoter-dependant manner after intramuscular injection. Indeed, it has been proposed that P85 allows transfection of plasmids with viral promoters containing binding sites for specific transcription factors such as NF $\kappa$ B by the improvement of plasmid nuclear targeting due to the NLS sequences present within the transcription factors bound to the plasmid promoter (15). This signalling pathway activation mechanism was also described by Sriadibhatla et al., who demonstrated that P85 activates in vitro luciferase transcription in engineered cells expressing luciferase (17). More recently, Yang et al. showed that P85 cell pretreatment also promotes transfection enhancement in a promoter-dependant manner, suggesting a signalling pathway activation-dependent mechanism (32). A previous study with PE6400 containing 40% PEO also showed that microinjected DNA molecules complexed with PE6400 in the cell cytoplasm led to an increase in transfection efficiency (4). This was probably due to the activation of inflammation pathways resulting in the binding of transcription factors to the CMV promoter, as described with P85.

By contrast, the present study shows that block copolymers of 80% PEO enhance DNA cell internalization without displaying any promoter dependence, either in vivo or in vitro. Transcription factor binding elements present on CMV and SV40 promoters did not influence the transfection efficiency, underlying the absence of promoter-specific signalling pathway stimulation, notably inflammatory such as NFkB signaling pathways. Of note, Q-PCR experiments did not reveal any NFkB transcript enhancement in Lutrol® pre-treated cells, contrary to what has been described with more hydrophobic block copolymers. Therefore, the present study strongly suggests that these 80% PEO block copolymers promote nucleic acid internalization without the activation of previously described inflammatory signalling pathways highlighting their use for the expression of protein of therapeutic interest, as we previously described with EPO expression by intramuscular EPO gene transfer which lasted for at least 250 days (10), and with dystrophin expression in mdx mice (11).

Previous results, and those obtained in this study, have allowed us to propose the in vivo mechanism of action of these 80% PEO block copolymers. Block copolymers interacting with DNA molecules would not only enhance the tissue distribution of DNA molecules, but also their cellular internalization by a passive physicochemical mechanism that does not involve an endocytotic process, but rather by a direct delivery to the cytoplasm by fusion with the cell membrane. Indeed, if DNA was internalized via an endocytic pathway in vivo, PEO-PPO-PEO block copolymers would be unable to facilitate endosomal escape, as shown by the absence of free DNA molecules in the cell cytoplasm as seen by TEM and efficient transfection in cultured cell lines. Thus, one can imagine that Lutrol® could favour the transmembrane passage of DNA molecules, because it has been shown that, on the one hand, polymers are able to interact with cell membranes by their PPO hydrophobic moiety (33), and on the other hand, polymers are also able to directly interact with DNA by their PPO blocks (13). This explanation is also supported by results described in this paper using heparan sulfate-depleted CHO cells, where transfection of cationic lipid/DNA lipoplexes was only observed in the presence of Lutrol<sup>®</sup>, whereas as clearly demonstrated by Kopatz et al., cation-mediated transfection requires heparan sulfate proteoglycan (28). In addition, fusion process has already been described in vitro by using negatively charged

lipoplexes (34). In the reported study, Resina and colleagues demonstrated that cationic but also anionic lipoplexes are both internalized, but that only cationic objects enter cells through temperature-dependant endocytosis. Indeed, anionic objects were able to enter the cell in a temperature-independent manner. Moreover, Lu et al. also recently showed that siRNA lipid based carriers mostly enter the cell through endocytosis-dependent pathway (95%), but also through a minority endocytosis-independent process, which was probably achieved by fusion processes. Interestingly, they observed that this minority endocytosis-independent uptake was responsible of most of the silencing effect, underlying the importance of endosomal sequestration (35). In the present study, the passive enhancement observed with Lutrol® may be attributed to the enhanced attachment of nucleic acids to cell membrane, which could lead to an enhanced internalization through endocytosis in in vitro conditions, but may also be attributed to an enhanced fusion process. In the light of these observations, fusion processes might make sense to a passive and endocytosis-independent role of Lutrol® during in vivo transfection.

All together, these results show that all block copolymers cannot be considered to have a common mechanism of action regarding gene delivery but, depending on their physicochemical characteristics, they can promote gene expression either by direct fusion with the plasma membrane, or by acting as a biological modifier.

#### CONCLUSION

In vitro cells present a particular behaviour respective to in vivo cells. In fact, as they do not have at their disposal a vascular system to bring them the essential nutrients, they developed an enhanced endocytosis to catch the nutrients present in the medium. This extended endocytosis process is the main route used by cationic vectors such as lipoplexes and polyplexes to enter the cell. Their ability to escape from endosomal sequestration (through flip-flop or proton sponge mechanisms) ensures an efficient gene transfer in vitro. A contrario, non-ionic vectors such as amphiphilic block copolymers like Lutrol® can not promote endosomal disruption, leading to lysosomal degradation of the carried nucleic acid molecules. This lack of endosomal escape ability allowed us to propose an in vivo mechanism of internalization through an endocytosis independant pathway. In fact, reductio ad absurdum, if Lutrol<sup>®</sup> was internalized in vivo through endocytosis, its inability to escape from endosomes could not lead to any transfection signal. We support (i) that amphiphilic block copolymers act in vivo independently of an endocytosis mechanism, but also (ii) that they do not enhance nucleic acid transfection at the same level. In fact, we showed here that high HLB polymers, such as Lutrol<sup>®</sup>, facilitate the first step of transfection, i.e. nucleic acid diffusion and cell membrane interaction. Low and intermediate HLB polymers such as P85 have been shown to enhance in vivo transfection through gene expression stimulation and nuclear import facilitation by activating

#### Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4 1621

inflammatory signalling pathways (15,16,17,32). This classification is in good agreement with previous data obtained by Batrakova *et al.* concerning polymers structure influence on membrane interaction behaviour and signalling pathways activation (33). Moreover, this rational analysis of the different transfection steps stimulated by these three vectors (high HLB polymers, low HLB polymers and cationic lipids) could explain the enhanced effect promoted by their combination as demonstrated with SP1017 polymeric formulation (2) or with multimodular lipid-polymer based systems (36). The identification of the mechanism of action of this novel class of vectors for *in vivo* gene delivery should aid in guiding the future design and synthesis of new block copolymers.

#### SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Clothilde Gourden and Emilie Goudeau for excellent technical expertise in cell culture. They thank Pascal Fender (Grenoble, France) for providing CHO-2241 cells. They are also indebted to Pierre and Jean-Marie Lehn for their pioneer works related to the synthesis of cationic lipids used in this study and for their stimulating discussions and constant interest in this work.

#### FUNDING

An ACI 'jeunes chercheurs' grant from the 'Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies'; grant no. 018716 from the European Union (strep; SyntheGeneDelivery); special grants from the 'Association Française contre les myopathies' (Evry, France) and 'Vaincre la Mucoviscidose' (Paris, France). O.L. and F.B. are recipients of Ph.D. fellowships from 'Vaincre la Mucoviscidose'. Funding for open access charge: INSERM.

Conflict of interest statement. None declared.

#### REFERENCES

- Pitard, B., Bello-Roufai, M., Lambert, O., Richard, P., Desigaux, L., Fernandes, S., Lanctin, C., Pollard, H., Zeghal, M., Rescan, P.Y. et al. (2004) Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res.*, 32, e159.
- Lemieux, P., Guerin, N., Paradis, G., Proulx, R., Chistyakova, L., Kabanov, A. and Alakhov, V. (2000) A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene. Ther.*, 7, 986–991.
- Liaw,J., Chang,S.F. and Hsiao,F.C. (2001) In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles. *Gene Ther.*, 8, 999–1004.
- Pitard,B., Pollard,H., Agbulut,O., Lambert,O., Vilquin,J.T., Cherel,Y., Abadie,J., Samuel,J.L., Rigaud,J.L., Menoret,S. et al. (2002) A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery

1622 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 4

in vivo to skeletal and cardiac muscles. Hum. Gene Ther., 13, 1767-1775.

- Kabanov, A.V., Lemieux, P., Vinogradov, S. and Alakhov, V. (2002) Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. Adv. Drug Deliv. Rev., 54, 223–233.
- Desigaux, L., Gourden, C., Bello-Roufai, M., Richard, P., Oudrhiri, N., Lehn, P., Escande, D., Pollard, H. and Pitard, B. (2005) Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther.*, 16, 821–829.
   Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Aesadi, G.,
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P.L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 247, 1465–1468.
- muscle in vivo. Science, 247, 1465–1468.
  8. Wolff J.A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A. and Chong, W. (1991) Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques*, 11, 474–485.
- Wolff, J.A., Ludtke, J.J., Acsadi, G., Williams, P. and Jani, A. (1992) Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.*, 1, 363–369.
- Richard-Fiardo, P., Payen, E., Chevre, R., Zuber, J., Letrou-Bonneval, E., Beuzard, Y. and Pitard, B. (2008) Therapy of anemia in kidney failure, using plasmid encoding erythropoietin. *Hum. Gene Ther.*, 19, 331–342.
- Richard, P., Bossard, F., Desigaux, L., Lanctin, C., Bello-Roufai, M. and Pitard, B. (2005) Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum. Gene Ther.*, 16, 1318–1324.
- Johnston, T.P. and Miller, S.C. (1985) Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. J. Parenter. Sci. Technol., 39, 83–89.
- Bello-Roufai, M., Lambert, O. and Pitard, B. (2007) Relationships between the physicochemical properties of an amphiphilic triblock copolymers/DNA complexes and their intramuscular transfection efficiency. *Nucleic Acids Res.*, 35, 728–739.
   Gau-Racine, J., Lal, J., Zeghal, M. and Auvray, L. (2007) PEO-PPO
- Gau-Racine, J., Lal, J., Zeghal, M. and Auvray, L. (2007) PEO-PPO block copolymer vectors do not interact directly with DNA but with lipid membranes, J. Phys. Chem. B, 111, 9900–9907.
- Yang,Z., Zhu,J., Sriadibhatla,S., Gebhart,C., Alakhov,V. and Kabanov,A. (2005) Promoter- and strain-selective enhancement of gene expression in a mouse skeletal muscle by a polymer excipient Pluronic P85. J. Control Release, 108, 496–512.
- Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Sriadibhatla, S., Yang, Z., Kelly, D.L. and Alakov, V.Y. (2005) Polymer genomics: shifting the gene and drug delivery paradigms. J. Control Release, 101, 259–271.
- Sriadibhatla,S., Yang,Z., Gebhart,C., Alakhov,V.Y. and Kabanov,A. (2006) Transcriptional activation of gene expression by pluronic block copolymers in stably and transiently transfected cells. *Mol. Ther.*, 13, 804–813.
- Ferrari, S., Moro, E., Pettenazzo, A., Behr, J.P., Zacchello, F. and Scarpa, M. (1997) ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 4, 1100–1106.
- Vigneron, J.P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.C., Basseville, M., Lehn, P. and Lehn, J.M. (1996) Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 9682–9686.
- Desigaux, L., Sainlos, M., Lambert, O., Chevre, R., Letrou-Bonneval, E., Vigneron, J.P., Lehn, P., Lehn, J.M. and Pitard, B. (2007) Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 16534–16539.

- Sainlos, M., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Zertal-Zidani, S., Aissaoui, A., Vigneron, J.P., Lehn, J.M. and Lehn, P. (2005) Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection. *Chembiochem.*, 6, 1023–1033.
- Belmont, P., Aissaoui, A., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Petit, L., Vigneron, J.P., Lehn, J.M. and Lehn, P. (2002) Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection in vitro and in vivo. J. Gene Med., 4, 517–526.
- 23. Pitard, B., Oudrhiri, N., Vigneron, J. P., Hauchecorne, M., Aguerre, O., Toury, R., Airiau, M., Ramasawmy, R., Scherman, D., Crouzet, J. et al. (1999) Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 2621–2626.
- Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402–408.
- Le Bihan,O., Chèvre,R., Mornet,S., Garnier,B., Pitard,B. and Lambert,O. (2010) Probing the mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. doi:10.1093/nar/ gkq921.
- Labat-Moleur, F., Steffan, A.M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., Oberling, F., Brambilla, E. and Behr, J.P. (1996) An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.*, 3, 1010–1017.
- Mislick, K.A. and Baldeschwieler, J.D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 12349–12354.
- Kopatz, I., Remy, J.S. and Behr, J.P. (2004) A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. J. Gene Med., 6, 769–776.
- Piron,J., Quang,K.L., Briec,F., Amirault,J.C., Leoni,A.L., Desigaux,L., Escande,D., Pitard,B. and Charpentier,F. (2008) Biological pacemaker engineered by nonviral gene transfer in a mouse model of complete atrioventricular block. *Mol. Ther.*, 16, 1937–1943.
- Xu,Y. and Szoka,F.C. Jr (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, 35, 5616–5623.
- Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E. and Danos, O. (2001) Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. J. Gene Med., 3, 135–144.
- Yang,Z., Sahay,G., Sriadibhatla,S. and Kabanov,A.V. (2008) Amphiphilic block copolymers enhance cellular uptake and nuclear entry of polyplex-delivered DNA. *Bioconjug. Chem.*, 19, 1987–1994.
- Batrakova, E.V., Li, S., Alakhov, V.Y., Miller, D.W. and Kabanov, A.V. (2003) Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304, 845–854.
   Resina, S., Prevot, P. and Thierry, A.R. (2009) Physico-chemical
- Resina,S., Prevot,P. and Thierry,A.R. (2009) Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy. *PLOS ONE*, 4, e6058.
- Lu, J.J., Langer, R. and Chen, J. (2009) A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Mol. Pharm.*, 6, 763–771.
   Letrou-Bonneval, E., Chevre, R., Lambert, O., Costet, P., André, C.,
- Letrou-Bonneval, E., Chevre, R., Lambert, O., Costet, P., André, C., Tellier, C. and Pitard, B. (2008) Galactosylated multimodular lipoplexes for specific gene transfer into primary hepatocytes, J. Gene Med., 10, 1198–1209.



## Supplementary data

Figure S1: Toxicity assay of Lutrol® treatment. MTT toxicity assay was performed on treated cells to assess treatment toxicity. Cells were pretreated with indicated amounts of Lutrol and transfected as previously described with DOSP/DOPE at a charge ratio of (4+/-). NT: Non-transfected.



**Figure S2:** Analysis of NFkB and P53 transcriptional variation during Lutrol® treatment in vitro. C2C12 cells were transfected with 1µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP-DOPE at a charge ratio of 4 (+/-). Transfection was performed after Lutrol® treatment (grey bar) or without Lutrol® treatment (white bars). Quantification of NFkB (A) and P53 (B) transcripts was performed by quantitative RT-PCR. Values were normalised to hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1) in each condition.

## Chapitre 3 - Développement d'un protocole de vaccination à ADN dans un modèle d'asthme allergique chez la souris

# Chapitre 3 - Développement d'un protocole de vaccination à ADN dans un modèle d'asthme allergique chez la souris

L'efficacité avec laquelle les copolymères à blocs amphiphiles permettent la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques, alliée aux propriétés immunomodulatrices de l'ADN, en fait des candidats de choix pour le développement de nouveaux vaccins basés sur l'ADN. Le polymère tétrabranché 704 notamment a montré son efficacité pour la délivrance d'ADN plasmidique dans le muscle squelettique (Pitard et al., 2004). Il a en outre été utilisé avec succès dans le développement d'un modèle de vaccination contre une protéine modèle (McIlroy et al., 2009) et d'un modèle de vaccination pour le traitement du carcinome hépatocellulaire induit par la diéthylnitrosamine chez la souris (Cany et al., 2011).

L'asthme allergique, causé par une réaction exacerbée de l'organisme contre des antigènes présents dans notre environnement, est un problème majeur de santé publique puisqu'il touche 300 millions de personnes dans le monde. L'un des allergènes majoritaires rencontrés chez les patients est la protéine Derf1 de l'acarien *D. farinae*. Des travaux antérieurs ont montré que l'injection intramusculaire d'un plasmide nu encodant cette protéine dans un modèle de souris asthmatique permet d'améliorer les paramètres biologiques des animaux traités. Cependant, la quantité de plasmide importante (50 µg à 300 µg) que nécessite ce protocole le rend difficilement transposable chez l'humain.

Nous avons étudié dans un travail collaboratif avec l'équipe de A. Magnan le développement d'un modèle de souris asthmatique et la mise au point d'un protocole de vaccination contre Derf1 utilisant le polymère 704. Les résultats montrent que des injections de 10 µg seulement d'ADN permettent la mise en place d'une réponse immunitaire biaisée Th1 contre Derf1 amenant à la diminution de la réponse allergique suite à une exposition à l'antigène. Ces travaux confirment l'efficacité du 704 comme adjuvant pour la vaccination à ADN, permettant de réduire drastiquement les doses d'ADN utilisées tout en autorisant la mise en place d'une réponse immunitaire biais at ADN, permettant de réduire drastiquement les doses d'ADN utilisées tout en autorisant la mise en place d'une réponse immunitaire puissante. Ces résultats ont fait l'objet de la publication suivante dans la revue *Human Gene Therapy*.

HUMAN GENE THERAPY 23:597-608 (June 2012) Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/hum.2012.024

## DNA/Amphiphilic Block Copolymer Nanospheres Reduce Asthmatic Response in a Mouse Model of Allergic Asthma

Fanny Beilvert,<sup>1,2</sup> Adrien Tissot,<sup>1-3</sup> Marie Langelot,<sup>1-3</sup> Mathieu Mével,<sup>1,2</sup> Benoit Chatin,<sup>1,2</sup> David Lair,<sup>1,2</sup> Antoine Magnan,<sup>1-3</sup> and Bruno Pitard<sup>1,2,4</sup>

#### Abstract

Asthma is a chronic, inflammatory, respiratory disease caused by an abnormal reactivity against allergens. The most promising treatments for asthma are based on specific immunotherapies, but they lack efficiency and can induce deleterious side effects. Among new modalities of immunotherapy currently in development, DNA vaccination presents a promising approach, as it enables targeted immunotherapy in association with reduced allergenicity. We have developed an innovative, DNA-based vaccine against *Dermatophagoides farinae* 1 allergen (Der f 1), one of the allergens most commonly encountered by asthma patients in Europe. Intramuscular administration of a Der f 1-encoding plasmid formulated with the block copolymer 704 in healthy mice induced a strong humoral and cellular response with a pro-helper T cell type 1 bias. Administration of the same formulation in asthmatic mice, according to an early vaccination protocol, led to a reduction of airway hyperresponsiveness and a significant decrease in the level of inflammatory cytokines in the bronchoalveolar lavage of Der f 1-vaccinated mice.

#### Introduction

LLERGIC ASTHMA is a chronic respiratory disease af- ${f A}$  fecting 300 million people worldwide (Global Initiative for Asthma [GINA], 2011). The number of individuals with asthma has doubled since the early 2000s (Loddenkemper et al., 2003) and about 250,000 people die prematurely of this condition each year (Bousquet et al., 2007; Bateman et al., 2008). In the majority of cases, asthma is caused by an abnormal reactivity against some environmental antigens, also called allergens (Arbes et al., 2007). In Western Europe, the prevalence of atopic diseases (including asthma and rhinitis) is more than 30%, and thus allergic diseases are considered to be an important public health issue (Asher et al., 2006). Considering the pathophysiological aspects, allergic asthma is a bronchial inflammatory disease resulting from the exposure of a predisposed subject to various allergens. In Europe and the United States, the most commonly encountered species of mite are Dermatophagoides pteronyssinus and Dermatophagoides farinae. In Europe, Dermatophagoides farinae 1 (Der f 1) is one of the major allergens of Dermatophagoides farinae, and 50% of the allergic population are carriers of Der f 1 IgE-specific antibodies (Zock et al., 2006).

Patients with asthma are usually treated with corticosteroids, which, however, only suspend the disease and are associated with deleterious side effects (Barnes, 2010). An alternative treatment for allergic asthma is based on a specific immunotherapy protocol: the repeated administration of increasing doses of allergen to induce hyposensitivity, and hence reduced symptoms when another subsequent exposure to this allergen occurs. Nevertheless, the efficacy of immunotherapy remains limited (Pipet *et al.*, 2009), and its efficacy is variable between patients. Moreover, immunotherapy may cause an anaphylactic crisis when administered subcutaneously.

Thus, new modalities for immunotherapy are under development, notably based on DNA vaccination, which presents a promising approach. Here, DNA encoding immunodominant peptide sequences of the allergen are administered instead of allergen extracts, leading to a targeted immunotherapy associated with reduced allergenicity. Some studies have shown the therapeutic potential of this strategy. Jarman and Lamb reported that intramuscular administration

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>INSERM U915, Nantes F-44000, France.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Université de Nantes, IRT-UN, l'Institut du Thorax, Nantes F-44000, France.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>CHU Nantes, l'Institut du Thorax, Service de Pneumologie, Plate-Forme Transversale d'Allergologie, Nantes F-44000, France.
<sup>4</sup>In-Cell-Art, Nantes F-44093, France.

to asthmatic mice of a naked plasmid encoding an immunodominant peptide of Der p 1, which is one of the major allergens in allergic asthma, led to a decrease in type 2 cytokines in bronchoalveolar lavages compared with untreated mice (Jarman and Lamb, 2004). The antigen-encoding plasmids may also be formulated with adjuvants that are able to modulate the immune response toward a helper T cell type 1 (Th1) or type 2 (Th2) bias as reported by Kim and colleagues, who used bacillus Calmette-Guérin, known to induce a Th1 bias, in a DNA vaccination protocol against Der p 2 (Kim et al., 2006). Nevertheless, the amounts of DNA used in these studies were too large to consider a future application in humans. Moreover, no study has demonstrated that DNA vaccination against the specific allergen, Der f 1, could prevent or reduce the development of asthmatic symptoms in a relevant animal model.

Thus, the future application of DNA vaccines in humans requires the development of a new, efficient, and safe adjuvant that is capable of inducing a strong humoral and cellular response with a low dose of injected DNA. Previous studies by our group showed that formulations comprising plasmid DNA in association with a new class of synthetic vector, a tetrafunctional block copolymer, were able to safely increase the transfection efficiency of reporter or therapeutic genes in lung, skeletal muscle, and cardiac muscle in healthy subjects and animal models of disease compared with results achieved with naked DNA (Pitard et al., 2004; Richard et al., 2005; Jespersen et al., 2007; Piron et al., 2008; Richard-Fiardo et al., 2008; Biliczki et al., 2009). It has also been shown that the tetrafunctional block copolymer 704 is able to promote low-dose DNA vaccination efficiency (McIlroy et al., 2009). This novel class of vector has also been used to treat hepatocellular carcinoma in a highly autochthonous, relevant mouse model (Cany et al., 2011).

In the present study, we developed an innovative synthetic DNA vaccine, based on block copolymer against the allergen Der f 1, to modulate the allergic response in asthmatic mice. The formulation of the Der f 1 vaccine has been optimized in a model of healthy mice, and allowed to elicit a strong humoral and cellular response with a Th1 and CD8<sup>+</sup> T cell type 1 (Tc1) bias. Administration of this formulation in a highly relevant new model of asthmatic mice, according to an early vaccination approach, led to a significant reduction in airway hyperresponsiveness, and of levels of inflammatory cytokines in the bronchoalveolar lavage (BAL), which were, in contrast, present at higher levels in the lungs of nonvaccinated asthmatic mice.

#### Materials and Methods

#### Animal procedures

BALB/c mice (Elevage Janvier, Le Genest, France) were housed under conventional conditions according to INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) guidelines. Mice, 8 weeks of age, were used for all experiments. For intramuscular DNA vaccination, mice were anesthetized by isoflurane inhalation, and then various DNA-polymer formulations were injected into both tibialis anterior muscles, using an Insumed Pic Indolore 30-gauge syringe (Artsana, Grandate, Italy). Two sites were injected per animal, and DNA doses were given via the tibialis anterior. In all cases, the injection volume was 50 µl per in-

#### BEILVERT ET AL.

jection site. After vaccination, sera and spleens were recovered for analysis of the immune response at the end of each experiment.

#### Plasmid preparation and formulation

The pCMV-βgal plasmid (Clontech, Saint-Germainen-Laye, France) encoding β-galactosidase, and the pVAX-Derf1 plasmid encoding Der f 1, under the control of the human cytomegalovirus immediate promoter, were used as antigen. The pVAX-Derf1 plasmid was obtained by cloning the Der f 1 gene sequence into pVAX (Invitrogen, Courtaboeuf, France) with *Hind*III and *Xhol* restriction enzymes. pQE30 (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used as carrier DNA. All plasmids were purified by passage through EndoFree plasmid purification columns (Qiagen). The tetrafunctional block copolymers 304, 704, and 904 were kindly supplied by In-Cell-Art (Nantes, France). Plasmid DNA was formulated immediately before intramuscular injection, as previously described (McIlroy *et al.*, 2009).

#### Der f 1 expression

For Der f 1 expression experiments, tibialis anterior muscles were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen. Der f 1 expression was then quantified in muscle extracts, using a Der f 1 ELISA kit (Indoor Biotechnologies, Wiltshire, UK) according to the manufacturer's protocol.

#### Measurement of immune response

Humoral immune responses were measured by ELISA. For anti-Der f 1 IgG, IgG1, and IgG2a antibody dosage, 96well plates (MaxiSorp; Nunc/Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4°C with purified Der f 1 (2.5 µg/ml) (Indoor Biotechnologies) in NaHCO3 (50 mmol/liter), pH 9.5, and then blocked for 1 hr at room temperature with phosphate-buffered saline (PBS)-0.05% Tween 20-1% bovine serum albumin, before distributing diluted sera in duplicate. Plates were incubated at 37°C for 90 min, and then Der f 1-specific IgG, IgG1, and IgG2a were detected with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) diluted 1:5000, goat anti-mouse IgG1 (AbD Serotec, Oxford, UK) diluted 1:10,000, and goat anti-mouse IgG2a (AbD Serotec) diluted 1:10,000 in PBS-0.05% Tween 20, respectively. Peroxidase activity was revealed with o-phenylenediamine (1 mg/ml) in pH 5 citrate buffer. Reactions were stopped by addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 mol/liter), and optical density was measured at 490nm. Anti-Der f 1 IgG titers were calculated from the regression curve of a standard Der f 1-specific mouse serum included in each ELISA plate. The absolute titer of the standard was 204,800 and was diluted from 1:1000 to 1:64,000 to build a calibration curve. Each tested sample was diluted two times and dilutions with optical density (OD) included in the linear part of the calibration curve were conserved for antibody titer determination. Other dilutions were excluded. Similarly, for anti-β-galactosidase (β-Gal) IgG antibody dosage, 96-well plates (MaxiSorp; Nunc/Thermo Fisher Scientific) were coated overnight at 4°C with purified β-Gal (5µg/ml) (Roche, Rosny-sous-Bois, France) in NaH-CO3 (50 mmol/liter), pH 9.5, and then blocked for 1 hr at room temperature with PBS-0.05% Tween 20-1% bovine

#### Der f 1/704 VACCINATION IN A MOUSE MODEL OF ASTHMA

serum albumin, before distributing diluted sera in duplicate. Plates were incubated at 37°C for 90 min, and then β-Galspecific IgG was detected with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) diluted 1:5000 in PBS-0.05% Tween 20. Peroxidase activity was revealed with o-phenylenediamine (1 mg/ml) in pH 5 citrate buffer. Reactions were stopped by addition of H2SO4 (1mol/liter), and optical density was measured at 490nm. Anti-ß-Gal IgG titers were calculated from the regression curve of a standard β-Gal-specific mouse serum included in each ELISA plate. The titer of the standard was arbitrarily fixed at 5000 and was diluted from 1:1000 to 1:64,000 to build a calibration curve. Each tested sample was diluted two times and dilutions with OD included in the linear part of the calibration curve were conserved for antibody titer determination. Other dilutions were excluded.

As a paradigm readout of the cellular response to block copolymer 704 vaccine formulation, the Der f 1-specific CD8\* response was tested by class I-restricted interferon (IFN)-7 secretion determined by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) (AbCys, Paris, France). Sixteen 8-mer Der f 1derived peptides predicted to bind with H-2K<sup>b</sup> were selected on the basis of the binding score, as calculated by BIMAS and NetMHC software (Supplementary Table S1; supplementary data are available online at www.liebertonline.com/hum) and were used as representative Der f 1 epitopes. The negative control was the KRWIILGLNK peptide (HIV Gag 263-272). Live splenocytes were counted on a hemocytometer slide by trypan blue exclusion, resuspended at 10°/ml in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine [2 mmol/liter], penicillin, and streptomycin; all from Invitrogen, Paisley, UK), and then distributed in triplicate at 105 cells per well. Cells were incubated overnight at 37°C in 5% CO2 in the presence of peptide at 4 µg/ml. Spot-forming colonies (SFCs) were detected according to the manufacturer's protocol and counted automatically with an AID ELISPOT reader (Autoimmun Diagnostika, Strassberg, Germany), and results were expressed as SFCs per million splenocytes after subtraction of the nonspecific signal obtained with the negative control.

#### Allergic asthma mouse model

BALB/c mice were sensitized and challenged with total extract of *Dermatophagoides farinae*, kindly supplied by Stallergenes (Antony, France), according to the protocol described in Fig. 5. Mice were sensitized percutaneously in each ear with 250  $\mu$ g total extract of HDM diluted in 10  $\mu$ l of dimethyl sulfoxide, and challenged by intranasal inhalation of 250  $\mu$ g total extract of HDM diluted in 40  $\mu$ l of PBS.

#### Measurement of airway responsiveness

Airway responsiveness was measured in conscious, unrestrained mice using barometric, whole-body plethysmography by recording respiratory pressure curves (EMKA Technologies, Paris, France) in response to inhaled methacholine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at concentrations of 5–20 mg/ml for 1 min. Airway responsiveness was expressed in enhanced pause ( $P_{enh}$ ) units, a calculated value, which correlates with the measurement of airway resistance, impedance, and intrapleural pressure in the same mouse:  $P_{enh} = (t_e/t_r - 1) \times PEF/PIF$  (where  $t_e$  is the expiration time,  $t_r$  is the relaxation time, PEF is the peak expiratory flow, and PIF is the peak inspiratory flow).

#### Bronchoalveolar lavage analysis

Mice were tracheotomized and administered 1 ml of sterile PBS intratracheally through a flexible catheter. Cells and supernatants from recovered fluid were separated by centrifugation. Total cell number was determined by optical microscopy and after cell samples were spotted on Cytospin slides using a cytocentrifuge (Cytospin; Thermo Fisher Scientific). Cell proportions were established after May-Grünwald Giemsa staining of about 300 cells.

#### Cytokine analysis

Expression levels of cytokines interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, and IFN-γ were determined in BAL supernatant by Luminex technology. A bead-based Bio-Plex kit (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) was used to measure IL-4, IL-5, IL-13, and IFN-γ. The assays were performed according to the manufacturer's specifications. Cytokines were quantified on the basis of an eight-point calibration curve constructed from the standard provided. Data analysis was performed with Bio-Plex Manager software version 4.0.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with SigmaStat 2.03 software (Systat, San Jose, CA). All data are expressed as means $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed by Student–Newman test. p < 0.05 was considered significant.

#### Results

#### Optimization of formulation containing various amounts of DNA encoding Der I 1

We previously showed that a formulation containing  $\beta$ galactosidase-encoding plasmid with the block copolymer 704 led to high antigen expression *in vivo*, correlating with a strong humoral and cellular response against  $\beta$ -Gal (McIlroy *et al.*, 2009). Here, mice were injected intramuscularly with plasmid encoding the Der f 1 antigen formulated with block copolymer 704. Five days after injection, muscles were collected and evaluated for Der f 1 expression levels by ELISA. As shown in Fig. 1, injection of naked plasmid DNA resulted in no significant expression of the Der f 1 protein in muscle, irrespective of the amount of injected DNA. Conversely, injection of plasmid DNA formulated with the block copolymer 704 led to a significant increase in Der f 1 expression in muscle when the amount of injected DNA encoding Der f 1 was increased.

We then evaluated the ability of this synthetic formulation to elicit specific humoral and cellular immune responses against Der f 1. Mice were injected intramuscularly on days 0 and 21 with various amounts of pVAX-Derf1 formulated with block copolymer 704. Cellular and humoral responses were analyzed on days 21 and 42 after the first injection. Dose–response experiments showed a maximal humoral response for 10 µg of pVAX-Derf1, which then remained at this level for higher doses (Fig. 2a). To analyze the cellular response, we synthesized sixteen 8-mer immunodominant peptides from Der f 1, predicted to bind to the H-2K<sup>b</sup>-

BEILVERT ET AL.





FIG. 1. Formulation of pVAX-Derf1 with block copolymer 704 increases the Dermatophagoides farinae 1 allergen (Der f 1) expression level after intramuscular injection. Mice were injected intramuscularly with Der f 1-encoding plasmid DNA, either alone (open columns) or formulated with block copolymer 704 (solid columns). Mice were killed 5 days later and Der f 1 expression levels were analyzed by ELISA. \*p<0.05 by Student Newman–Keuls test.</p>

restricted MHC-I molecule (Supplementary Table S1). These peptides were used in IFN-9 ELISPOT assays to evaluate the specific CD8<sup>+</sup> T cell response induced by Der f 1 DNA/704 immunizations in mice. Results showed that the cellular response increased with increasing amounts of injected pVAX-Derf1 formulated with block copolymer 704 and reached a plateau at 10  $\mu$ g of pVAX-Derf1 (Fig. 2b). To measure the orientation of the immune response, we measured different, specific anti-Der f 1 antibody isotypes for various amounts of injected, formulated plasmid DNA. Formulation with block copolymer 704 led to the induction of a Th1 bias, as indicated by the predominance of Der f 1-specific IgG2a compared with Der f 1-specific IgG1 (Fig. 2c).

In a previous study we also reported the adjuvant property of noncoding DNA when added to DNA vaccination (McIlroy et al., 2009). Thus, we tested the effect of noncoding DNA on Der f 1 vaccine formulation efficiency. Mice were injected on days 0 and 21 with Der f 1-encoding plasmid only, or in the presence of noncoding plasmid pQE30, formulated with block copolymer 704. As previously reported, decreasing the amount of coding plasmid, while maintaining the total amount of DNA, led to similar humoral and cellular immune response levels (Fig. 3a and b). Figure 3a also shows that with only 3 µg of pVAX-Derf1 formulated with block copolymer 704, the same anti-Der f 1 antibody titer was obtained as with 5 or 10 µg of formulated plasmid DNA encoding Der f 1. Results also show that 0.5 µg of plasmid encoding Der f 1, in the presence of pQE30, was sufficient to lead to a strong humoral response against Der f 1, which was similar to that obtained with a 20-fold higher amount of formulated plasmid encoding Der f 1. In the same experimental group of mice, the class Irestricted cellular response indicated that plasmid DNA encoding Der f 1 formulated with block copolymer 704 led to the same high ELISPOT response irrespective of the



FIG. 2. Influence of the amount of pVAX-Derf1 plasmid on humoral and cellular immune responses. Groups of mice (n=5) were injected intramuscularly with various amounts of pVAX-Derf1, ranging from 1 to 50 µg, formulated with block copolymer 704, on days 0 and 21. (a) The humoral response was measured on day 21 (open columns) and on day 42 (solid columns). Results are expressed as anti-Der f 1 IgG antibody titers. The mean titer and standard deviation are shown for each group. (b) For the cellular response, splenocytes were stimulated overnight with a pool of Der f 1 immunodominant peptides and the number of IFN-7 SFCs was determined. The mean number of IFN-7 SPCs and standard deviation are shown for each group. (c) Isotype profiles of Der f 1-specific antibody. IgG1 and IgG2a were titered in sera on day 42 and the ratio of IgG2a to IgG1 is shown as the mean and standard deviation for each group. \*p < 0.05 by Student Newman-Keuls test. Doses given are per tibialis anterior.

601



Der f 1/704 VACCINATION IN A MOUSE MODEL OF ASTHMA

FIG. 3. Conservation of vaccination efficiency with a low dose of Der f 1-encoding plasmid and carrier DNA associated with block copolymer 704. Groups of mice (n=5) were injected intramuscularly on days 0 and 21 with various amounts of pVAX-Derf1, in the presence or absence of plasmid carrier DNA, formulated with block copolymer 704. (a) The humoral response was measured on day 21 (open columns) and on day 42 (solid columns). Results are expressed as anti-Der f 1 lgG antibody titers. The mean titer and standard deviation are shown for each group. (b) For the cellular response, splenocytes were stimulated overnight with a pool of Der f 1 immunodominant peptides and the number of IFN- $\gamma$  SFCs was determined. The mean number of IFN- $\gamma$  SFCs and standard deviation are shown for each group. Doses given are per tibialis anterior.

amount of formulated pVAX-Derf1, in the presence or absence of pQE30.

#### Optimization of vaccine formulation and protocol

To optimize the anti-Der f 1 vaccine formulation, we tested the effect of three different block copolymers that were previously shown to enhance reporter gene expression *in vivo* and vaccination efficiency. Mice were injected intramuscularly on days 0 and 21 with 10  $\mu$ g of pVAX-Derf1 plasmid formulated at two doses of block copolymer 304, 704, or 904. Each formulation led to a significant and specific humoral immune response on day 42, whereas the maximal humoral response was obtained with block copolymer 704 at a concentration of 0.15% (Supplementary Fig. S1a). All formulations tested were able to elicit a cellular response. Interestingly, block copolymer 704 at 0.15% promoted a high cellular response, as measured by INF-7 ELISPOT assay (Supplementary Fig. S1b). Moreover, the various polymers tested provided a Th1 bias, as attested by the predominance of Der f 1-specific IgG2a compared with Der f 1-specific IgG1 (Supplementary Fig. S1c). We subsequently investigated the influence of mouse strain on the immune response. Mice from two different strains, BALB/c and C57BL/6, were injected intramuscularly on days 0 and 21 with 10 µg of pVAX-Derf1 plasmid formulated with block copolymer 704. On day 42, BALB/c and C57BL/6 inbred mice, which are typically used for immunological studies, had similar anti-Der f 1 antibody titers (Supplementary Fig. S2), indicating that mouse strain did not influence vaccination efficiency against Der f 1.

Given that DNA vaccination usually requires a repeated injection scheme to elicit the development of a strong immune response characterized by high antibody titers and memory B cell activation, we investigated the influence of the prime-boost injection protocol on the immune response. Mice were injected intramuscularly on day 0 with 10 µg of pVAX-Derf1 plasmid formulated with block copolymer 704, and then boosted 1, 2, 3, or 4 weeks later. Antibody titers were analyzed each week during 10 weeks (Fig. 4). It was clear that the mice that received a boost 1 or 2 weeks after the primary injection presented low antibody titers, comparable with those obtained using only one injection. On the other hand, mice receiving a boost injection 3 or 4 weeks after the primary injection showed a robust increase in their antibody titers, occurring 2 weeks or 1 week after the boost injection, respectively. Seventy days after the primary injection, antibody titers were still detectable for all conditions. As boosting at 21 days after the primary injection led to the sustained presence of antibodies in serum, we selected this injection scheme for Der f 1 vaccination in an allergic mouse model.

#### Der f 1 vaccination in an allergic asthma mouse model

The efficiency of our vaccination formulation against Der f 1 was tested in a model of asthmatic mice. The allergic asthma phenotype was induced with a total house dust mite (HDM) extract in BALB/c mice. First, mice were sensitized by percutaneous administration of  $250 \,\mu\text{g}$  of total HDM extract, once per week for 4 weeks (days 0, 7, 14, and 21). They were then challenged three times by intranasal inhalation of  $250 \,\mu\text{g}$ of total HDM extract, on days 28, 42, and 49. Two different pVAX-Derf1/704 vaccination schemes of asthmatic mice were used to study the impact of anti-Der f 1 vaccination in these mice.

In the first setting, BALB/c mice were vaccinated at the onset of HDM sensitization (Fig. 5a). First, we evaluated the influence of the mouse model on block copolymer 704mediated vaccination efficiency. To this end, mice were immunized with the  $\beta$ -galactosidase antigen at the onset of HDM sensitization. Mice were immunized twice, according to the protocol described in Fig. 5, using pCMV- $\beta$ gal reporter plasmid formulated with block copolymer 704. The humoral response was assessed on day 52, after the last HDM challenge. The dosage of specific, anti- $\beta$ -galactosidase IgG antibodies indicated that no significant differences between healthy or asthmatic mice were obtained. This result shows

#### BEILVERT ET AL.



FIG. 4. Influence of the number of boost injections and time of boost injection on the amplitude and kinetics of the humoral response. Groups of mice (n=5) were injected with  $10 \mu g$  of pVAX-Derf1 formulated with block copolvmer 704 and the anti-Der f 1 antibody IgG titer was determined at various time points. The mean titer and standard deviation are shown for each group. Doses given are per tibialis anterior. Groups of mice were injected on day 0 only (triangles), on days 0 and 7 (diamonds), on days 0 and 14 (mult symbols), on days 0 and 21 (squares), or on days 0 and 28 (circles). Doses given are per tibialis anterior.

that the induction of an asthmatic phenotype does not modify the immune response against an antigen expressed by gene transfer with block copolymer 704 (Fig. 6a). As a control, we also investigated whether the immunization protocol with block copolymer 704 against Der f 1 could induce, by itself, an asthmatic phenotype. Analysis of respiratory parameters of healthy mice immunized with the synthetic vector pVAX-Derf1/704 showed no differences compared with untreated healthy mice, indicating that the immunization protocol did not promote an asthmatic phenotype (data not shown). Then, at the same time as the HDM sensitization, mice were immunized on days 0 and 21, using pCMV- $\beta$ gal plasmid as control plasmid or using pVAX-Derf1 plasmid formulated with block copolymer 704. On day 52, after the last HDM challenge, various parameters were assessed. Results showed that asthmatic mice vaccinated against Der f 1 present high levels of Der f 1-specific IgG antibodies (Fig. 6b), associated with a strong Th1 bias, as



FIG. 5. Immunization protocols against Der f 1 in asthmatic mice. (a) Prophylactic approach. Groups of mice (n=5), exhibiting an asthmatic phenotype after sensitization and challenge with a total extract of HDM, were administered, intramuscularly, 50 µg of pVAX-Derf1 plasmid formulated with block copolymer 704 on days 0 and 21. (b) Early vaccination approach. Groups of mice (n=5) were administered, intramuscularly, 10 µg of pVAX-Derf1 plasmid formulated with block copolymer 704 on days 0 and 21 and then sensitized and challenged with total extract of HDM.

603

#### Der f 1/704 VACCINATION IN A MOUSE MODEL OF ASTHMA

attested by the predominance of Der f 1-specific IgG2a compared with Der f 1-specific IgG1 (Fig. 6d). As a control, the dosage of the specific Der f 1 IgG antibodies in nonvaccinated healthy mice, and in  $\beta$ -galactosidase-vaccinated asthmatic mice, did not show the presence of Der f 1-specific IgG antibodies. This indicates that production of the asthmatic mouse model did not induce a specific immune response against Der f 1. Under the same experimental conditions, healthy and asthmatic mice vaccinated against  $\beta$ galactosidase did not present a significant cellular response, whereas asthmatic mice vaccinated against Der f 1 presented a high level of IFN- $\gamma$ -secreting splenocytes stimulated by a cocktail of Der f 1 peptides (Fig. 6c).

Asthma is usually characterized by airway hyperresponsiveness and by an influx of inflammatory cells and cytokines into the lungs. Airway responsiveness was measured after inhalation of methacholine (5 to 20 mg/ml), which induces bronchoconstriction, and expressed as enhanced pause (Penh). Results show that asthmatic mice presented a high Penh value compared with healthy mice (Fig. 7a). Asthmatic mice immunized against  $\beta$ -galactosidase or Der f 1 antigen presented no significant variation of Penh compared with nonvaccinated, asthmatic mice. The influx of inflammatory cells into the lungs was assessed by cell counts in bronchoalveolar lavage (BAL) and by histological analysis of lung tissues. The BAL of healthy mice contained essentially macrophages, whereas the BAL of asthmatic mice contained macrophages and also numerous neutrophils, eosinophils, and lymphocytes. Interestingly, the asthmatic, Der f 1-vaccinated mice presented significantly reduced amounts of macrophages and eosinophils compared with asthmatic mice vaccinated against  $\beta$ -galactosidase antigen (Fig. 7b). The numbers of neutrophils and lymphocytes were also reduced. We also determined the expression of inflammatory cytokines in the BAL, using Luminex technology. The BAL of asthmatic mice immunized against the control antigen,

FIG. 6. Effect of a prophylactic immunization protocol on the immune response of asthmatic mice. Groups of mice (n=5) were injected intramuscularly on days 0 and 21 according to a prophylactic protocol (see Fig. 5) with 50 µg of plasmid formulated with block copolymer 704. (a) Healthy and asthmatic mice were injected intramuscularly on days 0 and 21 with 50  $\mu$ g of pCMV- $\beta$ gal formulated with block copolymer 704. The humoral response was measured on day 21 (open columns) and day 52 (solid columns). Results are expressed as anti-\//Gal IgG antibody titers. The mean titer and standard deviation are shown for each group. (b) Asthmatic mice were injected intramuscularly on days 0 and 21 with 50 µg of pVAX-Derf1 formulated with block copolymer 704. The humoral response was measured on day 21 (open columns) and day 52 (solid columns). Results are expressed as anti-Der f 1 IgG antibody titers. The mean titer and standard deviation are shown for each group. (c) For the cellular response, splenocytes were stimulated overnight with a pool of Der f 1 immunodominant peptides and the number of IFN-7 SFCs was determined. The mean number of IFN-7 SFCs and standard deviation are shown for each group. (d) Isotype profiles of Der f 1-specific antibody. IgG1 and IgG2a were titered in sera on day 42 and the ratio of IgG2a to IgG1 is shown as the mean and standard deviation for each group. Doses given are per tibialis anterior.



#### BEILVERT ET AL.



FIG. 7. Effect of immunization protocol on asthmatic phenotype of asthmatic mice. Groups of asthmatic mice (n=5) were injected intramuscularly on days 0 and 21 with pVAX-Derf1 plasmid formulated with block copolymer 704. Doses given are per tibialis anterior. (a) Airway responsiveness was measured on day 52, using a plethysmography system, after intranasal instillation of methacholine (5 to 20 mg/ml) in healthy mice (triasthmatic angles), mice (squares), and asthmatic, vaccinated mice (diamonds). Results are expressed as enhanced pause (Penh). The mean and standard deviation are presented for each group. (b) BAL cellular composition. Cell proportions in BAL were established after May-Grünwald Giemsa staining of about 300 cells in healthy mice (open columns), asthmatic mice (shaded columns), and asthmatic, vaccinated mice (solid columns). Results are expressed as absolute number of cells in 1 ml of BAL, as the mean and standard deviation for each group. \*p<0.05 by Student Newman-Keuls test. (c-f) IL-4, IL-5, IL-13, and IFN-7 levels, respectively, in BAL were deter-mined by Luminex technology.

#### Der f 1/704 VACCINATION IN A MOUSE MODEL OF ASTHMA

 $\beta$ -galactosidase, presented high levels of IL-4, IL-5, and IL-13, which are proinflammatory cytokines, and reduced levels of IFN-7, which is a pro-Th1 cytokine. Conversely, asthmatic mice presented reduced levels of IL-5 and IL-13 and an increased level of IFN-7 in BAL, compared with asthmatic mice vaccinated against the  $\beta$ -galactosidase antigen (Fig. 7c–f). Altogether these data show that, in this first setting, vaccination of asthmatic mice against the major allergen, Der f 1, promoted a significant reduction in inflammatory cells and cytokines observed in BAL, as compared with asthmatic mice vaccinated against a control antigen.

In the second setting, mice were given two vaccination injections on days 0 and 21. On day 28, they were HDMsensitized followed by HDM challenges (see Fig. 5b). Mouse airway hyperreactivity was measured on day 73. Asthmatic mice immunized with the control antigen,  $\beta$ -galactosidase, presented a high Penh value compared with healthy mice, whereas asthmatic mice vaccinated with pVAX-Derf1 formulated with block copolymer 704 presented a reduction of Penh for all amounts of methacholine used, indicating a reduction of airway hyperresponsiveness (Fig. 8a). Measurements of inflammatory cytokine expression levels in the BAL, using Luminex technology, showed that the BAL of asthmatic mice immunized against the control antigen,  $\beta$ galactosidase, presented high levels of IL-4, IL-5, and IL-13, which are proinflammatory cytokines, and reduced levels of IFN-y, which is a pro-Th1 cytokine. Conversely, asthmatic mice presented reduced levels of IL-4, IL-5, and IL-13 and increased levels of IFN-y in BAL, compared with asthmatic mice vaccinated against  $\beta$ -galactosidase antigen (Fig. 8b-e).

Taken altogether, these data show that early vaccination of asthmatic mice against the major allergen Der f 1 promotes a significant reduction of airway hyperresponsiveness and of cytokines observed in the BAL, as compared with asthmatic mice vaccinated with a control antigen. Thus, early vaccination of asthmatic mice may confer a protective effect on the development of asthmatic symptoms.

#### Discussion

The treatment and prevention of allergic asthma represent a major public health issue, and specific immunotherapy based on DNA vaccination seems to be a promising approach to reduce the incidence of this disease. Preclinical evaluation of treatments against allergic asthma requires adequate models. The most relevant mouse models of asthma rely on repeated sensitizations of mice with house dust mite (HDM) total extract followed by repeated intranasal exposures to HDM to induce an asthmatic phenotype that mimics the human disease (Cheng et al., 1998). We performed initial experiments that verified the kinetics of the HDM-induced asthma phenotype in mice. We observed that the development of the asthma phenotype in this model parallels the pattern observed in a clinical setting. Mice sensitized with HDM present bronchial hyperreactivity and important infiltration of inflammatory cells and cytokines in the lung and the BAL when challenged with HDM.

Der f 1 protein, from the mite Dermatophagoides farinae, is reported to be one of the major allergens encountered by patients with asthma. More than 50% of the house dust miteallergic population are carriers of Der f 1 IgE-specific antibodies (Zock et al., 2006). A previous study showed that intramuscular administration of a plasmid encoding Der p 1, another allergen encountered in patients with asthma, leads to the reduction of proinflammatory cytokines in the BAL of treated mice (Jarman and Lamb, 2004).

However, Der f 1-specific immunization has never been tested in mice presenting an asthmatic phenotype. Because Der f 1 is a major allergen implicated in the development of the asthmatic phenotype, we sought to test Der f 1-specific immunotherapy in a mouse model of asthma induced by HDM sensitization. Immunization was performed in two different settings, before or simultaneously with HDM sensitizations, to mimic a clinical situation of prophylactic treatment before exacerbation of asthmatic symptoms.

In the present study, two injections, 3 weeks apart, with the synthetic vector pVAX-Derf1/704 led to a significant reduction of inflammatory cell infiltration and cytokines in the BAL of asthmatic mice, 52 days after the first immunization, compared with mice immunized with a control antigen. Further, early immunization against Der f 1, before induction of the asthmatic phenotype, led to a reduction of airway hyperresponsiveness and of inflammatory cytokine levels in the BAL of asthmatic mice, 73 days after the first immunization.

To our knowledge, this is the first demonstration that Der f 1 is an effective target, and well adapted for specific immunotherapy in allergic asthma. These results show that vaccination with a block copolymer 704-based vaccine induces a strong and specific humoral and cellular immune response, characterized by a strong Th1 bias (increase in IgG2a/IgG1 ratio) and Tc1 (increase in IFN-7 produced by CD8+ cells by stimulation of splenocytes of vaccinated mice with Der f 1 class I-restricted peptides). ELISA analysis revealed the presence of Der f 1-specific IgG induced by vaccination with a plasmid-encoded Der f 1 antigen complexed with the 704 polymer. Therefore, the hypothesis of mechanism is that the immune response induced by the vaccination of asthmatic mice with Der f 1/704 led to the systemic production of Der f 1-specific IFN-7-secreting CD8+ T cells and anti-Der f 1 IgG2a antibodies. All together, these results show the induction of a systemic Tc1 and Th1 profile in the vaccinated asthmatic mice. Then, during the induction of asthma by giving nasally 250 µg of HDM protein extract containing Der f 1, Der f 1-specific IFN-7-secreting CD8+ T cells migrate to the lungs, where they locally secrete IFN-y in response to their stimulation by the presence of Der f 1 peptides presented by immune cells. This hypothesis is also supported by Fonseca and colleagues (2012), who have shown that cells transferred from naked DNA-immunized GFP transgenic mice to ovalbumin-induced allergic mice migrated to the allergic sites because they found GFP-positive allergen-specific CD8+ T cells in the lungs. It has also been described in the literature (Iwamoto et al., 1993; Tong et al., 2006) that IFN-7 has a well-known effect on the suppression of airway eosinophilia and on the downmodulation of the allergic response by directly inhibiting Th2 cells expressing IL-5. In the present study, we indeed observed this secretion of IFN-y in the lungs and the concomitant reduction of (1) interleukin levels, (2) the presence inflammatory cells, and (3) airway hyperresponsiveness.

Therefore, the Tc1 and Th1 cells specific to Der f 1, induced by vaccination via the muscle with a low dose of DNA

#### BEILVERT ET AL.



FIG. 8. Effect of prophylactic immunization protocol in asthmatic mice on asthmatic phenotype. Groups of asthmatic mice (n=5) were injected intramuscularly on day 0 and day 21 with pVAX-Derf1 plasmid formulated with 704. Doses given are per tibialis anterior. (a) Airway responsiveness was measured on day 73 using a plethysmography system following intranasal instillation of 5 to 40 mg/ml methacholine in healthy mice (A), asthmatic mice ( and asthmatic vaccinated mice (•). Results are expressed in enhanced pause ( $\hat{P}_{enh}$ ), as a mean for each group±standard deviation. (b - e) IL-4. IL-5, IL-10 and IFN-7 levels in BAL of control mice or asthmatic mice immunized with pVAX-Derf1 or pCMV-βgal plasmids formulated with 704, were determined using Luminex technology. p < 0.05by t test (Mann-Whitney). Groups included at least 17 different mice.

encoding Der f 1 in the presence of the synthetic vector 704, migrate to the allergic lungs exposed to the allergen and mediate by secreting IFN-7 the local immunomodulatory effect overcoming the deleterious effect of the Th2 response in the allergic condition.

Although the treatment significantly reduced the presence of inflammatory cytokines in the BAL of asthmatic mice, airway hyperresponsiveness was reduced only after the early vaccination protocol, and only a slight effect on airway hyperreactivity was observed in mice immunized concomitantly with the induction of the asthmatic phenotype. In this latter protocol, we analyzed respiratory parameters on day 52 after the first immunization with the synthetic vector, pVAX-Derf1/704. At this time point, the Der f 1-specific IgG antibody titer decreased, as shown in Fig. 4. Indeed, the Der f 1-specific IgG antibody titer was maximal on day 42. Thus, on day 52, IgG levels may not be sufficient to observe a significant reduction in airway hyperreactivity. The immunization protocol could be modified to generate higher levels of Der f 1-specific IgG antibody on

#### Der f 1/704 VACCINATION IN A MOUSE MODEL OF ASTHMA

day 52, by performing another immunization on day 42 when the IgG antibody level is maximal. We also wonder whether immunization against Der f 1, concomitantly with the sensitization protocol, may impair the efficiency of the immunization protocol. Indeed, as sensitization begins simultaneously with the Der f 1 immunization protocol, the immune system is not yet "educated" to recognize Der f 1 as an antigen, rather than an allergen. Consequently, the immune system produces both Der f 1-specific IgE and Der f 1specific IgG antibodies, which impairs the efficiency of the Der f 1-specific immunization protocol. Results obtained with the early vaccination protocol are in agreement with this hypothesis, showing that early vaccination led to a better reduction of asthmatic symptoms.

Although a strong Th1/Tc1 bias was demonstrated that is likely to be responsible for the preventive effect of the vaccine on asthmatic inflammation, other mechanisms could be involved. During classical allergen-specific immunotherapy, it is well established that not only a Th2-to-Th1 recommitment but also regulatory T (Treg) cell activation occurs (Pipet et al., 2009). The involvement of Treg cells in the vaccination efficiency in the present mouse model of allergic asthma requires further investigation.

The clinical relevance of the preventive strategy used in the present study may be questionable because it seems difficult to envisage allergen-specific vaccination before the occurrence of sensitization. However, it is not aberrant to consider that in high-risk children with sensitization to allergens other than HDM, the prevention of Der f 1 allergy is crucial to prevent severe rhinitis and asthma.

In conclusion, our present study demonstrates that, in a clinically relevant model of allergic asthma, Der f 1 is a valid target for immunotherapy. DNA vaccination has produced encouraging results in mice, but the production of large amounts of DNA will be difficult to achieve before its transfer to the clinical setting. In contrast to previous studies, we performed a low-dose DNA immunization protocol using the 704 polymer, which offers a number of practical advantages, such as ease of production and purification in large quantities, and the absence of special handling or storage conditions. We have validated this immunotherapy strategy for the prevention of allergic asthma and we suggest that immunotherapy to prevent allergic disease represents an attractive alternative to classical, specific immunotherapy.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Emilie Goudeau for excellent technical expertise in ELISA and to Marie Aude Muller for excellent technical expertise in animal experimentation. They are also indebted to Benoit Barteau for technical expertise in synthetic DNA vaccination and for stimulating discussions. The authors are grateful to Stallergenes (France) for providing the *Dermatophagoides farinae* extracts. This work was supported by special grants from the Association Française contre les Myopathies (Evry, France), Vaincre la Mucoviscidose (Paris, France), Fondation Recherche Médicale, Société Française d'Allergologie, and Région Pays de Loire. F. Beilvert is the recipient of a Ph.D. fellowship from Vaincre la Mucoviscidose. M. Langelot is the recipient of a CIFRE contract with Agence Nationale pour la Recherche et la Technologie (ANRT) and Stallergenes.

#### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

- Arbes, S.J., Jr., Gergen, P.J., Vaughn, B., and Zeldin, D.C. (2007). Asthma cases attributable to atopy: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. J. Allergy Clin. Immunol. 120, 1139–1145.
- Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., et al.; ISAAC Phase Three Study Group. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. Lancet 368, 733–743.
- Barnes, P.J. (2010). New therapies for asthma: Is there any progress? Trends Pharmacol. Sci. 31, 335–343.
- Bateman, E.D., Hurd, S.S., Barnes, P.J. et al. (2008). Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. Eur. Respir. J. 31, 143–178.
- Biliczki, P., Girmatsion, Z., Brandes, R.P., et al. (2009). Trafficking-deficient long QT syndrome mutation KCNQ1-T587M confers severe clinical phenotype by impairment of KCNH2 membrane localization: Evidence for clinically significant IKr-IKs α-subunit interaction. Heart Rhythm 6, 1792–1801.
- Bousquet, J., Dahl, R., and Khaltaev, N. (2007). Global alliance against chronic respiratory diseases. Allergy 62, 216–223.
- Cany, J., Barteau, B., Tran, L., et al. (2011). AFP-specific immunotherapy impairs growth of autochthonous hepatocellular carcinoma in mice. J. Hepatol. 54, 115–121.
- Cheng, K.C., Lee, K.M., Krug, M.S., et al. (1998). House dust mite-induced sensitivity in mice. J. Allergy Clin. Immunol. 101, 51–59.
- Fonseca, D.M., Wowk, P.F., Paula, M.O., et al. (2012). Recombinant DNA immunotherapy ameliorates established airway allergy in IL-10 dependent pathway, Clin. Exp. Allergy 42, 131–143.
- Global Initiative for Asthma (2011). Global burden of asthma. Available at http://www.ginasthma.org/pdf/GINABurden Report.pdf
- Iwamoto, I., Nakajima, H., Endo, H., and Yoshida, S. (1993). Interferon 7 regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4\* T cells. J. Exp. Med. 177, 573–576.
- Jarman, E.R., and Lamb, J.R. (2004). Reversal of established CD4<sup>+</sup> type 2 T helper-mediated allergic airway inflammation and eosinophilia by therapeutic treatment with DNA vaccines limits progression towards chronic inflammation and remodelling. Immunology 112, 631–642.
- Jespersen, T., Membrez, M., Nicolas, C.S., et al. (2007). The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. Cardiovasc. Res. 74, 64–74.
- Kim, N., Kwon, S.S., Lee, J., et al. (2006). Protective effect of the DNA vaccine encoding the major house dust mite allergens on allergic inflammation in the murine model of house dust mite allergy. Clin. Mol. Allergy 4, 4.
- Loddenkemper, R., Gibson, G.J., and Sibille, Y. (2003). The burden of lung disease in Europe: Why a European White Book on lung disease? Eur. Respir. J. 22, 869.
- McIlroy, D., Barteau, B., Cany, J., et al. (2009). DNA/amphiphilic block copolymer nanospheres promote low-dose DNA vaccination. Mol. Ther. 17, 1473–1481.
- Pipet, A., Botturi, K., Pinot, D., et al. (2009). Allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis and asthma: Mechanisms and proof of efficacy. Respir. Med. 103, 800–812.

#### BEILVERT ET AL.

- Piron, J., Quang, K.L., Briec, F., et al. (2008). Biological pacemaker engineered by nonviral gene transfer in a mouse model of complete atrioventricular block. Mol. Ther. 16, 1937–1943.
- Pitard, B., Pollard, H., Agbulut, O., et al. (2002). A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. Hum. Gene Ther. 13, 1767–1775.
- Pitard, B., Bello-Roufaï, M., Lambert, O., et al. (2004). Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. Nucleic Acids Res. 32, e159.
- Richard, P., Bossard, F., Desigaux, L., et al. (2005). Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. Hum. Gene Ther. 16, 1318–1324.
- Richard-Fiardo, P., Payen, E., Chèvre, R., et al. (2008). Therapy of anemia in kidney failure, using plasmid encoding erythropoietin. Hum. Gene Ther. 19, 331–342.
- Tong, J., Bandulwala, H.S., Clay, B.S., et al. (2006) Fas-positive T cells regulate the resolution of airway inflammation in a murine model of asthma. J. Exp. Med. 203, 1173–1184.
- Zock, J.P., Heinrich, J., Jarvis, D., et al.; Indoor Working Group of the European Community Respiratory Health Survey II.

(2006). Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: The European Community Respiratory Health Survey II. J. Allergy Clin. Immunol. 118, 682–690.

> Address correspondence to: Dr. Bruno Pitard INSERM U915 IRT-UN 8 quai Moncousu, BP70721 44007 Nantes, Cedex 1 France

E-mail: bruno.pitard@univ-nantes.fr

Received for publication January 30, 2012; accepted after revision February 8, 2012.

Published online: March 19, 2012.

#### 608

## Chapitre 4 - Développement de nouveaux vecteurs pour la délivrance intracellulaire de protéines

## Chapitre 4 - Développement de nouveaux vecteurs pour la délivrance intracellulaire de protéines

De nombreux lipides cationiques développés à l'origine pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques ont montré leur capacité à délivrer des protéines dans des cellules en culture. Cependant, les propriétés physicochimiques des complexes qu'ils forment avec les protéines sont relativement peu connues. Il a pourtant été établi de longue date que ces propriétés sont intimement liées à l'efficacité de ces vecteurs dans le cas de la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques.

Dans ce travail, nous avons étudié la capacité de lipides cationiques développés par l'équipe de J.M. Lehn à délivrer des protéines dans des cellules vivantes. Pour ce faire, nous avons mis au point un modèle d'étude basé sur une protéine modèle, la β-galactosidase, afin d'identifier parmi ces composés des vecteurs efficaces. Nous avons ensuite évalué la capacité de ces lipides à vectoriser d'autres types de protéines. Les propriétés physicochimiques des assemblages supramoléculaires lipide cationique/protéine les plus efficaces ont été explorées, notamment par microscopie électronique, afin de mieux comprendre le mode d'action de ces vecteurs, ce qui doit permettre à terme le design rationnel de lipides cationiques spécialement dédiés au transfert de protéines. Enfin, nous avons étudié la capacité de ces vecteurs à délivrer in vitro un anticorps visant une cible fonctionnelle afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette technique dans la prise en charge de la mucoviscidose.

Les résultats détaillés ici ont fait l'objet d'une publication actuellement en révision dans la revue *Biomaterials* : Chatin,B. Mével,M., Lambert,O. and Pitard,B. Supramolecular assemblies for the intracellular delivery of proteins.

## A. Criblage d'une librairie de lipides cationiques

## 1. Lipides cationiques inclus dans le criblage

Les vecteurs dédiés à la délivrance intracellulaire de protéines développés au cours de ces dernières années sont basés, entre autres, sur des lipides cationiques dont certains ont été auparavant utilisés dans le cadre de la délivrance d'acides nucléiques. Les travaux réalisés sur les dérivés lipidiques d'aminoglycosides (DLA) ont montré l'efficacité de ces composés pour la délivrance d'acides nucléiques *in vitro* comme *in vivo* ainsi que leur faible toxicité. Nous avons donc cherché à identifier par un criblage parmi ces lipides cationiques des molécules capables de délivrer efficacement des protéines dans le cytoplasme de cellules vivantes.

Les DLA que nous avons inclus dans ce criblage peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur partie hydrophobe : un groupement cholestérol ou dérivé du cholestérol Figure 16 A-G) ou des chaînes d'acides gras (Figure 16 H-N). Nous avons également inclus dans ce criblage le BGTC, un lipide basé sur le cholestérol et porteur de groupements guanidinium (Figure 3 F). Cette molécule, développée par l'équipe de J.M. Lehn pour le transfert d'acides nucléiques (Vigneron et al., 1996; Pitard et al., 1999; Pitard et al., 2001), était susceptible de facilement former des complexes avec les protéines par interaction électrostatique via ses groupements guanidinium fortement protonés à pH physiologique (pKa = 13.5).

## 2. Stratégie de criblage

Nous avons dans un premier temps développé un modèle d'étude pour l'identification de nouveaux vecteurs pour la délivrance intracellulaire de protéines, basé sur un essai enzymatique à la  $\beta$ -galactosidase. Le protocole, schématisé sur la Figure 29, consiste à formuler le lipide cationique étudié avec la protéine  $\beta$ -gal pour former des complexes lipide cationique / protéine. Ces complexes sont déposés sur des cellules HeLa en culture dans un milieu sans sérum et incubés durant 4h. Le milieu est remplacé par un milieu avec sérum et les cellules sont à nouveau incubées 4h avant la mesure de l'activité enzymatique de la  $\beta$ -gal.



Figure 29 – Stratégie de criblage de la librairie de lipides cationiques.

Nous avons auparavant évalué la stabilité de la  $\beta$ -gal dans nos conditions expérimentales, les 8h d'incubation à 37° imposées par le protocole étant susceptibles de la dénaturer. La Figure 30 montre que si l'enzyme perd rapidement son activité dans l'eau pure à 37°C, elle reste relativement stable dans un milieu de culture comme l'OptiMEM, perdant moins de 10 % de son activité en 8 h. Ceci est probablement dû aux solutés présents dans l'OptiMEM qui stabilisent la  $\beta$ -gal dans sa conformation active. Il est intéressant de noter que l'activité de l'enzyme est préservée lorsqu'elle est complexée à des liposomes de BGTC:DOPE dans l'OptiMEM, montrant que les lipides cationiques ne dénaturent pas la protéine mais auraient au contraire tendance à la stabiliser. La baisse d'activité de l'enzyme étant négligeable, nous avons choisi dans les expériences suivantes de ne pas tenir compte de cette diminution et d'exprimer l'activité  $\beta$ -gal associée aux cellules par rapport à l'activité initiale. Ainsi, les résultats présentés expriment la quantité d'enzyme délivrée aux cellules sous forme active.



Figure 30 - Stabilité de la  $\beta$ -gal à 37°C en fonction du milieu. H2O (losanges) ; H2O + BGTC:DOPE (ronds) ; OptiMEM (triangles) ; OptiMEM + BGTC:DOPE (carrés).

Afin de déterminer le temps d'incubation optimal des lipoplexes avec les cellules, nous avons effectué une cinétique d'internalisation de la  $\beta$ -gal dans les cellules HeLa par le BGTC:DOPE dans un milieu dans sérum. La Figure 31 montre que le taux d'internalisation de la  $\beta$ -gal augmente avec le temps pour atteindre un maximum à 4h. Nous avons choisi cette durée optimale, sans la dépasser éviter un stress trop important aux cellules dû à la privation de

sérum, en poursuivant par 4h d'incubation avec sérum pour permettre aux cellules d'internaliser correctement les complexes.



Figure 31 - Cinétique d'internalisation de la  $\beta$ -gal par le BGTC:DOPE. 800ng de  $\beta$ -gal ont été complexés au BGTC au rapport molaire de 1500 et incubés avec des cellules HeLa dans un milieu sans sérum pour une durée variable. Les cellules ont ensuites été lysées et l'activité  $\beta$ -gal mesurée.

## 3. Résultats du criblage de la librairie

Les différents lipides testés au cours de ce criblage ont été formulés à 800ng de  $\beta$ -gal, à trois rapports molaires lipide cationique/protéine: 1000, 1500 et 2000. La Figure 32 A indique que la  $\beta$ -gal nue n'est pas spontanément internalisée par les cellules, alors que les dérivés aliphatiques d'aminoglycosides en solution micellaire permettent de délivrer jusqu'à 2,5 % de la dose initiale de protéine aux cellules HeLa. Cette proportion est cependant faible en regard de liposomes de BGTC:DOPE utilisés comme référence et qui sont trois fois plus efficaces pour internaliser la protéine. En revanche, certains des DLA basés sur un groupement cholestérol (Figure 32 B) sont particulièrement efficaces, notamment la TGKC qui permet de délivrer jusqu'à 15% de la  $\beta$ -gal aux cellules. Cette activité supérieure des dérivés de cholestérol est surprenante puisque que dans le cas du transfert de gènes, ils ont tendance à être moins efficaces que les dérivés aliphatiques. Il a été suggéré que les dérivés aliphatiques forment des couches lipidiques plus fluides que les dérivés du cholestérol, donc plus aptes à fusionner avec la membrane endosomale et à délivrer l'acide nucléique dans le cytosol. Il semble au contraire que dans le cas du transfert intracellulaire de protéines, la rigidité conférée par le groupement cholestérol contribue à l'efficacité du vecteur. L'importance de la rigidité de l'assemblage supramoléculaire dans l'efficacité de ces lipides est toutefois à nuancer au regard de l'influence du bras espaceur dans la structure de certains lipides. En effet, la KC est un vecteur relativement peu efficace (1,6 % de la  $\beta$ -gal délivrée aux cellules) alors que ses dérivés possédant un bras espaceur (KCL et KCC) sont nettement plus efficaces (respectivement 6,8 et 5,7 % de la dose initiale de  $\beta$ -gal). Leur efficacité également supérieure dans le cas de la transfection d'ADN a été expliquée par leur hydrophobicité augmentée et leur capacité à former des couches plus fluides que la KC (Sainlos et al., 2005). Il semble donc que l'activité des lipides cationiques pour le transfert de protéines soit intimement liée à leurs propriétés physicochimiques, tout comme dans le cas du transfert d'acides nucléiques, et que leur hydrophobicité comme la fluidité des couches qu'ils forment déterminent au moins partiellement leur efficacité.

Il est intéressant de noter que la TGKC, qui ne diffère de la KC que par la guanidylation de ses groupements amines, est nettement plus efficace que cette dernière alors que c'est l'inverse qui est observé dans le cas de la vectorisation d'acides nucléiques (Sainlos et al., 2005). Le pKa des groupements guanidinium de la TGKC (13,5) étant nettement supérieur à celui des amines de la KC (voisin de 8), on peut considérer qu'ils sont totalement protonés à pH physiologique, contrairement aux fonctions amines qui ne le sont que partiellement, conférant à la KC une charge partielle inférieure à 3. Cette différence de charge ne semble cependant pas suffisante pour expliquer l'efficacité de la TGKC, et d'autres caractéristiques du groupement guanidinium, entre autres sa structure plane favorable à la création de liaisons hydrogène, pourraient expliquer ce gain d'activité. Dans le cas du transfert d'acides nucléiques, l'efficacité moindre de la TGKC peut s'expliquer par la stabilité du complexe qu'elle forme avec l'ADN. La dissociation d'un tel complexe est en effet essentielle pour une bonne expression du transgène : il a été montré que l'injection intranucléaire d'ADN nu est plus efficace que l'injection intranucléaire de lipoplexes, probablement pour des raisons d'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN (Zabner et al., 1995). La formation d'un complexe stable avec la  $\beta$ -gal pourrait au contraire être favorable à sa délivrance dans les cellules HeLa : la délivrance intracellulaire de protéines n'impliquant pas d'étape de transcription, l'importante stabilité du complexe est moins susceptible de nuire à l'efficacité du processus. L'ensemble de ces résultats montre que si les propriétés physicochimiques



Figure 32 - Délivrance intracellulaire de  $\beta$ -gal dans les cellules HeLa par les dérivés lipidiques d'aminoglycosides. (A) Efficacité des dérivés d'acides gras. (B) Efficacité des dérivés de cholestérol. Les cellules ont reçu 800ng de  $\beta$ -gal complexée aux lipides cationiques aux rapports molaires 1000 (barres blanches), 1500 (barres grises) et 2000 (barres noires). Après 8h d'incubation, les cellules ont été lysées et l'activité  $\beta$ -gal mesurée.

des lipides cationiques semblent jouer un rôle essentiel dans leur activité de délivrance de protéines, la part de chacune de ces propriétés (hydrophobicité, charge, fluidité) dans l'efficacité du vecteur est difficile à déterminer et des investigations plus poussées dans la relation structure/fonction de tels vecteurs sont nécessaires pour permettre le design rationnel de lipides cationiques spécifiquement conçus pour le transfert de protéines. De plus, il semble impossible de prévoir l'efficacité d'un lipide pour la délivrance intracellulaire de

protéines à partir de son efficacité de transfection d'acides nucléiques puisque des paramètres favorables à l'une peuvent être défavorables à l'autre.

Un autre facteur influençant l'efficacité de la délivrance de la  $\beta$ -gal dans les cellules HeLa par ces lipides est le rapport molaire lipide cationique/protéine (RM), les deux semblant directement corrélés. Ceci est particulièrement visible dans le cas des dérivés du cholestérol (Figure 32 B). On remarque ainsi que les complexes de TGKC formulée à la  $\beta$ -gal à un RM de 2000 sont trois fois plus efficaces que les complexes formés à un RM de 1000. Cette relation dose-réponse n'est pas surprenante mais les effets toxiques des lipides cationiques à haute dose sont à prendre en compte et seront étudiés plus loin. Enfin, on remarque que le vecteur le plus efficace dans cette étude est le BGTC:DOPE utilisé comme référence au cours du criblage. Ceci est particulièrement intéressant puisque le BGTC utilisé sous forme de micelles est relativement inefficace pour délivrer la  $\beta$ -gal. Il apparaît donc que l'ajout d'un lipide neutre à la formulation des lipides cationiques améliore de façon importante son efficacité. Ces deux dernières observations montrent que si la structure des lipides cationiques a une grande influence sur leur efficacité, d'autres paramètres entrent également en jeu, notamment ceux liés à la formulation de ces vecteurs.

### B. Optimisation des lipides cationiques pour la délivrance intracellulaire de protéines

Dans le cadre de la délivrance des acides nucléiques, la formulation des vecteurs et les conditions expérimentales ont une grande influence sur l'efficacité de transfection, par exemple la quantité d'ADN et la quantité de lipide cationique apportées aux cellules, la présence d'un colipide, le milieu de formulation des complexes ou la présence de sérum durant la transfection (Barteau *et al.*, 2008). Nos observations suite au criblage suggérant que certains de ces paramètres, en plus de la structure du lipide cationique, influent également sur l'efficacité de la délivrance de protéines, nous avons étudié leur influence sur l'efficacité de délivrance de la β-gal dans les cellules HeLa par le BGTC.

#### 1. Influence de la quantité de protéine du rapport molaire lipide/protéine

La Figure 32 montre une relation entre le rapport molaire lipide cationique/protéine et l'efficacité d'internalisation de la protéine. Cet effet dose/réponse est clairement visible pour les dérivés du cholestérol. Il paraît logique que l'efficacité de délivrance soit proportionnelle à la quantité de vecteur utilisée, cependant les lipides cationiques peuvent avoir un effet toxique sur les cellules, limitant la quantité de lipide effectivement utilisable.



Figure 33 – Influence de la quantité de protéine et du rapport molaire sur l'efficacité et la toxicité du BGTC:DOPE. Les cellules ont reçu 600ng, 800ng ou 1000ng de  $\beta$ -gal complexée aux lipides cationiques aux rapports molaires 1000 (barres blanches), 1500 (barres grises) et 2000 (barres hachurées) ou 2500 (barres noires). Après 8h d'incubation, les cellules ont été lysées et l'activité  $\beta$ -gal mesurée.

Cette toxicité des lipides cationiques tient en partie à leur analogie avec certains lipides cellulaires, les rendant capables d'interférer de façon délétère avec des voies de signalisation. Ainsi, il a été montré que les dérivés cationiques du cholestérol sont susceptibles d'inhiber la protéine kinase C (Bottega and Epand, 1992; Farhood *et al.*, 1992).

Nous avons donc étudié les effets de la quantité de lipide et également de la quantité de protéine délivrée aux cellules sur l'efficacité d'internalisation tout en évaluant la toxicité par un test au MTT. La Figure 33 A indique que le taux d'internalisation de la β-gal par le BGTC:DOPE est très nettement influencé par le rapport molaire, l'influence de la quantité de protéine étant en revanche plus discrète. Toutefois, la viabilité cellulaire est compromise pour des quantités importantes de lipide ou de protéine, montrant un effet toxique des complexes (Figure 33 B). Dans le cas de la vectorisation d'acides nucléiques, la baisse de viabilité des cellules transfectées est attribuée aux effets toxiques du lipide cationique mais également à l'acide nucléique délivré dans les cellules, qui est susceptible d'activer des voies de signalisation conduisant à l'inflammation ou à l'apoptose. Les cellules se sont en effet dotées au cours de l'évolution de senseurs intracellulaires des acides nucléiques, permettant notamment la détection de pathogènes intracellulaires (virus, bactéries, protozoaires...) et l'initiation d'une réponse immunitaire adéquate. Les acides nucléiques exogènes activent ces mêmes voies et ont par conséquent des effets indésirables sur les cellules en culture. Ainsi, l'ADN plasmidique délivré par des lipides cationiques active la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I, notamment par le biais de TLR9 (Toll-like receptor 9) et de ZBP1 (Z-DNA binding protein) (Vilaysane and Muruve, 2009; Takeuchi and Akira, 2010; Hornung and Latz, 2010). Nous avons donc cherché à déterminer si la protéine exogène apportée à la cellule par notre système de délivrance peut participer à sa toxicité.



**Figure 34 – Influences respectives du lipide cationique et de la protéine délivrée dans la toxicité induite par les complexes sur les cellules.** (A) Viabilité cellulaire en fonction de la quantité de BGTC. (B) Viabilité cellulaire en fonction de la quantité de β-gal.

Les résultats présentés sur la Figure 34 semblent indiquer que c'est le BGTC qui est principalement responsable de la toxicité observée sur les cellules HeLa, puisque la quantité de lipide est corrélée avec la baisse de viabilité (coefficient de corrélation  $r^2 = 0,8306$ ) (Figure

34 A) alors que la quantité de  $\beta$ -gal apportée aux cellules n'est pas corrélée avec leur viabilité (r<sup>2</sup> = 0,3922) (Figure 34 B). La toxicité d'un système de délivrance intracellulaire de protéines serait donc majoritairement due au lipide cationique utilisé. Cependant cette observation est difficilement généralisable puisque les protéines, contrairement aux acides nucléiques, ont des structures moléculaires très variées. D'autres protéines que la  $\beta$ -gal seraient donc susceptibles d'avoir des effets indésirables en activant des voies de signalisation délétères dans les cellules traitées.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de limiter la dose de lipide cationique apportée aux cellules par les complexes pour limiter la toxicité du système de délivrance. La Figure 33 indique que des complexes contenant 800ng de  $\beta$ -gal complexée au BGTC:DOPE à un rapport molaire de 1500 permettent d'internaliser 6% de la dose initiale de protéine dans les cellules tout en conservant plus de 95% de viabilité. Nous avons donc défini cette formulation comme la formulation optimale pour la délivrance de  $\beta$ -gal dans les cellules HeLa.

## 2. Influence du colipide

Nous avons observé au cours du criblage que l'ajout du colipide neutre DOPE au BGTC augmente considérablement son efficacité de délivrance de la  $\beta$ -gal (Figure 32 B). Pour étudier plus précisément l'influence de l'ajout d'un lipide neutre sur l'efficacité de délivrance de protéine des lipides cationiques, nous avons formulé la TGKC et la DOSP, en plus du BGTC, avec la DOPE sous forme de liposomes. La Figure 35 montre que chacun de ces lipides cationique soit son activité améliorée. Cette amélioration est d'autant plus importante que le lipide cationique est peu efficace lorsqu'il est utilisé seul. Ainsi, la DOPE améliore d'un facteur 15 l'activité de la DOSP, qui est très peu efficace lorsqu'elle est utilisée seule, mais n'améliore que d'un facteur 3 l'activité de la TGKC, qui est le lipide cationique le plus efficace mis en évidence par le criblage précédent. Ceci suggère que le mécanisme de délivrance de la protéine dans les cellules HeLa, dont au moins une étape est améliorée par la DOPE, est saturable et ne peut être augmenté au-delà d'une certaine proportion.



Figure 35 – Influence de l'ajout d'un colipide sur l'efficacité de délivrance de la  $\beta$ -gal par les lipides cationiques. Les cellules ont reçu 800 ng de  $\beta$ -gal complexée avec les lipides cationiques aux rapports molaires 1000 (barres blanches), 1500 (barres grises) et 2000 (barres noires). Après 8h d'incubation, les cellules ont été lysées et l'activité  $\beta$ -gal mesurée.

Dans le cas de la vectorisation d'acides nucléiques, l'ajout d'un colipide neutre ou *helper lipid* aux lipides cationiques est courant pour augmenter leur efficacité de transfection. Le rôle de la DOPE est attribué principalement à ses propriétés fusogéniques, favorisant l'accès de l'ADN au cytosol en déstabilisant la membrane endosomale (Zuhorn and Hoekstra, 2002; Wasungu and Hoekstra, 2006). Un tel mécanisme est envisageable ici, la DOPE pouvant permettre la libération de la β-gal dans le cytosol avant sa dégradation par les lysosomes. Il semblerait donc que l'échappement endosomal des complexes lipide cationique/protéine soit une des principales barrières à franchir pour la délivrance de protéines dans le cytoplasme de cellules en culture.

## 3. Influence du milieu de formulation des complexes lipide cationique/protéine.

Un autre facteur pouvant influencer l'efficacité des lipides cationiques est le milieu de formulation des complexes, la présence de certains solutés étant susceptible de modifier leurs propriétés physicochimiques ou l'interaction avec la protéine à délivrer. La Figure 36 indique que les complexes formulés dans un tampon contenant 120mM de NaCl et 20mM d'HEPES pH 7,4 permettent de délivrer 1% seulement de la dose initiale de  $\beta$ -gal aux cellules, alors que les complexes formulés dans le milieu OptiMEM sont huit fois plus efficaces. Ceux formés dans le milieu DMEM présentent une efficacité intermédiaire. Cette

influence du milieu de formulation sur l'efficacité de délivrance d'acides nucléiques par les lipides cationiques est connue. Il a été observé que des complexes lipide cationique/ADN formulés dans des milieux contenant des polyanions, notamment des milieux tamponnés au bicarbonate de sodium, transfectent plus efficacement des cellules en culture que des complexes formulés dans un milieu ne contenant pas de polyanions (Ross and Hui, 1999). Cette efficacité a été liée à la taille des complexes formés, plus importante en présence de polyanions, permettant une sédimentation efficace sur les cellules et augmentant donc la quantité de lipoplexes endocytés. Cet effet se retrouve avec les complexes lipide cationique/protéine et la présence de polyanions - dont un tampon carbonate - dans les milieux de culture OptiMEM et DMEM est certainement responsable de l'efficacité des complexes qui y sont formés. Il est intéressant de noter que le milieu OptiMEM conduit à la meilleure efficacité de délivrance de la β-gal alors qu'il contient 15µg/mL de protéines (insuline et transferrine), soit presqu'autant que la  $\beta$ -gal dans le milieu de formulation des complexes (16μg/mL). Ces protéines pourtant susceptibles d'entrer en compétition avec la βgal lors de la formation du complexe semblent au contraire avoir un effet facilitateur sur le processus de délivrance de la  $\beta$ -gal aux cellules HeLa.



Figure 36 – Influence du milieu de formulation de complexes BGTC:DOPE/  $\beta$ -gal sur le taux d'internalisation de la protéine. Les cellules ont reçu 800ng de  $\beta$ -gal complexée au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500 dans 120mM NaCI-20mM HEPES pH 7,4, du milieu DMEM ou du milieu OptiMEM. Après 8h d'incubation, les cellules ont été lysées et l'activité  $\beta$ -gal mesurée.

## 4. Influence du sérum

Les cellules en culture nécessitent en général la présence de sérum dans leur milieu de culture. Il contient entre autres des facteurs d'adhérence et de croissance indispensable au maintien de la lignée cellulaire (Eagle, 1955), mais également de l'albumine sérique, des immunoglobulines (IgG), des lipoprotéines... Depuis le début de l'utilisation des lipides cationiques pour la délivrance d'acides nucléiques, il a été observé que la présence de sérum dans le milieu de culture nuit généralement à l'efficacité de transfection (Felgner et al., 1987; Turek et al., 2000). Il a été montré que nombre de ces composés interfèrent avec la délivrance d'acides nucléiques par les lipides cationiques. Dans le cas de lipoplexes DOTAP/ODN (oligodésoxynucléotides) par exemple, l'albumine sérique bovine (BSA) limite l'interaction des lipoplexes avec les membranes cellulaires et compromet leur endocytose, les IgG réduisent la densité de charge à la surface des lipoplexes et les lipides présents dans le sérum dissocient partiellement les ODN du complexe (Zelphati et al., 1998). Il a également été montré que la présence de sérum empêche la formation de lipoplexes DOTAP:DOPE/ADN de taille importante dans le milieu de culture, limitant leur sédimentation et leur internalisation par les cellules (Ross and Hui, 1999). Ces données laissaient penser que le sérum pourrait avoir un effet néfaste sur l'efficacité de délivrance intracellulaire d'une protéine par les lipides cationiques, nous avions donc choisi dans nos expériences préliminaires d'effectuer les quatre premières heures d'incubation des complexes lipides cationiques/β-gal avec les cellules HeLa sans sérum. La Figure 37 confirme en effet que la présence de sérum durant toute la durée d'incubation de complexes BGTC:DOPE/β-gal réduit de 80% l'efficacité de délivrance de la protéine.



Figure 37 – Influence de la présence de sérum sur l'efficacité d'internalisation de la  $\beta$ -gal par le BGTC:DOPE dans les cellules HeLa. Les cellules ont reçu 800ng de  $\beta$ -gal complexée au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500 dans l'OptiMEM. Les complexes ont été incubés avec les cellules dans du DMEM contenant

10% de sérum de veau fœtal ou sans sérum. Après 4 heures, le milieu contenant les complexes a été remplacé dans les deux cas par du DMEM contenant 10% de sérum.

Certains lipides cationiques ayant été décrits comme insensibles à la présence de sérum dans le milieu de culture (Shi *et al.*, 2001), nous avons recherché si parmi les DLA à notre disposition certains composés étaient capables de délivrer efficacement la β-gal dans les cellules HeLa en présence de sérum mais nos résultats ont montré que tous voyaient leur activité diminuer lorsque le sérum était présent durant toute la durée d'incubation.

La sensibilité des lipides cationiques à la présence de sérum est un problème qui devra être résolu avant d'éventuelles applications *in vivo* de la délivrance intracellulaire de protéines. Des stratégies ont été développées pour améliorer le transfert de gènes par ces vecteurs *in vivo*, par l'incorporation de stabilisateurs stériques comme le polyethylene-glycol (PEG) qui empêchent l'interaction des composants du sérum avec la surface des lipoplexes et augmentent leur temps de circulation dans le sang (Ogris and Wagner, 2002). De telles stratégies pourraient être appliquées à la délivrance de protéines. Le problème se pose également pour des applications *in vitro* car s'il est aisé de retirer le sérum du milieu de culture, cette privation même pendant une durée limitée à 4 heures a des effets importants sur de nombreuses voies de signalisation intracellulaire qui peuvent s'avérer délétères (Pirkmajer and Chibalin, 2011). Les cellules HeLa utilisées dans cette étude sont relativement résistantes à une telle privation, mais les cellules primaires y sont nettement plus sensibles.

## 5. Influence du temps d'incubation des complexes avec les cellules

Nous avions observé dans nos expériences préliminaires que le taux d'internalisation de la  $\beta$ -gal dans les cellules HeLa est proportionnel au temps d'incubation des complexes BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal avec les cellules dans un milieu sans sérum (Figure 31). Nous avons également étudié l'influence du temps d'incubation des complexes avec les cellules en présence de sérum après une phase initiale de quatre heures sans sérum. La Figure 38 montre que la délivrance de la protéine dans les cellules est maximale à huit heures d'incubation et décroît ensuite graduellement. La présence de la  $\beta$ -gal est toujours détectable après 55 heures d'incubation, indiquant une libération prolongée de la protéine par les complexes ou une certaine stabilité de la protéine dans le cytoplasme des cellules. Nous avons comparé la délivrance directe de la  $\beta$ -gal sous forme protéique à son expression à partir d'un plasmide pCMV-  $\beta$ -gal délivré aux cellules par le BGTC:DOPE. La Figure 38 indique que l'expression du transgène est détectable huit heures après la transfection, à un

niveau très faible, et augmente pour atteindre un maximum environ trente heures après la transfection. Il est intéressant de noter que si la délivrance d'un plasmide codant l'enzyme permet une activité  $\beta$ -gal supérieure à celle obtenue par délivrance de la protéine, les taux de  $\beta$ -gal obtenus via ces deux approches sont du même ordre de grandeur, signifiant que la délivrance de protéines peut être substituée à la transfection d'un plasmide en obtenant les mêmes taux de protéine fonctionnelle au sein des cellules.



Figure 38 – Cinétique d'internalisation de la  $\beta$ -gal et comparaison avec la transfection d'un plasmide pCMV-  $\beta$ -gal. Les cellules ont reçu 800ng de  $\beta$ -gal complexée au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500 dans l'OptiMEM (ligne pleine) ou 1µg de plasmide pCMV-  $\beta$ -gal complexé au BGTC:DOPE au rapport de charge 4 (ligne pointillée). Les complexes ont été incubés avec les cellules HeLa durant 4 heures dans du milieu DMEM sans sérum puis le milieu a été retiré et remplacé par du DMEM contenant 10% de sérum. A intervalles réguliers les cellules ont été lysées et l'activité  $\beta$ -gal mesurée.

Le taux de β-gal après la transfection d'un plasmide pCMV-β-gal diminuant après avoir atteint un maximum, nous avons cherché à savoir si cette diminution est due à une perte de l'expression du plasmide ou bien à la mort des cellules transfectées. En effet, la transfectioin d'un plasmide est un phénomène généralement transitoire et si l'intégration du transgène dans les chromosomes d'une cellules transfectée est possible, cet évènement reste rare. La Figure 39 montre qu'après la délivrance de la β-gal sous forme de protéines dans les cellules HeLa, le taux de protéines totales des cellules mesuré par un test à l'acide bicinchoninique (BCA) augmente, indiquant que les cellules traitées continuent de croître et de se diviser après le traitement. Au contraire, le taux de protéines après la transfection du plasmide pCMV-β-gal est stable, indiquant que la croissance des cellules est stoppée. Cet effet est probablement du aux effets toxiques de l'ADN et non au lipide cationique puisqu'on ne l'observe pas dans le cas de la délivrance de protéines. Ces résultats suggèrent que dans les cas où l'expression d'un transgène n'est nécessaire que de façon transitoire, la délivrance directe de la protéine correspondante permet de s'affranchir des effets toxiques d'une transfection, et est même souhaitable dans le cas où l'intégration du transgène dans

les chromosomes doit absolument être évitée, lorsque les cellules traitées doivent être réinjectées chez un patient par exemple.



Figure 39 – Evolution du taux de protéines totales après délivrance de la  $\beta$ -gal sous forme de protéine ou via un plasmide pCMV- $\beta$ -gal. Les cellules ont reçu 800ng de  $\beta$ -gal complexée au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500 dans l'OptiMEM (ligne pleine) ou 1µg de plasmide pCMV- $\beta$ -gal complexé au BGTC:DOPE au rapport de charge 4 (ligne pointillée). Les complexes ont été incubés avec les cellules HeLa durant 4 heures dans du milieu DMEM sans sérum puis le milieu a été retiré et remplacé par du DMEM contenant 10% de sérum. A intervalles réguliers les cellules ont été lysées et le taux de protéines totales mesuré.

### 6. Validation du système sur d'autres types cellulaires

Les résultats obtenus jusque là dans cette étude l'ont tous étés sur la lignée cellulaire HeLa. Nous avons vérifié que le système de délivrance de protéines puisse également s'appliquer à d'autres types cellulaires. Nous avons donc traité, en plus des cellules HeLa, la lignée humaine H1299 issue d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules, la lignée de myoblastes murine C2C12 et la lignée ovarienne de hamster chinois CHO-K1 par des complexes de BGTC:DOPE/β-gal. La Figure 40 indique que la protéine est efficacement internalisée par ces autres types cellulaires. Il est intéressant de noter que si des variations du taux d'internalisation sont observées entre ces quatre lignées, ce taux reste compris dans une fourchette entre 5 et 15 % de la dose de protéine initiale. Au contraire, lorsque ces cellules sont transfectées, on observe d'importantes variations dans l'expression du transgène, pouvant atteindre plusieurs ordres de grandeur. Ceci suggère que les étapes communes entre le transfert de gènes et le transfert de protéines, à savoir l'internalisation des complexes et l'échappement endosomal, ont globalement la même efficacité entre ces différents types cellulaires, et que ce sont les étapes en aval (importation nucléaire et transcription) qui semblent être un facteur limitant dans le cas du transfert de gène.



**Figure 40 – Délivrance de la β-gal dans différents types cellulaires.** Les cellules HeLa, H1299, C2C12 et CHO-K1 ont reçu 800 ng de β-gal complexée avec le BGTC:DOPE aux rapports molaires 1000 (barres blanches), 1500 (barres grises) et 2000 (barres noires). Après 8h d'incubation, les cellules ont été lysées et l'activité β-gal mesurée.

## 7. Localisation intracellulaire de la protéine délivrée par le BGTC:DOPE

Nous avons choisi de baser cette étude sur un dosage enzymatique de la  $\beta$ -gal dans le lysat des cellules traitées par les complexes lipide cationique/protéine. Ce test a pour avantage d'être simple à mettre en œuvre et d'être extrêmement sensible, pouvant détecter une quantité de  $\beta$ -gal de l'ordre du nanogramme. Cependant, il ne fournit aucune indication sur la localisation de la  $\beta$ -gal : la protéine dosée est-elle effectivement dans le cytoplasme des cellules traitées, ou bien dans les endosomes ou dans des complexes associés à la membrane des cellules mais non internalisés ? Pour lever l'ambigüité sur la localisation réelle de la protéine vectorisée par le BGTC:DOPE, nous avons effectué une coloration au X-gal, un substrat chromogène de la  $\beta$ -gal. La Figure 41 A indique que les complexes lipide cationique/protéine sont rapidement internalisés puisque la  $\beta$ -gal est détectée dans les cellules après 15 minutes d'incubation. Cependant, seuls 25% des cellules présentent une activité  $\beta$ -


Figure 41 – Localisation intracellulaire de la  $\beta$ -gal délivrée aux cellules HeLa par le BGTC:DOPE. Les cellules ont reçu 800ng de  $\beta$ -gal complexée avec le BGTC:DOPE au rapports molaire 1500. Après 15 minutes (A) ou 4 heures (B) d'incubation, les cellules ont été fixées et traitées au X-gal pour révéler l'activité  $\beta$ -gal. L'absence d'activité  $\beta$ -gal sur des cellules non traitées par les complexes a été vérifiée (C).

gal dans leur cytoplasme, la protéine étant majoritairement présente dans des structures punctiformes qui correspondent probablement à des endosomes ou des complexes non dissociés. En revanche, après 4 heures d'incubation, toutes les cellules présentent une activité  $\beta$ -gal dans leurs cytoplasmes, indiquant un échappement endosomal efficace (Figure 41 B). L'évolution de la proportion de cellules dont le cytoplasme présente une activité  $\beta$ -gal (Figure 42) montre une augmentation progressive pour atteindre un maximum à 4 heures. Ceci est à mettre en regard de l'évolution du taux d'internalisation de la protéine en fonction du temps (Figure 31) : ces résultats indiquent que même si le test enzymatique utilisé au cours de cette étude dose la totalité de la  $\beta$ -gal associée aux cellules, il reflète toutefois avec justesse la quantité de protéine effectivement délivrée sous forme active dans le cytosol des cellules traitées.



Figure 42 – Evolution du pourcentage de cellules positives à la  $\beta$ -gal en fonction du temps d'incubation avec les complexes. Les cellules ont reçu 800ng de  $\beta$ -gal complexée avec le BGTC:DOPE au rapports molaire 1500. A intervalles réguliers, les cellules ont été fixées puis traitées au X-gal pour révéler l'activité  $\beta$ -gal.

### C. Délivrance intracellulaire de protéines fonctionnelles à destinée cytosolique

La phase de mise au point du système de délivrance intracellulaire de protéines a montré que les lipides cationiques utilisés permettent la délivrance d'une enzyme bactérienne, la  $\beta$ -gal, dans le cytoplasme de cellules en culture et sous sa forme active capable d'hydrolyser son substrat. Toutefois, le fait que ce système de délivrance fonctionne avec cette protéine ne permet pas de préjuger de son efficacité avec d'autres protéines, étant donné la grande diversité structurale des protéines. Nous avons donc choisi de délivrer dans des cellules en culture d'autres protéines, eucaryotes cette fois, qui pourraient avoir un intérêt dans le traitement de certaines pathologies, afin de s'assurer leur délivrance dans le cytosol et de leur fonctionnalité.

#### 1. Induction de l'apoptose par délivrance intracellulaire de caspase 3

Les caspases sont une famille de protéases à sérine impliquées dans le déclenchement et le déroulement de l'apoptose. Ces enzymes (une quinzaine ont été décrites à cette heure), présentes sous forme de procaspases inactives dans le cytosol, peuvent être classées en caspases initiatrices (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 et 12) et effectrices (caspases 3, 6, 7 et 14). Les caspases initiatrices peuvent être activées par divers stimuli (activation de récepteurs à domaine de mort, relargage du cytochrome C par les mitochondries, granzyme B...) et clivent les procaspases effectrices qui, une fois activées, clivent leurs substrats respectifs (Hyman and Yuan, 2012). La caspase 3 notamment a un rôle central dans l'apoptose, avec une guarantaine de substrats connus gu'elle dégrade au niveau d'une séquence consensus DEVDG. Elle est responsable des changements morphologiques majeurs observés durant l'apoptose : condensation du noyau par destruction de la lamina nucléaire et activation de la protéine DFF (DNA fragmentation factor) (Liu et al., 1997), perte de l'intégrité du cytosquelette par clivage de la gelsoline, découplage de la membrane et du cytosquelette par clivage de la fodrine provoquant l'apparition de bulles membranaires ou blebs (Janicke et al., 1998a; Janicke et al., 1998b; Porter and Janicke, 1999). Présente dans le cytosol sous forme d'une proenzyme de 32 kDa, elle est clivée par les caspases 8, 9 et 10 pour donner deux sous-unités, p17 et p12, qui associées deux à deux dans un héterotétramère constituent la forme active de la caspase 3 (Kumar, 1997). Elle-même est capable d'activer les caspases 6, 7 et 9, permettant l'amplification du signal de mort cellulaire.

Ce rôle pivot de la caspase 3 dans le processus de l'apoptose nous a incités à la choisir parmi ses homologues pour tester la délivrance d'une protéine fonctionnelle capable de déclencher un effet biologique dans des cellules en culture. Du fait de la faible masse molaire de cette protéine (29 kDa sous forme active), la délivrance de 800ng de protéine (dose optimale déterminée pour la  $\beta$ -gal) au rapport molaire lipide cationique/protéine de 1500 aurait apporté plus de 40 nmoles de lipide cationique aux cellules. Nous avons observé précédemment qu'une telle dose de lipide provoque une perte de viabilité de plus de 40% des cellules (Figure 34) indépendamment des effets de la caspase. Nous avons donc choisi de diminuer la dose de lipide apportée aux cellules en délivrant 100ng seulement de caspase 3 formulée au rapport molaire 1500, soit 3,4 pmoles de caspase 3 et 5,17 nmoles de lipide cationique. Comme contrôle, les cellules ont reçu 1,64 µg de  $\beta$ -gal formulée au rapport molaire 1500, soit 3,4 pmoles de lipide cationique. Cette équivalence dans les doses de lipide cationique nous a permis de s'affranchir de la toxicité induite par ce dernier pour ne mesurer que la toxicité induite par la caspase 3.



Figure 43 – Induction de l'apoptose dans les cellules HeLa par délivrance intracellulaire de caspase 3 active. Les cellules ont reçu 1,64  $\mu$ g de  $\beta$ -gal (barres blanches) ou 100ng de caspase 3 active (barres noires) complexée au BGTC:DOPE ou à la TGKC:DOPE au rapport molaire 1500. Les complexes lipide cationique/protéine ont été déposés sur les cellules dans un milieu sans sérum. Après 4 heures d'incubation, du sérum a été ajouté (10%) et les cellules ont été incubées 48 heures au total avant évaluation de la survie cellulaire par un test MTT.

La Figure 43 montre que la délivrance de caspase 3 active dans les cellules HeLa permet d'induire une baisse de viabilité de 20 % lorsqu'elle est délivrée par le BGTC:DOPE et de 50% lorsqu'elle est délivrée par la TGKC:DOPE, par rapport à la délivrance d'une protéine sans lien avec l'apoptose, la  $\beta$ -gal. Cette différence dans l'efficacité des deux vecteurs est cohérente avec ce qui avait été observé précédemment avec la délivrance de  $\beta$ -gal (Figure

35). La baisse de viabilité qui est observée est cependant modérée, ce peut être attribuée à deux facteurs. D'une part, la faible dose de caspase 3 apportée aux cellules (100ng) est probablement sous-optimale. D'autre part, il a été récemment décrit que les cellules subissant l'apoptose induite par la caspase 3 sécrètent des facteurs de croissance favorables à la prolifération des cellules avoisinantes. En particulier, le clivage par la caspase 3 de la phospholipase A2 calcium-indépendante (iPLA2) active cette dernière et entraîne la production d'acide arachidonique et de prostaglandine E2. Le relargage de ces puissants médiateurs lipidiques dans le milieu extracellulaire par les cellules mourantes entraîne la prolifération des cellules voisines non touchées par l'apoptose. Ce mécanisme original, nommé phœnix rising par ses découvreurs, jouerait un rôle clé dans la cicatrisation après une lésion (Li et al., 2010), mais également dans la résistance de tumeurs à la radiothérapie, où les cellules mourantes stimuleraient la croissance des cellules survivantes (Huang et al., 2011), et permettrait d'expliquer pourquoi la caspase 3 délivrée par les lipides cationiques ne provoque pas la mort de la majorité des cellules. Plus important, ce mécanisme empêche d'envisager la délivrance de caspase 3 in vivo comme biothérapie pour le traitement de cancers par exemple, rendant cette stratégie inefficace voir potentiellement dangereuse dans l'état actuel des connaissances. Cependant, nos résultats montrent que les lipides cationiques sont capables de délivrer une enzyme effectrice, la caspase 3, sous forme fonctionnelle dans le cytosol de cellules HeLa en culture où elle peut induire l'apoptose.

#### 2. Délivrance intracellulaire d'anticorps

Parmi les applications potentielles de la délivrance intracellulaire de protéines, une des plus prometteuses serait la délivrance d'anticorps fonctionnels au sein de cellules vivantes. Les anticorps, sous forme de sérum, sont utilisés depuis plus d'un siècle dans le traitement de maladies infectieuses : Behring et Kitasato démontrent dès 1892 qu'un sérum peut conférer l'immunité contre la diphtérie (Strohl and Knight, 2009; Both et al., 2012). Durant le 20<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation d'anticorps sera essentiellement cantonnée au traitement des maladies infectieuses et des envenimations. La découverte de leur structure dans les années 1960 puis de la technologie des hybridomes en 1975 (Kohler and Milstein, 1975) a mené à la mise sur le marché en 1986 du premier anticorps monoclonal utilisé en médecine humaine, le Muromonab-CD3, un anticorps murin anti-CD3 utilisé dans la prévention du rejet de greffe (An, 2010). Depuis, un grand nombre d'immunoglobulines monoclonales ont été développées et sont utilisées dans le traitement de pathologies variées, comme le Trastuzumab pour certains cancers du sein (Bange et al., 2001) ou le Rituximab pour les

syndromes myéloprolifératifs ou inflammatoires (Maloney, 2012). Le point commun entre tous ces anticorps est qu'ils ciblent des antigènes extracellulaires ou membranaires. L'accès à des cibles intracellulaires est interdit par la membrane plasmique qui empêche le passage de ces protéines. Pourtant, de nombreuses cibles potentielles existent dont le blocage pourrait s'avérer bénéfique pour le traitement de certaines pathologies. Nous avons donc appliqué notre système de délivrance intracellulaire de protéines à la vectorisation d'anticorps vers le cytoplasme de cellules en culture.

# a Délivrance d'un anticorps anti-β-tubuline

Nous avons dans un premier temps tenté de délivrer dans des cellules HeLa un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -tubuline. Les microtubules sont des structures de grandes dimensions et donnent un marquage spécifique facilement observable. La Figure 44 montre cependant que l'incubation des cellules avec des complexes BGTC:DOPE/anticorps anti- $\beta$ -tubuline donne un marquage punctiforme, non spécifique de la  $\beta$ -tubuline. Il semble donc que le BGTC:DOPE ne soit pas capable de délivrer cet anticorps dans le cytoplasme de cellules HeLa sous sa forme fonctionnelle.



**Figure 44** – **Observation de cellules HeLa incubées avec des complexes BGTC:DOPE/anticorps anti-β-tubuline.** Les cellules ont reçu 750ng d'anticorps complexé au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500. Après 4 heures d'incubation avec les complexes, les cellules ont été lavées, fixées et les noyaux marqués au DAPI avant observation sous un microscope à épifluorescence.

Afin de déterminer quelle étape du processus de délivrance de cette protéine dans le cytoplasme des cellules ne fonctionne pas dans ce cas, nous avons étudié plus précisément la localisation de la protéine par microscopie confocale avec un contre-marquage des contours cellulaires à l'iodure de propidium. La Figure 45 montre que si certains complexes sont associés à la membrane plasmique sur sa face extracellulaire, la majorité d'entre eux est répartie de façon ponctuelle dans le cytoplasme. Ceci indique que les lipolexes sont internalisés par les cellules mais que l'anticorps n'atteint pas le cytosol, indiquant un probable défaut d'échappement endosomal. Il semble donc que si la DOPE permet l'échappement endosomal de complexes BGTC:DOPE/β-gal de par ses propriétés fusogéniques, les propriétés physicochimiques des complexes BGTC:DOPE/anticorps empêchent son action déstabilisatrice sur la membrane des endosomes.



**Figure 45 - Observation de cellules HeLa incubées avec des complexes BGTC:DOPE/anticorps anti-β-tubuline.** Les cellules ont reçu 750ng d'anticorps complexé au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500. Après 4 heures d'incubation avec les complexes, les cellules ont été lavées, fixées et contre-marquées à l'iodure de propidium avant observation sous un microscope confocal à balayage laser. Dix plans focaux de 400nm de profondeur ont été superposés. Deux plans de coupe en x et y (lignes blanches) sont présentés dans les bandeaux inférieur et droit.

L'inefficacité de la DOPE dans ce cas de figure nous a amenés à utiliser un nouveau lipide neutre particulièrement efficace pour promouvoir l'échappement endosomal, le MM27 (Figure 46), dont l'action est basée sur un mécanisme différent de celui de la DOPE. Ce composé initialement développé pour améliorer l'efficacité de transfection d'acides nucléiques par les lipides cationiques porte un groupement imidazole protonable permettant

la rupture de l'endosome par un mécanisme d'éponge à protons (Mevel et al., 2008; Midoux et al., 2009; Billiet et al., 2012).



#### Figure 46 – Structure du MM27

Nous avons donc formulé l'anticorps anti-β-tubuline à des liposomes de BGTC:MM27. L'observation en épifluorescence des cellules traitées par ces complexes s'est avérée difficile car leurs membranes plasmiques étaient recouvertes de complexes fluorescents empêchant l'observation précise du cytoplasme. En revanche, l'observation en microscopie confocale nous a permis d'obtenir des plans de coupe du cytoplasme exempts du signal de la membrane plasmique (Figure 47 A). On distingue dans le cytosol des structures filamenteuses similaires à celles obtenues avec l'anticorps anti-β-tubuline par un marguage en immunofluorescence classique sur cellules perméabilisées (Figure 47 B). Ceci indique que le MM27 permet l'échappement endosomal des complexes lipide/protéine. Le marguage des microtubules est cependant de qualité médiocre par rapport à celui obtenu sur cellules perméabilisées. Ceci peut s'expliquer par deux raisons. i) Les microtubules n'étant pas nécessairement parallèles au plan de coupe, l'imagerie confocale ne permet pas ici de les visualiser sur toute leur longueur. ii) L'anticorps utilisé ici est fourni dans une solution contenant 1% de BSA comme agent stabilisateur, soit cent fois plus de BSA que d'anticorps (m/m). Si la présence de cette protéine ne gêne en rien le marquage des microtubules dans un protocole d'immunofluorescence classique, elle est en revanche susceptible d'entrer en compétition avec l'anticorps lors de la formation des complexes avec le lipide cationique. Ainsi, la dose d'anticorps effectivement délivrée dans les cellules serait largement sousoptimale.



**Figure 47 - Délivrance d'un anticorps anti-\beta-tubuline par le BGTC:MM27 dans les cellules HeLa.** (A) Les cellules ont reçu 750ng d'anticorps complexé au BGTC:MM27 au rapport molaire 1500. Après 4 heures d'incubation avec les complexes, les cellules ont été lavées, fixées et les noyaux marqués au ToPro-3 avant observation sous un microscope confocal à balayage laser. Acquisition d'un plan focal de 400nm d'épaisseur passant par le cytoplasme (B) Marquage des microtubules par l'anticorps anti  $\beta$ -tubuline sur cellules HeLa fixées au paraformaldéhyde et perméabilisées au Triton X-100. Marquage des noyaux au DAPI et observation sous un microscope à épifluorescence.

#### b Délivrance d'un anticorps anti-kératine 8

Suite à ces observations, nous avons délivré par les lipides cationiques un anticorps anticytokératine 8 (K8) dans les cellules HeLa. Cet anticorps présentait l'avantage de ne pas inclure de BSA ni aucune autre protéine dans sa formulation commerciale, et était donc susceptible de donner de meilleurs résultats que l'anticorps anti-β-tubuline utilisé précédemment. Afin d'étudier plus en avant l'influence du colipide sur l'efficacité de délivrance de l'anticorps, nous avons vectorisé l'anticorps par le BGTC, seul ou formulé à la DOPE ou au MM27. Nous avons également délivré l'anticorps au moyen de la DOSP, formulée ou non à ces colipides, afin d'observer une éventuelle influence du lipide cationique sur l'efficacité du système. La Figure 48 A montre que le BGTC utilisé seul ne permet pas de délivrer l'anticorps dans le cytosol des cellules traitées, ce qui est peu surprenant étant donné que cette formulation ne contient pas de composé susceptible de favoriser l'échappement endosomal. La Figure 48 B confirme que la DOPE est inefficace pour promouvoir cette phase dans le cas de la délivrance d'un anticorps. En revanche, le colipide MM27 permet la délivrance de l'anticorps dans le cytosol (Figure 48 C), avec une efficacité cependant limitée puisque moins de 10 % des cellules présentent un marquage des filaments de kératine (l'efficacité des différents vecteurs est indiquée dans la Figure 49). La DOSP utilisée seule s'est également avérée inefficace (Figure 48 D) et d'une efficacité limitée (15 %) lorsqu'elle est formulée avec la DOPE (Figure 48 E). On notera que les complexes DOSP:DOPE/anticorps se présentent sous la forme d'aiguilles de grande taille peu susceptibles d'entrer dans les cellules. En revanche, l'ajout du MM27 à la formulation permet d'augmenter drastiquement l'efficacité du système puisque près de 70 % des cellules traitées présentent un marquage des filaments de kératine (Figure 48 F). Ce résultat confirme que le MM27 permet un échappement endosomal efficace et montre que la DOSP, peu active par elle-même, constitue un vecteur efficace lorsqu'elle est formulée à un colipide adéquat, du moins dans le cas de la délivrance d'un anticorps.



(suite de la figure page suivante)



**Figure 48** – **Délivrance d'un anticorps anti-K8 dans les cellules HeLa.** Les cellules ont reçu 750ng d'anticorps complexé au rapport molaire 1500 à différents lipides : BGTC (A), BGTC:DOPE (B), BGTC:MM27 (C), DOSP (D), DOSP:DOPE (E), DOSP:MM27 (F et G). Après 4 heures d'incubation avec les complexes, les cellules ont été lavées, fixées et les noyaux marqués au DAPI avant observation sous un microscope à épifluorescence. (G) Observation à fort grossissement des cellules traitées par les complexes DOSP:MM27/anticorps. (H) Observation de cellules fixées au méthanol et perméabilisées à l'acétone avant marquage du cytosquelette par l'anticorps anti-kératine 8.

L'observation des cellules incubées avec les complexes DOSP:MM27/anticorps à fort grossissement (Figure 48 G) confirme que les filaments de kératine sont intensément marqués par l'anticorps. Le marquage est similaire à celui obtenu avec le même anticorps sur des cellules fixées et perméabilisées (Figure 48 H), toutefois on notera que les filaments marqués sur les cellules vivantes sont fins et bien individualisés alors qu'ils semblent groupés en faisceaux épais sur les cellules fixées. Le processus de fixation des cellules au méthanol, provoquant la déshydratation des protéines et leur coagulation, est certainement responsable de cet aspect en faisceaux des filaments de kératine. Les cellules traitées par les liposomes de DOSP:MM27/anti-K8 n'ayant pas subi une telle déshydratation, il est probable que le marquage de leur cytosquelette reflète mieux la réalité qu'un marquage obtenu à l'aide de techniques susceptibles de générer des artefacts.



**Figure 49** – **Efficacité de délivrance de l'anticorps anti-K8 en fonction du vecteur.** Les cellules ont reçu 750ng d'anticorps complexé aux lipides cationiques au rapport molaire 1000. Après 4 heures d'incubation, les cellules ont été lavées, fixées et les noyaux comptés au DAPI avant observation sous un microscope à épifluorescence. Le comptage des noyaux et des cellules positives a été effectué sur 3 lames par condition.

#### 3. Délivrance d'une protéine cationique à destinée nucléaire

Toutes les protéines que nous avons délivrées dans des cellules en culture au moyen de lipides cationiques ont été, à ce stade, des protéines anioniques, susceptibles de former facilement un complexe avec les lipides cationiques par le biais d'interactions électrostatiques. Nous nous sommes également intéressés au cas d'une protéine cationique à destinée nucléaire. La délivrance de ce type de protéines est particulièrement intéressante dans le domaine des cellules-souches pluripotentes induites (iPSc). Ces cellules pluripotentes sont généralement dérivées de cellules somatiques différenciées, par la surexpression de facteurs de transcription tels que Oct-3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc, Nanog ou Lin-28 (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Ces transgènes délivrés au moyen de virus ou de plasmides sont susceptibles de s'intégrer dans les chromosomes des cellules traitées, interdisant leur utilisation en médecine régénérative (Yu et al., 2007). La délivrance de ces facteurs directement sous forme protéique, par le biais de domaines de transduction (PTD) permet de générer des cellules iPSc sans intégration mais l'efficacité d'un tel système est limitée (0.001 % de reprogrammation) et sa toxicité importante (Kim et al., 2009). La délivrance de ces facteurs de transcription par le biais de lipides cationiques pourrait permettre la génération efficace de cellules iPSc sans intégration génomique, cependant beaucoup de protéines interagissant avec l'ADN, dont Sox-2, Klf-4 et Lin-28, sont positivement chargées à pH physiologique, compromettant la formation d'un complexe stable avec les lipides cationiques. Nous avons donc choisi de vectoriser dans des cellules en culture une protéine chargée positivement et à localisation nucléaire, l'histone H1de veau conjuguée à l'Alexa488, afin d'évaluer la capacité des lipides cationiques à délivrer une telle protéine non seulement dans des cellules en culture, mais également jusqu'au noyau où ce type de protéines est habituellement localisé.

Nous avons dans un premier temps tenté de délivrer l'histone H1 dans les cellules HeLa par le BGTC:DOPE en suivant le protocole mis au point pour la β-gal. De façon surprenante, le système de délivrance s'est avéré fonctionnel et les conditions de formulation proches de celles de la β-gal (500ng de protéine complexée au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500). La Figure 50 A-C montre que l'histone est présente dans les noyaux de 60% des cellules après 4 heures d'incubation. Il est intéressant de noter que l'histone libre est capable de rentrer spontanément dans les cellules mais s'accumule dans les endosomes sans accéder au cytoplasme (Figure 50 G-I). Il semble donc que dans le cas de l'histone, les liposomes de BGTC:DOPE jouent un rôle prépondérant au niveau de l'échappement endosomal alors qu'ils ne sont pas essentiels pour le franchissement de la membrane plasmique.

Les cellules HeLa utilisées jusqu'ici constituent un modèle intéressant pour le développement du système de délivrance intracellulaire de protéines, en revanche elles ne sauraient être utilisées dans le cadre de la génération de cellules iPSC qui sont dérivées de cellules primaires. Ce genre de cellules étant réputé difficile à transfecter par des acides nucléiques, nous avons délivré l'histone H1 dans des cellules mésenchymateuses primaires de souris (CSM) afin de vérifier si une telle limitation existe concernant la délivrance de protéines. La Figure 50 D-E montre que l'histone est présente dans les noyaux de 40% des CSM traitées. Ce résultat est à mettre en regard des résultats obtenus sur plusieurs lignées cellulaires (Figure 40) où l'on retrouve des taux similaires de protéine internalisée alors que les taux de transfection des acides nucléiques diffèrent largement. Ceci semble confirmer que dans le cas de cellules difficiles à transfecter, les étapes en aval de l'échappement endosomal semblent être le facteur limitant puisque les taux de délivrance de protéine sont similaires à ceux de cellules facilement transfectables comme la lignée HeLa.



**Figure 50 – Délivrance d'histone H1 par le BGTC :DOPE dans des cellules en culture.** (A-C) Cellules HeLa + complexes ; (D-F) Cellules souches mésenchymateuses murines + complexes. Les cellules ont reçu 500ng d'histone H1 formulée au BGTC:DOPE au rapport molaire 1500. Comme contrôle, des cellules HeLa ont reçu 500ng d'histone H1 libre. Après 4h d'incubation, les cellules ont été lavées, fixées et les noyaux marqués au DAPI avant observation sous un microscope à épifluorescence. (A-D-G) DAPI; (B-E-F) Alexa 488; (C-F-I) Overlay.

La DOSP s'étant révélée être un vecteur particulièrement efficace sous certaines conditions, nous avons délivré l'histone H1 à l'aide de DOSP:DOPE et de DOSP:MM27. La Figure 51 A-C montre que la DOSP:DOPE permet de délivrer la protéine dans les noyaux de 45% des cellules, un taux comparable à celui du BGTC:DOPE. En revanche, la DOSP:MM27 permet la délivrance de l'histone dans 90% des noyaux (Figure 51 D-F). Ce résultat rejoint ceux observés dans le cas de la délivrance d'anticorps et montre que le MM27 est nettement plus efficace que la DOPE pour promouvoir l'échappement endosomal, qui semble être le facteur limitant l'accès de l'histone dans le cytoplasme.



**Figure 51 - Délivrance d'histone H1 par la DOSP dans des cellules Hela.** Les cellules ont reçu 500ng d'histone H1 formulée à la DOSP:DOPE (A-C) ou à la DOSP:MM27 (D-F) au rapport molaire 1500. Après 4h d'incubation, les cellules ont été lavées, fixées et les noyaux marqués au DAPI avant observation sous un microscope à épifluorescence. (A-D) DAPI; (B-E) Alexa 488; (C-F) Overlay.

Les résultats encourageants obtenus sur la délivrance d'histone montrent que les lipides cationiques peuvent efficacement délivrer cette protéine dans le cytoplasme des cellules traitées, où elle est prise en charge par le système d'importation nucléaire pour s'accumuler dans le noyau. Cependant, ils soulèvent une question cruciale : l'histone H1 possédant une nette charge positive à pH physiologique, il est peu probable que le mécanisme de délivrance de cette protéine repose sur la formation d'un complexe avec les lipides cationiques. Une étude des propriétés physicochimiques du mélange lipides cationiques/histone H1 est donc nécessaire pour déterminer la présence – ou non – de complexes et le mode d'action des vecteurs dans ce cas particulier.

# D. Propriétés physicochimiques des complexes lipide cationique/protéines

L'activité de vectorisation des lipides cationiques est intimement liée aux propriétés physicochimiques des complexes qu'ils forment avec les acides nucléiques : taille des particules, charge, organisation supramoléculaire, état de complexation du lipide et du cargo (Almofti et al., 2003a; Ma et al., 2007; Barteau et al., 2008). Nous avons donc étudié dans le cas de la délivrance intracellulaire de protéines l'influence de ses paramètres sur l'efficacité des systèmes de vectorisation en appliquant l'approche utilisée pour les acides nucléiques à l'étude des complexes BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal.

# 1. Propriétés des complexes BGTC:DOPE/β-gal

# a Complexation de la β-gal par le BGTC:DOPE

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de complexation des protéines par les lipides cationique. Dans le cas des acides nucléiques, ce paramètre est généralement déterminé en mesurant la fluorescence de l'ADN ou de l'ARN en présence de bromure d'éthidium (BET) et de lipides cationiques (Xu and Szoka, Jr., 1996; Ferrari et al., 1998; Barteau et al., 2008). Plus l'acide nucléique est complexé par les lipides, moins la double hélice est accessible au BET et la fluorescence de la solution diminue en proportion. Un autre technique repose sur l'electrophorèse en gel d'agarose des complexes à analyser : seul les acides nucléiques libres peuvent migrer dans le gel, la mesure de l'intensité des bandes résultantes reflète donc l'état de complexation.

Nous avons adapté cette technique d'électrophorèse à l'analyse des complexes lipide cationique/ADN en utilisant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en conditions non dénaturantes pour ne pas perturber l'assemblage supramoléculaire des complexes. La Figure 52 A montre que la complexation de la  $\beta$ -gal par le BGTC:DOPE est efficace dans un tampon 120mM NaCl – 20mM HEPES pH 7,4 puisque pour des rapports molaires supérieurs à 200, la totalité de la protéine est contenue dans les complexes. En revanche, lorsque la complexation a lieu dans le milieu OptiMEM, elle est nettement moins efficace puisque même pour un rapport molaire de 2000, de la  $\beta$ -gal libre migre encore dans le gel (Figure 52 B). Cette différence s'explique facilement par la présence dans l'OptiMEM de nombreux solutés, dont des protéines, qui sont susceptibles d'entrer en compétition avec la  $\beta$ -gal pour se lier au BGTC. Ce résultat est toutefois surprenant dans la mesure où ces complexes formés dans l'OptiMEM sont huit fois plus efficaces que ceux formés dans 120mM NaCl –

20mM HEPES pH 7,4 pour internaliser la  $\beta$ -gal dans les cellules HeLa (Figure 36). Une autre propriété physicochimique de ces complexes doit donc être responsable de leur efficacité.



**Figure 52** – **Mesure de la complexation de la \beta-gal par le BGTC:DOPE par PAGE.** Chaque piste a été chargée avec 1µg de  $\beta$ -gal complexée au BGTC:DOPE à différents rapports molaires lipide cationique/protéine (indiqués au dessus des pistes). Les complexes ont été formés dans 120mM NaCl – 20mM HEPES pH 7.4 (A) ou dans le milieu OptiMEM (B). Gel de stacking 5%, resolving 7%. Après 2h de migration à 80V, la  $\beta$ -gal a été révélée au bleu de Coomassie.

#### b Stabilité colloïdale des complexes BGTC:DOPE/β-gal

La taille des complexes à base de lipides cationiques est un facteur clé de leur efficacité. En effet, elle influe directement sur leur capacité à sédimenter sur des cellules en culture et sur les voies d'endocytose par lesquelles ils sont internalisés. Dans le cas de complexes basés sur l'ADN, il a été proposé un modèle de stabilité colloïdale à trois zones basé sur la taille des complexes en fonction du rapport de charge lipide cationique/ADN (Pitard et al., 1997; Pitard et al., 1999). Ce modèle a ensuite été appliqué avec succès à des complexes à base de siRNA (Desigaux et al., 2007). Nous avons donc cherché à déterminer si un tel modèle de stabilité colloïdale peut s'appliquer aux complexes basés sur des protéines.



**Figure 53** – **Stabilité colloïdale des complexes BGTC:DOPE/\beta-gal.** 1µg de  $\beta$ -gal a été complexé au BGTC:DOPE à différents rapports molaires dans un tampon NaCl 120mM – 20mM HEPES pH 7,4 (A) ou dans du milieu OptiMEM (B). La taille des complexes résultants a été mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière.

La Figure 53 A montre que ce modèle à trois zones s'applique aux complexes BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal formés dans 120mM NaCI – 20mM HEPES pH 7,4. On peut définir une zone A pour les rapports molaires inférieurs à 100 où les complexes sont stables et de petite taille avec un diamètre moyen de 120 nm. La charge théorique de la la  $\beta$ -gal étant de -154, les particules résultantes sont chargées négativement jusqu'à un rapport molaire voisin de 80 et leur répulsion électrostatique empêche leur agrégation. Pour des rapports molaires supérieurs, on observe une augmentation rapide de la taille des complexes (neutralisation électrique et agrégation par interaction hydrophobe) jusqu'à une large zone B correspondant à des particules colloïdalement instables, avec un diamètre supérieur à 700nm. A des rapports supérieurs à 1000, le large excès de lipide cationique apporte des charges positives permettant la répulsion électrostatique des complexes : on observe une diminution de la taille des complexes vers une zone C de stabilité colloïdale. Au rapport molaire de 1500, optimal pour internaliser la  $\beta$ -gal, ces complexes ont un diamètre moyen de 300nm.

En revanche, dans le cas de complexes BGTC:DOPE/β-gal formés dans l'OptiMEM (Figure 53 B), l'agrégation des complexes due aux solutés entraîne une augmentation de taille rapide vers une zone d'instabilité colloïdale même pour les rapports molaires élevés. La grande taille de ces complexes formés dans l'OptiMEM (> 700nm) permet d'expliquer leur efficacité par rapport aux complexes formés dans 120mM NaCI – 20mM HEPEs pH 7,4 malgré leur incapacité à complexer efficacement la protéine. D'une part, étant moins soumis au mouvement brownien, ils sont plus aptes à sédimenter sur les cellules que les complexes de 300nm formés dans 120mM NaCI – 20mM HEPES pH 7,4. D'autre part, il a été rapporté dans le cas du transfert de gène que la taille des complexes influe sur leur voie d'entrée dans la cellule. Même si ces voies semblent être variables en fonction du type cellulaire traité, un consensus semble établi sur le fait que des complexes de grande taille ont une activité de transfection supérieure aux petits complexes (Ross and Hui, 1999; Almofti et al., 2003b). D'autre part, des complexes de grand diamètre sontplus à même de provoquer la rupture de la membrane endosomale et d'accéder au cytosol (Escriou et al., 1998). Il semble là encore que ces règles s'appliquent aux complexes lipide cationique/protéine.

### c Morphologie des complexes BGTC:DOPE/β-gal

Pour mieux comprendre le mode d'action des complexes de BGTC:DOPE/ β-gal, nous avons analysé leur morphologie par microscopie électronique à transmission



Figure 54 - Observation en cryo-TEM de liposomes de BGTC:DOPE non complexés

(cryo-TEM). La Figure 54 montre que le BGTC:DOPE forme des liposomes unilamellaires ou oligolamellaires, sphériques, d'un diamètre moyen de 120nm en accord avec les données obtenues par diffusion quasi-élastique de la lumière. En revanche, lorsque ces liposomes sont complexés à la  $\beta$ -gal au rapport molaire de 1500, on observe une importante agrégation des liposomes, ceux-ci gardant toutefois une forme sphérique (Figure 55 A-C). Cela révèle une importante interaction entre la  $\beta$ -gal et les liposomes. Des densités protéiques sont présente au sein des complexes, pouvant former des jonctions entre deux membranes adjacentes (Figure 55, flèches noires), révélant la capacité de la  $\beta$ -gal à induire des déformations des bicouches lipidiques. L'épaisseur de telles jonctions est d'environ 10nm, compatible avec la présence d'une monocouche de  $\beta$ -gal en considérant que



**Figure 55** – **Observation en cryo-TEM de complexes BGTC:DOPE/** $\beta$ -gal formulés à différents rapports molaires. (A-C) Rm = 1500; (D-F) RM = 750 ; (G-I) RM = 375. Flèches noires : jonctions protéiques entre deux membranes lipidiques. Flèches blanches : couche de protéine en surface des lipolexes. Barres d'échelle :  $0.5\mu$ m (A, D, G) et 50nm (B, C, E, F, H, I).

celle-ci est un tétramère de 175 x 135 x 90 Å (Jacobson et al., 1994). La protéine est en revanche absente de la surface des complexes : cette disposition autorisant un contact étroit entre le complexes et la membrane endosomale, l'échappement endosomal des complexes contenant de la DOPE repose probablement sur un mécanisme de fusion. Pour mieux observer l'interaction entre la β-gal et les liposomes, nous avons diminué le rapport molaire. Aux rapports de 750 (Figure 55 D-F) et 375 (Figure 55 G-I), les complexes sont plus compacts du fait de la présence d'une proportion accrue de protéine. Au rapport de 375 notamment, on observe des densités protéiques à la surface des complexes (Figure 55, flèches blanches). Ces observations suggèrent que la formation des complexes est provoquée par des interactions lipide/protéine, due aux forces électrostatiques et aux forces de Van der Waals.

## 2. Propriétés des complexes lipide cationique/anticorps

Les anticorps présentant des propriétés physicochimiques différentes de la  $\beta$ -gal, nous avons également analysé par cryo-TEM la morphologie des complexes qu'ils forment avec le BGTC:DOPE afin d'observer d'éventuelles différences. Comme dans le cas de la  $\beta$ -gal, on observe au rapport molaire de 1500 une forte agrégation des liposomes (Figure 56 A-C), en revanche la protéine n'est pas visible. Cela peut s'expliquer par le fait que l'anticorps est trois fois moins massif que la  $\beta$ -gal, et donc encore moins détectable. En revanche, au rapport molaire de 375, on retrouve la protéine à la surface des complexes (Figure 56 D-F). Ces observations suggèrent que la formation des complexes est là aussi provoquée par des interactions lipide/protéine conduisant à l'agrégation des liposomes, avec une déformation des membranes lipidiques sans véritable remaniement. Là encore, l'absence de protéine en surface des complexes permet d'envisager un mécanisme d'échappement endosomal par fusion; même si cette étape est probablement insuffisante au vu du faible taux de délivrance observé



**Figure 56 - Observation en cryo-TEM de complexes BGTC:DOPE/anticorps anti-K8** formulés aux rapports molaires de 1500 (A-C) et 375 (D-F). Flèches noires : couche de protéine en surface des lipolexes. Barres d'échelle : 0,5µm (A, D) et 50nm (B, C, E, F).

Il est intéressant de noter que lorsque la solution d'anticorps contient de la BSA comme stabilisateur, on retrouve cette dernière à la surface des complexes sous forme d'épaisses densités protéiques empêchant l'agrégation des liposomes entre eux (Figure 57). Ceci permet d'expliquer la faible efficacité de délivrance de l'anticorps anti-β-tubuline par le BGTC:DOPE (Figure 47) : en plus de la compétition entre la BSA et l'anticorps pour se lier aux liposomes, la présence de BSA en surface empêche la formation de grands complexes aptes à sédimenter sur les cellules, et est



Figure 57 – Observation en cryo-TEM de complexes BGTC:DOPE/anticorps anti- $\beta$ -tubuline formulés aux rapports molaires de 1500 Flèche noire : couche de protéine en surface du lipolexe. Barre d'échelle : 50nm.

susceptible de limiter fortement le contact entre la membrane endosomale et le complexe, empêchant le mélange de la DOPE avec les phospholipides membranaires et donc le bon déroulement de l'échappement endosomal.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux complexes formés par la DOSP:MM27 et un anticorps pour déterminer si leurs caractéristiques permettent d'expliquer leur efficacité. La Figure 58 A-B montre que la DOSP:MM27 seule ne forme pas de liposomes mais des agrégats diffus au sein desquels les lipides sont rassemblés en microdomaines d'une vingtaine de nanomètres, sans structure ou organisation précise. Notamment, on ne retrouve pas la présence de bicouches lipidiques comme avec le BGTC:DOPE. Le mélange de DOSP:MM27 avec l'anticorps entraîne en revanche des changements structurels importants. Les complexes se présentent comme des agrégats micrométriques d'éléments sphériques (Figure 58 C). Ces éléments sont eux-mêmes constitués de couches lipidiques concentriques, formant une structure en oignon couverte de densités protéiques (Figure 58 D, flèche noire). Il s'est avéré que la formation de ces structures concentriques est due non pas à l'anticorps lui-même mais aux phosphates présents dans sa formulation commerciale, puisque le mélange de DOSP:MM27 à une solution contenant 1mM de phosphates mais sans anticorps a conduit à l'observation de tels objets.



**Figure 58 - Observation en cryo-TEM de DOSP:MM27 non complexée** (A-B) et de complexes DOSP:MM27/anticorps anti K8 (C-D) formulés au rapport molaire de 375. Barres d'échelle : 0,5μm (A, C) et 50nm (B, D)

Cette organisation rappelle celle observée dans le cas de complexes lipide cationique/acides nucléiques (Pitard et al., 1999; Desigaux et al., 2007), mais dans ce cas on retrouve l'acide nucléique au sein du complexe entre les couches lipidiques, alors que dans le cas présent la protéine est retrouvée uniquement en surface. Nous avons également observé la présence de structures multilamellaires dans les complexes DOSP:DOPE/anticorps, mais sans

organisation concentrique comme avec le MM27. Cette organisation permet d'expliquer l'efficacité d'internalisation des complexes formés avec cet anticorps et contentant du MM27 : bien que la présence de protéines en surface puisse empêcher l'accolement des complexes à la membrane endosomale, le mécanisme d'action du MM27 repose sur un effet endosomolytique d'éponge à protons et la fusion des membranes ne semble pas nécessaire. La grande quantité de MM27 présente au sein des structures multilamellaires concentriques offre probablement une grande capacité d'absorbtion des protons à ces complexes, permettant de tamponner efficacement le pH des endosomes tardifs et de provoquer leur rupture par choc osmotique.

# 3. Propriétés du mélange BGTC:DOPE / histone H1

L'histone H1 possède à pH physiologique une charge théorique de + 53. Il est donc peu probable qu'elle soit à même de former un complexe avec les lipides cationiques. Nos résultats montrent cependant que les lipides cationiques permettent sa délivrance dans le cytosol. Nous avons donc étudié les propriétés physicochimiques d'un mélange BGTC:DOPE / histone H1 afin de déterminer si un complexe est formé et quel peut être le mode d'action des lipides cationiques dans ce cas précis.

# a Complexation de l'histone H1 par le BGTC:DOPE

Nous avons étudié l'état de complexation de l'histone H1 par électrophorèse comme dans le cas de la  $\beta$ -gal. Cependant, la charge positive de l'histone se prêtant mal à une électrophorèse en conditions non dénaturantes, nous avons recherché par SDS-PAGE la présence d'histone libre dans le milieu de formulation après élimination des éventuels complexes par centrifugation. La Figure 59 indique que la quantité d'histone libre est la même quel que soit le rapport molaire utilisé. On notera que pour les rapports molaires élevés, la quantité de lipide cationique utilisée est telle que celui-ci devient détectable dans le gel. Pourtant, même dans ces conditions, la présence d'histone libre suggère l'absence de formation d'un complexe.



**Figure 59** – **Electrophorèse d'un mélange BGTC:DOPE/histone H1.** 10µg d'histone H1 ont été incubés dans 120mM de NaCl – 20mM HEPES pH 7.4 avec des liposomes de BGTC:DOPE à différents rapports molaires lipide cationique/protéine (indiqués au dessus des pistes) puis les mélanges ont été centrifugés 10 minutes à 17 900 xg. Un aliquot de surnageant a été prélevé et incubé 5 minutes à 95°C dans du tampon de Laemmli avant dépôt sur un gel SDS-PAGE (stacking 5%, resolving 7%). Après 2h de migration à 80V, la β-gal a été révélée au bleu de Coomassie.

#### b Stabilité colloïdale du mélange BGTC:DOPE/histone H1

La diffusion quasi-élastique de la lumière montre que les particules mesurée dans un mélange d'histone H1 avec de BGTC:DOPE ont une taille identique aux liposomes d'origine, suggérant que ce sont les liposomes intacts et non complexés (Figure 60).



**Figure 60 - Stabilité colloïdale d'une solution de BGTC:DOPE et d'histone H1.** 2µg d'histone H1 ont été complexés au BGTC:DOPE à différents rapports molaires dans un tampon NaCl 120mM – 20mM HEPES pH 7,4 La taille des complexes résultants a été mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière.

#### c Microscopie électronique du mélange BGTC:DOPE/histone

Pour confirmer ces observations, nous avons procédé à l'observation directe du mélange BGTC:DOPE/histone H1 en cryo-TEM. La Figure 61 montre que les liposomes sont intacts et non agrégés, de plus on ne détecte pas la présence de la protéine, que ce soit en surface ou à l'intérieur des liposomes, confirmant que l'histone ne forme pas de complexe avec le BGTC:DOPE. L'absence de formation d'un complexe implique que le mode d'action des lipides cationiques pour internaliser l'histone H1 dans des cellules en culture diffère fondamentalement de celui proposé pour l'internalisation d'acides nucléiques et de protéines anioniques.



Figure 61 - Observation en cryo-TEM d'un mélange de BGTC:DOPE et d'histone H1 formulé au rapport molaire de 375. Barres d'échelle : 50nm.

Nous avons observé précédemment que l'histone libre est capable d'être internalisée spontanément par les cellules HeLa en culture, se retrouvant dans les endosomes sans toutefois accéder au cytosol (Figure 50 I). Cette entrée spontanée dans la cellule de l'histone en solution dans le milieu extracellulaire se fait probablement par pinocytose, un mode d'entrée dans la cellule de solutés en phase fluide (Conner and Schmid, 2003). La charge positive de l'histone lui permet d'être adsorbée à la surface de la cellule négativement chargée, ce qui pourrait faciliter son internalisation. Les vecteurs lipidiques permettant la délivrance de l'histone H1 dans le cytosol, il est probable que ceux-ci jouent un rôle essentiellement au niveau de la sortie des endosomes. Cependant, leur mode d'action ne peut pas être réduit à celui de simples agents endosomolytiques, car l'incubation de cellules HeLa en présence d'histone et de 150µM de chloroquine, un agent lysomotropique et endosomolytique utilisé notamment pour faciliter l'échappement endosomal (Wolfert and Seymour, 1998), ne permet pas l'accès de la protéine au cytosol. De plus, l'incubation des cellules en présence d'histone et de liposomes contenant une faible proportion de lipide cationique (DOSP:MM27 1:5) ne permet pas non plus de délivrer l'histone dans le cytosol, indiguant qu'un colipide facilitant l'échappement endosomal n'est pas suffisant et que la présence du lipide cationique est indispensable. Des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer la voie d'entrée précise de l'histone dans la cellule et le mode d'action des lipides cationiques dans ce cas particulier, pour permettre le design rationnel de vecteurs destinés aux protéines cationiques, à destinée nucléaire notamment.

### E. Signification du rapport molaire lipide cationique/protéine

Nous avons observé au cours de cette étude que le rapport molaire lipide cationique/protéine optimal pour internaliser différents types de protéines au sein de cellules en culture est constamment voisin de 1500. Dans le cas de la délivrance d'acides nucléiques, on définit un rapport de charge optimal, ou rapport N/P, généralement positif et permettant la formation de complexes de la zone C de stabilité colloïdale positivement chargés (Barteau et al., 2008). Ce rapport optimal est constant pour un vecteur donné, de façon relativement indépendante de la taille de l'acide nucléique à vectoriser (Kreiss et al., 1999). Nous avons cherché si le rapport molaire optimal observé dans nos expériences correspond à un rapport de charge constant. La Figure 62 montre qu'il n'en est rien, les rapports de charge calculés pour les complexes BGTC:DOPE/protéine allant de 19,5 pour la  $\beta$ -gal à 769 pour la caspase 3. L'équipe de J.P. Behr a montré que dans le cas de complexes DOGS/protéine, le rapport molaire optimal observé (qui s'étend de 500 à 1400 suivant la protéine, contrairement à nos observations où il est relativement constant) correspond à un nombre optimal de molécules de DOGS par unité de surface de protéine voisin de 5 DOGS / nm<sup>2</sup> (Dalkara et al., 2004). La Figure 62 indique que dans le cas du BGTC, ce rapport de surface n'est pas constant. De plus, ce rapport de surface paraît peu pertinent, tout au moins dans le cas du BGTC et de la DOSP, puisque les observations en cryo-TEM montrent que les lipides cationiques ne sont pas simplement adsorbés à la surface de protéines isolées mais que leur interaction est complexe, impliquant la formation d'objets supramoléculaires composés à la fois d'agrégats de protéines et de membranes lipidiques libres.

Pour des rapports molaires supérieurs à 1500, la toxicité induite par les lipides cationiques entraîne la mort des cellules ayant internalisé le plus de complexes, entraînant une baisse du taux d'internalisation mesuré. Pour des rapports inférieurs, la cryo-TEM montre que les complexes sont couverts d'une couche de protéines susceptible d'empêcher leur interaction avec les membranes endosomales et donc leur rupture, entraînant la dégradation de la protéine cargo par les lysosomes et par conséquent une baisse du taux d'internalisation mesuré. Il semble donc que ce rapport molaire optimal correspondre à un juste milieu entre deux situations défavorables, l'une par un faible accès au cytosol et l'autre par une trop forte toxicité.

	MW (kDa)	Surface (nm²) <sup>1</sup>	Charge <sup>2</sup>	RM optimal	Ratio de charge	Ratio de surface (BGTC/nm <sup>2</sup> )
β-galactosidase	475	353	- 154	1500	19.5	4.2
Anticorps anti K8	150	164	- 7	1500	428	9.1
Caspase 3	29	54	- 3.9	1500	769	27.7
Histone H1	25	50	+ 52.9	1500	N.D.	N.D.

Figure 62 – Relation entre le rapport optimal BGTC/protéine et les propriétes des protéines

<sup>1</sup> Considérant que la surface de la protéine est proportionnelle à (MW)<sup>2/3</sup>
<sup>2</sup> Charge à pH 7.4 calculatée avec Protein Calculator v3.3 (<u>http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html</u>)

#### F. Restauration de CFTR ΔF508 par vectorisation d'anticorps anti kératine 8

La protéine CFTR est un canal à anions dépendant à l'AMP cyclique (AMPc) exprimé dans de nombreux épithéliums polarisés. Il participe au maintien de l'équilibre hydrique du mucus, notamment au niveau respiratoire et digestif, en permettant l'efflux d'ions chlorure (Lubamba et al., 2012). Plus de 1500 mutations ont été décrites dans le gène qui l'encode, responsables de la mucoviscidose. Dans 70 % des cas, il s'agit de la perte d'un triplet qui entraîne une délétion de la phénylalanine en position 508 ( $\Delta$ F508) (Vankeerberghen et al., 2002). Cette mutation entraîne un défaut de maturation et de glycosylation du canal, qui est retenu dans le réticulum endoplasmique et est rapidement dégradé au lieu d'être adressé vers la membrane plasmique, d'où un flux réduit de chlorure et un épaississement du mucus (Welsh and Smith, 1993). Cependant, ce canal est partiellement fonctionnel lorsqu'il atteint la membrane (Dalemans et al., 1991), autorisant une restauration au moins partielle du phénotype des cellules mutées lorsque son trafic est rétabli.

Il a été montré que la mutation  $\Delta$ F508 entraîne une augmentation de l'expression des cytokératines 8 et 18 (K8 et K18), qui sont colocalisées avec le canal muté au niveau du réticulum endoplasmique (Davezac et al., 2004). Plus précisément, il existe une interaction directe de K8 avec CFTR, responsable de sa rétention dans le réticulum, et l'inhibition de l'expression de K8 par interférence ARN permet de restaurer le trafic de CFTR (Colas et al., 2012). Cette interaction ayant lieu entre le premier domaine de liaison aux nucléotides NBD1 de CFTR et la partie N-terminale de K8, nous avons émis l'hypothèse que la délivrance d'un anticorps anti K8 spécifique du domaine N-terminal dans des cellules porteuses de la mutation  $\Delta$ F508 pourrait bloquer l'interaction et permettre la restauration du trafic de CFTR vers la membrane plasmique.

Pour évaluer l'impact fonctionnel de la délivrance de cet anticorps, nous avons dans un premier temps cherché à mesurer une restauration de la conductance membranaire AMPcdépendante associée à CFTR par la technique du patch-clamp. Malheureusement, nous avons rapidement observé que les complexes adsorbés à la surface des cellules interdisent le contact étroit entre l'électrode de mesure et la membrane plasmique (*seal*) nécessaire à l'enregistrement du courant CFTR. Des expériences de mise au point sont en cours pour éviter la présence de lipides cationiques à la surface des cellules après le traitement.

Nous avons donc mesuré les flux transmembranaires d'iode dans les cellules traitées par vidéomicroscopie. Cette technique est basée sur des sondes dérivées du 6-méthoxyquinolinium, qui présentent une fluorescence bleue sous excitation UV. Cette fluorescence est éteinte (*quenching*) en présence d'ions halogénures par un processus collisionnel de désactivation intermoléculaire, permettant une mesure semi-quantitative de la

concentration d'halogénures dans l'environnement de la sonde (Mansoura et al., 1999). Les principales faiblesses de ces sondes sont : i) leur faible intensité d'émission, qui est partiellement masquée par l'autofluorescence des cellules sous excitation UV, ii) leur sensibilité au photoblanchiment et iii) l'absence de décalage spectral de leur fluorescence en présence d'halogénures, qui interdit une mesure ratiométrique donnant accès à la concentration absolue de l'halogénure puisque la fluorescence dans ce cas est à la fois proportionnelle à la concentration de l'halogénure et à celle de la sonde. Néanmoins, la vidéomicroscopie permet, en suivant la fluorescence de ces sondes dans le temps, d'étudier des flux transmembranaires d'halogénures en fonction de divers stimuli, et donc sont un outil de choix pour l'étude de la fonction de CFTR. Ces sondes étant des composés peu perméants, ils sont généralement chargés dans les cellules par une incubation prolongée (>12h), incompatible avec notre protocole de délivrance intracellulaire de protéines, ou par un choc hypotonique rapide mais susceptible de générer un stress mécanique peu souhaitable ici puisque notre étude porte sur un élément du cytosquelette. Une de ces sondes, le MEQ, présente la particularité de pouvoir être facilement réduite en dihydro-MEQ. Ce composé perméant est rapidement oxydé dans le cytosol pour redonner du MEQ imperméant qui s'accumule rapidement (2-3 min) dans la cellule sans générer de stress important. Nous avons donc choisi dans un premier temps d'utiliser le MEQ pour notre étude, malgré ses caractéristiques spectrales inférieures à celles des autres sondes de la même famille. Nos premières observations ont toutefois montré que le dihydro-MEQ a une forte affinité pour les complexes déposés sur et autour des cellules, les rendant fluorescents et entraînant une diminution inacceptable du rapport signal/bruit. Nous avons donc décidé dans un second temps de charger le MEQ dans les cellules par choc hypotonique, en adaptant le protocole de base pour occasionner le moins de stress possible aux cellules. L'absorption de cette forme de la sonde par les complexes étant moindre, nous avons pu accéder à la mesure de la fluorescence intracytoplasmique du MEQ.

Pour la mesure elle-même, les cellules sont placées, après chargement de la sonde, dans une chambre à perfusion installée sous l'objectif du microscope. Initialement à l'équilibre dans un milieu riche en iode où la fluorescence du MEQ est minimale, les cellules sont perfusées par une solution riche en ions nitrate, lesquels peuvent passer par CFTR mais n'éteignent pas la fluorescence de la sonde. La présence de canaux CFTR fonctionnels à la membrane se traduit donc par une augmentation de la fluorescence de la sonde consécutive à l'échange iode/nitrate du milieu intracellulaire lorsque les cellules sont stimulées par l'AMPc.

175



**Figure 63** – **Mesure de flux d'iode dans des cellules traitées par l'anticorps.** (A) Enregistrement de la fluorescence du MEQ en fonction de divreses stimulations. Les cellules HeLa-CFTR-WT (triangles, ligne pleine) ou HeLa-CFTR-  $\Delta$ F508 (ronds, ligne pleine) ont reçu 1,5 µg d'anticorps anti-K8 N-term spécifique complexé à la DOSP:MM27 au rapport molaire de 1000. Comme contrôles, les cellules HeLa-CFTR-  $\Delta$ F508 ont été enregistrées sans traitement (ronds, ligne pointillée) ou après avoir reçu 1,5µg d'anticorps anti-K8 C-term spécifique complexé à al DOSP:MM27 au rapport molaire de 1000. (B) Vitesse de quenching du MEQ après stimulation des cellules par l'AMPc (unités arbitraires).

La Figure 63 A montre que les cellules HeLa exprimant la forme sauvage de CFTR présentent une augmentation rapide et importante de la fluorescence du MEQ après stimulation des cellules par l'AMPc, suivie d'une diminution rapide de la fluorescence après échange d'une solution de nitrate par une solution d'iodure comme indiqué par la Figure 63

B. En revanche, les cellules HeLa exprimant la forme mutée du canal ont une augmentation de la fluorescence lente et de faible amplitude après stimulation à l'AMPc, indiquant une absence de CFTR fonctionnel à la membrane plasmique et un échange d'anions via des conductances AMPc-indépendantes. La délivrance de l'anticorps anti-K8 N-term spécifique permet la restauration partielle d'un flux d'iode AMPc dépendant dans des cellules HeLa exprimant CFTR- ΔF508, indiquant la présence de CFTR sous forme fonctionnelle à la membrane plasmique des cellules. La Figure 63 B indique que la vitesse de quenching du MEQ dans ces conditions est égale à 50% de la valeur enregistrée sur les cellules HeLa-CFTR-WT. Au contraire, la délivrance d'un anticorps anti-K8 C-term spécifique dans ces cellules conduit à un courant identique à celui mesuré sur les cellules HeLa-CFR- ΔF508 non traitées, qui bien que d'amplitude plus importante est indépendant de la stimulation à l'AMPc et dont la vitesse de quenching n'est pas modifiée.

Ces résultats préliminaires sont encourageants mais restent à confirmer par d'autres techniques pour s'assurer de la restauration de CFTR sous sa forme active à la surface des cellules traitées. Il est notamment possible de s'assurer de la localisation de CFTR par la technique du western-blot sur extrait membranaire : la protéine immature apparaît sous la forme d'une bande B alors que la forme mature, correctement glycosylée apparaît sous la forme d'une bande C plus lourde (Colas et al., 2012). D'autres tests fonctionnels sont également envisageables afin de s'assurer de la restauration d'un courant anionique dépendant à l'AMPc. Le patch-clamp s'avérant difficile à mettre en œuvre sur les cellules traitées par les complexes lipide cationique/anticorps, la méthode de mesure de courants de court-circuit sur des épithéliums in vitro permettrait d'analyser les propriétés électriques des cellules ciblées par ce système de délivrance car elle ne nécessite pas de contact direct avec les membranes. L'équipe de M. Chanson a mis au point un modèle d'épithélium respiratoire reconstitué in vitro à partir de cellules primaires de patients atteints de la mucoviscidose (Wiszniewski et al., 2006). Cette technique permettrait de tester la capacité de la délivrance intracellulaire de l'anticorps anti-K8 à restaurer l'activité de CFTR dans des conditions plus physiologiques que sur des cellules HeLa exprimant CFTR à partir d'un transgène. La délivrance de l'anticorps doit également être évaluée in situ dans les voies aériennes chez la souris. L'équipe de A. Edelman a montré que le transfert d'un siRNA anti-K8 dans l'épithélium nasal de souris porteuses de la mutation ΔF508 par la Lipofectamine a permis la restauration partielle de la différence de potentiel nasal caractéristique chez ces souris (Colas et al., 2012). L'efficacité d'un agent transfectant lipidique dans cette approche laisse envisager la possibilité de l'appliquer à la délivrance intraépithéliale d'un anticorps anti-K8.

# **Discussion et perspectives**

# **Discussion et perspectives**

Les résultats obtenus tout au long des différents projets de recherche qui composent ce travail de thèse illustrent divers aspects de la délivrance intracellulaire de macromolécules biologiques par des vecteurs synthétiques. Ces vecteurs présentent l'avantage sur les vecteurs viraux d'être faciles à produire, peu immunogènes et bien caractérisés tout en étant d'une utilisation plus sûre. Leur efficacité est cependant moindre, notamment dans le cadre du transfert de gènes in vivo.

Nous avons axé nos travaux sur deux grands types de vecteurs synthétiques : les copolymères à blocs amphiphiles non ioniques d'une part, les lipides cationiques d'autre part. Ces composés présentent des structures et des propriétés physico-chimiques radicalement différentes qui sous-tendent des modes d'action et des domaines d'applications différents.

Les copolymères à blocs amphiphiles non ioniques constituent une nouvelle classe de vecteurs particulièrement efficaces pour le transfert d'ADN in vivo, cependant ils sont inactifs in vitro. Leur développement dans le champ de la médecine humaine est freiné par la mauvaise compréhension que nous avons de leur mode d'action. Une partie de nos travaux a contribué à éclaircir le mécanisme d'action de l'un d'entre eux, le Lutrol, en montrant qu'il facilite le passage des acides nucléiques à travers la membrane plasmique des cellules ciblées (Chevre et al., 2011). De nombreuses questions restent cependant en suspens, notamment le mécanisme fin de ce polymère au niveau de la membrane : s'agit-il d'une "simple" perturbation de la structure de la bicouche lipidique par les parties hydrophobes du polymère qui conduisent à la formation de pores ? Cette hypothèse est peu probable étant donné que le Lutrol est capable in vitro d'augmenter l'internalisation de lipoplexes lipide cationique/ADN. Une action biologique au niveau membranaire ou sous membranaire semble envisageable. L'action de ce polymère sur le cytosquelette doit notamment être étudiée : le rôle du cytosquelette, notamment de l'actine, est primordial dans les mouvements transmembranaires. Ainsi, l'équipe de M.P. Rols a souligné l'implication de l'actine dans le transfert de gène par électroporation dans des cellules CHO, l'ADN ne rentrant pas dans les cellules par simple diffusion électrophorétique à travers les pores membranaires créés par le choc électrique mais conjointement à une action du cytosquelette sous-membranaire (Rosazza et al., 2011). Une étude a montré la capacité du F68 à protéger des cellules en culture suite à un choc thermique. Au cours de ce traitement, on observe une puissante action du polymère sur le cytosquelette puisque si celui-ci est désorganisé dans les cellules ne recevant pas de traitement après un choc thermique, il conserve en revanche un aspect normal lorsque les cellules sont exposées au F68 (Merchant et al., 1998). Des études sont nécessaires pour opréciser l'action du F68 sur les mouvements de la membrane et du cytosquelette de cellules traitées. L'utilisation de cellules modifiées exprimant des protéines fluorescentes, similaires à celles utilisées dans un travail collaboratif à laquelle notre équipe a participé sur les voies d'entrée dans la cellule de lipoplexes marqués, serait d'une aide précieuse pour ce genre d'étude (Billiet et al., 2012).

Malgré leur mode d'action mal connu, les copolymères à blocs ont déjà fait preuve d'une efficacité considérable pour le transfert de gènes in vivo (Pitard et al., 2004; Desigaux et al., 2005; Richard et al., 2005a; Richard et al., 2005b; Bello-Roufai et al., 2007) et notamment dans des protocoles de vaccination à ADN où ils ont permis de réduire de façon importante la dose d'ADN nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace (McIlroy et al., 2009; Cany et al., 2011). Les récepteurs intracellulaires de l'ADN sont les déclencheurs de cette réponse, par leur capacité à reconnaître les plasmides délivrés au moyen de vecteurs synthétiques comme des pathogènes intracellulaires. Cependant, cette réponse peut être encore exacerbée par l'utilisation d'adjuvants capables de lier et d'activer fortement ces récepteurs. Des travaux ont ainsi fait état de l'utilisation d'adjuvants, notamment des ligands des TLR, comme immunomodulateurs afin d'exacerber la réponse immunitaire induite par l'ADN dans des essais cliniques de vaccination contre l'hépatite B, la grippe ou l'anthrax (Desmet and Ishii, 2012). La connaissance du mode d'action précis du polymère 704 utilisé par notre équipe dans les protocoles de vaccination à ADN permettrait un ciblage plus efficace des sensors cytosoliques de l'ADN pour augmenter la réaction immunitaire contre un antigène : en fonction de son entrée dans la cellule par endocytose ou par délivrance directe dans le cytosol, différents agonistes doivent être utilisés pour cibler les sensors concernés.

A contrario, la connaissance du mécanisme de délivrance des copolymères à blocs permettrait d'inhiber les sensors susceptibles de rencontrer et détecter l'ADN exogène introduit à des fins de **thérapie de remplacement génique**. L'utilisation de plasmides ne contenant pas de motifs CpG a été rapportée et conduit à une expression du transgène soutenue lorsque ces plasmides sont délivrés in vivo par des vecteurs cationiques : étant incapables d'activer TLR9, leur passage dans les endosomes des cellules ciblées n'est pas détecté (Pringle et al., 2012; Davies et al., 2012a). Toutefois, l'utilisation de vecteurs non ioniques comme le Lutrol étant indépendante des voies d'endocytose, l'utilisation de plasmides CpG-free ne permettrait probablement pas d'obtenir une expression aussi soutenue étant donné que l'ADN serait détecté par des sensors cytosoliques indépendamment de la présence de CpG dans sa séquence. Il a récemment été décrit un

181
inhibiteur de l'inflammasome AIM2 capable de bloquer la sécrétion d'interleukine et la pyroptose dans des cellules stimulées par un poly(dA:dT) (Coll and O'Neill, 2011). L'utilisation d'un tel composé conjointement à l'administration d'un plasmide permettrait de réduire l'inflammation induite et potentiellement d'obtenir une amélioration de l'expression du transgène. On peut espérer que la découverte ces dernières années de nombreux sensors intracellulaires des acides nucléiques, souvent redondants, stimulera la recherche de molécules capables de les inhiber afin d'administrer de l'ADN exogène de manière furtive et s'affranchir ainsi des réactions immunitaires dirigées contre le transgène, qui constituent aujourd'hui un obstacle majeur au développement de la thérapie de remplacement génique.

Les lipides cationiques constituent aujourd'hui la classe de vecteurs de référence pour la délivrance d'ADN ou d'ARN in vitro. Etudiés depuis vingt cing ans, leur profil d'efficacité et de toxicité n'a cessé d'être amélioré. Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides notamment, synthétisés par design rationnel en prenant en compte les propriétés des différentes parties les constituant, permettent d'obtenir de hauts niveaux de transfection avec une toxicité minimale. Cependant, leur faible efficacité in vivo limite leur utilisation chez l'animal. Les principales stratégies permettant leur utilisation in vivo consiste à les formuler avec des stabilisateurs stériques qui empêchent leur agrégation et permettent ainsi leur trafic dans les fluides biologiques vers les cellules à transfecter (Belmont et al., 2002; Sainlos et al., 2005; Mevel et al., 2012). Ces stabilisateurs stériques peuvent par ailleurs comporter des motifs de ciblage afin de diriger ces vecteurs vers un type cellulaire donné, comme cela a été montré dans une étude à laquelle a participé notre équipe sur la mise au point d'un système multimodulaire permettant la délivrance ciblée d'ADN vers les hépatocytes (Letrou-Bonneval et al., 2008). L'étude des propriétés physicochimiques des complexes que ces lipides forment avec les acides nucléigues, à laguelle notre équipe s'intéresse particulièrement, permet de définir les caractéristiques de vecteurs idéaux et doit permettre le design rationnel de nanovecteurs synthétiques efficaces in vivo comme in vitro.

Ces lipides cationiques, dont la principale utilisation est la délivrance d'acides nucléiques, émergent depuis quelques années comme des vecteurs efficaces pour la **délivrance intracellulaire de protéines**. Cette stratégie, qui permet de s'affranchir des effets indésirables de l'utilisation d'acides nucléiques, est en plein développement mais manque de vecteurs efficaces. Diverses stratégies ont été développées pour délivrer des protéines dans le cytosol de cellules vivantes. Les méthodes physiques comme la micro-injection ou l'électroporation ont des effets délétères sur les cellules et sont impossibles à mettre en œuvre à l'échelle d'un organe entier. Les méthodes basées sur les domaines de transduction

protéiques sont plus prometteuses mais requièrent leur fusion avec la protéine à vectoriser, ce qui peut perturber sa structure et lui faire perdre son activité. De plus, ces séquences peptidiques dérivées de protéines animales (Antennapedia) ou de virus (TatP, VP22) sont susceptibles d'être reconnues par le système immunitaire et donc de déclencher des réactions immunitaires suite à leur administration in vivo. Leur mode d'action est encore mal compris, bien que le rôle du cytosquelette et de la macropinocytose ait été mis en évidence pour certains peptides (Imamura et al., 2011; Suzuki, 2012) mais leur mécanisme semble très dépendant du peptide et de la protéine cargo qui lui est rattachée, ainsi qu'au type cellulaire ciblé (van den Berg and Dowdy, 2011).

Les lipides cationiques, eux, sont utilisés depuis plus de vingt ans pour la délivrance d'acides nucléiques et leur mode d'action, même si des zones d'ombre subsistent, a été particulièrement étudié et repose sur la formation d'un complexe avec l'acide nucléique à vectoriser. Ces systèmes présentent l'avantage sur les domaines de transduction protéigue de pouvoir délivrer la protéine sous sa forme native sans requérir sa modification pour la fusionner à un peptide, une étape susceptible de modifier sa conformation. De plus, les lipides cationiques sont peu immunogènes contrairement aux domaines de transduction protéique, et l'encapsulation de la protéine cargo dans des lipoplexes est susceptible de limiter sa reconnaissance par le système immunitaire et donc d'empêcher la mise en place d'une réponse dirigée contre la protéine. Les complexes lipide cationique/protéine sont internalisés par les cellules ciblées via différentes voies d'endocytose, et se retrouvent dans les endosomes. Une étape cruciale du transfert de gènes par les lipides cationiques est l'échappement endosomal, qui permet à la molécule cargo d'accéder au cytosol avant sa dégradation dans les lysosomes. Cette étape est favorisée par l'incorporation dans la formulation du vecteur de composés capables de déstabiliser la membrane endosomale par leurs propriétés fusogéniques ou par un mécanisme d'éponge à protons. L'utilisation de lipides cationiques pour la délivrance de protéines dans des cellules en culture a émergé parallèlement à leur utilisation pour le transfert d'acides nucléiques et a permis la délivrance de nombreux types de protéines dans des cellules vivantes ; protéines rapportrices et anticorps (Zelphati et al., 2001; Dalkara et al., 2006; Weill et al., 2008a; Weill et al., 2008b) ainsi que des protéines fonctionnelles comme des caspases (Zelphati et al., 2001), la protéine cytotoxique saporine (Fretz et al., 2007), la méthyltransférase Mssl (van der Gun et al., 2007), le core antimicrobien de la lactoferricine (Richardson et al., 2009) ou le cytochrome C (Kim et al., 2012). La délivrance de protéines par ces vecteurs suit probablement les mêmes modalités que pour la délivrance d'acides nucléiques, cependant leur mode d'action précis qui a été largement extrapolé à partir des données obtenues sur le transfert d'acides nucléiques, reste à préciser, et les propriétés physicochimiques des

complexes lipide cationique / protéine doivent également être définies afin de les relier à l'efficacité de ces systèmes et permettre le développement rationnel de vecteurs dédiés aux protéines.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence la capacité de certains lipides cationiques, notamment le BGTC et la DOSP, à délivrer dans des cellules HeLa en culture une protéine modèle, la β-galactosidase, lorsqu'ils sont utilisés sous forme de micelles, avec toutefois une efficacité limitée. Ces deux composés sont efficaces pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques tout en étant relativement peu toxiques (Vigneron et al., 1996; Mevel et al., 2012). Le faible taux de délivrance de la protéine suggérant un faible échappement endosomal, et donc une dégradation de la  $\beta$ -gal internalisée par les lysosomes, nous avons formulé ces lipides cationiques au colipide DOPE et avons observé une augmentation importante du taux d'internalisation. La DOPE est couramment utilisée dans les formulations destinées à la délivrance d'acides nucléique afin de promouvoir l'échappement endosomal des lipoplexes (Zuhorn and Hoekstra, 2002; Barteau et al., 2008) et a également été utilisée avec succès dans des formulations pour la délivrance de protéines (Zelphati et al., 2001; Dalkara et al., 2006; van der Gun et al., 2007; Richardson et al., 2009; Kim et al., 2012). Ce résultat souligne que l'importance de l'échappement endosomal observée dans le transfert d'acides nucléiques s'applique également à la délivrance intracellulaire de protéines. D'autres stratégies pour promouvoir cette étape ont été développées, par exemple l'utilisation d'un agent photosensibilisant permettant la rupture de la membrane endosomale par production d'espèces réactives de l'oxygène lorsque les cellules sont éclairées (Fretz et al., 2007), mais cette stratégie est plus complexe à mettre en œuvre que le simple ajout d'une molécule aux liposomes, entraîne une cytotoxicité importante et paraît difficile à mettre en œuvre in vivo.

Nous avons déterminé les paramètres optimaux de formulation des complexes lipide cationique / protéine et avons mis en évidence l'importance de deux facteurs. Le premier est le **rapport molaire** lipide cationique / protéine, les complexes les plus efficaces étant formulée à des rapports molaires voisins de 1000-1500. Un tel ratio lipide / cargo est d'une importance capitale dans le transfert d'acides nucléiques, où il définit un rapport de charge et permet l'assemblage de complexes positivement chargés et colloïdalement stables (Barteau et al., 2008). Cependant nous n'avons pas observé de corrélation entre le rapport molaire optimal que nous observons et un rapport de charge constant. L'équipe de J.P. Behr a proposé la définition d'un rapport optimal de surface pour la délivrance de protéines anioniques par la DOGS (Dalkara et al., 2004), cependant il apparaît que ce rapport de surface n'est pas applicable aux lipides que nous avons utilisé dans cette étude. L'étude de la structure des complexes par cryo-TEM nous amène à penser que le rapport molaire

optimal que nous observons correspond à un juste milieu entre des complexes formulés à bas rapport molaire, recouverts d'une couche de protéines et donc incapables d'interagir avec la membrane endosomale et de la rompre, et des complexes formulés à haut rapport molaire qui, en entraînant la mort des cellules traitées du fait d'une importante cytotoxicité, provoquent une baisse du taux d'internalisation mesuré. Le second facteur ayant une influence importante sur le taux d'internalisation est le milieu de formulation des complexes lipide cationique / protéine. Il apparaît que des complexes formulés dans un milieu isotonique contenant uniquement des ions monovalents conduit à l'incorporation efficace de la protéine dans des complexes de petite taille, mais que ceux-ci sont peu efficaces pour la délivrer dans des cellules en culture. A contrario, la formulation de ces complexes dans un milieu de culture riche en solutés et en ions divalents conduit à une incorporation limitée de la protéine, mais les complexes résultants s'avèrent toutefois nettement plus efficaces pour la délivrer. Cette différence peut s'expliquer par la taille importante des complexes formulés dans le milieu de culture par rapport à ceux formulés dans un milieu simple. Cette influence de la taille a déjà été mise en évidence pour des lipoplexes lipide cationique / acide nucléique (Ross and Hui, 1999) : des complexes de grande taille sont plus aptes à sédimenter sur les cellules en culture et à être endocytée.

Nous avons vérifié que nos formulations sont capables de délivrer la β-gal dans d'autres lignées cellulaires que les HeLa et avons observé un taux relativement constant de 10-20 % d'internalisation sur des lignées humaines et animales. Ceci contraste avec la transfection d'un plasmide dans ces mêmes lignées, dont le taux d'expression peut varier de plusieurs ordres de grandeur. Il a été observé précédemment, lors de la transfection de différentes lignées cellulaires, que le taux d'internalisation des plasmides est sensiblement identique et que les variations d'expression de ces plasmides sont imputables à des efficacités variables d'importation nucléaire des plasmides par les différents types cellulaires traités (James and Giorgio, 2000). Cela suggère que le transfert de protéines et de plasmides jusqu'au cytosol suit les mêmes voies, et que l'efficacité de ces voies est sensiblement identique entre différentes lignées cellulaires. Il convient donc de vérifier sur des lignées cellulaires réputées particulièrement difficiles à transfecter, comme des cellules immunitaires cultivées en suspension du type Jurkat, si un taux important d'internalisation de protéines est observé, ce qui indiquerait que les difficultés à transfecter ces cellules par des plasmides seraient essentiellement dues à des évènements en aval de l'échappement endosomal.

Nous avons ensuite vérifié la capacité de notre système de délivrance à vectoriser d'autres protéines que la β-gal, notamment des anticorps capables de reconnaître leur cible intracellulaire. La délivrance d'un anticorps anti-β-tubuline par le BGTC et la DOSP, formulés ou non à la DOPE, s'est avérée inefficace, la protéine cargo se retrouvant dans les

endosomes sans accéder au cytosol. Ce résultat indique que si les vecteurs synthétiques sont capables de délivrer des acides nucléiques, qui partagent une structure universelle et des propriétés physicochimiques communes, indépendamment de leur séquence, ils ne peuvent pas délivrer tout type de protéine car ces molécules présentent une grande variété de structures et de propriétés. Ce manque d'échappement endosomal lors de la délivrance d'un anticorps a déjà été observé dans des études précédentes. Le dérivé cationique d'acides gras Saint-2 formulé à la DOPE s'est avéré capable de délivrer de la β-gal et une méthyltransférase dans le cytosol de cellules en culture sous forme active, comme cela a été démontré par des tests sans ambigüité. En revanche, la délivrance d'anticorps par ce système a invariablement conduit à un marquage punctiforme dans le cytoplasme. Si les auteurs de cette étude ont considéré que leur système est efficace pour la délivrance d'anticorps, au vu du marquage obtenu il semble que l'anticorps soit contenu dans des endosomes et n'atteigne pas sa cible intracellulaire (van der Gun et al., 2007), indiguant qu'un vecteur efficace pour certaines protéines n'est pas nécessairement applicable à d'autres protéines. Faisant face à la même problématique, nous avons choisi de favoriser l'échappement endosomal en utilisant le MM27, un lipide neutre contenant un noyau imidazole. Ce composé s'est précédemment avéré 100 fois plus efficace que la DOPE pour faciliter la transfection d'ADN (Mevel et al., 2008; Billiet et al., 2012). Il a été suggéré que le groupement imidazole de ce composé se protone dans les endosomes en cours d'acidification, menant à la rupture de la membrane endosomale par un mécanisme d'éponge à protons (Midoux et al., 2009). Lorsque nous avons utilisé le BGTC et la DOSP formulés au MM27, nous avons observé une nette amélioration de l'échappement endosomal puisque la délivrance d'anticorps par ces vecteurs a conduit au marquage du cytosquelette après seulement 4 heures d'incubation des cellules avec les complexes, confirmant l'importance de l'échappement endosomal et donc de l'ajout dans les formulations de composés capables de promouvoir cette étape.

Nous avons ensuite étudié la structure des complexes formés par les lipides cationiques et les protéines. Si les liposomes de BGTC:DOPE sont des vésicules unilamellaires ou oligolamellaires de 120 nm de diamètre environ, leur mélange avec la  $\beta$ -gal au rapport molaire optimal de 1500 conduit à la formation de complexes agrégés, indiquant une forte interaction entre la protéine et le lipide cationique. Peu de réorganisations membranaires sont observables dans ces complexes, cependant nous avons observé la capacité de la  $\beta$ -gal à déformer les bicouches lipidiques, formant des jonctions protéiques formées d'une monocouche de  $\beta$ -gal enserrée entre deux membranes lipidiques. L'observation de complexes à des rapports molaires inférieurs à 1500 montre que les complexes résultants sont couverts d'une couche de protéines qui limite leur agrégation. Cette observation

suggère que ces complexes formés à bas rapport molaire sont incapables d'interagir avec la membrane endosomale, préalable nécessaire au mélange des lipides du complexe avec les phospholipides anioniques de la membrane endosomale, et permet d'expliquer au moins en partie leur inefficacité à délivrer la β-gal dans le cytosol des cellules traitées. L'observation de complexes formés par la DOSP:DOPE avec un anticorps anti-K8 nous a amenés aux mêmes conclusions. Par contre, l'observation de complexes formés avec cet anticorps anti-K8 et la DOSP:MM27 a montré l'apparition de structures multilamellaires concentriques absentes de la suspension de lipide seule. De telles structures sont couramment observées dans les lipoplexes lipide cationique/acide nucléique (Pitard et al., 1999) mais sont formées de couches lipidiques enserrant des brins d'ADN, alors que dans le cas de complexes DOSP:MM27 / anticorps ces complexes apparaissent vides. Il nous est apparu que la formation de telles structures n'est pas due à l'anticorps mais aux ions phosphate présents dans sa formulation commerciale. Cependant, de telles structures pourraient avoir un effet bénéfique sur la délivrance de l'anticorps puisque la grande quantité de MM27 qu'elles contiennent procure à ces objets un pouvoir tampon important susceptible de favoriser l'échappement endosomal de l'anticorps. Il est maintenant nécessaire d'évaluer la capacité de complexes DOSP:MM27/anticorps anti-K8 à sortir des endosomes lorsqu'ils sont formulés en l'absence de phosphates.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la capacité de quelques lipides cationiques à délivrer des protéines aux fonctions et aux structures variées dans des cellules en culture. Cependant, de nombreux points sont encore à préciser concernant les propriétés physicochimiques des complexes qu'ils forment avec les protéines et leur mode d'action précis. Si les mesures de taille et l'observation de ces complexes en microscopie électronique suggère un mode d'assemblage et un mécanisme d'action proches de ceux mis en œuvre avec les lipides cationiques, de nombreuses inconnues demeurent. L'utilisation de lignées cellulaires exprimant des protéines fluorescentes au niveau des organelles mis en jeu dans les processus d'endocytose permettrait de préciser leurs modalités d'internalisation et les mécanismes de l'échappement endosomal, à l'instar de ce qui a déjà été effectué dans le domaine de la délivrance d'acides nucléiques (Billiet et al., 2012). Le mécanisme d'échappement endosomal des complexes contenant du MM27 pourrait également être appréhendé par l'observation en microscopie électronique de ces complexes à différentes conditions de pH. La microscopie électronique a également été utilisée avec succès dans l'étude du trafic intracellulaire de lipoplexes de DOSP:DOPE et de BGTC:DOPE (Le Bihan et al., 2011) et pourrait être mise à profit pour l'étude du mécanisme d'action des vecteurs pour la délivrance intracellulaire de protéines à l'échelle nanométrique. Enfin, une zone d'ombre majeure subsiste concernant ces systèmes de délivrance puisqu'ils se sont avérés capables

de délivrer dans des cellules en culture une protéine chargée positivement, l'histone H1, alors que les études physicochimiques ont montré qu'ils sont incapables de former un complexe avec elle. Cette absence de formation d'un complexe, qui est pourtant à la base de la délivrance de macromolécules anioniques par les lipides cationiques, suggère un mécanisme d'action radicalement différent de celui observé pour les acides nucléiques et nécessite des investigations plus poussées car la délivrance de ce type de protéines peut s'avérer d'un grand intérêt, notamment dans le domaine de la reprogrammation des cellules iPSc par vectorisation de facteurs de transcription qui sont des protéines majoritairement cationiques (Kim et al., 2009). Enfin, la capacité de ces systèmes à délivrer des protéines in vivo doit être évaluée. On peut notamment envisager leur formulation à des lipides pégylés, qui a permis la transfection de voies aériennes de souris par les dérivés lipidiques d'aminoglycosides notamment (Mevel et al., 2012), ou à des copolymères à blocs amphiphiles non ioniques pour former des systèmes multimodulaires stables dans les fluides biologiques et capables de les délivrer de façon ciblée, une stratégie déjà employée avec succès pour la délivrance ciblée de gènes dans les hépatocytes (Letrou-Bonneval et al., 2008).

Malgré ces lacunes dans la compréhension de leur mode d'action, ces vecteurs nous ont permis de délivrer dans des cellules porteuses de la mutation  $\Delta$ F508 un anticorps ciblant la kératine 8, une cible potentielle pour restaurer le trafic du canal CFTR muté. Si les résultats encourageants que nous avons obtenus restent à confirmer, cette approche originale pourrait déboucher à terme sur la mise au point d'outils pour l'étude de cette pathologie et, à plus long terme, d'une approche thérapeutique basée sur cette technique. De nombreuses améliorations sont cependant nécessaires avant d'envisager une utilisation efficace de ce système. La mise au point d'anticorps bloquants à haute affinité pour la kératine 8 pourrait permettre d'améliorer l'efficacité du système, ainsi que la mise au point d'anticorps monochaîne dirigés contre cette protéine. Si nos observations sont confirmées, la mise au point de peptides bloquant l'interaction K8 / CFTR  $\Delta$ F508 résistants à la protéolyse pourrait être envisagée pour augmenter le temps de résidence de la protéine exogène dans les cellules traitées, qui est pour le moment limitée à quelques jours.

Ces différents projets de recherche illustrent l'utilisation de macromolécules biologiques et leur utilisation potentielle en biothérapies. Cette approche de la médecine basée sur des produits issus du vivant et capables d'exercer leur action de façon très ciblée, contrairement aux molécules issues de la synthèse chimique qui peuvent présenter des spectres d'action larges, est en pleine expansion et va probablement prendre de plus en plus d'importance dans l'approche des pathologies humaines ces prochaines années. Si de nombreux essais de thérapie de remplacement génique ont déjà eu lieu ou sont en cours, les approches de

vaccination à ADN chez l'Homme sont actuellement à un stade moins avancé mais les possibilités offertes par l'immunothérapie dans le traitement de maladies infectieuses ou de cancers amènent ce champ de recherches à prendre de plus en plus d'importance. Quand à la vectorisation intracellulaire de protéines, si elle est encore cantonnée à la paillasse et, pour certaines techniques plus abouties, en phase de tests sur des modèles animaux, il est possible qu'elle devienne une stratégie courante de la médecine de demain à condition de mettre au point des vecteurs aussi efficaces pour les protéines que pour les acides nucléiques.

# **Références bibliographiques**

# **Références bibliographiques**

Almofti, M.R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Baba, Y., and Kiwada, H. (2003a). Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. Arch. Biochem. Biophys. *410*, 246-253.

Almofti,M.R., Harashima,H., Shinohara,Y., Almofti,A., Li,W., and Kiwada,H. (2003b). Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum. Mol. Membr. Biol. *20*, 35-43.

An,Z. (2010). Monoclonal antibodies - a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. Protein Cell *1*, 319-330.

Aoki,T., Hagiwara,H., Matsuzaki,T., Suzuki,T., and Takata,K. (2007). Internalization of caveolae and their relationship with endosomes in cultured human and mouse endothelial cells. Anat. Sci. Int. *8*2, 82-97.

Arruda, V.R., Favaro, P., and Finn, J.D. (2009). Strategies to modulate immune responses: a new frontier for gene therapy. Mol. Ther. *17*, 1492-1503.

Astafieva,I., Maksimova,I., Lukanidin,E., Alakhov,V., and Kabanov,A. (1996). Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer. FEBS Lett. *389*, 278-280.

Avery,O.T., Macleod,C.M., and McCarty,M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med. *79*, 137-158.

Aviezer, D., Brill-Almon, E., Shaaltiel, Y., Hashmueli, S., Bartfeld, D., Mizrachi, S., Liberman, Y., Freeman, A., Zimran, A., and Galun, E. (2009). A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation. PLoS. One. *4*, e4792.

Bange, J., Zwick, E., and Ullrich, A. (2001). Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. Nat. Med. *7*, 548-552.

Banks,W.A., Gertler,A., Solomon,G., Niv-Spector,L., Shpilman,M., Yi,X., Batrakova,E., Vinogradov,S., and Kabanov,A.V. (2011). Principles of strategic drug delivery to the brain (SDDB): development of anorectic and orexigenic analogs of leptin. Physiol Behav. *105*, 145-149.

Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Can. Med. Assoc 141-146.

Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. *202*, 1131-1139.

Barteau,B., Chevre,R., Letrou-Bonneval,E., Labas,R., Lambert,O., and Pitard,B. (2008). Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. Curr. Gene Ther. *8*, 313-323.

Batrakova, E.V. and Kabanov, A.V. (2008). Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. J. Control Release *130*, 98-106.

Behr, J.P., Demeneix, B., Loeffler, J.P., and Perez-Mutul, J. (1989). Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *86*, 6982-6986.

Beilvert, F., Tissot, A., Langelot, M., Mevel, M., Chatin, B., Lair, D., Magnan, A., and Pitard, B. (2012). DNA/Amphiphilic Block Copolymer Nanospheres Reduce Asthmatic Response in a Mouse Model of Allergic Asthma. Hum. Gene Ther. *23*, 597-608.

Bell,P.C., Bergsma,M., Dolbnya,I.P., Bras,W., Stuart,M.C., Rowan,A.E., Feiters,M.C., and Engberts,J.B. (2003). Transfection mediated by gemini surfactants: engineered escape from the endosomal compartment. J. Am. Chem. Soc. *125*, 1551-1558.

Bello-Roufai, M., Lambert, O., and Pitard, B. (2007). Relationships between the physicochemical properties of an amphiphilic triblock copolymers/DNA complexes and their intramuscular transfection efficiency. Nucleic Acids Res. *35*, 728-739.

Belmont, P., Aissaoui, A., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Petit, L., Vigneron, J.P., Lehn, J.M., and Lehn, P. (2002). Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection in vitro and in vivo. J. Gene Med. *4*, 517-526.

Benn,S.C., Ay,I., Bastia,E., Chian,R.J., Celia,S.A., Pepinsky,R.B., Fishman,P.S., Brown,R.H., Jr., and Francis,J.W. (2005). Tetanus toxin fragment C fusion facilitates protein delivery to CNS neurons from cerebrospinal fluid in mice. J. Neurochem. *95*, 1118-1131.

Bertling,W.M., Gareis,M., Paspaleeva,V., Zimmer,A., Kreuter,J., Nurnberg,E., and Harrer,P. (1991). Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers. Biotechnol. Appl. Biochem. *13*, 390-405.

Billiet,L., Gomez,J.P., Berchel,M., Jaffres,P.A., Le Gall,T., Montier,T., Bertrand,E., Cheradame,H., Guegan,P., Mevel,M., Pitard,B., Benvegnu,T., Lehn,P., Pichon,C., and Midoux,P. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. Biomaterials *33*, 2980-2990.

Blizzard, R.M. (2012). History of growth hormone therapy. Indian J. Pediatr. 79, 87-91.

Bonifaci,N., Sitia,R., and Rubartelli,A. (1995). Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing HIV Tat requires unfolding. AIDS *9*, 995-1000.

Both,L., Banyard,A.C., van Dolleweerd,C., Horton,D.L., Ma,J.K., and Fooks,A.R. (2012). Passive immunity in the prevention of rabies. Lancet Infect. Dis. *12*, 397-407.

Bottega,R. and Epand,R.M. (1992). Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. Biochemistry *31*, 9025-9030.

Boussif,O., Lezoualc'h,F., Zanta,M.A., Mergny,M.D., Scherman,D., Demeneix,B., and Behr,J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *92*, 7297-7301.

Boutorin,A.S., Gus'kova,L.V., Ivanova,E.M., Kobetz,N.D., Zarytova,V.F., Ryte,A.S., Yurchenko,L.V., and Vlassov,V.V. (1989). Synthesis of alkylating oligonucleotide derivatives containing cholesterol or phenazinium residues at their 3'-terminus and their interaction with DNA within mammalian cells. FEBS Lett. *254*, 129-132.

Boyer, J.D., Cohen, A.D., Vogt, S., Schumann, K., Nath, B., Ahn, L., Lacy, K., Bagarazzi, M.L., Higgins, T.J., Baine, Y., Ciccarelli, R.B., Ginsberg, R.S., MacGregor, R.R., and Weiner, D.B. (2000). Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. J. Infect. Dis. *181*, 476-483.

Campbell, P.L., McCluskey, J., Yeo, J.P., and Toh, B.H. (1995). Electroporation of antibodies into mammalian cells. Methods Mol. Biol. *48*, 83-92.

Cany, J., Barteau, B., Tran, L., Gauttier, V., Archambeaud, I., Couty, J.P., Turlin, B., Pitard, B., Vassaux, G., Ferry, N., and Conchon, S. (2011). AFP-specific immunotherapy impairs growth of autochthonous hepatocellular carcinoma in mice. J. Hepatol. *54*, 115-121.

Carlisle,R.C., Bettinger,T., Ogris,M., Hale,S., Mautner,V., and Seymour,L.W. (2001). Adenovirus hexon protein enhances nuclear delivery and increases transgene expression of polyethylenimine/plasmid DNA vectors. Mol. Ther. *4*, 473-483.

Caron,N.J., Quenneville,S.P., and Tremblay,J.P. (2004). Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-fusion proteins. Biochem. Biophys. Res Commun. *319*, 12-20.

Cavazzana-Calvo,M., Hacein-Bey,S., de Saint,B.G., Gross,F., Yvon,E., Nusbaum,P., Selz,F., Hue,C., Certain,S., Casanova,J.L., Bousso,P., Deist,F.L., and Fischer,A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science *288*, 669-672.

Chauhan, A., Tikoo, A., Kapur, A.K., and Singh, M. (2007). The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. J. Control Release *117*, 148-162.

Chevre, R., Le, B.O., Beilvert, F., Chatin, B., Barteau, B., Mevel, M., Lambert, O., and Pitard, B. (2011). Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. Nucleic Acids Res. *39*, 1610-1622.

Choi, J.H., Jang, J.Y., Joung, Y.K., Kwon, M.H., and Park, K.D. (2010). Intracellular delivery and anti-cancer effect of self-assembled heparin-Pluronic nanogels with RNase A. J. Control Release *147*, 420-427.

Choi,S.O., Kim,Y.C., Lee,J.W., Park,J.H., Prausnitz,M.R., and Allen,M.G. (2012). Intracellular protein delivery and gene transfection by electroporation using a microneedle electrode array. Small *8*, 1081-1091.

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

Cohen,S., Coue,G., Beno,D., Korenstein,R., and Engbersen,J.F. (2012). Bioreducible poly(amidoamine)s as carriers for intracellular protein delivery to intestinal cells. Biomaterials *33*, 614-623.

Colas, J., Faure, G., Saussereau, E., Trudel, S., Rabeh, W.M., Bitam, S., Guerrera, I.C., Fritsch, J., Sermet-Gaudelus, I., Davezac, N., Brouillard, F., Lukacs, G.L., Herrmann, H.,

Ollero, M., and Edelman, A. (2012). Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect. Hum. Mol. Genet. *21*, 623-634.

Coll,R.C. and O'Neill,L.A. (2011). The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. PLoS. One. *6*, e29539.

Conner,S.D. and Schmid,S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. Nature 422, 37-44.

Courtete, J., Sibler, A.P., Zeder-Lutz, G., Dalkara, D., Oulad-Abdelghani, M., Zuber, G., and Weiss, E. (2007). Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA. Mol. Cancer Ther. *6*, 1728-1735.

Cullis, P.R. and Hope, M.J. (1978). Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion. Nature *271*, 672-674.

Dalemans,W., Barbry,P., Champigny,G., Jallat,S., Dott,K., Dreyer,D., Crystal,R.G., Pavirani,A., Lecocq,J.P., and Lazdunski,M. (1991). Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. Nature *354*, 526-528.

Dalkara, D., Chandrashekhar, C., and Zuber, G. (2006). Intracellular protein delivery with a dimerizable amphiphile for improved complex stability and prolonged protein release in the cytoplasm of adherent cell lines. J. Control Release *116*, 353-359.

Dalkara, D., Zuber, G., and Behr, J.P. (2004). Intracytoplasmic delivery of anionic proteins. Mol. Ther. *9*, 964-969.

Davezac,N., Tondelier,D., Lipecka,J., Fanen,P., Demaugre,F., Debski,J., Dadlez,M., Schrattenholz,A., Cahill,M.A., and Edelman,A. (2004). Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane. Proteomics. *4*, 3833-3844.

Davies,L.A., Hyde,S.C., Nunez-Alonso,G., Bazzani,R.P., Harding-Smith,R., Pringle,I.A., Lawton,A.E., Abdullah,S., Roberts,T.C., McCormick,D., Sumner-Jones,S.G., and Gill,D.R. (2012b). The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes. Biomaterials *33*, 5618-5627.

Davies,L.A., Hyde,S.C., Nunez-Alonso,G., Bazzani,R.P., Harding-Smith,R., Pringle,I.A., Lawton,A.E., Abdullah,S., Roberts,T.C., McCormick,D., Sumner-Jones,S.G., and Gill,D.R. (2012a). The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes. Biomaterials *33*, 5618-5627.

Dean, D.A., Dean, B.S., Muller, S., and Smith, L.C. (1999). Sequence requirements for plasmid nuclear import. Exp. Cell Res. *253*, 713-722.

Debs,R.J., Freedman,L.P., Edmunds,S., Gaensler,K.L., Duzgunes,N., and Yamamoto,K.R. (1990). Regulation of gene expression in vivo by liposome-mediated delivery of a purified transcription factor. J. Biol. Chem. *265*, 10189-10192.

Demeneix, B. and Behr, J.P. (2005). Polyethylenimine (PEI). Adv. Genet. 53PA, 215-230.

Desigaux,L., Gourden,C., Bello-Roufai,M., Richard,P., Oudrhiri,N., Lehn,P., Escande,D., Pollard,H., and Pitard,B. (2005). Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. Hum. Gene Ther. *16*, 821-829.

Desigaux,L., Sainlos,M., Lambert,O., Chevre,R., Letrou-Bonneval,E., Vigneron,J.P., Lehn,P., Lehn,J.M., and Pitard,B. (2007). Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *104*, 16534-16539.

Desmet, C.J. and Ishii, K.J. (2012). Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. Nat. Rev. Immunol. *12*, 479-491.

Dimitriadis, G.J. (1978). Entrapment of ribonucleic acids in liposomes. FEBS Lett. *86*, 289-293.

Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. Biotechnol. J. *3*, 90-97.

Drury,L. (1994). Transformation of bacteria by electroporation. Methods Mol. Biol. 31, 1-8.

Dubes ,G.R. and Klingler,E.A. (1961). Facilitation of infection of monkey cells with poliovirus "ribonucleic acid". Science *133*, 99-100.

Eagle ,H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 122, 501-514.

Eastman,S.J., Siegel,C., Tousignant,J., Smith,A.E., Cheng,S.H., and Scheule,R.K. (1997). Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. Biochim. Biophys. Acta *1325*, 41-62.

El Sayed, A., Futaki, S., and Harashima, H. (2009). Delivery of macromolecules using argininerich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. AAPS. J. *11*, 13-22.

Endo, Y. and Tsurugi, K. (1987). RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. J. Biol. Chem. *262*, 8128-8130.

Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K., and Adamson, J.W. (1987). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. N. Engl. J. Med. *316*, 73-78.

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

Escriou, V., Ciolina, C., Lacroix, F., Byk, G., Scherman, D., and Wils, P. (1998). Cationic lipidmediated gene transfer: effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes. Biochim. Biophys. Acta *1368*, 276-288.

Falnes, P.O. and Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. Curr. Opin. Cell Biol. *12*, 407-413.

Farhood,H., Bottega,R., Epand,R.M., and Huang,L. (1992). Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. Biochim. Biophys. Acta *1111*, 239-246.

Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., and Felgner, P.L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. J. Biol. Chem. *269*, 2550-2561.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *84*, 7413-7417.

Felgner, P.L., Tsai, Y.J., Sukhu, L., Wheeler, C.J., Manthorpe, M., Marshall, J., and Cheng, S.H. (1995). Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. Ann. N. Y. Acad. Sci. 772, 126-139.

Ferrari, M.E., Nguyen, C.M., Zelphati, O., Tsai, Y., and Felgner, P.L. (1998). Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. Hum. Gene Ther. *9*, 341-351.

Feuerstein, B.G., Pattabiraman, N., and Marton, L.J. (1986). Spermine-DNA interactions: a theoretical study. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 83, 5948-5952.

Fintini, D., Brufani, C., and Cappa, M. (2009). Profile of mecasermin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency. Ther. Clin. Risk Manag. *5*, 553-559.

Ford,K.G., Souberbielle,B.E., Darling,D., and Farzaneh,F. (2001). Protein transduction: an alternative to genetic intervention? Gene Ther. *8*, 1-4.

Fraley, R., Subramani, S., Berg, P., and Papahadjopoulos, D. (1980). Introduction of liposomeencapsulated SV40 DNA into cells. J. Biol. Chem. *255*, 10431-10435.

Frankel, A.D. and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell *55*, 1189-1193.

Fretz, M.M., Hogset, A., Koning, G.A., Jiskoot, W., and Storm, G. (2007). Cytosolic delivery of liposomally targeted proteins induced by photochemical internalization. Pharm. Res. *24*, 2040-2047.

Friedmann, T. (1992). A brief history of gene therapy. Nat. Genet. 2, 93-98.

Fuchs,H.J., Borowitz,D.S., Christiansen,D.H., Morris,E.M., Nash,M.L., Ramsey,B.W., Rosenstein,B.J., Smith,A.L., and Wohl,M.E. (1994). Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. N. Engl. J. Med. *331*, 637-642.

Gao, X. and Huang, L. (1991). A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. Biochem. Biophys. Res Commun. *179*, 280-285.

Gartler ,S.M. and Pavlovskis ,O.R. (1960). Demonstration of celluar uptake of polymerized DNA in mammalian cell cultures. Biochem. Biophys. Res Commun. *3*, 127-131.

Gaymalov,Z.Z., Yang,Z., Pisarev,V.M., Alakhov,V.Y., and Kabanov,A.V. (2009). The effect of the nonionic block copolymer pluronic P85 on gene expression in mouse muscle and antigen-presenting cells. Biomaterials *30*, 1232-1245.

Gehl,J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiol Scand. *177*, 437-447.

Giannotti, M.I., Esteban, O., Oliva, M., Garcia-Parajo, M.F., and Sanz, F. (2011). pH-responsive polysaccharide-based polyelectrolyte complexes as nanocarriers for lysosomal delivery of therapeutic proteins. Biomacromolecules. *12*, 2524-2533.

Graessmann, M., Menne, J., Liebler, M., Graeber, I., and Graessmann, A. (1989). Helper activity for gene expression, a novel function of the SV40 enhancer. Nucleic Acids Res. *17*, 6603-6612.

Gregoriadis, G., Leathwood, P.D., and Ryman, B.E. (1971). Enzyme entrapment in liposomes. FEBS Lett. *14*, 95-99.

Grieger, J.C. and Samulski, R.J. (2005). Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. Adv. Biochem. Eng Biotechnol. *99*, 119-145.

Guillaume, C., Delepine, P., Mercier, B., Gobin, E., Leroy, J.P., Morin, V., and Ferec, C. (2000). Phosphonocationic lipids in protein delivery to mice lungs. J. Pharm. Sci. *89*, 639-645.

Guo,H., Hao,R., Wei,Y., Sun,D., Sun,S., and Zhang,Z. (2012). Optimization of Electrotransfection Conditions of Mammalian Cells with Different Biological Features. J. Membr. Biol.

Gustafsson, J., Arvidson, G., Karlsson, G., and Almgren, M. (1995). Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. Biochim. Biophys. Acta *1235*, 305-312.

Hacein-Bey-Abina,S., Garrigue,A., Wang,G.P., Soulier,J., Lim,A., Morillon,E., Clappier,E., Caccavelli,L., Delabesse,E., Beldjord,K., Asnafi,V., MacIntyre,E., Dal Cortivo,L., Radford,I., Brousse,N., Sigaux,F., Moshous,D., Hauer,J., Borkhardt,A., Belohradsky,B.H., Wintergerst,U., Velez,M.C., Leiva,L., Sorensen,R., Wulffraat,N., Blanche,S., Bushman,F.D., Fischer,A., and Cavazzana-Calvo,M. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J. Clin. Invest *118*, 3132-3142.

Hafez,I.M. and Cullis,P.R. (2001). Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. Adv. Drug Deliv. Rev *47*, 139-148.

Heitz, F., Morris, M.C., and Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. Br. J. Pharmacol *157*, 195-206.

Ho,S.Y. and Mittal,G.S. (1996). Electroporation of cell membranes: a review. Crit Rev. Biotechnol. *16*, 349-362.

Holbourn,K.P., Shone,C.C., and Acharya,K.R. (2006). A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. FEBS J. 273, 4579-4593.

Hornung, V. and Latz, E. (2010). Intracellular DNA recognition. Nat. Rev. Immunol. *10*, 123-130.

Huang,Q., Li,F., Liu,X., Li,W., Shi,W., Liu,F.F., O'Sullivan,B., He,Z., Peng,Y., Tan,A.C., Zhou,L., Shen,J., Han,G., Wang,X.J., Thorburn,J., Thorburn,A., Jimeno,A., Raben,D., Bedford,J.S., and Li,C.Y. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. Nat. Med. *17*, 860-866.

Hui,S.W., Langner,M., Zhao,Y.L., Ross,P., Hurley,E., and Chan,K. (1996). The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. Biophys. J. *71*, 590-599.

Hyman,B.T. and Yuan,J. (2012). Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. Nat. Rev Neurosci. *13*, 395-406.

Imamura, J., Suzuki, Y., Gonda, K., Roy, C.N., Gatanaga, H., Ohuchi, N., and Higuchi, H. (2011). Single particle tracking confirms that multivalent Tat protein transduction domain-induced

heparan sulfate proteoglycan cross-linkage activates Rac1 for internalization. J. Biol. Chem. 286, 10581-10592.

Jacobson, R.H., Zhang, X.J., DuBose, R.F., and Matthews, B.W. (1994). Three-dimensional structure of beta-galactosidase from E. coli. Nature *369*, 761-766.

James, M.B. and Giorgio, T.D. (2000). Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. Mol. Ther. *1*, 339-346.

Janicke,R.U., Ng,P., Sprengart,M.L., and Porter,A.G. (1998a). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. J. Biol. Chem. 273, 15540-15545.

Janicke,R.U., Sprengart,M.L., Wati,M.R., and Porter,A.G. (1998b). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J. Biol. Chem. *273*, 9357-9360.

Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *88*, 1864-1868.

Jungas, T., Motta, I., Duffieux, F., Fanen, P., Stoven, V., and Ojcius, D.M. (2002). Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J. Biol. Chem. *277*, 27912-27918.

Kaczmarczyk,S.J., Sitaraman,K., Young,H.A., Hughes,S.H., and Chatterjee,D.K. (2011). Protein delivery using engineered virus-like particles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *108*, 16998-17003.

Kamiya,H., Fujimura,Y., Matsuoka,I., and Harashima,H. (2002). Visualization of intracellular trafficking of exogenous DNA delivered by cationic liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *298*, 591-597.

Karamitsos, D.T. (2011). The story of insulin discovery. Diabetes Res. Clin. Pract. 93 Suppl 1, S2-S8.

Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., and Kim, K.S. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell *4*, 472-476.

Kim,E.S., Yang,S.W., Hong,D.K., Kim,W.T., Kim,H.G., and Lee,S.K. (2010a). Cellpenetrating DNA-binding protein as a safe and efficient naked DNA delivery carrier in vitro and in vivo. Biochem. Biophys. Res Commun. *392*, 9-15.

Kim,S.K., Foote,M.B., and Huang,L. (2012). The targeted intracellular delivery of cytochrome C protein to tumors using lipid-apolipoprotein nanoparticles. Biomaterials *33*, 3959-3966.

Kim,T., Pazhoor,S., Bao,M., Zhang,Z., Hanabuchi,S., Facchinetti,V., Bover,L., Plumas,J., Chaperot,L., Qin,J., and Liu,Y.J. (2010b). Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *107*, 15181-15186.

Ko,Y.T., Falcao,C., and Torchilin,V.P. (2009). Cationic liposomes loaded with proapoptotic peptide D-(KLAKLAK)(2) and Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide G3139 for enhanced anticancer therapy. Mol. Pharm. *6*, 971-977.

Kohler,G. and Milstein,C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature *256*, 495-497.

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

Komarova, Y., Peloquin, J., and Borisy, G. (2007). Microinjection of protein samples. CSH. Protoc. 2007, db.

Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., and Pitard, B. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. Nucleic Acids Res. *27*, 3792-3798.

Krolick,K.A., Villemez,C., Isakson,P., Uhr,J.W., and Vitetta,E.S. (1980). Selective killing of normal or neoplastic B cells by antibodies coupled to the A chain of ricin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 77, 5419-5423.

Krylova,O.O., Melik-Nubarov,N.S., Badun,G.A., Ksenofontov,A.L., Menger,F.M., and Yaroslavov,A.A. (2003). Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation. Chemistry. *9*, 3930-3936.

Kumar, S. (1997). The apoptotic cysteine protease CPP32. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29, 393-396.

Kumar,V.V., Pichon,C., Refregiers,M., Guerin,B., Midoux,P., and Chaudhuri,A. (2003). Single histidine residue in head-group region is sufficient to impart remarkable gene transfection properties to cationic lipids: evidence for histidine-mediated membrane fusion at acidic pH. Gene Ther. *10*, 1206-1215.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lalli,G., Bohnert,S., Deinhardt,K., Verastegui,C., and Schiavo,G. (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. Trends Microbiol. *11*, 431-437.

Le Bihan,O., Chevre,R., Mornet,S., Garnier,B., Pitard,B., and Lambert,O. (2011). Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. Nucleic Acids Res *39*, 1595-1609.

Leblond,A.L., Naud,P., Forest,V., Gourden,C., Sagan,C., Romefort,B., Mathieu,E., Delorme,B., Collin,C., Pages,J.C., Sensebe,L., Pitard,B., and Lemarchand,P. (2009). Developing cell therapy techniques for respiratory disease: intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury. Hum. Gene Ther. *20*, 1329-1343.

Lemieux, P., Guerin, N., Paradis, G., Proulx, R., Chistyakova, L., Kabanov, A., and Alakhov, V. (2000). A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. Gene Ther. *7*, 986-991.

Letrou-Bonneval, E., Chevre, R., Lambert, O., Costet, P., Andre, C., Tellier, C., and Pitard, B. (2008). Galactosylated multimodular lipoplexes for specific gene transfer into primary hepatocytes. J. Gene Med. *10*, 1198-1209.

Li,F., Huang,Q., Chen,J., Peng,Y., Roop,D.R., Bedford,J.S., and Li,C.Y. (2010). Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. Sci. Signal. *3*, ra13.

Liu,X., Zou,H., Slaughter,C., and Wang,X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell *89*, 175-184.

Lubamba,B., Dhooghe,B., Noel,S., and Leal,T. (2012). Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. Clin. Biochem.

Luby-Phelps,K. (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. Int. Rev. Cytol. *192*, 189-221.

Lundberg, P. and Langel, U. (2003). A brief introduction to cell-penetrating peptides. J. Mol. Recognit. *16*, 227-233.

Lyu,M.A., Cheung,L.H., Hittelman,W.N., Liu,Y., Marks,J.W., Cho,M.J., and Rosenblum,M.G. (2012a). Bax345/BLyS: a novel, completely human fusion protein targeting malignant B cells and delivering a unique mitochondrial toxin. Cancer Lett. *322*, 159-168.

Lyu,M.A., Pham,L.V., Sung,B., Tamayo,A.T., Ahn,K.S., Hittelman,W.N., Cheung,L.H., Marks,J.W., Cho,M.J., Ford,R.J., Aggarwal,B.B., and Rosenblum,M.G. (2012b). The therapeutic effects of rGel/BLyS fusion toxin in in vitro and in vivo models of mantle cell lymphoma. Biochem. Pharmacol. *84*, 451-458.

Ma,B., Zhang,S., Jiang,H., Zhao,B., and Lv,H. (2007). Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. J. Control Release *123*, 184-194.

Madhumathi, J. and Verma, R.S. (2012). Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins. Curr. Opin. Microbiol. *15*, 300-309.

Magee,W.E., Goff,C.W., Schoknecht,J., Smith,M.D., and Cherian,K. (1974). The interaction of cationic liposomes containing entrapped horseradish peroxidase with cells in culture. J. Cell Biol. *63*, 492-504.

Mahato,R.I., Anwer,K., Tagliaferri,F., Meaney,C., Leonard,P., Wadhwa,M.S., Logan,M., French,M., and Rolland,A. (1998). Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration. Hum. Gene Ther. *9*, 2083-2099.

Maloney, D.G. (2012). Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. N. Engl. J. Med. 366, 2008-2016.

Manoukian, G. and Hagemeister, F. (2009). Denileukin diftitox: a novel immunotoxin. Expert. Opin. Biol. Ther. *9*, 1445-1451.

Mansoura, M.K., Biwersi, J., Ashlock, M.A., and Verkman, A.S. (1999). Fluorescent chloride indicators to assess the efficacy of CFTR cDNA delivery. Hum. Gene Ther. *10*, 861-875.

Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. Science 286, 2244-2245.

McIlroy, D., Barteau, B., Cany, J., Richard, P., Gourden, C., Conchon, S., and Pitard, B. (2009). DNA/amphiphilic block copolymer nanospheres promote low-dose DNA vaccination. Mol. Ther. *17*, 1473-1481.

Merchant, F.A., Holmes, W.H., Capelli-Schellpfeffer, M., Lee, R.C., and Toner, M. (1998). Poloxamer 188 enhances functional recovery of lethally heat-shocked fibroblasts. J. Surg. Res *74*, 131-140.

Mevel, M., Neveu, C., Goncalves, C., Yaouanc, J.J., Pichon, C., Jaffres, P.A., and Midoux, P. (2008). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. Chem. Commun. (Camb.) 3124-3126.

Mevel, M., Sainlos, M., Chatin, B., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Lambert, O., Vigneron, J.P., Lehn, P., Pitard, B., and Lehn, J.M. (2012). Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies. J. Control Release *158*, 461-469.

Midoux, P., LeCam, E., Coulaud, D., Delain, E., and Pichon, C. (2002). Histidine containing peptides and polypeptides as nucleic acid vectors. Somat. Cell Mol. Genet. *27*, 27-47.

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

Miller, A.D., Jolly, D.J., Friedmann, T., and Verma, I.M. (1983). A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): gene transfer into cells obtained from humans deficient in HPRT. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *80*, 4709-4713.

Mindell, J.A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. Annu. Rev Physiol 74, 69-86.

Mislick,K.A. and Baldeschwieler,J.D. (1996). Evidence for the role of proteoglycans in cationmediated gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *93*, 12349-12354.

Mok,K.W. and Cullis,P.R. (1997). Structural and fusogenic properties of cationic liposomes in the presence of plasmid DNA. Biophys. J. 73, 2534-2545.

Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Leander, K.R., Perry, H.C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., and Liu, M.A. (1993). Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. DNA Cell Biol. *12*, 777-783.

Moolten, F.L. and Cooperband, S.R. (1970). Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. Science *169*, 68-70.

Mumper, R.J., Duguid, J.G., Anwer, K., Barron, M.K., Nitta, H., and Rolland, A.P. (1996). Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. Pharm. Res *13*, 701-709.

Muratori, C., Bona, R., and Federico, M. (2010). Lentivirus-based virus-like particles as a new protein delivery tool. Methods Mol. Biol. *614*, 111-124.

Naldini,L., Blomer,U., Gallay,P., Ory,D., Mulligan,R., Gage,F.H., Verma,I.M., and Trono,D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science *272*, 263-267.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. *1*, 841-845.

Nicolau,C., Le Pape,A., Soriano,P., Fargette,F., and Juhel,M.F. (1983). In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *80*, 1068-1072.

Ogris, M. and Wagner, E. (2002). Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. Drug Discov. Today 7, 479-485.

Oudrhiri, N., Vigneron, J.P., Peuchmaur, M., Leclerc, T., Lehn, J.M., and Lehn, P. (1997). Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 1651-1656.

Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S., and Stayton, P.S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. Nat. Rev Drug Discov. *4*, 581-593.

Palte, M.J. and Raines, R.T. (2012). Interaction of nucleic acids with the glycocalyx. J. Am. Chem. Soc. *134*, 6218-6223.

Pastan, I., Hassan, R., Fitzgerald, D.J., and Kreitman, R.J. (2007). Immunotoxin treatment of cancer. Annu. Rev. Med. 58, 221-237.

Peretti,S., Schiavoni,I., Pugliese,K., and Federico,M. (2005). Cell death induced by the herpes simplex virus-1 thymidine kinase delivered by human immunodeficiency virus-1-based virus-like particles. Mol. Ther. *12*, 1185-1196.

Perez, F., Joliot, A., Bloch-Gallego, E., Zahraoui, A., Triller, A., and Prochiantz, A. (1992). Antennapedia homeobox as a signal for the cellular internalization and nuclear addressing of a small exogenous peptide. J. Cell Sci. *102 (Pt 4)*, 717-722.

Pirkmajer, S. and Chibalin, A.V. (2011). Serum starvation: caveat emptor. Am. J. Physiol Cell Physiol *301*, C272-C279.

Piron, J., Quang, K.L., Briec, F., Amirault, J.C., Leoni, A.L., Desigaux, L., Escande, D., Pitard, B., and Charpentier, F. (2008). Biological pacemaker engineered by nonviral gene transfer in a mouse model of complete atrioventricular block. Mol. Ther. *16*, 1937-1943.

Pitard,B. (2002). Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. Somat. Cell Mol. Genet. *27*, 5-15.

Pitard,B., Aguerre,O., Airiau,M., Lachages,A.M., Boukhnikachvili,T., Byk,G., Dubertret,C., Herviou,C., Scherman,D., Mayaux,J.F., and Crouzet,J. (1997). Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 14412-14417.

Pitard,B., Bello-Roufai,M., Lambert,O., Richard,P., Desigaux,L., Fernandes,S., Lanctin,C., Pollard,H., Zeghal,M., Rescan,P.Y., and Escande,D. (2004). Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. Nucleic Acids Res. *32*, e159.

Pitard,B., Oudrhiri,N., Lambert,O., Vivien,E., Masson,C., Wetzer,B., Hauchecorne,M., Scherman,D., Rigaud,J.L., Vigneron,J.P., Lehn,J.M., and Lehn,P. (2001). Sterically stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways in vivo. J. Gene Med. *3*, 478-487.

Pitard,B., Oudrhiri,N., Vigneron,J.P., Hauchecorne,M., Aguerre,O., Toury,R., Airiau,M., Ramasawmy,R., Scherman,D., Crouzet,J., Lehn,J.M., and Lehn,P. (1999). Structural

characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *96*, 2621-2626.

Pitard,B., Pollard,H., Agbulut,O., Lambert,O., Vilquin,J.T., Cherel,Y., Abadie,J., Samuel,J.L., Rigaud,J.L., Menoret,S., Anegon,I., and Escande,D. (2002). A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. Hum. Gene Ther. *13*, 1767-1775.

Pollard,H., Remy,J.S., Loussouarn,G., Demolombe,S., Behr,J.P., and Escande,D. (1998). Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. J. Biol. Chem. *273*, 7507-7511.

Porter, A.G. and Janicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death. Differ. *6*, 99-104.

Pringle,I.A., Hyde,S.C., Connolly,M.M., Lawton,A.E., Xu,B., Nunez-Alonso,G., Davies,L.A., Sumner-Jones,S.G., and Gill,D.R. (2012). CpG-free plasmid expression cassettes for cystic fibrosis gene therapy. Biomaterials *33*, 6833-6842.

Rao, N.M. (2010). Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic. Chem. Phys. Lipids *163*, 245-252.

Reisine, T., Rougon, G., and Barbet, J. (1986). Liposome delivery of cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitor into intact cells: specific blockade of cyclic AMP-mediated adrenocorticotropin release from mouse anterior pituitary tumor cells. J. Cell Biol. *102*, 1630-1637.

Reisine, T., Rougon, G., Barbet, J., and Affolter, H.U. (1985). Corticotropin-releasing factorinduced adrenocorticotropin hormone release and synthesis is blocked by incorporation of the inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase into anterior pituitary tumor cells by liposomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *82*, 8261-8265.

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. Biochem. J. 377, 159-169.

Riabowol,K.T., Vosatka,R.J., Ziff,E.B., Lamb,N.J., and Feramisco,J.R. (1988). Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. Mol. Cell Biol. *8*, 1670-1676.

Richard,P., Bossard,F., Desigaux,L., Lanctin,C., Bello-Roufai,M., and Pitard,B. (2005a). Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. Hum. Gene Ther. *16*, 1318-1324.

Richard,P., Pollard,H., Lanctin,C., Bello-Roufai,M., Desigaux,L., Escande,D., and Pitard,B. (2005b). Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation. J. Gene Med. *7*, 80-86.

Richard-Fiardo, P., Payen, E., Chevre, R., Zuber, J., Letrou-Bonneval, E., Beuzard, Y., and Pitard, B. (2008). Therapy of anemia in kidney failure, using plasmid encoding erythropoietin. Hum. Gene Ther. *19*, 331-342.

Richardson, A., de Antueno, R., Duncan, R., and Hoskin, D.W. (2009). Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells. Biochem. Biophys. Res Commun. *388*, 736-741.

Roberts,R.J. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *102*, 5905-5908.

Rosazza, C., Escoffre, J.M., Zumbusch, A., and Rols, M.P. (2011). The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. Mol. Ther. *19*, 913-921.

Ross,G.F., Bruno,M.D., Uyeda,M., Suzuki,K., Nagao,K., Whitsett,J.A., and Korfhagen,T.R. (1998). Enhanced reporter gene expression in cells transfected in the presence of DMI-2, an acid nuclease inhibitor. Gene Ther. *5*, 1244-1250.

Ross, P.C. and Hui, S.W. (1999). Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. Gene Ther. *6*, 651-659.

Sainlos, M. Transfert de gènes à l'aide de substances bioactives. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris 6 . 2004. Ref Type: Thesis/Dissertation

Sainlos, M., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Zertal-Zidani, S., Aissaoui, A., Vigneron, J.P., Lehn, J.M., and Lehn, P. (2005). Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection. Chembiochem. *6*, 1023-1033.

Sandvig,K. and van,D.B. (2000). Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. EMBO J. *19*, 5943-5950.

Sardesai, N.Y. and Weiner, D.B. (2011). Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. Curr. Opin. Immunol. *23*, 421-429.

Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H. (1982). Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene. Science *215*, 166-168.

Scherman, D., Bessodes, M., Cameron, B., Herscovici, J., Hofland, H., Pitard, B., Soubrier, F., Wils, P., and Crouzet, J. (1998). Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells. Curr. Opin. Biotechnol. *9*, 480-485.

Schiffmann,R. and Brady,R.O. (2006). Development of enzyme replacement therapy for Fabry disease.

Schwarze,S.R., Ho,A., Vocero-Akbani,A., and Dowdy,S.F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science *285*, 1569-1572.

Schwarze, S.R., Hruska, K.A., and Dowdy, S.F. (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? Trends Cell Biol. *10*, 290-295.

Semple,S.C., Chonn,A., and Cullis,P.R. (1996). Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. Biochemistry *35*, 2521-2525.

Shi,F., Nomden,A., Oberle,V., Engberts,J.B., and Hoekstra,D. (2001). Efficient cationic lipidmediated delivery of antisense oligonucleotides into eukaryotic cells: down-regulation of the corticotropin-releasing factor receptor. Nucleic Acids Res. *29*, 2079-2087.

Siegel, D.P. (1999). The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. Biophys. J. *76*, 291-313.

Smisterova, J., Wagenaar, A., Stuart, M.C., Polushkin, E., ten Brinke, G., Hulst, R., Engberts, J.B., and Hoekstra, D. (2001). Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. J. Biol. Chem. *276*, 47615-47622.

Smith,B.L. and Mochly-Rosen,D. (1992). Inhibition of protein kinase C function by injection of intracellular receptors for the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. *188*, 1235-1240.

Sonawane, N.D., Szoka, F.C., Jr., and Verkman, A.S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. J. Biol. Chem. *278*, 44826-44831.

Stegmann, T. and Legendre, J.Y. (1997). Gene transfer mediated by cationic lipids: lack of a correlation between lipid mixing and transfection. Biochim. Biophys. Acta *1325*, 71-79.

Stretton, A.O. (2002). The first sequence. Fred Sanger and insulin. Genetics 162, 527-532.

Strohl,W.R. and Knight,D.M. (2009). Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues. Curr. Opin. Biotechnol. *20*, 668-672.

Suzuki,Y. (2012). Exploring transduction mechanisms of protein transduction domains (PTDs) in living cells utilizing single-quantum dot tracking (SQT) technology. Sensors. (Basel) *12*, 549-572.

Takahashi,K. and Yamanaka,S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663-676.

Takaoka,A., Wang,Z., Choi,M.K., Yanai,H., Negishi,H., Ban,T., Lu,Y., Miyagishi,M., Kodama,T., Honda,K., Ohba,Y., and Taniguchi,T. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. Nature *448*, 501-505.

Takeuchi,O. and Akira,S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. Cell *140*, 805-820.

Tatum, E.L. (1966). Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. Perspect. Biol. Med. *10*, 19-32.

Timmerman, J.M., Singh, G., Hermanson, G., Hobart, P., Czerwinski, D.K., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C.B., Van, B.A., and Levy, R. (2002). Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma. Cancer Res. *62*, 5845-5852.

Tong,A.W., Jay,C.M., Senzer,N., Maples,P.B., and Nemunaitis,J. (2009). Systemic therapeutic gene delivery for cancer: crafting Paris' arrow. Curr. Gene Ther. *9*, 45-60.

Tong, J., Luxenhofer, R., Yi, X., Jordan, R., and Kabanov, A.V. (2010). Protein modification with amphiphilic block copoly(2-oxazoline)s as a new platform for enhanced cellular delivery. Mol. Pharm. *7*, 984-992.

Trotman,L.C., Mosberger,N., Fornerod,M., Stidwill,R.P., and Greber,U.F. (2001). Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. Nat. Cell Biol. *3*, 1092-1100.

Turek, J., Dubertret, C., Jaslin, G., Antonakis, K., Scherman, D., and Pitard, B. (2000). Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection. J. Gene Med. *2*, 32-40. van den Berg, A. and Dowdy, S.F. (2011). Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. Curr. Opin. Biotechnol. *22*, 888-893.

van der Gun,B.T., Monami,A., Laarmann,S., Rasko,T., Slaska-Kiss,K., Weinhold,E., Wasserkort,R., de Leij,L.F., Ruiters,M.H., Kiss,A., and McLaughlin,P.M. (2007). Serum insensitive, intranuclear protein delivery by the multipurpose cationic lipid SAINT-2. J. Control Release *123*, 228-238.

Vankeerberghen, A., Cuppens, H., and Cassiman, J.J. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. J. Cyst. Fibros. *1*, 13-29.

Varkouhi,A.K., Scholte,M., Storm,G., and Haisma,H.J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. J. Control Release *151*, 220-228.

Vigneron, J.P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.C., Basseville, M., Lehn, P., and Lehn, J.M. (1996). Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *93*, 9682-9686.

Vilaysane, A. and Muruve, D.A. (2009). The innate immune response to DNA. Semin. Immunol. *21*, 208-214.

Wang, J., Faust, S.M., and Rabinowitz, J.E. (2011). The next step in gene delivery: molecular engineering of adeno-associated virus serotypes. J. Mol. Cell Cardiol. *50*, 793-802.

Wang,R., Epstein,J., Baraceros,F.M., Gorak,E.J., Charoenvit,Y., Carucci,D.J., Hedstrom,R.C., Rahardjo,N., Gay,T., Hobart,P., Stout,R., Jones,T.R., Richie,T.L., Parker,S.E., Doolan,D.L., Norman,J., and Hoffman,S.L. (2001). Induction of CD4(+) T celldependent CD8(+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *98*, 10817-10822.

Wasungu,L. and Hoekstra,D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. J. Control Release *116*, 255-264.

Weill,C.O., Biri,S., Adib,A., and Erbacher,P. (2008a). A practical approach for intracellular protein delivery. Cytotechnology *56*, 41-48.

Weill,C.O., Biri,S., and Erbacher,P. (2008b). Cationic lipid-mediated intracellular delivery of antibodies into live cells. Biotechniques 44, vii-vxi.

Welsh,M.J. and Smith,A.E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell *73*, 1251-1254.

Wen,X., Lyu,M.A., Zhang,R., Lu,W., Huang,Q., Liang,D., Rosenblum,M.G., and Li,C. (2011). Biodistribution, pharmacokinetics, and nuclear imaging studies of 111In-labeled rGel/BLyS fusion toxin in SCID mice bearing B cell lymphoma. Mol. Imaging Biol. *13*, 721-729.

Wilson, T., Papahadjopoulos, D., and Taber, R. (1979). The introduction of poliovirus RNA into cells via lipid vesicles (liposomes). Cell *17*, 77-84.

Wiszniewski,L., Jornot,L., Dudez,T., Pagano,A., Rochat,T., Lacroix,J.S., Suter,S., and Chanson,M. (2006). Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *34*, 39-48.

Wolfert, M.A., Dash, P.R., Nazarova, O., Oupicky, D., Seymour, L.W., Smart, S., Strohalm, J., and Ulbrich, K. (1999). Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. Bioconjug. Chem. *10*, 993-1004.

Wolfert, M.A. and Seymour, L.W. (1998). Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro. Gene Ther. *5*, 409-414.

Wolff, J.A. and Budker, V. (2005). The mechanism of naked DNA uptake and expression. Adv. Genet. *54*, 3-20.

Wolff, J.A. and Lederberg, J. (1994). An early history of gene transfer and therapy. Hum. Gene Ther. *5*, 469-480.

Xu,Y. and Szoka,F.C., Jr. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. Biochemistry *35*, 5616-5623.

Yang,Z., Sahay,G., Sriadibhatla,S., and Kabanov,A.V. (2008). Amphiphilic block copolymers enhance cellular uptake and nuclear entry of polyplex-delivered DNA. Bioconjug. Chem. *19*, 1987-1994.

Yang,Z., Zhu,J., Sriadibhatla,S., Gebhart,C., Alakhov,V., and Kabanov,A. (2005). Promoterand strain-selective enhancement of gene expression in a mouse skeletal muscle by a polymer excipient Pluronic P85. J. Control Release *108*, 496-512.

Yeo, J.P., Alderuccio, F., and Toh, B.H. (1994). A new chromosomal protein essential for mitotic spindle assembly. Nature *367*, 288-291.

Yi,X., Batrakova,E., Banks,W.A., Vinogradov,S., and Kabanov,A.V. (2008). Protein conjugation with amphiphilic block copolymers for enhanced cellular delivery. Bioconjug. Chem. *19*, 1071-1077.

Yi,X., Zimmerman,M.C., Yang,R., Tong,J., Vinogradov,S., and Kabanov,A.V. (2010). Pluronic-modified superoxide dismutase 1 attenuates angiotensin II-induced increase in intracellular superoxide in neurons. Free Radic. Biol. Med. *49*, 548-558.

Yoneyama, M. and Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. Immunol. Rev. 227, 54-65.

Yu,J., Vodyanik,M.A., Smuga-Otto,K., Antosiewicz-Bourget,J., Frane,J.L., Tian,S., Nie,J., Jonsdottir,G.A., Ruotti,V., Stewart,R., Slukvin,I.I., and Thomson,J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science *318*, 1917-1920.

Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A., and Welsh, M.J. (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. J. Biol. Chem. *270*, 18997-19007.

Zelphati,O., Uyechi,L.S., Barron,L.G., and Szoka,F.C., Jr. (1998). Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. Biochim. Biophys. Acta *1390*, 119-133.

Zelphati,O., Wang,Y., Kitada,S., Reed,J.C., Felgner,P.L., and Corbeil,J. (2001). Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. J. Biol. Chem. *276*, 35103-35110.

Zuhorn,I.S. and Hoekstra,D. (2002). On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? J. Membr. Biol. *189*, 167-179.

Zuhorn,I.S., Kalicharan,R., and Hoekstra,D. (2002). Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. J. Biol. Chem. *277*, 18021-18028.

# Annexes

## Annexes

Trois publications sont jointes en annexe de ce travail de thèse, en plus de celles présentées dans la partie **Résultats**.

## **Publication 1**

Chatin,B. Mével,M., Lambert,O. and Pitard,B. Supramolecular assemblies for the intracellular delivery of proteins. *En soumission dans la revue Biomaterials.* 

## **Publication 2**

S.David<sup>1</sup>, C.Passirani, N.Carmoy, M. Morille, M. Mevel, **B.Chatin**, J.P.Benoit<sup>1,2</sup>, T.Montier, B.Pitard (2012). **DNA nanocarriers for systemic administration - characterisation and** *in vivo* bioimaging in healthy mice. Sous presse dans la revue Moleculat Therapy – Nucleic Acids

### **Publication 3**

Beilvert,F., Mével,M., Chatin,B. and Pitard,B. (2012). Local siRNA delivery by non-viral vectors. J. Drug Del. Sci. Tech., 22 (1) 17-27

# **Publication 1**

Supramolecular assemblies for the intracellular delivery of proteins

#### Supramolecular assemblies for the intracellular delivery of proteins

Benoît Chatin 1.2, Mathieu Mével 1.2, Olivier Lambert 3, Aleksander Edelman4, Bruno Pitard 1.2

<sup>3</sup>CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux 1-ENITAB, Talence, F-33405

<sup>4</sup> Faculté de médecine Paris-Descartes, INSERM U845, Paris, F-75015

### Abstract

Proteins currently used in human medicine have extracellular targets. Reaching intracellular targets could be of a great interest for several applications in research and care but the lack of an efficient vector to cross impermeable plasma membranes is a major obstacle. Intracellular protein delivery reagents are emerging tools permitting to cross this barrier. Amongst them, cationic lipids, used for decades for nucleic acid delivery, are of a great interest. These well characterized compounds are safe, stable and non immunogenic. Furthermore, they have been studied for years and their mechanism of action for nucleic acid delivery has been solved to a large extent. However, the efficacy of such compounds greatly relies on the physicochemical characteristics of the nanoparticles they form when combined with their cargoes. If these characteristics are well-defined with nucleic acids, there is a need to solve them with proteins. We describe here cationic liposome-based systems allowing efficient proteins delivery into cultured, living cells. We defined the physicochemical parameters linked to their efficacy, and propose the use of a new neutral helper lipid to promote an efficient release of the cargo proteins into the cytosol.

#### Keywords

Intracellular protein delivery - Transduction - Cationic lipid - Helper lipid - Liposome -

<sup>1</sup> INSERM, UMR\_S 1087

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Université de Nantes, Faculté de médecine, L'institut du Thorax, Nantes F-44000

#### Introduction

Biotherapies represent a major development of medicine, based on the use of life-derived products. Biotherapies encompass gene therapy, cell therapy and therapeutic use of proteins. Proteins have been used for decades as therapeutic drugs, e.g. insuline since 1922 (Bliss, 1993) or growth hormone since 1957 (Laron, 2011)

Protein therapy recently showed important developments with recombinant proteins used in human medicine : hormones e.g. erythropoietin or insulin-like growth factor (Eschbach et al., 1987; Fintini et al., 2009), enzymes e.g. glucocerebrosidase or desoxyribonuclease I (Aviezer et al., 2009; Fuchs et al., 1994) or antibodies e.g. Rituximab or Trastuzumab (Maloney, 2012; Bange et al., 2001). All these molecules have extracellular targets. Indeed, most of proteins, because of their important size and charge, do not spontaneously cross plasma membranes. However, intracellular delivery of proteins could represent a powerful tool for investigating biological functions of a given protein and its implication in signaling pathways, and could initiate promising developments as a part of therapies based on intracellular-targeting proteins. Furthermore, protein delivery could overcome some of gene therapy drawbacks, in particular difficulty to control its expression level. Indeed, when transgene expression is not necessary over a long period, delivery of the corresponding protein can be sufficient and can allow circumventing problems due to its expression from a copy of its gene into the nucleus. Moreover, internalization of proteins can avoid toxic aspects of the integration of nucleic acid sequences encoding recombinant proteins into the host cell genome. For instance, this could be of a crucial importance in the field of induced pluripotent stem cells (iPSc), avoiding genomic and epigenomic abnormalities that may affect their safe use in cell replacement therapy (Yu et al., 2007).

In this context, various strategies are available to cross the plasma membrane. Microinjection, developed in the 1980's (Riabowol et al., 1988), allows efficient delivery of a controlled amount of a protein directly into cell cytoplasm, but this technique can only be applied to a limited number of cells and only in cells in culture. Furthermore it is traumatic for cells. Electroporation can also be used, but is partly limited to the delivery of proteins in *in vitro* cells (Campbell et al., 1995)

Recently, new strategies appeared. One of them lies on the engineering of the protein to be delivered, precisely its fusion with a particular class of peptides named PTDs (Protein Transduction Domains) or CPPs (Cell Penetrating Peptides) (Ho et al., 2001; Jarver and

Langel, 2006). Those sequences can be derived from viral proteins (TAT protein from HIV, VP22 protein from HSV) or animal proteins (Antennapedia factor of Drosophila). The mechanism of action of such peptides is still largely unknown. Studies tend to show that those positively-charged aminoacids rich sequences have the ability to destabilize the plasma membrane, thereby leading to a translocation of the whole protein towards the cytoplasm (Ford et al., 2001). However, this method requires the engineering of the gene coding the protein to be delivered, in order to fuse it with the transduction domain, which can affect the structure of the protein leading to a loss of biological function. Furthermore, these virus or animal-derived peptides could trigger after *in vivo* injection adaptative humoral and/or cellular immune responses.

Another delivery strategy based on non-viral vectors used for gene transfer lies on the use of cationic lipids. These molecules have already shown their ability to deliver nucleic acids like DNA or siRNAs into cultured cells, and have more recently been used to deliver proteins (Dalkara et al., 2004; van der Gun et al., 2007; Zelphati et al., 2001). These amphiphilic compounds spontaneously form supramolecular assemblies with the macromolecule to be delivered, which are internalized by cells. These synthetic vectors show advantages over peptides, since there is no engineering step of the protein, it simplifies the procedure and reduces the amount of protein needed. Furthermore, they do not lead to specific immune response and seem more efficient than transduction domains peptides (Ye et al., 2002). In addition, their action mechanism tends to be well known, since it has been studied in the field of gene transfer (Le Bihan et al., 2011). It consists on the interaction of a positively charged macromolecule-cationic lipid complex with the negatively charged plasma membrane of cells, leading to the endocytosis of the complex. This step is followed by the release of the cargomolecule into the cytoplasm, by destabilization of the membrane of complex-containing endosomes (Wasungu and Hoekstra, 2006). The ability of such supramolecular assemblies to cross plasma membranes and deliver their cargo into the cytoplasm greatly depends on their physico-chemical properties. However, even if the properties of complexes based on DNA or RNA are well characterized (Barteau et al., 2008), protein-based complexes are still illdefined. Therefore, there is a need develop efficient and safe synthetic intracellular protein delivery systems.

In this study, we identified new compounds able to deliver proteins into cells, a strategy that has been applied with success to the discovery of new classes of vectors for the delivery either *in vitro* or *in* vivo of nucleic acids. This strategy consists in the study of the relationships

between the physico-chemical properties of supramolecular assemblies formed with proteins and cationic lipids and their influence on protein delivery efficiency into cells. This strategy has been applied, in the present study, to deliver proteins of various origins including antibodies and nuclear proteins in various cell types. Furthermore, our results suggest that the delivery of antibodies against an intracellular target can be used to restore the trafficking of the CFTR ion channel towards the plasma membrane, a process which is impaired in cystic fibrosis, providing a new approach for the study of channelopathies.

#### Materials and methods

#### Preparation of liposomes and micelles

Cationic lipids used in this study were BGTC (bis-guanidinium-tren-cholesterol) (Vigneron et al., 1996) and DOSP (dioleoyl-succinyl-paromomycine) (Mevel et al., 2012). Neutral lipids were DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and MM27 (Mevel et al., 2008). Liposomes were prepared by dissolving cationic lipid and neutral lipid together in chloroform at a molar ratio cationic lipid/neutral lipid of 1. Solvent was removed on a rotary evaporator under vacuum at room temperature. The lipidic film was rehydrated with ultrapure water during 24h at 4°C to obtain a suspension containing 10mM of cationic lipid. This suspension was vortexed and then sonicated to obtain liposomes of 100-200 nm diameter. The size of liposomes was controlled on a Zetasizer 300HSA (Malvern Instruments). Cationic micelles were prepared by weighing precisely the lipid and adding ultrapure water to obtain a solution at 10mM of cationic lipid. This solution was briefly vortexed and sonicated for 5 minutes.

#### Formulation of lipid:protein complexes

Proteins used in this study were  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) from *E.coli* (Roche Applied Sceince, Basel, Switzerland) and monoclonal anti-cytokeratin 8-FITC antibody (Abcam). Proteins were diluted at various concentrations in 120mM NaCl buffered with 20mM HEPES pH 7.4, or in cell culture medium OptiMEM (Life Technologies). Lipids (liposomal suspension or micellar solution) were diluted in water or OptiMEM at various concentrations to obtain cationic lipid/protein molar ratios (MR) from 100 to 2000 in the final lipid-protein mix. Equal volumes of lipid and protein solutions were mixed together and incubated for 15 minutes at room temperature to form lipid-protein complexes.

#### Size measurements of lipid:protein complexes

The size of BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal complexes was measured by dynamic light scattering on a Zetasizer 300HSA (Malvern Instruments Ltd., Malvern, United Kingdom). Complexes were prepared with 1µg of protein at various lipid/protein molar ratios 120mM NaCl and 20mM HEPES pH 7.4 in a total volume of 100 µL. After 15 minutes of incubation at room temperature, 900 µL of 120mM NaCl and 20mM HEPES pH 7.4 were added and the size measured.

#### Polyacrylamide gel electrophoresis of lipid:protein complexes.

BGTC:DOPE/  $\beta$ -gal complexes were prepared with 10 µg of  $\beta$ -gal at various lipid/protein molar ratios in 120mM NaCl and 20mM HEPES pH 7.4 in a final volume of 50 µL. After 15 minutes of incubation at room temperature, 5 µL of preparation were mixed with 5µL of Blue-Orange load buffer (Promega, Madison, WI). Migration was performed on a polyacrylamide gel (stacking : 5%, resolving : 7%, without SDS) at 80 V during 2 hours, then the protein was revealed by Coomassie blue staining.

#### Cell culture

Wild-typeHeLa cells (cervix adenocarcinoma, *H.sapiens*), H1299 (non-small cells lung carcinoma, *H.sapiens*) and C2C12 (myoblasts, *M.musculus*) were cultured in DMEM medium (Life Technologies). HeLa cells expressing GFP and WT-CFTR or F508del-CFTR (kind gift of A.Edelman) were cultured in DMEM medium supplemented with 450  $\mu$ g/mL Zeocin (Invivogen). CHO-K1 cells (ovary, *C. griseus*) were cultured in F12-K medium (Life Technologies). All media were also supplemented with 2 mM L-glutamin, 10  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 10 % fetal calf serum (Life Technologies). Cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/ humidified atmosphere.

#### Protein internalization

For  $\beta$ -gal delivery, cells were seeded 24h before experiment onto 24-well culture plates, at a cell density of 70,000/well, resulting in 70-80% confluence 24h later. Internalization was performed by adding 100 µL of complexes in 400 µL of serum-free medium to each well. Complexes contained various amounts of protein complexed with cationic lipid at different molar ratios. After 4 hours of incubation of the cells with the complexes, FCS was added -if necessary- to the medium (10%) and incubation was prolonged for various times. For fluorescent antibodies internalization, cells were seeded at day-1 before experiment onto 24-well culture plates containing glass slides, at a cell density of 70,000/well, resulting in 70-

80% confluence 24h later. Internalization was performed by adding 100 μL of complexes in 400μL of serum-free DMEM to each well. After 4 hours incubation, cells were washed and treated for microscopy.

#### β-gal quantification

After incubation, wells were washed three times with 1mL of PBS. Three hundred  $\mu$ L of Reporter Lysis Buffer (Promega) supplemented with a protease inhibitor cocktail Complete Mini (Roche Applied Science) were added and cells were freeze-thawed (-80°C/20°C) to ensure complete lysis. After 5 minutes of centrifugation at 9,000xg, protein amounts was measured from an aliquot of supernatant using β-glo Assay Kit (Promega) on a Victor-X3 multilabel plate reader (Perkin-Elmer). For the quantification of β-gal –containing cells, HeLa cells were incubated as described above with 800 ng of β-gal complexed with BGTC:DOPE at a lipid/protein molar ratio of 1500. Cells were incubated for various times (15 minutes to 4 hours). Cells were then washed three times with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde at room temperature and treated with a staining solution (X-Gal 400  $\mu$ g/mL, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 4 mM, K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 4 mM, in PBS). Slides were mounted with PBS in the presence of glycerol (50% v/v) and observed under an optical microscope. Counts were made on minimum 115 cells, on two independent slides.

#### Epifluorescence microscopy

For fluorescent antibody observation, cells were washed with PBS and fixed with 3.7% paraformaldehyde for 10 min at room temperature before counterstaining with DAPI (Life Technologies). For immunocytochemistry experiments, cells were permeabilized and fixed with a mixture of acetone and methanol (50/50 v/v) at -20°C, then saturated with 1% BSA for 30 min RT before incubation with FITC anti K8 antibody diluted at 1/100 in PBS containing 1% BSA for 30 min RT. Slides were then washed and nuclei counterstained using DAPI. Slides were mounted with Prolong Gold Antifading Reagent (Life Technologies) and incubated 24 hours at room temperature before observation under a Zeiss Axiovert epifluorescence microscope using appropriate filters. Images were treated using ImageJ 1.42q software.

#### Cryo-TEM

Cryo-TEM imaging of cationic lipids/proteins complexes were performed as described in (Pitard et al., 2004).
#### MEQ fluorescence assay

HeLa cells stably expressing WT-CFTR or F508-del and GFP were grown on glass coverslips for 24 hours before antibody treatment, C-terminus or N-terminus-specific anti-cytokeratin 8 antibodies were delivered using DOSP:MM27 in serum-free medium. Four hours after antibody treatment, cells were rinsed with an iodide-containing isotonic solution (NaI 138mM, K2HPO4 2,4mM, KH2PO4 0,8mM, HEPES 10mM, CaSO4 1mM, D-Glucose 10mM, pH 7,4) and incubated 2 minutes in an hypotonic solution containing the halide-sensitive probe MEQ (Life Technologies) (MEQ 10mM, NaI 110mM, K2HPO4 1,92mM, KH2PO4 0,64mM, HEPES 8mM, CaSO<sub>4</sub> 0,8mM, D-Glucose 8mM, pH 7,4). Cells were then left 15 minutes in the isotonic solution to recover. Coverslips were mounted on a homemade perfusion chamber continuously fed with the isotonic solution at 37°C and observed under an epifluorescence microscope Leica DMI6000B equipped with environmental control. Intracellular MEQ fluorescence of GFP-expressing cells was recorded using MetaFluor software (Molecular Devices), After 120 seconds of perfusion with the isotonic iodidecontaining solution to obtain the basal fluorescence level, cells were perfused with an isotonic nitrate-containing solution (NaNO3 138mM, K2HPO4 2,4mM, KH2PO4 0,8mM, HEPES 10mM, CaSO<sub>4</sub> 1mM, D-Glucose 10mM, pH 7,4) during 120 seconds to record the increase of MEQ fluorescence due to iodide efflux from the cells. A cAMP stimulatory cocktail (cptAMPc 500µM, forskolin 25µM, IBMX 100µM) was then added to the perfusion during 210 seconds, then the solution was replaced by the iodide-containing isotonic solution to quench MEQ fluorescence. Results are expressed as relative fluorescence (F/Fi)-1 where F is the change of fluorescence with time after background subtraction and compensation of MEQ photobleaching, and Fi is the basal MEQ fluorescence obtained before the nitrate-containing solution perfusion.

#### Results

#### Optimization of the protein formulation conditions for β-galactosidase delivery

We identified through the screening of a cationic lipids library two compounds able to deliver β-Galactosidase (β-Gal) into living HeLa cells. Fig. 1A shows that the fatty acid derivative DOSP and the cholesterol derivative BGTC, when complexed to β-Gal at various cationic lipid/protein molecular ratios (MR), led to β-Gal internalization into HeLa cells. When used as micelles, these cationic lipids showed a limited efficacy, but when they were combined with the neutral lipid DOPE to form liposomes we observed a dramatic increase of the internalization efficiency. The absence of spontaneous internalization of β-Gal was also verified (data not shown). As BGTC:DOPE was the most efficient formulation, we decided to further explore its properties to optimize the protein delivery system. We first assessed the influence of the protein amount on the protein internalization efficiency. In the same experiment, vector cytotoxicity was measured by an MTT assay. Figure 1 B shows that the internalization efficiency increased both with the increasing amount of protein and with the lipid/protein molar ratio. We observed that the formulation which led to the best internalization efficiency was 1000 ng of β-Gal complexed with BGTC:DOPE at a MR of 2500, which also led to a reduction of cell viability of 40 % (Fig.1C). For further experiments we choosed to work with 800ng of protein complexed with BGTC:DOPE at MR of 1500, which led to the delivery of 6% of the protein into the cells without compromising their viability.

We next investigated the influence of the formulation medium of BGTC:DOPE  $\beta$ -Gal complexes on the protein delivery efficiency. Figure 1D shows that complexes formulated in OptiMEM medium display a 7 fold increase of internalization compared to complexes formulated in NaCl-HEPES buffer. BGTC:DOPE ability to deliver proteins in other cells than HeLa was assessed. Figure 1E shows that BGTC:DOPE led to internalization of  $\beta$ -Gal into various cell lines, with an efficiency comparable to the one observed with HeLa cells.



Figure 1 - Intracellular delivery of the reporter protein  $\beta$ -galactosidase. (A) shows  $\beta$ -gal internalization efficiency in HeLa cells of two cationic lipids, BGTC and DOSP, respectively bearing cholesterol-derived and fatty acids-derived hydrophobic tails. Lipids were formulated either as micelles, either as liposomes in combination with the neutral lipid DOPE. 800ng of  $\beta$ -Gal were complexed with the cationic lipids in OptiMEM medium at MR of 1000 (dashed bars), 1500 (black bars), 2000 (dotted bars). Internalization was performed in serum-free DMEM. After 4 hours of incubation of the complexes with cells, 10% serum was added. After 8 hours of incubation, cells were lysed and  $\beta$ -Gal activity was measured. (B-C)Influence of protein amount and cationic lipid / protein molar ratio on internalization and toxicity was assessed by delivering various amounts of  $\beta$ -gal in HeLa cells complexed with BGTC:DOPE in OptiMEM medium at a MR of 1000 (dashed bars), 1500 (black bars), 2000 (dotted bars), 2000 (dotted bars), 1500 (black bars), 2000 (dotted bars), 2000 (dotted bars) and 2500 (white bars). (D) Influence of the formulation medium was evaluated by delivering 800ng of  $\beta$ -Gal in the La cells complexed with BGTC:DOPE to deliver  $\beta$ -Gal in various cell lines was assessed by delivering 800ng of  $\beta$ -Gal at various molar ratios.

We next investigated the localization of the  $\beta$ -galactosidase after intracellular internalization. To this end, HeLa cells were incubated with BGTC:DOPE/  $\beta$ -gal complexes. X-gal staining of HeLa cells treated with BGTC:DOPE  $\beta$ -gal complexes after 15 min and 4 hours of incubation showed that for short incubation periods,  $\beta$ -Gal activity is low into cell cytoplasm, the blue staining being mostly located into punctuate structures corresponding to newly endocyted complexes (Fig.2A). For longer incubation periods, the activity is present throughout cytoplasm, indicating the release of the enzyme by the complexes (Fig.2B).



Figure 2 - Influence of the incubation time on the percentage of HeLa cells containing the internalized  $\beta$ -Gal. 800 ng of protein were complexed with BGTC:DOPE at a MR of 1500. Complexes were added on cells in serum-free DMEM. After various incubation times, cells were washed, fixed with 3.7% paraformaldehyde and stained with X-Gal. (A) cells after 15 minutes of incubation with the complexes. (B) cells after 4 hours of incubation with the complexes.

#### Internalization of antibodies

Then, we investigated the ability of cationic lipids to deliver an antibody into cell cytoplasm under its native conformation capable of recognizing its antigenic intracellular target. An FITC-tagged monoclonal immunoglobulin directed against human cytokeratin 8 (K8 antibody) was delivered into cultured HeLa cells using BGTC, BGTC:DOPE, DOSP or DOSP:DOPE (Fig.3). After 4 hours of incubation with the cells, the antibody was mostly detected into complexes surrounding the cells but only a few cells displayed intracytoplasmic fluorescence. This prompted us to test whether another neutral lipid than DOPE could improve the delivery of antibodies into HeLa cells. The formulation of BGTC as liposomes with the neutral lipid MM27 did not lead to a significant increase of FITC-labelled cells (Fig. 3 C) but the use of DOSP:MM27 liposomes led to a dramatic increase of FITC-positive cells (Fig.3 F). The percentage of K8-labelled cells as a function of the different delivery systems is summarized in figure 4.

DOSP:MM27-mediated anti-K8 antibody delivery led to an intense labeling of the cell cytoskeleton visible after 4 hours of incubation of cells with the complexes (Fig.3 G) and was still present after 24 hours (Fig.3 H), demonstrating the ability of DOSP:MM27 liposomes to deliver the antibody over an extended period of time. The cytoskeleton staining pattern was similar to that observed in acetone/methanol fixed and permeabilized HeLa cells treated with the same anti-K8 antibody in a classical immunofluorescence protocol (Fig.3 I). Of note, cytoskeleton organization was more preserved when the K8 antibody was delivered by DOSP:MM27 liposomes rather than by acetone/methanol permeabilization, probably because cells treated with cationic lipid/protein complexes did not underwent dehydratation and protein coagulation caused by methanol. As a control, C2C12 cells which do not express human cytokeratin 8 did not displayed cytoskeleton labeling in any of the conditions used with HeLa cells (data not shown). It was verified that DOSP:MM27-mediated delivery could apply to other immunoglobulins by vectorizing an antibody against human β-tubulin, leading to the labeling of microtubules in living HeLa cells (data not shown).



Figure 3 – Hela cells treated with cationic lipid/anti K8 antibody complexes. Cell received 750ng of anti-K8 antibody complexed with BGTC (A), BGTC:DOPE (B) and BGTC:MM27 (C) or DOSP (D), DOSP:DOPE (E) or DOSP:MM27 (F) at a molar ratio of 1500. In each condition, cells were incubated 4 hours with the complexes





Figure 4 – Influence of BGTC- and DOSP-based delivery systems on the intracellular vectorization of anti K8antibody. Results are expressed as the mean percentage of 3 representative experiments  $\pm$  S.D.

#### Physico-chemical characterization of BGTC:DOPE/ β-Gal complexes.

We investigated the physicochemical properties of complexes resulting from the association of proteins and BGTC:DOPE liposomes at the macroscopic and microscopic levels. Colloidal stability of BGTC:DOPE/β -Gal complexes was assessed by size measurement using dynamic light scattering. Fig.5A shows that complexes formed in NaCl-HEPES buffer display a size increase for lipid/protein molar ratios over 100, reaching colloidal instability (mean diameter above 700nm). As the ratio increased over 1000, the mean diameter decreased, leading to colloidaly stable particles of 300nm for a MR of 1500. In these conditions, the whole protein was trapped into complexes as assessed by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Fig.5 B) where the free protein solely can migrate through the gel. Molar lipid/protein ratios above 200 resulted in aggregates that did not migrate out of the wells. Thus BGTC:DOPE led to the efficient complexation of the protein and to its compaction into colloidally stable particles at a MR of 1500.





Figure 5 – (A) Colloidal stability of lipid/  $\beta$ -gal complexes.  $\beta$ -gal was complexed with BGTC:DOPE at various molar ratios. The mean diameter of BGTC:DOPE/ $\beta$ -gal particles was measured by dynamic light scattering when lipoplexes were formulate in 140mM NaCl- 20mM HEPES pH 7.4. (B)Native-PAGE was used to assess the complexation of  $\beta$ -gal in NaCl-HEPES.



Figure 6 - Typical cryoTEM images of complexes of  $\beta$ -gal with BGTC:DOPE liposomes formulated in 120mM NaCl and 20mM HEPES pH 7.4 at various cationic lipid/protein ratios. (A-C) MR = 1500; (D-F) MR = 750; (G-I) MR = 375.  $\beta$ -gal interacted with lipid membrane inducing liposome aggregation and can form protein junction between two lipid membranes (black arrows). At MR = 375, surface of some liposome was coated with protein densities (white arrows). Scale bars 0.5  $\mu$ m (A, D, G) and 50nm (B, C, E, F, H, I)

To further understand the mechanism of action of BGTC liposomes for β-gal delivery, mixtures of liposomes and β-gal proteins at various ratios were analyzed by cryoTEM. Non complexed BGTC:DOPE liposomes are spherical unilamellar or oligolamellar vesicles with a mean diameter of 120nm (data not shown). For MR = 1500, a considerable aggregation of liposomes was observed revealing that β-gal proteins strongly interacted with liposomes (Fig.6 A-C). Liposomes kept their overall spherical shape. Lipid bilayers of liposomes at the periphery of aggregates appeared free of protein. The protein molecules were present within the aggregates and occasionally formed protein layer between two lipid membranes so called protein junctions (arrows). The thickness of this junction was about 10 nm. Given that β-gal molecule is a tetramer, it is likely that β-gal molecule exposed more than one binding site for liposome promoting contacts between two lipid membrane and then responsible of this liposome aggregation. To get a better analysis of β-gal organization at liposome surface, the lipid to protein ratio was decreased. At a ratio of 750, liposome aggregation appeared less important and protein junctions were more frequently encountered indicative of a larger amount of proteins bound to liposomes (Fig.6 D-F). At a ratio of 375, liposome aggregates were clearly less compact than that at higher ratio values (Fig.6 G-I). Some liposomes at the periphery of aggregates and isolated liposomes were decorated at their surfaces with proteins.



Figure 7 - Typical cryoTEM images of complexes of K8 antibody with DOSP:MM27. (A-B) DOSP:MM27 alone. (C-D) DOSP:MM27 mixed with anti-K8 antibody at a MR of 375. Scale bars 1µM (A-C) and 50nm (B-D).

We next investigated the structure of complexes formed by DOSP:MM27 and anti-K8 antibody. Cryo-TEM analysis showed that DOSP:MM27 was organized in 20 nm domains showing no evidence of an internal structure. These domains were aggregated to form clusters with a mean diameter of 1µm (Fig. 7 A-B). When mixed with anti-K8 antibody, it formed 1-2 µm lipoplexes consisting in aggregated spherical elements (Fig. 7C). At higher magnification, these spherical structures were seen as "onion-like" concentric multilamellar structures of 100-200 nm in diameter (Fig. 7D) bearing protein densities on their surfaces. These concentric structures appear to be devoid of proteins. The formation of such concentric structures was promoted by phosphate ions present in the buffer of this commercial antibody,

and not by the protein itself, as they were observed in DOSP:MM27 in the presence of 1 mM phosphate alone (data not shown).

#### Functional impact of anti K8-antibody delivery on F580del-CFTR trafficking

We investigated whether the intracellular delivery of antibodies directed against cytokeratin 8 could have an impact on F508del-CFTR trafficking. Indeed, it was previously shown that cytokeratin 8 is responsible of F508del-CFTR endoplasmic reticulum retention, resulting in a default of trafficking of this mutated channel towards the plasma membrane where it is partially functional (Davezac et al., 2004). Furthermore, disruption of the interaction between F508del-CFTR and cytokeratin network by pharmacological means or RNA interference leads to the restoration of its trafficking towards the plasma membrane (Lipecka et al., 2006; Colas et al., 2012). Consequently, we hypothesized that the delivery of an antibody directed against cytokeratin 8 could also disrupt this interaction and lead to the recovery of a cAMP-dependant anionic conductance through the plasma membrane of F508-del-CFTR expressing cells. MEQ fluorescence assay showed that WT-CFTR expressing HeLa cells treated with anti-cytokeratin 8 antibody display an intense cAMP-dependant anionic conductance (Figure 8 A) as shown by the rapid quenching of MEQ fluorescence under iodide perfusion after cAMP stimulation (Figure 8 B). Untreated cells displayed a similar behavior but a reduced fluorescence amplitude (data not shown). Contrarily, F508del-CFTR-expressing cells displayed a low anionic conductance independent of cAMP stimulation. After DOSP:MM27-mediated delivery of the antibody, these cells displayed a robust and rapid increase in MEQ fluorescence after cAMP stimulation, followed by a rapid quenching after iodide perfusion as shown of Figure 8 B, indicating the appearance of a cAMP-dependant anionic conductance at their plasma membranes and suggesting a partial restoration of F508del-CFTR channel trafficking towards the plasma membrane.

A



в



Figure 8 – Analysis of CFTR function after anti-cytokeratin 8 antibody delivery. (A) MEQ fluorescence assay on WT-CFTR-expressing HeLa cells treated with 1.5  $\mu$ g of antibody complexed with DOSP:MM27 at a MR of 1000 (triangles), untreated F508del-CFTR-expressing HeLa cells (diamonds) and F508del-CFTR-expressing HeLa cells treated with 1.5  $\mu$ g of antibody complexed with DOSP:MM27 at a MR of 1000 (circles). (B) Quenching slopes of MEQ fluorescence registered during 30s after cAMP stimulation and iodide perfusion.

#### Discussion

Intracellular protein delivery represents a powerful tool to investigate protein function after reaching intracellular targets, and can be a promising approach *in vivo* in the field of biotherapies. Furthermore, even if a protein has a limited lifetime into a cell due to its proteolysis and/or denaturation, it permits biological engineering without the use of nucleic acids which can integrate into chromosomes or trigger inflammation.

Various strategies have been developed to introduce proteins into living cells. Physical methods like micro-injection or electroporation may have deleterious effects on cells and are difficult to apply in vivo to an entire tissue or organ. Peptide-based methods relying on the use of protein transduction domains or cell-penetrating peptides are more promising approaches but they require the covalent linkage between the PTD sequence and the cargo (protein, siRNA or DNA). In the case of proteins, a step of genetic engineering is required to create a chimeric protein fused with the PTD, which can alter the structure and function of the cargo. Additionnally, these peptidic sequences are derived from viruses (HIV-TatP, VP22) or animals (Antennapedia) and may trigger immune reactions *in vivo*. Some have underlined the role of actin network and macropinocytosis in the transduction of HIV-TatP (Imamura et al., 2011; Suzuki, 2012) but the mechanism seems highly dependant on the PTD and on the nature of the cargo (van den Berg and Dowdy, 2011). Despite these limitations, PTD technology is already tested *in vivo* for clinical applications (Michiue et al., 2009; van Duijnhoven et al., 2011; Olson et al., 2009).

Cationic lipids are used for nucleic acids transfection since years, *in vitro* and *in vivo*, and several clinical trials are on progress to evaluate their therapeutic potential (Zhang et al., 2012). Their mechanism of action is well described in the case of nucleic acids and relies on the formation of complexes between the cargo and cationic liposomes, i.e. lipoplexes. These lipoplexes are adsorbed on cells via electrostatic interactions and are endocyted. The limiting step in nucleic acids transfection is the endosomal escape which must take place before the degradation of the cargo by lysosomal enzymes. This step is promoted in lipid-based formulation by compounds selected for their ability to disrupt the endosomal membrane, permitting the delivery of the cargo to the cytoplasm (Wasungu and Hoekstra, 2006). It is likely that in the case of protein delivery, the same mechanisms could be involved and the same barriers are to be overcome. In opposition to PTDs, cationic lipids do not require a fusion with the cargo (DNA, RNA or protein) since they are able to spontaneously form

supramolecular assemblies when mixed with the macromolecule to be delivered. Consequently, in the case of protein delivery the native protein can be delivered without modifications.

A forerunner study focused in 1974 on the interaction of sphingomyelin-cholesterolstearylamine liposomes containing horse radish peroxidase in cultured cells. The authors concluded that liposomes were adsorbed on the cells and that some were endocyted, but did not detect the release of the enzyme into cell cytoplasm, probably due to the lack of an endosomal escape-promoting molecule in the formulation (Magee et al., 1974). More recently, a study showed the possibility to regulate gene expression into living cells by the delivery of a transcription factor using DOTMA based liposomes. The purified peptide T7X556 derived from the rat glucocorticoid receptor was delivered into various cell lines including primary cells and was shown to accumulate into cell nuclei and to enhance the expression of a reporter gene (Debs et al., 1990). Surprisingly, these interesting findings do not seem to have been followed up immediately. A decade later, several lipid-based formulations were successively described to introduce proteins into living cells: reporter proteins and fluorescent antibodies (Zelphati et al., 2001; Dalkara et al., 2006; Weill et al., 2008a; Weill et al., 2008b) but also functionnal proteins, e.g. caspases and granzyme-B (Zelphati et al., 2001), cytotoxic protein saporin (Fretz et al., 2007), DNA methyltransferase MssI (van der Gun et al., 2007), lactoferricin's antimicrobial core (Richardson et al., 2009) or cytochrome-C (Kim et al., 2012)

Here, we choosed  $\beta$ -galactosidase as a model protein to identify lipidic compounds able to deliver a protein into living cells. The availability of a highly sensitive detection test and the possibility to observe its presence in cell cytoplasm by X-gal staining allowed us to perform a screening on a libary of cationic lipids. Furthermore, as its detection is based on its enzymatic activity, it is a convenient way to discover compounds able to deliver proteins without denaturating them, under their active conformation. If most of the cationic lipids we tested proved to be inefficient to deliver the enzyme into cultured HeLa cells, two molecules, DOSP and BGTC, were able to deliver a low but detectable amount (respectively 0.3 and 0.9 %) of the initial protein dose to the cells when they were used as micellar solutions. BGTC is a cholesterol-based lipid bearing two guanidinium polar headgroups (Vigneron et al., 1996) and DOSP is a fatty-acid-based molecule bearing a paromomycin headgroup (Desigaux et al., 2007; Mevel et al., 2012). These two compounds are commonly used for their high DNA and siRNA transfection potential and their lack of toxicity. In order to enhance their protein delivery activity, we formulated them as liposomal suspensions, combined with the neutral

lipid DOPE. We observed a dramatic increase of their activity, DOSP:DOPE and BGTC:DOPE leading to internalization efficiencies of 4.4% and 10% of the initial protein dose with more than 95% of cell viability. DOPE is commonly used in nucleic acids transfection reagents to promote endosomal membrane disruption (Zuhorn and Hoekstra, 2002; Barteau et al., 2008) and has also been used in protein delivery reagents (Dalkara et al., 2006; van der Gun et al., 2007; Richardson et al., 2009; Kim et al., 2012; Zelphati et al., 2001). It is likely that cationic lipids used alone led to the internalization of the protein by cells, followed by lysosomal degradation. Adding DOPE to the formulation seems to promote the delivery of the enzyme into the cytosol before fusion of endosomes with lysosomes. To verify that β-gal was delivered into the cytosol, we performed an X-gal staining of cells treated with BGTC:DOPE/B-gal lipoplexes. If after 15 minutes of incubation the enzymatic activity was mostly contained into punctuate structures through the cell, probably endosomes, after 4 hours of incubation β-gal was detectable throughout the cytosol of virtually all treated cells, indicating that it was released under its native conformation capable of catalytic activity, without being denatured by cationic lipids. Interestingly, β-gal activity was still detectable after 60 hours of incubation, indicated a prolonged release of the enzyme to the cells and/or a prolonged survival of the protein into the cytosol (data not shown).

It was also verified that BGTC:DOPE liposomes enable the delivery of  $\beta$ -gal into other cell lines than HeLa. The internalization efficiency was of 5-10% in mouse myoblast lineage C2C12 and in human non-small cell lung carcinoma H1299 and of 10-20% in Chinese hamster ovary lineage CHO-K1. These homogeneous results contrast with cationic lipidmediated DNA transfection efficiency in the same cell lines, where we observed that transgene expression levels after DNA delivery can differ of several magnitude orders (data not shown). It was previously observed that different cell lines internalize the same amounts of plasmid after lipofection, but that the transgene expression level is limited by the nuclear importation of the plasmids (James and Giorgio, 2000). This suggests that the internalization mechanism is similar between cationic lipid/nucleic acid and cationic lipid/protein complexes and that its efficiency is roughly the same among different cell lines;

Then we investigated the possibility to deliver into HeLa cells an antibody under its native conformation able to recognize its intracellular target. An FITC-tagged antibody directed against human cytokeratin 8 was vectorized using BGTC and DOSP, with or without DOPE. None of the conditons tested by varying the dose of protein and the molar ratio enabled the delivery of the antibody into the cytosol: punctuate FITC fluorescence indicated that

lipoplexes were trapped in endosomal system. Such a lack of efficiency for cationic lipidmediated antibody delivery was already observed in previous studies. The fatty-acid cationic derivative Saint-2 was used by van der Gun et al. to deliver β-gal, antibodies and the DNA methyltransferase M.SssI into various cell lines. Results showed that exogenous β-gal delivered by Saint2:DOPE was present through cell cytoplasm. The delivery of M.SssI led to changes in the methylation pattern of cells genomic DNA and to modification of gene expression, indicating that the delivered protein reached the nucleus and was active. The authors observed that antibodies delivered by Saint-2:DOPE were localized into the cell and also considered the delivery was successful (van der Gun et al., 2007). However, antibodies delivered by this mean were located into punctuate structures, independently of their targets, probably indicating a defect of endosomal escape of Saint2:DOPE/antibodies lipoplexes and suggesting that the efficacy of this delivery system is protein dependant. Facing the same issue, we choosed to enhance the endosomal escape step by using MM27, an imidazolebearing neutral lipid. It was previously reported that this compound is 100 fold more efficient than DOPE to promote DNA transfection (Billiet et al., 2012; Mevel et al., 2008). It was suggested that the amines of the imidazole headgroup, neutral at physiological pH, undergo protonation in acidic organelles, leading to endosomal membrane disruption by a proton sponge mechanism (Midoux et al., 2009). When we used BGTC:MM27 liposomes to deliver anti-K8 antibody into HeLa cells, we observed a labeling of the cytokeratin network only in 10% of the cells, showing a limited improvement compared to BGTC or BGTC:DOPE mediated antibody delivery. In contrast, DOSP:MM27 liposomes lead to the labeling of the cytokeratin network in 70% of the treated cells after 4 hours of incubation with lipolexes, a dramatic improvement compared to DOSP and DOSP:DOPE-mediated antibody delivery. The staining pattern observed in these cells was similar to that observed on fixed/permeabilized cells treated with the same antibody following a classical immunofluorescence protocol. Interestingly, the structure of cytokeratin network seemed more preserved when labeled by the delivered antibody than when using acetone/methanol permeabilization, probably because in the first case cells did not underwent dehydratation caused by methanol. If most of the cells were labeled only 4 hours after DOSP:MM27/antibody treatment, the cytoskeleton remained stained 24 hours after treatment, indicating a prolonged release of the antibody by lipoplexes. These findings indicate that in the case of protein delivery, the efficacy of the system greatly varies depending on the protein type, and that vectors have to be adapted to obtain an efficient delivery. This contrasts with DNA or RNA delivery which takes advantage of the universal structure of nucleic acids: independently of the nucleotidic sequence, nucleic acids present the

same structure and electrical charge, which is not the case of peptides and protein whose physicochemical parameters greatly vary.

We took advantage of the efficacy of the delivery of antibodies into living cells by DOSP:MM27 to investigate the ability of anti-cytokeratin 8 antibodies to disrupt the interaction between cytokeratin 8 and F508del-CFTR. This interaction has previously been shown to impair the trafficking of this mutated channel towards the plasma membrane where it is partially functional, leading to cystic fibrosis (Davezac et al., 2004; Lipecka et al., 2006; Colas et al., 2012). The evaluation of transmembrane anionic efflux by MEQ fluorescence measurement showed that the delivery of antibodies against cytokeratin 8 led to the restoration of a cAMP-dependant anionic conductance at the surface of F508del-CFTR expressing cells, which was absent in untreated cells but present in WT-CFTR expressing cells. These preliminary results have to be confirmed by other means but strongly suggest that antibody-mediated disruption of the interaction between cytokeratin 7 and F508del-CFTR can restore the trafficking of this mutated channel towards the plasma membrane, which could provide a new approach for the study ant future therapeutic strategies of such channelopathies.

Interestingly, we found that the optimal cationic lipid/protein ratios for protein delivery were between 1000 and 1500 independently of the nature of the protein. Dalkara et al. found that DOGS-mediated intracellular delivery of proteins was optimal with ratios corresponding to 4.7 DOGS molecules per square nanometer of protein surface (Dalkara et al., 2004). In the case of nucleic acid delivery, the key parameter is the charge ratio between the negative phosphates of the nucleic acid and the positive groups of the cationic lipid (Barteau et al., 2008). In the case of BGTC and DOSP-mediated protein delivery, we found no relation to explain the constant optimal ratio we observed, neither considering the protein surface nor considering the electric charge of the delivered protein (data not shown). We suppose that this optimal ratio of 1500 corresponds to a compromise between two unfavorable situations : for lower ratios, the protein densities coated at the surface of lipoplexes, as observed by cryo-TEM imaging, may prevent the fusion between endosomal membranes and cationic lipids, hampering endosomal escape and leading to the degradation of the protein by lysosomal enzymes. At higher ratios, toxic effects of the cationic lipid may have a negative impact on the delivery efficiency.

The colloidal stability of BGTC:DOPE/β-gal complexes assessed by dynamic light scattering showed that such complexes follow a three-zone model previously proposed for cationic lipid/nucleic acids complexes (Pitard et al., 1997). In the first zone of this model (MR under 100), the protein is in excess, probably leading to the formation of negatively charged complexes stabilized by electrostatic repulsion. Increasing the molar ratio over 100, leading to electric neutralization, increases the size of the complexes which become colloidally unstable and undergo aggregation, probably by hydrophobic interactions. For molar ratios above1000, cationic lipids in large excess promote electrostatic repulsion. At the optimal ratio of 1500, lipoplexes of 300nm in diameter are likely to efficiently sediment on cells and to enter into cells through endocytosis (Ross and Hui, 1999)

To get a better understanding of the properties of cationic lipid/protein lipoplexes, we performed cryo-TEM imaging of BGTC:DOPE/B-gal complexes. Our results show that BGTC:DOPE liposomes are spherical monolamellar or oligolamellar vesicles with an average diameter of 120 nm. Cryo-TEM observation indicates that the mixing of these liposomes with β-gal at a MR of 1500 promotes aggregation, resulting in large, globally spherical lipoplexes with a few membrane remodeling and protein junctions. The spanning across such protein junctions was of 10nm, compatible with the presence of a monolayer of βgal proteins whose thickness is 9nm, assuming that E. coli β-gal is a tetramer of 175 x 135 x 90 Å (Jacobson et al., 1994). Lowering the MR to increase lipid/protein interaction showed that β-gal was coated on the surface of liposomes. This seemed that protein density reached at liposome surface prevented liposome aggregation. It suggests then that liposome aggregation is mediated by protein-lipid membrane interactions and unlikely by protein-protein interactions. Interestingly, at this ratio, liposomes appeared also deformed revealing the capability of B-gal to induce membrane remodeling. Then it is likely that the binding of B-gal to BGTC liposomes is driven by electrostatic and Van der Waals interactions, the latter being responsible of membrane remodeling.

Next we investigated the supramolecular organization of DOSP:MM27/ antibodies complexes by cryo-TEM. DOSP:MM27 alone was organized in micrometer-sized clusters composed of smaller domains of 10nm with no evidence of an internal structure. When DOSP:MM27 was mixed with anti-K8 antibody, a deep reorganization of the supramolecular assembly occurred, showing clusters of onion-like structures bearing antibodies on their surface but apparently devoid of proteins. This organization was promoted by phosphates present in the commercial formulation of the antibody, and not by the antibody itself. Such a remodeling of cationic

lipids-based supramolecular structures, to form onion-like structures have already been described with cationic lipid/nucleic acids complexes: in this case concentric multilamellar structures consist in nucleic acid intercalated between two adjacent lipidic bilayers (Pitard et al., 1999). The presence of such assemblies devoid of proteins might play a role in MM27mediated endosomal escape, the large amount of MM27 into the lipoplexe offering a high buffering capacity. One can explain the lack of efficiency of DOSP:DOPE to promote endosomal escape of antibodies by the coating of proteins present at the surface of lipoplexes. Indeed, a tight contact between lipoplexe surface and endosomal membrane is essential to promote the mixing of lipids by flip-flops between the two bilayers, resulting in endosomal membrane destabilization and disruption (Xu and Szoka, Jr., 1996; Zuhorn and Hoekstra, 2002). A layer of proteins between the two lipidic membranes may prevent such lipid mixing. Contrarily, MM27-mediated endosomal escape is presumed to partially rely on a proton sponge mechanism. Protons are more likely to diffuse through a protein layer than large lipidic molecules, enabling the buffering of the endosome undergoing acidification and its swelling without needing a tight contact between the endosomal membrane and the lipoplexes.

To summarize, we describe here two efficient protein delivery systems based on cationic lipid able to deliver various proteins under their functional conformation in the cytosol of various cultured cell types. Our results indicate that, contrarily to nucleic acid transfection, vectors for protein delivery have to be adapted depending on the nature of the protein. Particularly, the endosomal escape of lipoplexes seems to be a crucial step in the delivery mechanism and has to be optimized for some proteins like antibodies. We propose here the use of a protonable helper lipid, instead of the fusogenic lipid DOPE commonly used, to circumvent problems due to the structure of lipoplexes preventing endosomal membrane disruption. Furthermore, our results suggest that the delivery of antibodies directed against an intracellular target involved in cystic fibrosis can lead to the restoration of F508del-CFTR traffick and function. Finally, by focusing on the physicochemical properties of such lipoplexes, we determined which parameters are crucial for an efficient delivery. Such findings should be useful to permit a rational design of cationic liposomes dedicated to the delivery of proteins into living cells.

#### Acknowledgements

The authors are very grateful to Philippe Hulin from the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for his technical expertise in cellular imaging. The authors are indebted to Jean-Marie Lehn and Pierre Lehn for their pioneer works related to the synthesis of BGTC and DOSP cationic lipids.

#### **Reference** List

Aviezer, D., Brill-Almon, E., Shaaltiel, Y., Hashmueli, S., Bartfeld, D., Mizrachi, S., Liberman, Y., Freeman, A., Zimran, A., and Galun, E. (2009). A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation. PLoS. One. 4, e4792.

Bange, J., Zwick, E., and Ullrich, A. (2001). Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. Nat. Med. 7, 548-552.

Barteau, B., Chevre, R., Letrou-Bonneval, E., Labas, R., Lambert, O., and Pitard, B. (2008). Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. Curr. Gene Ther. 8, 313-323.

Billiet,L., Gomez,J.P., Berchel,M., Jaffres,P.A., Le Gall,T., Montier,T., Bertrand,E., Cheradame,H., Guegan,P., Mevel,M., Pitard,B., Benvegnu,T., Lehn,P., Pichon,C., and Midoux,P. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. Biomaterials 33, 2980-2990.

Bliss, M. (1993). Rewriting medical history: Charles Best and the Banting and Best myth. J. Hist Med. Allied Sci. 48, 253-274.

Campbell,P.L., McCluskey,J., Yeo,J.P., and Toh,B.H. (1995). Electroporation of antibodies into mammalian cells. Methods Mol. Biol. 48, 83-92.

Colas, J., Faure, G., Saussereau, E., Trudel, S., Rabeh, W.M., Bitam, S., Guerrera, I.C., Fritsch, J., Sermet-Gaudelus, I., Davezac, N., Brouillard, F., Lukacs, G.L., Herrmann, H., Ollero, M., and Edelman, A. (2012). Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect. Hum. Mol. Genet. 21, 623-634.

Dalkara, D., Chandrashekhar, C., and Zuber, G. (2006). Intracellular protein delivery with a dimerizable amphiphile for improved complex stability and prolonged protein release in the cytoplasm of adherent cell lines. J. Control Release *116*, 353-359.

Dalkara, D., Zuber, G., and Behr, J.P. (2004). Intracytoplasmic delivery of anionic proteins. Mol. Ther. 9, 964-969.

Davezac, N., Tondelier, D., Lipecka, J., Fanen, P., Demaugre, F., Debski, J., Dadlez, M., Schrattenholz, A., Cahill, M.A., and Edelman, A. (2004). Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane. Proteomics. 4, 3833-3844.

Debs,R.J., Freedman,L.P., Edmunds,S., Gaensler,K.L., Duzgunes,N., and Yamamoto,K.R. (1990). Regulation of gene expression in vivo by liposome-mediated delivery of a purified transcription factor. J. Biol. Chem. 265, 10189-10192.

Desigaux, L., Sainlos, M., Lambert, O., Chevre, R., Letrou-Bonneval, E., Vigneron, J.P., Lehn, P., Lehn, J.M., and Pitard, B. (2007). Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 104, 16534-16539.

Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K., and Adamson, J.W. (1987). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. N. Engl. J. Med. 316, 73-78.

Fintini, D., Brufani, C., and Cappa, M. (2009). Profile of mecasermin for the long-term treatment of growth failure in children and adolescents with severe primary IGF-1 deficiency. Ther. Clin. Risk Manag. 5, 553-559.

Ford,K.G., Souberbielle,B.E., Darling,D., and Farzaneh,F. (2001). Protein transduction: an alternative to genetic intervention? Gene Ther. 8, 1-4.

Fretz, M.M., Hogset, A., Koning, G.A., Jiskoot, W., and Storm, G. (2007). Cytosolic delivery of liposomally targeted proteins induced by photochemical internalization. Pharm. Res. 24, 2040-2047.

Fuchs,H.J., Borowitz,D.S., Christiansen,D.H., Morris,E.M., Nash,M.L., Ramsey,B.W., Rosenstein,B.J., Smith,A.L., and Wohl,M.E. (1994). Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. N. Engl. J. Med. 331, 637-642.

Ho,A., Schwarze,S.R., Mermelstein,S.J., Waksman,G., and Dowdy,S.F. (2001). Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. Cancer Res. 61, 474-477.

Imamura, J., Suzuki, Y., Gonda, K., Roy, C.N., Gatanaga, H., Ohuchi, N., and Higuchi, H. (2011). Single particle tracking confirms that multivalent Tat protein transduction domain-induced heparan sulfate proteoglycan cross-linkage activates Rac1 for internalization. J. Biol. Chem. 286, 10581-10592.

Jacobson, R.H., Zhang, X.J., DuBose, R.F., and Matthews, B.W. (1994). Three-dimensional structure of beta-galactosidase from E. coli. Nature 369, 761-766.

James, M.B. and Giorgio, T.D. (2000). Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. Mol. Ther. 1, 339-346.

Jarver, P. and Langel, U. (2006). Cell-penetrating peptides -- a brief introduction. Biochim. Biophys. Acta 1758, 260-263.

Kim,S.K., Foote,M.B., and Huang,L. (2012). The targeted intracellular delivery of cytochrome C protein to tumors using lipid-apolipoprotein nanoparticles. Biomaterials 33, 3959-3966.

Laron,Z. (2011). Growth hormone therapy: emerging dilemmas. Pediatr. Endocrinol. Rev 8, 364-373.

Le Bihan, O., Chevre, R., Mornet, S., Garnier, B., Pitard, B., and Lambert, O. (2011). Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. Nucleic Acids Res 39, 1595-1609.

Lipecka, J., Norez, C., Bensalem, N., Baudouin-Legros, M., Planelles, G., Becq, F., Edelman, A., and Davezac, N. (2006). Rescue of DeltaF508-CFTR (cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator) by curcumin: involvement of the keratin 18 network. J. Pharmacol Exp. Ther. 317, 500-505.

Magee, W.E., Goff, C.W., Schoknecht, J., Smith, M.D., and Cherian, K. (1974). The interaction of cationic liposomes containing entrapped horseradish peroxidase with cells in culture. J. Cell Biol. 63, 492-504.

Maloney, D.G. (2012). Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. N. Engl. J. Med. 366, 2008-2016.

Mevel, M., Neveu, C., Goncalves, C., Yaouanc, J.J., Pichon, C., Jaffres, P.A., and Midoux, P. (2008). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. Chem. Commun. (Camb.) 3124-3126.

Mevel, M., Sainlos, M., Chatin, B., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Lambert, O., Vigneron, J.P., Lehn, P., Pitard, B., and Lehn, J.M. (2012). Paromomycin and neomycin B derived cationic lipids: synthesis and transfection studies. J. Control Release 158, 461-469.

Michiue, H., Eguchi, A., Scadeng, M., and Dowdy, S.F. (2009). Induction of in vivo synthetic lethal RNAi responses to treat glioblastoma. Cancer Biol. Ther. 8, 2306-2313.

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

Olson, E.S., Aguilera, T.A., Jiang, T., Ellies, L.G., Nguyen, Q.T., Wong, E.H., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (2009). In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. Integr. Biol. (Camb.) 1, 382-393.

Pitard, B., Aguerre, O., Airiau, M., Lachages, A.M., Boukhnikachvili, T., Byk, G., Dubertret, C., Herviou, C., Scherman, D., Mayaux, J.F., and Crouzet, J. (1997). Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 14412-14417.

Pitard,B., Bello-Roufai,M., Lambert,O., Richard,P., Desigaux,L., Fernandes,S., Lanctin,C., Pollard,H., Zeghal,M., Rescan,P.Y., and Escande,D. (2004). Negatively charged selfassembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. Nucleic Acids Res. 32, e159.

Pitard,B., Oudrhiri,N., Vigneron,J.P., Hauchecorne,M., Aguerre,O., Toury,R., Airiau,M., Ramasawmy,R., Scherman,D., Crouzet,J., Lehn,J.M., and Lehn,P. (1999). Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 2621-2626.

Riabowol,K.T., Vosatka,R.J., Ziff,E.B., Lamb,N.J., and Feramisco,J.R. (1988). Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. Mol. Cell Biol. 8, 1670-1676.

Richardson, A., de Antueno, R., Duncan, R., and Hoskin, D.W. (2009). Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells. Biochem. Biophys. Res Commun. 388, 736-741.

Ross, P.C. and Hui, S.W. (1999). Lipoplex size is a major determinant of in vitro lipofection efficiency. Gene Ther. 6, 651-659.

Suzuki, Y. (2012). Exploring transduction mechanisms of protein transduction domains (PTDs) in living cells utilizing single-quantum dot tracking (SQT) technology. Sensors. (Basel) 12, 549-572.

van den Berg,A. and Dowdy,S.F. (2011). Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. Curr. Opin. Biotechnol. 22, 888-893.

van der Gun,B.T., Monami,A., Laarmann,S., Rasko,T., Slaska-Kiss,K., Weinhold,E., Wasserkort,R., de Leij,L.F., Ruiters,M.H., Kiss,A., and McLaughlin,P.M. (2007). Serum insensitive, intranuclear protein delivery by the multipurpose cationic lipid SAINT-2. J. Control Release *123*, 228-238.

van Duijnhoven, S.M., Robillard, M.S., Nicolay, K., and Grull, H. (2011). Tumor targeting of MMP-2/9 activatable cell-penetrating imaging probes is caused by tumor-independent activation. J. Nucl. Med. 52, 279-286.

Vigneron, J.P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.C., Basseville, M., Lehn, P., and Lehn, J.M. (1996). Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93, 9682-9686.

Wasungu,L. and Hoekstra,D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. J. Control Release 116, 255-264.

Weill,C.O., Biri,S., Adib,A., and Erbacher,P. (2008a). A practical approach for intracellular protein delivery. Cytotechnology 56, 41-48.

Weill,C.O., Biri,S., and Erbacher,P. (2008b). Cationic lipid-mediated intracellular delivery of antibodies into live cells. Biotechniques 44, vii-vxi.

Xu,Y. and Szoka,F.C., Jr. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. Biochemistry 35, 5616-5623.

Ye,D., Xu,D., Singer,A.U., and Juliano,R.L. (2002). Evaluation of strategies for the intracellular delivery of proteins. Pharm. Res. 19, 1302-1309.

Yu,J., Vodyanik,M.A., Smuga-Otto,K., Antosiewicz-Bourget,J., Frane,J.L., Tian,S., Nie,J., Jonsdottir,G.A., Ruotti,V., Stewart,R., Slukvin,I.I., and Thomson,J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 318, 1917-1920.

Zelphati,O., Wang,Y., Kitada,S., Reed,J.C., Felgner,P.L., and Corbeil,J. (2001). Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. J. Biol. Chem. 276, 35103-35110.

Zhang, X.X., McIntosh, T.J., and Grinstaff, M.W. (2012). Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. Biochimie 94, 42-58.

Zuhorn, LS. and Hoekstra, D. (2002). On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? J. Membr. Biol. 189, 167-179.

# **Publication 2**

DNA nanocarriers for systemic administration - characterisation and in vivo

bioimaging in healthy mice

# DNA NANOCARRIERS FOR SYSTEMIC ADMINISTRATION -CHARACTERISATION AND *IN VIVO* BIOIMAGING IN HEALTHY MICE

Dr. Stephanie David<sup>1,2,3</sup>, Prof. Catherine Passirani<sup>1,2,\*</sup>, Nathalie Carmoy<sup>5,6</sup>, Dr. Marie Morille<sup>1,2</sup>, Dr. Mathieu Mevel<sup>3</sup>, Benoit Chatin<sup>3</sup>, Prof. Jean-Pierre Benoit<sup>1,2</sup>, Dr. Tristan Montier<sup>5,6,7</sup>, Dr. Bruno Pitard<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup>LUNAM – Université d'Angers, F-49933 Angers, France

<sup>2</sup>INSERM – U1066, Micro et nanomédecines biomimétiques, F-49933 Angers, France

<sup>3</sup>INSERM UMR1087 – Université de Nantes, 8 quai Moncousu, F-44000 Nantes, France

<sup>4</sup>IN-CELL-ART, 1 place Alexis Ricordeau, F-44000 Nantes, France

<sup>5</sup>INSERM U1078, IFR 148 ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, 46 rue Felix Le Dantec, CS51819, 29218 Brest Cedex 02, France

<sup>6</sup>*Plateforme SynNanoVect, IFR 148 ScInBioS, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, Brest, France* 

<sup>7</sup>DUMG Brest – CHRU de Brest, 5 avenue du Maréchal Foch, F-29200 Brest, France

\*Correspondence should be addressed to C.P. (<u>catherine.passirani@univ-angers.fr</u>) or B.P. (<u>bruno.pitard@nantes.inserm.fr</u>)

**C. Passirani**: Inserm U1066, IBS-CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France, Tel.: +33 244 688534, Fax: +33 244 688546

**B. Pitard**: Inserm U1087, Institut du Thorax, IRT-UN Université de Nantes, 8 quai Moncousu, F-44000 Nantes, France, Tel: +33 228 080128, Fax: +33 228 080130

#### Abstract

We hereby present different DNA nanocarriers consisting of new multimodular systems (MMS), containing the cationic lipid dioleylaminesuccinylparomomycin (DNA MMS DOSP), or bis (guanidinium)-tren-cholesterol (DNA MMS BGTC), and DNA lipid nanocapsules (DNA LNCs). Active targeting of the asialoglycoprotein receptor using galactose as a ligand for DNA MMS (GAL DNA MMS) and passive targeting using a PEG coating for DNA LNCs (PEG DNA LNCs) should improve the properties of these DNA nanocarriers. All systems were characterised via physico-chemical methods and the DNA payload of DNA LNCs was quantified for the first time. Afterwards, their biodistribution in healthy mice was analysed after encapsulation of a fluorescent dye via *in vivo* biofluorescence imaging, revealing various distribution profiles depending on the cationic lipid used and their surface characteristics. Furthermore, the two vectors with the best prolonged circulation profile were administered twice in healthy mice revealing that the new DNA MMS DOSP vectors showed no toxicity and the same distribution profile for both injections, contrary to PEG DNA LNCs which showed a rapid clearance after the second injection, certainly due to the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon.

## Keywords:

Lipid nanocapsules; multimodular systems; repeated administration; targeting; ABC phenomenon

# INTRODUCTION

Gene therapy is an emerging technology that aims to permanently or temporarily correct a gene defect by the intracellular delivery of nucleic acids [1]. Gene defects can either arise during cell division processes or be due to external agents (such as UV or other radiation, chemical substances). The introduction of a plasmid DNA, encoding the native form of the gene can be a way to conquer these gene defects. Since naked plasmid DNA is quickly degraded by blood nucleases and in general shows no relevant therapeutic effects when administered systemically [1], vectors are necessary to transport plasmid DNA into the cell nucleus. In general, as with any drug, gene transfer complexes must reach their intended site of action to induce therapeutic effects, but this can be compromised through unspecific interactions, especially if they are frequently re-administrated. Consequently, one basic challenge for non-viral gene therapy is to develop an approach that delivers a therapeutic gene into selected cells. With this aim in mind, two different types of promising nanocarriers were developed in our laboratories: lipid nanocapsules (DNA LNCs) and multimodular systems (DNA MMS). DNA LNCs consist of a lipophilic lipid core, containing a mixture of triglycerides and polyglyceryl-6 dioleate surrounded by a shell composed of free polyethylene glycol (PEG) and hydroxystearate-PEG (HS-PEG) [2]. To encapsulate hydrophilic DNA in the lipophilic lipid core, the first step consists of complexing the anionic DNA with cationic lipids, to form lipoplexes which are then introduced into the formulation process of DNA LNCs, based on phase-inversions of an emulsion [3]. DNA LNCs encapsulating a luciferasecoding plasmid DNA proved their transfection efficacy in vitro [4] and, after surface-coating with DSPE-PEG<sub>2000</sub> chains forming PEG DNA LNCs, prolonged their circulation in the blood and their transfection efficacy in vivo in a tumour model [5, 6]. DNA MMS also exhibit a dual structure: a core composed of lipoplexes and an external corona of steric stabilisers capable of carrying the ligands necessary for active targeting. The first DNA MMS that were developed consisted of the cholesterol derivate BGTC (bis-guanidinium-tren-cholesterol) as a cationic lipid, the plasmid pCMV luciferase, and the steric stabiliser F108 (a block copolymer of PEO and PPO), with or without galactose as a ligand. They had already been tested *in vitro* on primary hepatocytes [7] and demonstrated a specific transfection for galactosylated DNA MMS due to the recognition of the galactose ligands by asialoglycoprotein receptors, present on hepatocytes.

With the aim of developing new, efficient non-viral DNA nanocarriers, new MMS containing the aminoglycoside derivate DOSP (dioleylsuccinylparomomycin) were developed and compared to the already *in vitro*-tested DNA MMS BGTC. In parallel, the DNA payload in DNA LNCs was for the first time quantified and localised. Afterwards, both DNA MMs, in the presence and absence of galactose, as well as DNA LNCs and PEG DNA LNCs, were injected for the first time via intravenous injection into healthy mice and their different biodistribution and kinetics were explored, *via* non-invasive *in vivo* biofluorescence imaging (BFI) [8]. Finally, PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP, the DNA nanocarriers with the longest circulation time, were tested for repeated administration since in future therapeutic applications multiple injections can be envisaged to improve the effect of the plasmid DNA.

# RESULTS

# **DNA** nanocarrier characterisation

#### DNA MMS DOSP – new multimodular systems for systemic administration

Similar to DNA MMS BGTC, new DNA MMS containing the cationic lipid DOSP were developed. They can be recovered with galactose in order to target the asialoglycoprotein receptors in future applications directed to the liver. To determine their colloidal stability [9],

electrophoresis experiments (Fig. 1a), size measurements (Fig. 1b) and fluorescence measurements (data not shown) of DOSP/DOPE/DNA lipoplexes were performed at different charge ratios (CR), defined as the ratio of the cationic lipid charge to the anionic nucleic acid charge (+/-) [10]. Three zones of colloidal stability A (CR < 2), B (CR 2 – 5) and C (CR > 5) were determined with a complete complexation of the nucleic acids at CR  $\geq$  2 indicated by low fluorescence intensities in electrophoresis experiments and fluorescence measurements (data not shown). As a consequence, CR 2 was chosen, but lipoplexes at this CR rate had an increased size and were colloidally unstable. To prevent their aggregation due to their neutral surface charge, the polymer F108 was added to reduce efficiently their size (final size about 100 - 130nm, Fig. 1c). Additionally, for all F108/DNA ratios tested, no fluorescence signal was detected in electrophoresis experiments thus indicating no dissociation of the lipoplexes (Fig. 1d). In view of these results, and in accordance with DNA MMS BGTC, the F108/DNA and F108-gal/DNA ratio of 300 (w/w) was chosen.

## DNA LNCs – quantification of the DNA payload

To check DNA complexation (lipoplexes) or encapsulation (DNA LNCs) and to confirm that the purification and that the post-insertion process did not modify the DNA encapsulation in PEG DNA LNCs, gel electrophoresis experiments were performed. When LNCs were intact, only very low fluorescence signals were detected for both types of LNCs, indicating neither a loss of DNA nor the liberation of DNA from the DNA LNCs (Fig. 2a). In contrast, after LNC destruction with Triton, an intense fluorescence signal was observed in both cases. Afterwards, the DNA localisation (lipoplexes versus LNCs) was determined using a newlydeveloped quantitative method based on chloroform extraction and subsequent UV spectroscopy analysis at 260nm. Our hypothesis is that DNA could be potentially localised in four different compartments of the formulation (Fig. 2b): (1) free DNA molecules, (2) DNA molecules in lipoplexes outside LNCs, (3) lipoplexes encapsulated in LNCs, and (4) DNA molecules encapsulated in LNCs dissociated from cationic lipids. DNA quantification, before purification or postinsertion (Table 1), revealed about 16% of free DNA molecules, corresponding to a small line of fluorescence at gel electrophoresis experiments, about 65% in lipoplexes outside DNA LNCs and up to 22% of DNA encapsulated in LNCs, whereas the major part was dissociated from cationic lipids (21% versus 1%). The experimental DNA payload was about 0.07% compared to the theoretical DNA payload of 0.29%. To eliminate free DNA, DNA LNCs were purified by gel chromatography before being coated with PEG and use for *in vivo* experiments. Due to the similar size between DNA LNCs and DNA lipoplexes, we hypothesized that these last particles were not totally eliminated by chromatography columns. Consequently, DNA LNCs or PEG DNA LNCs used for the different experiments likely corresponded to a mixture of DNA lipoplexes and LNC. To ensure the homogen composition from batch to batch, all preparations were characterised by physico-chemical methods before use for further experiments.

# Physico-chemical characterisation of the different DNA nanocarriers

The lipoplex composition used for DNA LNCs, PEG DNA LNCs, DNA MMS BGTC, GAL DNA MMS BGTC and the newly developed DNA MMS DOSP and GAL DNA MMS DOSP, as well as the polymer/DNA ratios used for *in vivo* experiments are listed in Table 2. The plasmid luciferase was initially chosen as a model because it can be quantified quite easily. Before using these DNA nanocarriers for *in vivo* experiments, they were characterised by size and zeta potential measurements (Table 2). DNA LNCs had a size of 114nm with a PDI of 0.3 and a positive zeta potential of +27mV. Coating the surface with DSPE-PEG<sub>2000</sub> resulted in a size of 132nm and a negative zeta potential of -17mV due to dipolar interactions of PEG with water as previously described [11]. DNA MMS showed sizes of 150nm (BGTC) and 200nm (DOSP) with a polydispersity index (PDI) of 0.4. The addition of galactose resulted in a size

of 300nm for GAL DNA MMS BGTC, which agrees well with previous results [7], and resulted in a size of 150nm for GAL DNA MMS DOSP with a PDI of 0.5 and unchanged neutral zeta potentials.

# In vivo biofluorescence imaging in healthy animals

#### Biodistribution after one systemic administration

For in vivo experiments, nude mice were chosen to avoid hair autofluorescence, to facilitate observations by in vivo biofluorescence imaging (BFI) [12], and to compare the results with those previously obtained on different tumour models [5, 6, 13]. To follow the DNA nanocarriers via BFI, we used as in a previously reported study [5] the fluorescent dye DiD (a near-infrared fluorophore used to avoid the autofluorescence wave length emitted by animals) encapsulated in the different DNA nanocarriers and images were taken 1, 3, 5 and 24h after systemic administration (Fig. 3) from lateral and decubitus dorsal views. Different regions of interest were selected to quantify the fluorescence intensities: (1) the abdominal region, including liver and bladder, (2) bladder, (3) liver and (4) lungs (Fig. 4). The DNA MMS BGTC and GAL DNA MMS BGTC were rapidly accumulated in the liver. This accumulation persisted during the whole observation period and was similar for both DNA nanocarriers. The fluorescence intensities in the liver were three to four times that in the bladder and about two times that in the lungs- DNA MMS DOSP showed an accumulation in the liver, but to a lesser extent than for DNA MMS BGTC. A fluorescence signal was also observed in the urinary system, and in the lungs during the whole period with similar intensities in liver, lungs and bladder. Interstingly, DNA MMS DOSP had an increased circulation time compared to the other DNA MMS tested, with fluorescence signals four to five times higher than for GAL DNA MMS DOSP and an increase at 24h. The addition of galactose ligands to these systems

provided an accentuated accumulation in the liver with less accumulation in the urinary system and the lungs than for DNA MMS DOSP. The fluorescence intensities in the liver were two times that in the bladder and about one and a third that of the lungs. DNA LNCs showed a wide degree of distribution 1h after intravenous administration, with fluorescence intensities in the liver and the lungs about two times that in the bladder. Afterwards, an rapid and important decrease of the fluorescence signal was observed as the signal was divided by two at 3h compared to 1h. The addition of long DSPE-PEG chains augmented the circulation time up to 5h after administration with a maximal signal at 3h and showed a wide distribution in the whole body as with DNA LNCs at 1h. However, 24h after their administration, no fluorescence was detected on the images as the fluorescence signal was only about 60% of the initial signal, indicating the elimination of these systems.

#### Biodistribution after repeated administration

As the repeated administration of these systems could be envisaged in a treatment context (chronic disease), the two systems with the longest circulation profile (PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP) were followed *via* BFI after two intravenous injections administered at time intervals of one week (Fig. 4d and 5). Images of the first injection have already been described in the previous section. After the second injection of DNA MMS DOSP, the biodistribution profile was similar to the first one, represented by a prolonged circulation time and an increase of the fluorescence signal at 24h. However, the fluorescence signal in the liver and in the lungs were, that time, twice that in the bladder, like for DNA LNCs. The biodistribution profile for the PEG DNA LNCs after the second injection showed a reduced circulation time and a similar profile to DNA LNCs, with wide distribution in the whole body one hour after administration. In contrast, an augmentation of the signal in the lungs and the

liver to 2.5 times that in the bladder after the second injection and a high level of intolerance to PEG DNA LNCs after the second injection were observed.

## Hepatotoxicity of PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP

To determine the hepatotoxicity of PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP, blood samples were collected regularly during the observation period and the enzyme activity of ALAT (alanine aminotransferase) and ASAT (aspartate aminotransferase) were quantified (Fig. 5) indicating a hepato-toxicity when both ALAT values, specific to the liver, and ASAT values, also found in other organs and tissues, were increased. For the group receiving PEG DNA LNCs, ASAT and ALAT values showed a slight increase 24h after the first injection. These values increased again, but to a lesser extent, 24h after the second injection. However, these values are near to the values obtained for the control group (without nanocarrier injection). ASAT and ALAT values for the mice receiving DNA MMS DOSP, showed nearly the same profile as the ASAT and ALAT values for the control group indicating no hepatotoxicity of these DNA MMS.

# Fluorescence accumulation and luciferase quantification in different organs 24h after i.v. injection

Twenty four hours after the last administration of DNA nanocarriers (two administrations for PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP, one administration for DNA LNCs, DNA MMS BGTC, GAL DNA MMS BGTC and GAL DNA MMS DOSP, and no injection for the control group), the animals were sacrificed and the fluorescence localisation was determined in different organs (liver, lungs, kidneys, spleen and heart) to confirm BF images since BFI is affected by tissue depth [8] (Fig. 6). For all DNA nanocarriers, the major intensity was

observed in the liver, followed by some fluorescence in the lungs and almost no fluorescence intensity in the heart, the spleen and the kidneys. In mice receiving the two injections, the luciferase expression was also quantified but revealed little luciferase expression (less than 2RLU/mg proteins) (data not shown).

# DISCUSSION

New MMS containing the lipids DOSP/DOPE were developed showing comparable physicochemical characteristics as previously described for DNA MMS BGTC. In parallel, DNA was quantified and localised for the first time using a method based on chloroform extraction and spectroscopy analysis and revealed about 22% of DNA being encapsulated in LNCs. The major part of this DNA was dissociated from cationic lipids, certainly due to a rearrangement of the different lipids around the nucleic acids during the formulation process, since lipoplexes with an initial size of about 400nm were encapsulated in DNA LNCs presenting a size of about 100nm [2]. However, a large part of the DNA was still complexed in lipoplexes outside DNA LNCs which remained in the formulation even after the purification step, carried out to eliminate the excess of free components, since they both have similar sizes. This was also confirmed by electrophoresis analysis that, showed similar fluorescence intensities for DNA LNCs (before the purification step) and PEG DNA LNCs (after the purification step) (Fig. 2a). Most of these (PEG) DNA LNCs and DNA MMS, developed in our laboratories, presented appropriated characteristics for systemic administration.

*In vivo* biofluorescence imaging (BFI), a fast, simple and relatively low-cost technique [14], was used to determine the biodistribution profiles of the DNA nanocarriers in healthy mice. With this aim in mind, the fluorescent tracer, DiD, which is not soluble in water and is known to be prone to aggregation and auto-quenching in aqueous buffer [15], was encapsulated in

DNA nanocarriers, which mimicked an "organic-like" medium, and thus improved its optical properties. However, the fluorescence intensity is not an absolutely quantitative method and depends on the tissue observed and its localisation [16]. Furthermore, the quantity of DiD was not equal in all systems, but quantities in DNA MMS with the different lipids and ligands were equal, so they could be compared on the one side, and quantities in DNA LNCs and PEG DNA LNCs on the other side, were also equal and could thus also be compared with each other. Each DNA nanocarrier showed a specific biodistribution profile in function of its composition. DNA MMS composed of the cationic lipid BGTC had a short circulation time and accumulated preferentially in the liver whereas DNA MMS composed of the cationic lipid DOSP favoured prolonged circulation time, as evidenced by a clear visible accumulation up to 24 hours after the first injection. The addition of the ligand galactose to both systems resulted in an accumulation in the liver. This phenomenon is certainly due to the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) situated on hepatocytes which recognises terminal, galactose-bearing asialoglycoproteins and favours the specific internalisation of galactosecontaining systems [7, 17, 18]. DNA LNCs showed wide distribution but a short circulation time which could be increased by being coated with DSPE-PEG chains, as has also been seen previously on different tumour models [5, 6, 13].

Afterwards, the DNA MMS DOSP and PEG DNA LNC systems which had the longest circulation times were chosen for repeated administration on healthy animals. DNA MMS DOSP showed no hepatotoxicity and similar biodistribution profiles for both injections. Interestingly, the fluorescence signal of these systems augmented, contrary to that of the other systems, at 24h for both injections. This could be due to a re-distribution or re-metabolisation of the labeled lipid, but as it was only observed with these systems, it is likely that this phenomenon could be attributed to the DNA complexes rather than the tracer itself. In

contrast, PEG DNA LNCs were rapidly eliminated and showed an augmented intolerance on healthy mice after the second injection. The elimination process is probably due by the MPS system [5], as these DNA nanocarriers are too big for renal elimination. The fluorescence signal observed in the bladder is likely due to the tracer (alone or in association with the cationic lipids from the lipoplex/LNC mixture). Mice presented signs of paralysis at their extremities and difficulty in breathing, typical of a shock response, to the point of rapid mortality within 10 to 30 minutes after the injection of some animals. This could be due to the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon of the PEGylated carriers in combination with their inflammatory payload (plasmid DNA) and the use of athymic (nude) mice. This phenomenon has already been reported in the literature [19-21] but is still not fully elucidated. Two distinct phases can be determined in this phenomenon [22, 23]. (1) The induction phase following the first injection, where liposomes, or in our case PEG DNA LNCs, bind and cross-link surface immunoglobulin on PEG-reactive B-cells [24], inducing the production of anti-PEG IgM and (2) the effectuation phase following the second injection, whereas on the one hand, the DNA payload is internalised followed by B-cell stimulatory pathway activation, such as TLR 9 [25] and on the other hand, accessory cells are induced to produce cytokines, independent of T cell help [25-27] followed by the rapid clearance of the PEGylated carriers from the bloodstream, mainly by Kupffer cells in the liver. The severe reactions observed here, including the death of some mice, could be due to the non-regulation of the immune response due to the use of nude (athymic) mice [21, 28, 29], but the regulation is complex and needs further investigations to be fully understood.

For the long-circulating systems, PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP, no luciferase or very low expression could be detected 24h after the last injection in any organ although fluorescence was observed in the liver. This is in good agreement with our objectif to
transfect only deficient cells and no healthy cells. To obtain transfection, a targeting strategy is necessary as was observed in other *in vivo* studies with grafted tumours after i.v. injection of PEG DNA LNCs (passive targeting) [6] and GAL DNA MMS DOSP (active targeting) (David et al., submitted manuscript). The absence of transfection in the physiological liver, observed here, could suggest that the number of hepatocytes transfected by nanoparticles compared to the total number of hepatocytes is not sufficient to produce enough luciferase to be detected. In contrast, by using targeting strategies, as was done in the other studies, accumulated doses were probably greater which should led to more efficient transfection. For PEG DNA LNCs, an important point for the absence of luciferase expression is certainly the rapid clearance of these DNA nanocarriers after the second injection due to the ABC phenomenon. For the future, there are different possibilities to diminish this immunogenic response by considering the time interval between the different injections [20, 30], the lipid composition of the PEG component [20, 31], the sequence of the pDNA [21] and/or the animals [19] used.

In summary, we have presented here various DNA nanocarriers for systemic administration with appropriate physico-chemical properties and different biodistribution profiles depending on their lipid and surface composition. These DNA nanocarriers represent a promising tool for various applications such as tumour targeting or hepatocyte targeting. Furthermore, this platform can easily be complemented using other lipids and/or ligands.

# **MATERIALS AND METHODS**

## **DNA** nanocarrier preparations

All DNA nanocarriers used were based on lipoplex formation prepared by adding equal volumes of DNA plasmid (pgWIZ<sup>TM</sup>-luciferase (Gene Therapy systems, Inc., San Diego, CA USA)) and liposomes in a defined charge ratio of cationic lipid charge and anionic DNA charge to obtain a final DNA concentration of 0.25g/l for DNA MMS or 0.825g/l for DNA LNCs. NaCl was added during preparation, to obtain a final concentration of 0.15M. Lipoplexes were incubated for 20min at room temperature before use. For liposome preparation a cationic lipid DOSP (dioleylamin-succinylparomomycin) (synthesis previously described in [32]), BGTC (bis(guanidinium)-tris(2-aminoethyl)amine-cholesterol) (synthesis previously described in [33]) or DOTAP (1.2-dioleyl-3-trimethylammoniumpropane) (Avanti® Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) was weighted with the neutral lipid DOPE (1.2-dioleyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) (Avanti® Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) at the ratios 1/1, 3/2 and 1/1 (M/M) respectively to obtain a final concentration of 20mM of cationic lipid charge (considering the number of positive charges per molecule: 4 for DOSP, 2 for BGTC and 1 for DOTAP), and solubilised in chloroform. Chloroform was then evaporated under vacuum to obtain a homogeneous lipid film which was hydrated with deionised water overnight at 4°C. The next day, liposomes were sonicated and size measurement was performed before use. To prepare DNA MMS for BFI, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD, em. = 644nm; exc. = 665nm) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was added to the lipids prior to lipid film preparation and the steric stabilisers F108 (80% poly(ethylene oxide), MW 14600, generously provided by BASF) or F108-gal (synthesis previously described in [7]) were added to DOSP/DOPE or BGTC/DOPE liposomes prior tolipoplex preparation. To obtain fluorescent DNA LNCs for BFI, DOTAP/DOPE/DNA lipoplexes (CR = 5), corresponding to 78.9% (w/w), were added to 9.9% (w/w) lipophilic Labrafac® WL 1349 (Gatefossé S.A., Saint-Priest, France) mixed with DiD as described in [34], 3.9% (w/w) oleic Plurol® (Polyglyceryl-6 dioleate) which was kindly provided by Gatefossé S.A. (Saint-Priest, France), 1.4% (w/w) NaCl (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France), and 5.9% (w/w) Solutol® HS-15 (BASF, Ludwigshafen, Germany) [3]. Briefly, after mixing all the components, temperature-cycles around the phaseinversion-temperature (PIT) were performed under magnetic stirring. Later, ice cooled water (obtained from a Milli-Q-plus® system, Millipore, Paris, France) was added (at a ratio of1:1.96) to dilute the obtained microemulsion and form LNCs. To eliminate free components, DNA LNCs were purified, using PD10 Sephadex columns (Amersham Biosciences Europe, Orsay, France), ultrafiltrated with MilliporeAmicon® Ultra-15 centrifugal filter devices (Millipore, St Quentin-Yvelines, France) and then the salt- and LNCconcentrations were readjusted to obtain a physiologic concentration of NaCl (150mM) and the initial concentration of LNCs (152g/l) [2]. PEG DNA LNCs with a final polymer concentration of 10mM were obtained by a post-insertion process which consisted of mixing purified DNA **LNCs** with DSPE-mPEG<sub>2000</sub> (1,2-DiStearoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000], Mean Molecular Weight (MMW) = 2,805g/mol, Avanti Polar Lipids, Inc, Alabaster, USA), and an incubation for 4h at 30°C by vortexing every 15 minutes [5].

### **DNA** nanocarrier characterisation

### Size and zeta potential measurements

Size measurements for DNA MMS DOSP development described in the first section of the results were performed using a Malvern Zetasizer 300HSA (Malvern Instruments S.A.,

Worcestershire, UK) with a dilution of 4:100 in 0.15M NaCl. Size and zeta potential measurements for DNA nanocarrier characterisation were performed using a Malvern Zetasizer® (Nano Series ZS, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) at 25°C, in triplicate after dilution at a ratio of 1:100 with deionised water for DNA LNCs or at a ratio of 4:100 with 0.15M NaCl for DNA MMS DOSP.

### Agarose gel electrophoresis

Sample preparation for electrophoresis experiments with the aim of DNA MMS DOSP development, described in the first section of the results, was performed by mixing complexes with Orange Blue loading dye (Promega, Madison, WI, USA). In contrast, a sample preparation for electrophoresis experiments with (PEG) DNA LNC formulations was performed as previously described [2]. Briefly, a treatment with Triton® X100 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) was performed to destroy a volume of LNCs equivalent to 0.2µg of DNA and samples with or without treatment were mixed with gel-loading solution (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). In both cases the prepared samples were then deposited on 1% agarose gel containing ethidium bromide (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) to migrate for about 30 min. at 100V.

### DNA quantification in DNA LNCs

To analyse the free and encapsulated DNA quantity in DNA LNCs, a volume of DNA LNCs was mixed with four volumes water (obtained from a Milli-Q-plus® system, Millipore, Paris, France) and one volume of chloroform, vortexed and immediately centrifuged for 15 min. at 12,600rpm at 4°C. The aqueous phase, containing free DNA, was removed and analysed with a UV spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Instruments, Munic, Germany) at 260nm. The volume removed for quantifying the free DNA was replaced by pure ethanol, to liberate

the DNA encapsulated in the DNA LNCs, and 6 volumes of water were added before vortexing and immediately centrifuging a second time for 15 min. at 12,600rpm at 4°C. The aqueous phase, containing the liberated DNA from DNA LNCs, was removed and analysed as previously with a UV spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Instruments, Munic, Germany) at 260nm. To analyse the DNA quantity complexed with cationic lipids inside or outside the DNA LNCs, the same procedure was used, but water was replaced by 1M of NaOH to dissociate the lipoplexes. The first aqueous phase contained the DNA liberated from lipoplexes outside DNA LNCs; the second aqueous phase contained the DNA liberated from lipoplexes inside DNA LNCs. The DNA quantity was calculated using a calibrating curve with different DNA concentrations and compared to the total DNA amount encapsulated in theory in DNA LNCs.

### In vivo experiments

### DNA nanocarrier administration

Six- to nine-week-old female, nude SWISS mice (Charles River, France) were housed and maintained at the University animal facility; they were processed in accordance with the Laboratory Animal Care Guidelines (NIH Publication 85-23, revised 1985) and with the agreement of the regional veterinary services (authorisation FR; 29-024). The different nanocarriers were injected at volumes of 150µl for DNA LNCs and PEG DNA LNCs, and 200µl for DNA MMS, by intravenous injection into the tail vein of the mice. Animals receiving PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP were injected twice at a time interval of 1 week between the two injections. The animals were sacrificed 24h after the last intravenous injection.

### In vivo biofluorescence imaging

To follow the biodistribution of the different nanocarriers, non-invasive fluorescent imaging (BFI) was performed 1, 3, 5, and 24h post-injection as described before on two animals per group[13]. Briefly, the BFI system of the NightOWL II (Berthold Technologies, Germany) equipped with a cooled, slow-scan CCD camera and driven with the WinLight 32 software (Berthold Technology, Germany) was used, using the 590nm excitation and 655nm emission filters. Each mouse was anaesthetised with isoflurane during the acquisition time (3 seconds for one fluorescent acquisition). The fluorescent signal was then quantified or overlaid on a picture of each mouse.

# Fluorescence and luciferase quantification in different organs

24h after the last DNA nanocarrier injection, animals were sacrificed and the heart, lungs, spleen, liver and kidneys were dissected. Organs from animals receiving no or one DNA nanocarrier injection (two animals per group) and organs from half of the animals receiving two DNA nanocarrier injections (three animals for the PEG DNA LNCs group and 4 animals for the DNA MMS DOSP group) were immediately placed in the BFI-system and biofluorescence images were taken using the same settings as for the whole animals. Organs from the other half of the animals receiving two injections (4 animals for the PEG DNA LNCs group and 5 animals for the DNA MMS DOSP group) were placed in tubes with PLB 1x (Passive Lysis Buffer, Promega France, Lyon, France) and shred with the gentleMACS Dissociator for luciferase quantification. Tubes were centrifuged for 10min. at 1,150g at 4°C and the upper phase was transferred into Eppendorf tubes. After another centrifugation of 10 min. at 20,000g at 4°C, 25µl of the upper phase was placed, in triplicate, in a white, 96-well

plate and the quantification with the luciferin reagent (Promega France, Lyon, France) was performed with the MLX luminometer plate reader (Dynex, Guyancourt, France).

### ALAT – ASAT determination

Blood samples were collected from the lateral saphenous vein as described in [35] from animals receiving no injections (n = 4), PEG DNA LNCs (n = 9) and DNA MMS DOSP (n = 9). Blood was collected once a day during the analysing period on different animals (two untreated animals and 5 treated animals per day) to prevent a too great loss of blood, and were collected in Microvette® collection tubes (Sarstedt, Numbrecht, Germany). Afterwards, the samples were centrifuged for 2 min. at 10,000g at 4°C and the plasma removed for further analysis. ALAT- and ASAT- values were determined using a Selectra-E (Elitech, Signes, France).

# ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Caroline Denis (Inserm U613, Brest, France) for their help with *in vivo* experiments as well as the platform SynNanoVect. The authors are also very grateful to Emilie Goudeau (Inserm UMR1087, Nantes, France) for excellent technical expertise in synthetic transfection. This work was supported by special grants from the "Association Française contre les Myopathies" (Evry, France), "Vaincre la Mucoviscidose" (Paris, France), "Région Pays de la Loire" (CIMATH), "Biogenouest", "Région Bretagne", "Ligue contre le cancer 29" and the "Canceropole Grand Ouest".

# **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest

# REFERENCES

 Viola JR, El-Andaloussi S, Oprea, II and Smith CI (2010). Non-viral nanovectors for gene delivery: factors that govern successful therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*, **7**: 721-735
 Vonarbourg A, Passirani C, Desigaux L, Allard E, Saulnier P, Lambert O, et al. (2009). The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. *Biomaterials*; **30**: 3197-3204

3. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE and Benoit JP (2002). A novel phase inversionbased process for the preparation of lipid nanocarriers. *PharmRes*; **19**: 875-880

4. Morille M, Passirani C, Letrou-Bonneval E, Benoit JP and Pitard B (2009). Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting. *Int J Pharm*; **379**: 293-300

5. Morille M, Montier T, Legras P, Carmoy N, Brodin P, Pitard B, et al. (2009). Longcirculating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials*; **31**: 321-329

Morille M, Passirani C, Dufort S, Bastiat G, Pitard B, Coll JL, et al. (2010). Tumor transfection after systemic injection of DNA lipid nanocapsules. *Biomaterials*; **32**: 2327-2333
 Letrou-Bonneval E, Chevre R, Lambert O, Costet P, Andre C, Tellier C, et al. (2008). Galactosylatedmultimodularlipoplexes for specific gene transfer into primary hepatocytes. *J Gene Med*; **10**: 1198-1209

8. Waerzeggers Y, Monfared P, Viel T, Winkeler A, Voges J and Jacobs AH (2009). Methods to monitor gene therapy with molecular imaging. *Methods*; **48**: 146-160

9. Pitard B (2002). Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat Cell Mol Genet*, **27**: 5-15

10. Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L, et al. (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther*, **8**: 511-512

11. Vonarbourg A, Saulnier P, Passirani C and Benoit JP (2005). Electrokinetic properties of noncharged lipid nanocapsules: influence of the dipolar distribution at the interface. *Electrophoresis*; **26**: 2066-2075

12. Hilderbrand SA and Weissleder R (2010). Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *CurrOpinChemBiol*; **14**: 71-79

13. David S, Carmoy N, Resnier P, Denis C, Misery L, Pitard B, et al. (2012). In vivo imaging of DNA lipid nanocapsules after systemic administration in a melanoma mouse model. *Int J Pharm*; **423**: 108-115

14. Goutayer M, Dufort S, Josserand V, Royere A, Heinrich E, Vinet F, et al. (2010). Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by in vivo fluorescence imaging. *Eur J Pharm Biopharm*; **75**: 137-147

15. Texier I, Goutayer M, Silva AD, Guyon L, Djaker N, Josserand V, et al. (2009). Cyanineloaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*; **14**: 054005

16. Dufort S, Sancey L, Wenk C, Josserand V and Coll JL (2010). Optical small animal imaging in the drug discovery process. *BiochimBiophysActa*; **1798**: 2266-2273

17. Schwartz AL (1984). The hepatic asialoglycoprotein receptor. *CRC Crit Rev Biochem*; **16**: 207-233

18. Steirer LM, Park EI, Townsend RR and Baenziger JU (2009). The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid alpha2,6-galactose. *J BiolChem*; **284**: 3777-3783

19. Semple SC, Harasym TO, Clow KA, Ansell SM, Klimuk SK and Hope MJ (2005). Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid. *J PharmacolExpTher*, **312**: 1020-1026

20. Judge A, McClintock K, Phelps JR and Maclachlan I (2006). Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes. *MolTher*, **13**: 328-337

21. Tagami T, Nakamura K, Shimizu T, Yamazaki N, Ishida T and Kiwada H (2010). CpG motifs in pDNA-sequences increase anti-PEG IgM production induced by PEG-coated pDNA-lipoplexes. *J Control Release*; **142**: 160-166

22. Laverman P, Carstens MG, Boerman OC, Dams ET, Oyen WJ, van Rooijen N, et al. (2001). Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *J PharmacolExpTher*, **298**: 607-612

23. Ishida T, Ichihara M, Wang X and Kiwada H (2006). Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *J Control Release*; **115**: 243-250

24. Mosier DE and Subbarao B (1982). Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunology Today*; **3**: 217-222

25. Peng SL (2005). Signaling in B cells via Toll-like receptors. *CurrOpinImmunol*; **17**: 230-236

26. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V and Banchereau J (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*; **19**: 225-234

27. Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, et al. (2004). Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood*; **103**: 3058-3064

28. Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, et al. (2007). Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*; **8**: 351-358

29. Pecanha LM, Snapper CM, Lees A, Yamaguchi H and Mond JJ (1993). IL-10 inhibits T cell-independent but not T cell-dependent responses in vitro. *J Immunol*; **150**: 3215-3223

30. Ishida T, Masuda K, Ichikawa T, Ichihara M, Irimura K and Kiwada H (2003). Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *Int J Pharm*; **255**: 167-174 31. Ishihara T, Maeda T, Sakamoto H, Takasaki N, Shigyo M, Ishida T, et al. (2010). Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers. *Biomacromolecules*; **11**: 2700-2706

32. Desigaux L, Sainlos M, Lambert O, Chevre R, Letrou-Bonneval E, Vigneron JP, et al. (2007). Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *ProcNatlAcadSci U S A*; **104**: 16534-16539

33. Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergely L, Bradley JC, Basseville M, et al. (1996). Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *ProcNatlAcadSci U S A*; **93**: 9682-9686

34. Garcion E, Lamprecht A, Heurtault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, Denizot B, et al. (2006). A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther*, **5**: 1710-1722
35. Hem A, Smith AJ and Solberg P (1998). Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Anim*; **32**: 364-368

# Tables

	(1) Free DNA [%]	(2) Free lipoplexes [%]	(3) Encapsulated lipoplexes [%]	(4) Encapsulated DNA [%]	DNA in LNCs [%] (3 + 4)	DNA payload <sup>a</sup> [%]
Formulation 1	0	85 +/- 4	1 +/- 1	15 +/- 6	16 +/- 4	0.05 +/- 0.01
Formulation 2	21 +/- 20	56 +/- 34	6 +/- 8	21 +/- 21	27 +/- 14	0.09 +/- 0.06
Formulation 3	27 +/- 5	53 +/- 1	0	21 +/- 4	21 +/- 4	0.07 +/- 0.02
Mean	16 +/- 14	65 +/- 18	1 +/- 2	21 +/- 5	22 +/- 5	0.07 +/- 0.02

<sup>a</sup>Experimental DNA payload [%] calculated as w (DNA in LNCs)/ w (formulation) \* 100

 Table 1: DNA quantification in three different formulations before purification and post-insertion with DSPE

PEG

DNA nanocarrier specifications						
	DNA LNCs	PEG DNA LNCs	DNA MMS BGTC	GAL DNA MMS BGTC	DNA MMS DOSP	GAL DNA MMS DOSP
			Lipoplex c	omposition		
Plasmid			pGWIZ-lu	uciferase		
Lipids	DOTA	DOTAP/DOPE BGTC/DOPE DOSP/DOPE				/DOPE
Charge ratio	5 2					
	Polymer composition					
Polymer	-	DSPE- PEG <sub>2000</sub>	F108	F108-gal	F108	F108-gal
Ratio polymer/DNA	-	- 70 (w/w) 300 (w/w)				
Size [nm]	114 +/- 25	132 +/- 3	150 +/- 32	298 +/- 171	198 +/- 57	152 +/- 58
PDI	0.3	0.3	0.4	0.5	0.4	0.5
Zeta potential [mV]	27 +/- 12	-17 +/- 4	-3 +/- 2	-2 +/- 1	0	-2 +/- 0

Table 2: Characteristics of the different DNA nanocarriers

# **Figures**



### Figure 1: Development of DNA MMS DOSP

Electrophoresis experiments (1a) and size measurements (1b) were performed at different charge ratios of DOSP/DOPE/ADN lipoplexes to determine their colloidal stability. Size measurements (1c) and electrophoresis experiments (1d) of DOSP/DOPE/ADN lipoplexes at CR 2 with different polymer/DNA ratios were performed to determine the quantity of polymer used for DNA MMS DOSP.



Figure 2: DNA Quantification in DNA LNCs

2a) Electrophoresis experiments were performed to check DNA encapsulation in DNA LNCs and PEG DNA LNCs. 2b) Schematic representation of DNA localisation in the DNA LNC formulation (1) as free DNA, (2) in lipoplexes outside LNCs, (3) in lipoplexes inside LNCs or (4) in LNCs dissociated from cationic lipids.

Type of DNA vector	DNA vector	distribution af (B	ter systemic ad (FI) 5 h	ministration	
DNA MMS BGTC				100	2
	1000		1	- 22	
GAL DNA MMS BGTC	100		200	~	•
P	R	134		T	
DNA MMS DOSP	A.	-	-	-	v Max
A A	1	-30		1	ce intensit
GAL DNA MMS DOSP	300	-	-700	305	norescend
1	- AUG		100	100	Min H
DNA LNC		3.67		-	
P. M.	20	10 m	20	200	-
PEG DNA LNC	100		100	100	
10	1	-	- Per	180	

Figure 3: BFI of the different DNA nanocarriers administered *via*i.v. injection in healthy animals at different times

DNA MMS BGTC, GAL DNA MMS BGTC, DNA MMS DOSP, GAL DNA MMS DOSP, DNA LNCs and PEG DNA LNCs encapsulating a fluorescent tracer, DiD, were injected i.v. in healthy mice (two animals per group) and BFI images were taken at different times (1h, 3h, 5h and 24h after injection) from decubitus dorsal (first line) and lateral (second line) views to follow their biodistribution.



Figure 4: Fluorescence quantification after systemic administration of the different DNA nanocarriers in healthy mice

Different regions of interest were selected to quantify the fluorescence signal from images taken via BFI at different times (1h, 3h, 5h, 24 after the first injection, or before (0h), 1h, 3h, 5h and 24h after the second injection) shown in Figure 3 and 5 (two animals per group): (1) the abdominal region, including liver and bladder, (2) bladder, (3) liver and (4) lungs. (a) Animals receiving one injection of DNA MMS BGTC or GAL DNA MMS BGTC, (b) animals after one injection of DNA MMS DOSP or GAL DNA MMS DOSP, (c) animals after one injection of DNA LNCs or PEG DNA LNCs and (d) animals after two injection of DNA MMS DOSP or PEG DNA LNCs.





PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP encapsulating the fluorescent dye DiD were injected twice intravenously in healthy animals with a time interval of 1 week between administrations and BFI images were taken (from two animals per group) at different times (1h, 3h, 5h and 24h after each injection and one day before the second injection (0h)) from decubitus dorsal (first line) and lateral (second line) views to follow their biodistribution.



**Figure 6**: ALAT and ASAT quantification to determine hepatotoxicity of PEG DNA LNCs and DNA MMS DOSP

Blood samples of animals receiving no injection (control, diamonds), PEG DNA LNCs (triangles) or DNA MMS DOSP (circles) were collected once a day during the observation period, starting 1h before the injection of the DNA nanocarriers, to analyse the hepatotoxicity of these DNA nanocarriers, represented by ALAT (continuous lines) and ASAT values (dashed lines) (n = 2 for untreated animals and n = 5 for treated animals).



**Figure 7**: BFI of DNA nanocarriers in different organs 24h after the last systemic administration Animals were sacrificed 24h after the last injection of DNA nanocarriers and the fluorescence intensity in (1) liver, (2) lungs, (3 and 4) kidneys, (5) heart and (6) spleen measured via BFI. All images were taken with the same settings. (a) control animals receiving no injection (n = 2), (b) animals receiving one DNA MMS BGTC injection (n = 2) (left) or one GAL DNA MMS BGT injection (n = 2) (right), (c) animals receiving two DNA MMS DOSP injections (n = 3) (left) or one GAL DNA MMS DOSP injection (n = 2) (right), (d) animals receiving one DNA LNC injection (n = 2) (left) or two PEG DNA LNC injections (n = 4) (right).

# **Publication 3**

Local siRNA delivery by non viral vectors

J. DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

# Local siRNA delivery by non-viral vectors

F. Beilvert<sup>1, 2</sup>, M. Mével<sup>1, 2</sup>, B. Châtin<sup>1, 2</sup>, B. Pitard<sup>1, 2, 3</sup>#

'Insenn U915, IRT-UN, 8, quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France 'Université de Nantes, IRT-UN, L'Institut du thoras, 44000 Nantes, France 'Incellart, 1, place Alexis-Riconteau, 44093 Nantes Cedex 1, France 'Correspondence: bruno pitard/s/univ-nantes.fr

Since the discovery of the RNA interference (RNAi) phenomenon, RNAi-based therapies new present a huge potential for the treatment of many diseases, including inflammatory and infectious diseases and cancers. While numerous reports have described the development of small interfering RNA (siENA) delivery systems for in-vivo applications, only a small number of siRNA-based therapies are carrently under clinical development. This is essentially due to the lack of efficient and safe siRNA delivery systems for intravenous administration. However, the delivery of siRNA after local injection could represent an attractive route of administration to limit the issues of toxicity associated with systemic injection. We will describe here the different synthetic vectors which here been developed for the local delivery of siRNA in various organs.

Key words: siRNA – Delivery – Cationic lipid – Polymer – Conjugated siRNA – Local – Micosal – Intracerebral – Intratumoral – Intraocular,

RNA interference (RNAi) is a very efficient process for posttranscriptional gene silencing in cells, induced by short interfering RNA (siRNA) consisting of double-stranded (ds) RNA of 21 to 25 nucleosides. SiRNA exert their gene-silencing activities by targeting mRNA in a highly specific manner via RNA-induced silencing complexes (RISC) which bind to the cognate mRNA and mediate its degradation.

The discovery of RNAi has generated much enthusiasm within the scientific community. In fact, siRNA molecules hold great promise as biological tools and novel therapentic agents, particularly in the areas of oncology and infectious diseases. In several studies, siRNA has been shown to allow specific targeting of selected genes without the common adverse effects of less-specific drug-based therapies or the dangers of viral gene therapy. The development of efficient RNAi-based therapeutics faces some challenges, such as the design of optimized siRNA molecules and of suitable delivery systems able to deliver siRNA efficiently, safely and repeatedly for in-vivo applications. Concerning the design of optimized RNAi molecules, two strategies are usually described. The first consists of the chemical synthesis of small double-stranded RNA molecules of approximately 20 nucleotides with asymmetric 3' overhangs, which are directly taken up by the RISC complex in the cytoplasm. Conversely, short hairpin RNA (shRNA) is composed of a small RNA sequence in a tight hairpin-turn structure and is loaded into a plasmid vector which ensures the expression of the shRNA in the nucleus. ShRNA is then cleaved by DICER complexes to produce small interfering siRNA which is taken up by the RISC complex. Thus, depending on the type of RNAi molecule used, specific vectors have to be developed. These must be optimized depending on the route of administration, the tissue or cell type expressing the target gene and on whether short- or longterm effects are required. To achieve efficient siRNA delivery, these systems must ; a) condense siRNA in nanoparticles, b) protect siRNA from enzymatic degradation, c) facilitate cellular internalization, d) promote endosomal escape, and e) not stimulate innate immunity. In this report, we will focus on the delivery of chemically synthesized duplex siRNA and not on plasmid-encoding shRNA. Non-viral delivery systems represent a promising method of efficient siRNA delivery. Non viral delivery systems consist usually of lipidic, polymeric and peptides molecules. We will report different strategies which have been developed to efficiently deliver siRNA by local administration, using non viral vectors, including mucosal and non mucosal applications.

#### I. MUCOSAL siRNA DELIVERY

The choice of route of administration is an important determinant of the efficiency of siRNA delivery. Direct application onto mucosal surfaces such as respiratory, gastro intestinal or vaginal epithelium is an attractive alternative to systemic delivery. Indeed mucosal delivery is a non-invasive method allowing drug delivery directly to target sites which are the main points of entry of numerous pathogens. The mucosal route reduces nuclease degradation, nanoparticle hepatic clearance and serum-induced aggregation, and facilitates direct contact with target cells. Nevertheless, major hurdles to efficient mucosal delivery include the presence of mucus lining all mucosal surfaces and a tight epithelial cell arrangement sweeping away potential penetrative material using apical cilia. While some reports have described efficient mucosal delivery of naked siRNA in the lung [1], large volumes and significant amounts of siRNA were necessary to obtain a good deposition of siRNA on mucosal surfaces. Recent improvements have been made in mucosal siRNA delivery, leading to efficient inhibition of the targeted gene with a low dose of siRNA (Table 1).

#### 1. Lung

The development of efficient therapies using RNA interference for the treatment or prevention of lung diseases represents a promising approach. Due to a high exposure to pollution, the airways are susceptible to numerous diseases, such as cancers and inflammatory or infectious diseases. Many of these diseases could be treatable by local siRNA treatment, but some hurdles need to be considered when developing efficient siRNA delivery systems. Airways are relatively accessible for the local administration of drug therapies, but harriers need to be overcome for efficient siRNA delivery.

#### 1.1. Challenges

The complex structure of the lung must be considered carefully. The majority of respiratory diseases, especially infectious diseases, are localized in the lower airways, thus siRNA delivery systems need to traverse the upper airways to reach their target in the alveolar surface of the lower airways. The upper airways present a highly branching structure with high nucceilliary clearance and the presence of mucus, preventing the entry of exogenous particles into the lower airways. To reach the lower airways, siRNA particles size and hydrodynamic behavior need to be optimized. The behavior of particles may be predicted by their aerodynamic diameter. Indeed, larger particles, with

J DRUG DEL SCI TECH., 22 (1) 17-27 2012

# Local siRNA delivery by non-vital vectors F. Belivert, M. Méxel, B. Châte, B. Pimer

Belivert,	м.	Mevel.	. В.	Chillin,	Β.	PILM

and the second				_
Delivery system	Animal/route	Molecular target/model	Dosage/effect	Flot.
		Lipid		
Transit-KO	Mouse-Intranasal	RSV-P/ Mouse model of RSV infection with Human RSV long strain HPIV-3 Mouse model of PIV infec- tion with PIV type 3 J5 strain	70 µg siRNA Reduction of 99 % of viral ther at 6 days post-viral- inflection Protective and curative effect on RSV replication	[1]
Oligolectamine	Mouse/intranasal	NP and PA/Influenza infection	20 µg siRNA Combination of Lv. and Ln. administration of siRNA lead to inhibition of influenza virus replication	[15]
	Mouse/intraveginal	EGFP/transgenic EGFP mice UL27-29/Mouse model of HSV infection with HSV-2 wild type virus	<ul> <li>7.5 µg siFINA</li> <li>Reduction of EGFP expression at day 3 up to day 9</li> <li>7.5 µg siFINA</li> <li>80 % of survival in mice receiving both siFINA</li> </ul>	[26] [26]
LIC-101	Mouse/intravesical	PLK1/bladder cancer model	600 nM/6 µM – 5 administrations Weak expression of PKL1, reduced tumor cells	[34]
Lipidoida	Mouse/intranasal	RSV/ Mouse model of RSV infec- tion with RSV/A2 or RSV/B1 strain	-40 µg siRNA Two-log reduction in viral plaques numbers	{9]
PLAS	Mouse/intravaginal	Lamine A/C	8 µg siRNA 85 % of lamin A/C expression inhibition at 24 h	[32]
		Polymer		
PEI	Mouse/intranasal	AKt1/lung cancer model	80 % knockdown of ARt activity Suppression of tumor growth	[17]
	Mouse/initialracheal	EFGP/ transgenic EGFP mice model	35 µg siRNA More than 65 % of EGFP knockdown	[7]
Chitosan	Mouse-intratracheat	EFGP/transgenic EGFP mice model	0.6 pg siFINA 82 % of EGFP expression inhibition compared with non-treated group	[60]
	Mouse/intranasal	EFGP/transgenic EGFP mice model	3 µg siFNA 47 % inhibition of EGFP-expressing epithelial cells	[61]
PLGA	Mouse/intravaginal	EFGP/transgenic EGFP mice	~2 pg siRNA 50-60 % reduction of EGFP expression in vaginal tract at day 10	[31]
Thicketal nanopar- ticles	Mouse/oral	TNFo/ulcerative coldia mice model	-46 μg aiRNA - five daily gavages Significant reduction of TNFα mRNA levels and re- duced manifestations of ulcerative colitis	[24]
NiMos	Mouse/oral	TNFo/ulcerative colitis mice model	- 24 µg s/RNA - 3 gavages three-fold decrease of TNFa expression on day 14	[25]
		Conjugated siRN	IA	
PDT-DR8P	Mouse/intranasal	ROSA26 mice expressing luci- ferase	Extensive reduction of luciferase expression through- out the nasal and tracheal passages	[8]
TAT/cholesterol conjugated	Mouse/intratracheal	P38 MAP kinase	1-15 to 750 µg conjugated sIRNA. TAT or Cholesterol conjugation extend protein expres- sion knockdown compared with naked sIRNA	[19]
Cholesterol conju- gated	Mouse/intravaginal	Nectin-1/UL29/Mouse model of HSV inflection with HSV-2 strain 186	-15 µg siRNA Significant and durable protection against HSV intec- tion	[33]
		Other		
Infasurt	Mouse/intratracheal	Codelivery with plasmind encoding Luciferase	30 µg sRNA Less-efficient luciferase expression inhibition than with DSW	[12]
D5W solution	Mouse/intratracheal Macaque/intratra- cheal	Codelivery with plasmind encoding Luciferase SC2 and SC5/Mouse model of SARS infection with PUMC01 SCV	30 µg s/RNA More-efficient luciferase expression inhibition than with Infasurf Suppression of SARS pathogenesis in prophylactic or therapeutic protocol	[12]
GeRPs	Mice/oral	Magik4 kinase	<ul> <li>400 ng siRNA</li> <li>40 %, 50 % and 80 % of inhibition in the lung, spleen and liver, respectively</li> </ul>	[21]

#### Table I - Overview of siRNA delivery systems for mucosal targets.

Local alRNA delivery by non-viral vectors F. Belivert, M. Mével, B. Châtin, B. Pitard

an acrodynamic diameter greater than  $5\mu$ m are mainly deposed in the mosth, threat or upper lung tissues and rapidly eliminated. Similarly, particles smaller than 1 $\mu$ m are directly eshaled and eliminated before deposition in the alveoli.

Clearance mechanisms also need to be considered carefully. In the lower airways, pulmonary macrophages ingest and degrade micro particles bigger than 260 nm, but smaller particles may escape macrophage clearance. The use of nanoparticles such as poly(lacticco-glycolic acid) (PLGA) could represent a suitable delivery method [2].

The lung epithelium is covered with mucus, from the nasal cavity to the bronchistles, whereas the alveolar epithelium is lined with alveolar fluid composed of phospholipid surfactants. In the case of a siRNA target localized to the alveolar epithelium, surfactants could affect the efficiency of lipid-based delivery systems, thus it would be preferable to use other symbelic delivery systems such as polymers. Mucus secretion is modified by physiological conditions depending on the state of the disease. For example, inflammatory conditions lead to increased macus secretion. The inhalation of mannitol, an osmotic agent, prior to siRNA delivery could reduce mucus secretion [3].

Once the siRNA reaches the cell of interest, it has to cross the celhalar membrane to enter the cytoplasm. SiRNA are negatively charged molecules of approximately 13 kDn, hence they are not able, alone, to cross the cellular barriers. In the case of non-viral siRNA delivery systems, endocytosis is the major cellular uptake pathway involved in siRNA internolization, but particles need to be smaller than 150 nm. Several types of endocytic pathways are known, the most important in the lung being the caveolar-mediated endocytose. In this case, after internalization, particles are enclosed in caveosomes which are non acidic particles, and could directly reach the RISC complex in the cytoplasm.

Practically, siRNA delivery in the lung is usually achieved by inhalation or by intrutrached or intranasal administration. Due to the case of application of intranasal administration, this method is the most commonly used for uIRNA delivery.

To achieve delivery by inhalation, siRNA need to be formulated in dry powder or liquid aerosol. In this case, formulation of the siRNA is a critical step, because lyophilization or aerosolization of siRNA could affect their efficiency and deposition in the lung. As reported by Lum et al. [4], different inhalation devices can be used, such as inciered-dose inhalers (MDfs), dry-powder inhalers (DPIs) and nebulizers. MDIs, in which siRNA are dissolved or suspended in propellants, are commonly used but are not the ideal system for siRNA delivery because of the limited biostability of the siRNA formulation. DPIs present promising advantages for siRNA delivery; siRNA are inhaled as a cloud of particles allowing improved stability of siRNA formulations. An alternative to MDIs and DPIs is nebulization, which can be used for the delivery of large volumes. In all cases, it is very important to easure the protection of the siRNA formulation. Indeed, siRNA could be damaged by the sheer force during the nebulization or drying process. Thus, formulation vectors need to protect siRNA from degradation. To date, no studies have reported on siRNA delivery by the inhalation method, due to the complexity of siRNA formulations required for inhalation [2].

Intratracheal and intranasal administration are widely used for lung siRNA delivery due to their anitalsility of injection. Intratracheal administration ensures optimal efficiency of siRNA delivery with minimal drug loss, but it remains an invasive and non-physiological proceedure and cannot be considered for applications in clinical trials or human use. In experimental animal studies, pulmonary delivery is often achieved by the instillation of small volumes of suspensions into the trachease of mice by endotracheal institution using an acrosol device such as a Penn Century Microsprayer (in the case of liquids) or a Dty Powder Insuffator which enables precise quantification of the delivered dose [5]. The traditional procedure for intratracheal J. DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

administration required micro-surgery in order to insert the catheter between the tracheal rings. Recently, an alternative method has been developed that does not require an incision in the tracheal tract, but rather the catheter is inserted in the trachea via the mouth, the trachea remains intact. This method is still, however, invasive and non physiological.

Intranasal delivery is an efficient alternative to intratracheal delivery as it is easy to perform and requires a low level of anesthesia. However, contrary to humans, mice are obligate nasal breathers, so extrapolation to humans of the potential efficiency of siRNA delivery by this method may be overestimated.

Several studies have used the inhibition of a reporter gene to optimize the development of non viral siRNA delivery systems for pulmonary administration. The majority of these studies have involved the inhibition of enhanced green fluorescent protein (EGEP) expression in endogenously EGEP expressing mice [6]. Beyerle *et al.* reported the use of polyethylenimine (PEI) [7], How and reported the use of chitosan and Eguchi reported the used of peptide transduction domain-double stranded RNA-binding domain (PTD-DRBD) peptides-based delivery systems [8]. The DRBD whind to siRNA with high avidity, masking the siRNA's negative charge and allowing PTD-mediated cellular uptake (see details in *Table 1*).

#### 1.2. Pathologies

The hungs are subject to numerous diseases involving epithelial cell, such as cystic fibrosis and asthma, but also to infection by many virtuses tuch as respiratory syncitial virtus (RSV), SARS corona virtus (SCV) and influenza virtus. As RNAi-based therapics represent a promising approach to the treatment of these diseases, many siRNA delivery strategies have been developed, as described below.

#### 1.2.1. Viral infections

1.2.1.1. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus

Respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus (PIV) are the most common causes of serious respiratory infections in infants and young children. RSV infects the uppers and lower respiratory met leading to croup, pneumonia and bronchiolitis. RSV and PIV infections could, notably, be reduced by the deletion of the P protein of RSV and PIV, which may be implicated in viral replication. Thus, Bitko et al. reported lung delivery of siRNA targeting the P protein of respiratory syncitial virus or parainfluenza virus [1]. Two siRNA against RSV and one against PIV were selected for an in vivo study. Mice were administered intranavally with approximately 70 µg siRNA complexed with TransIT-KO reagent, which is a polycation Tiposomal formulation from Mirus Corporation (Madison, United States). Four hours latermice were intranasally infected with RSV or PTV. Evaluation of siRNA efficacy was assessed five to six days after viral infection, when the maximum RSV replication in the lung occurs. At this time, viral titers were reduced by approximately 99 % in mice treated with RSV or PIV siRNA compared with untreated mice. Notably, naked siRNA was also able to inhibit pulmonary viral titers. Furthermore, virus inhibition was highly specific, as RSV siRNA did not inhibit PIV and vice versa, and the TransIT-KO reagent did not cause discomfort in uninfected mice. When mice were co-administered with the three siRNA at 70 µg each and co-infected with RSV and PIV, both viral titers were significantly reduced. In addition, Bitko et al. also evaluated whether siRNA delivery was associated with curative effects once infection was well established. In this case, mice administered with siRNA at the same time as, or one day after, viral infection, showed stable, or increased body weights, compared with uninfected mice. The administration of siRNA later, two to four days after viral infection, led to less-effective protection against RSV resulting in a decreased mouse body weight, with a late increase in body weight. Altogether, these results suggest that RSV siRNA delivery in the hungs enables a protective or curative effect on RSV replication.

J DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

Using another strategy, Akine et al. reported the use of lipidoids, a new class of lipid-like vectors, for the delivery of RSV-siRNA by intranasal administration. Lipidoids are obtained by the conjugated addition of alkyl-acrylates or alkyl-acrylamides to primary or secondary amines. Mice were intranasally administered with lipidoids-RSV siRNA formulations at a dose of approximately 70 µg siRNA and four hours later infected with 10° plaque-forming units of RSV [9]. Virus tites were assessed at day 4 after infection. Akine et al. observed that siRNA formulated with 98N12-5 lipidoids enabled more than two log-reductions in viral plaque numbers compared with naked siRNA which enabled only one log-reduction. These authors reported specific siRNA delivery in the lung with no gene silencing observed in the liver and kidney.

#### 1.2.1.2. Severe acute respiratory syndrome corona-virus

Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a newly emerging disease caused by SARS corona-virus [10], for which there is no efficient vaccine or treatment. Individuals infected by SARS virus present a high fever followed by severe clinical symptoms such as acute respiratory syndrome. Several studies have reported in vitro inhibition of SCV [11] Li et al. reported the intranasal delivery of anti-SCV siRNA in a Rhesus macaque model of SARS [12]. In a first evaluation of the in vivo activity of anti SCV-siRNA, two siRNA, siSC2 and siSC5, targeting the SCV genome spike-protein-coding and ORF1b regions, respectively, were tested. SiRNA were co-delivered with pCi-seLue plasmid containing the corresponding siSC2 and siSC5 target sequences and the luciferase reporter gene. SiSC2, siSC5 (30 µg) and plasmid pCT-scl.ac (30 µ g) were formulated with D5W solution (dextrose 5 % in water) or Infasturf solution (Forest Laboratories Inc. New York, United States) and delivered by intratracheal administration in mice. Infasorf is a sterile organic solvent extract from calf lung lavage, composed of surfactant protein B and C [12, 13]. Twenty-four hours after siRNA delivery, co-delivery of siSC2, siSC5 siRNA and pCI-scLuc plasmid formulated in DSW solution resulted in a higher level of reporter gene expression and stronger RNAi silencing compared with siRNA and plasmid formulated in Infasurf solution. Further experiments in the Rheuss macaque model were carried out using D5W solution. SiSC2 and siSC5 siRNA were administered intratracheally at a dose of 30 µg formulated in D5W, following a prophylactic-, concurrent or post exposure protocol. Analysis of the macaque body temperature (an indicator of severity of SARS symptoms and of effectiveness of siRNA treatment) showed that all protocols led to a potent suppressi of the SARS pathogenesis. Moreover, the authors observed diminished SCV viral levels and reduced acute diffuse alveolar damage, with no signs of siRNA-induced toxicity.

#### 1.2.1.3. Influenza virus

Influenza virus is one of the most prevalent infections in humans Current vaccines can prevent illness but need to be formulated every year because the viral antigens that elicit neutralizing antibodies change, rendering the previous year's vaccine ineffective against new subtypes. Many siRNA specific for the conserved regions of the influenza virus genome have been designed and tested for their abilities to inhibit influenza virus production in vitro [14]. Tompkins et al., have reported the efficiency of influenza virus inhibition or vivo using Oligofectamine mediated siRNA delivery in the lung [15]. To assess the efficiency of siRNA delivery, mice were pretreated with 50 µg naked siRNA by intravenous injection, followed 16 to 24 h later by infection with H1N1 influenza virus. A second dose of 20 µg siRNA formulated with the lipidic carrier OligofectamineTM, at a charge ratio of 3:2, was administered intranasally. Two different siRNA against influenza virus protein NP and PA were tested, alone or in combination. At day 18 post challenge, 60 % of animals receiving the control siRNA had died, whereas animals receiving either anti-NP or anti-PA siRNA presented respectively, only 20 or 10 % of mortality.

Local siRNA delivery by non-viral vectors F. Belivert, M. Mével, B. Châtin, B. Pitard

Of interest, animals receiving both siRNA showed 100 % survival. These authors also successfully evaluated the abilities of NP and PA siRNA to inhibit the replication of other influenza viruses such as 115, H7 and H9 influenza subtypes. This study demonstrated that the combination of hydrodynamic, intravenous delivery of siRNA with intrunasal delivery leads to significant inhibition of virus replication. Tompkins et al. also observed that intravenous administration alone provided significant protection, but with less efficiency, suggesting that intransal delivery contributed to survival. These studies, involving different siRNA/formulations and different

These studies, involving different siRNA formulations and different siRNA target, have clearly shown that siRNA delivery to the lung is a promising and viable approach to the treatment of viral infections.

#### 1.2.1.4. Lung cancer

Lung cancer is one of the most-frequent tumors worldwide with regards to incidence and mortality rates. Although knowledge in the field of lung cancer research has increased, the median survival time for primarily non-curable tumors is still less than 12 months [16]. Xu et al. assessed the potency of siRNA formulated with poly(ester amine) delivery for the treatment of lung cancer [17]. Protein kinase 1 (Akt1) is one of the most-frequently hyperactivated signaling pathways in cancer, notably in lung cancer. Poly(ester-amine) is a biodegradable polymer with a high transfection efficiency and low toxicity compared with polyethyleneimine (PET). Anti-Akt1 siRNA was formulated with the polycation poly(ester amine) at a poly(ester amine)/siRNA charge ratio of 45, and administered in a mouse model of K-rasLa1 or urethane-induced lung cancer by a nose inhalation system. Mice were exposed twice a week, for total of four weeks, to aerosol in a nose only exposure chamber, as described by Tehrani et al. [18]. Analyses of Akt1 expression and tumor growth were performed at the end of the protocol. This in wwo study clearly demonstrated the anticancer effect of Akt1 siRNA in the lung through aerosol inhalation and showed Akt1 protein expression knockdown of about 80 % in the lung. This was sufficient to suppress pulmonary tamor progression in K-rasLA1 mice and urethane-induced lung cancer mice. Moreover, acrosol delivery of Akt1 siRNA did not affect Akt1 protein expression in other organs.

#### 1.2.1.5. Inflammatory disease

RNA interference is also a promising strategy to inhibit the expression of pathologically (over-)-expressed genes, notably in inflammatory pathologies such as chronic obstructive pulmonary disease. Moschos er al. investigated knockdown of µ38 MAP kinase by conjugating siRNA with different non-viral delivery vectors such as cholesterol, TAT (48-60) peptide (derived from the transactivator of transcription (TAT) of human immunodeficiency virus) and penetratin peptide [19]. p38 MAP kinase is known to be implicated in the release of multiple pro-inflainmatory mediators, including tumor necrosis factor (TNF-a) and interfexikin (IL)-1. Inhibition of p38 MAP kinase could be a promising approach for the treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease and psoriasis [20]. Intratracheal administration of approximately 15 to 750 µg siRNA conjugated either with TAT (48-60), penetratin or cholesterol in mice resulted in a 30-45 % knockdown of p38 MAP kinase expression at 6 h, as observed with naked siRNA. Nevertheless, increasing amount of siRNA did not lead to an improvement in mRNA expression knockdown, but rather to an improvement of the duration of knockdown, except when siRNA were conjugated with penetratin. TAT (48-60) peptide alone was also able to reduce p38 MAP kinase expression, suggesting that TAT (48-60) peptide is a modulator of p38MAPkinase. It is interesting that TAT (48-60) peptide and cholesterol-conjugated viRNA did not elicit an innate immune response, contrary to penetratin-conjugated siRNA. This study suggests that conjugation of siRNA with CPP or cholesterol may extend, but not increase, siRNA knockdown in the lung, compared with naked siRNA. Moreover, some CPPs, such as

TAT peptides, are able to suppress unintended immunostimulation by recognition with the toll-fikit-receptor (TLRs) that are usually observed when siRNA is internalized in the endosome. Further studies are required to characterize the mechanisms of action of CPP on gene expression and immune activation.

#### 2. Oral

Oral siRNA delivery is the most convenient and cost-effective means to deliver siRNA to diseased intestinal tissues. Nevertheless, the main challenger of oral siRNA delivery are to protect siRNA from degradation by gastrointestinal enzymes and to allow crossing of the intestinal mucosa and cellular barriers. Some studies have achieved successful oral siRNA delivery in animal models of inflammatory bowel diseases. SiRNA are usually encapsulated within biodegradable particles which protect them from degradation and target them to M cells in Peyer's patches or in inflamed tissues.

Inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis are characterized by a chronic inflammation of the gastrointestinal tract. Many factors may be involved in the etiologies of theses phenotypes, including genetic predisposition, environmental and immune factors. Conventional treatments are based on anti-inflammatory and immune-suppressive drugs, but lack efficacy with high rates of recurrence. An alternative is surgical removal of the inflamed tissue, but this involves pain and numerous strains in everyday life for the patient. Thus, reduction of the inflammatory phenotype using an siRNA-based therapy could be a promising approach. Nevertheless, this requires the development of efficient vectors for oral siRNA delivery.

Aoudi et al, were the first to report successful oral siRNA delivery by encupsulating siRNA in biodegradable particles [21]. SiRNA, designed to silence Map4k4 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4) expression, were encapsulated in porous particles consist ing of fi-1.3-D-glucan shells derived from baker's yeast (GeRPs) by a series of chemical extractions. Particles were made of a central core of transfer RNA that was coated with layers of cationic PEL SiRNA are placed between these layers of PEI, by electrostatic interactions. SiRNA-containing GeRPs were administered orally in mice, once daily, for eight days. The aim was to target the M cells present in Peyer's patches in the intestinal wall in order to reach macrophages where Map4k4 siRNA could modulate cytokine expression. By oral delivery of GeRPs loaded with approximately 400 ng siRNA, the authors reported the internalization of siRNA-GeRP particles in macrophages expected, followed by a marked inhibition of Map4k4 mRNA levels of 40 % in the lung, 50 % in the spleen and 80 % in the liver, respectively, compared with controls. Moreover, the gene-silencing effects persisted for up to eight days after the last onal siRNA delivery, with no unexpected immune stimulation response. Of interest, oral delivery of GeRP particles loaded with only 400 ng siRNA lead to the efficient inhibition of mRNA expression: a dose five to 250 times less than the dosage usually used for systemic siRNA delivery [22, 23].

Similarly, in order to target inflamed intestinal tissues, Wilson et al. developed another oral siRNA delivery system based on the fact that diseased intestinal tissues are characterized by high levels of reactive oxygen species (ROS) produced at sites of inflammation, thus ROS could be used as a specific trigger of siRNA release [24]. Wilson et al. developed thioketal nanoparticles (TKNs) which release encapsulated agents in response to ROS. TKNs are derived from a polymer, poly-(1.4-phenyleneacetone dimethylene thioketal), composed of ROS-sensitive thioketal initiages. When delivered orally, siRNA.TKNs remain stable and intact in the hards environment of the gastrointestinal tract, protecting siRNA and preventing its release into non inflamed tissues. At the site of intestinal inflammation, the presence of high levels of ROS enables the degradation of TKNs, feading to the release of siRNA at the target site of inflammation time recrossis factor of (TNF-n) plays an essential role in the persistence of intestinal inflammation. Thus, Wilson et al. chose to true mice sufJ. DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

fering from ulcerative colitis with TNF-α-siRNA. TNF-α-siRNA was first complexed with the cationic lipid dioleoyl trimethylammor propane (DOTAP), and then co-encapsulated in TKNs. SiRNA-loaded TKNs have diameters of about 600 mm, in order to limit non specific uptake by enterocytes, and promote interaction with phagocytes. Mice were given, orally, TNF-et or scramble siRNA (approximately 46 µg siRNA) by five daily gavages. After seven days, the authors reported a marked, tenfold decrease in colonic TNF-rt mRNA in treated mice compared with control mice and reduced clinical manifestations of ulcerative colitis. Moreover, formulation of TNF-rt with another vector, such a PLGA or  $\beta$ -glucan particles, did not lead to a significant decrease in colonic TNF-11 mRNA, suggesting that the specificity of TKNs for inflamed tissues is an important factor for an efficient TNF-et siRNAdelivery. This study clearly emphases the importance of the vector design for efficient siRNA delivery to target cells. Indeed, TKNs have the chemical properties required for siRNA delivery in inflamed intestinal tissues

At the same time, Kriegel et al. developed a polymeric microsphere based delivery system, named NiMOS, for onil siRNA delivery in the same model of ulcerative colitis previously described by Wilson et al. [25]. The NiMOS delivery system comprises B-gelatin nanopurticles encapsulating siRNA, and further entrapped in a poly(epsiloncaprolactone) microsphere-forming nanoparticles-in-microsphere oral system. The composition of NiMOS promotes intestinal localization by delivery of gelatin particles to enterocytes and epithelial cells, after degradation of the poly(epsilon-caprolactone) matrix by lipases in the intestinal tract. To investigate the efficiency of the NiMOS system for oral delivery of siRNA, the authors developed a murine model of alcerative colitis. These mice received orally anti TNF-0siNRA-Nimos particles (approximately 24 µg siRNA) at days 3, 5 and after the beginning of ulcerative colitis induction. At days 10 and 14, TNF-0 mRNA and protein levels were lower in the mice treated with TNF-tt-tiRNA-NiMOS particles compared with control mice, with a three-fold decrease at day 14.

These studies show important advances which have been made in oral siRNA defivery, which may lead to significant developments in the therapeutics of the treatment of inflammatory and intestinal diseases in the elinic.

#### 3. Vaginal

Vaginal siRNA delivery holds great potential for the prevention and treatment of various viral infections responsible for diseases such as genital herpes, acquired immune deficiency syntrome and cervical cancer. The advantages of vaginal administration are numerous: this method is non-invasive, bypasses hepatic clearance and provides local delivery directly to the target tistue, reducing the amount of therapeutic agent required for efficient gene silencing. Vaginal siRNA delivery has already been described in pre-clinical trials for the treatment of herpes simplex virus (HSV) [26], but the method remains challenging as siRNA medecules have to cross nuccosal barriers and be taken up by cervicovaginal epithelial cells, while avoiding nuclease degradation.

#### 3.1. Challenges

Considering this, intravaginal siRNA delivery systems need to be effective, safe and non-irritating to mncosal surfaces, as inflammation of vaginal tissues renders them more permissive to infection. The majority of the developed systems are based on liposomal carriers. Palliser et al. showed that FTTC-labeled siRNA formulated with the commercial reagent Oligofectamine, and delivered intravaginally, is efficiently taken up by the vaginal and ectocervical epithelium [26]. Moreover, when siRNA-targeting EGFP were administered intravaginally with Oligofectamine to EGFP expressing mice, GFP expression was reduced three days later and this effect persisted for at least nine days without systemic silencing in distant organs. Nevertheless, it has been reported that fipoplexes remain toxic and unstable at high ionic

J DRUG DEL SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

conditions, leading to serious concerns regarding the use of liposomal carriers to deliver siRNA to nuccosal surfaces [27-30]. Woodrow et al. have developed biodegradable polymer nanoparticles enabling efficient siRNA delivery in mucosal surfaces [31]. These authors reported that poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles, with biodegradable and biocompatible properties, could be formulated with siRNA and delivered to the vaginal mucosa leading to efficient gene silencing. A single administration of siRNA PLGA nanoparticles into vaginal mucosa produced effective and sustained gene silencing throughout the female reproductive tract for at least 14 days. In order to efficiently encapsulate siRNA, the authors chose to pre-encapsulate siRNA with spermidine which acts as a counterion, following which the siRNAspermidine was encapsulates in PLGA nonoparticles at a charge ratio of 8.1 (N/Pratio), with a loading efficiency of 75 ng siRNA per milligram PLGA. After topical administration to the cervicovaginal tract, PLGA nanoparticles were detected in the vaginal canal and the uterine horns. Intravaginal delivery of siRNA targeting enhanced green fluorescent protein (EGFP) formulated with PLGA in transgenic GFP mice led to a reduction of GFP expression by 50-60 % in the reproductive tract up to ten days post administration using approximately 2 µg siRNA. Mice receiving siRNA formulated with PLGA showed earlier inhibition of EGPP expression without histological modification of the vaginal epithelium compared with mice receiving siRNA formulated with commercial liposomes (Lipofectamine RNAiMax from Invitrogen) which showed thickened vaginal epithelium with the presence of neutrophils. Thus, PLGA nanoparticles are attractive carriers for vaginal siRNA delivery as they are able to penetrate deeply into tissues and to silence gene expression efficiently using only a single dose of siRNA.

It is, nevertheless important to note that in these two studies, mice were pretreated with a progesterone derivative before siRNA delivery. Indeed, Wu et al. reported that conventional lipoplexes such as Oligofectamine, administered intravaginally, are unable to reach the vaginal epithelium undernormal physiological conditions. Physiological changes in the vaginal tract throughout the estrus cycle lave to be considered as they can affect the delivery of macromolecules into vaginal tissues. The outer layer of the epithelial cells becomes cormified and hyperkeratotic when mice are in estrus, as reported by Wu et al. [32].

Wu et al. recently investigated the challenges of delivering siRNA to vaginal tissues under normal physiological conditions without progesterone treatment, which mimics more accurately the human vaginal tract. They developed a novel alginate scallold system containing muco-inert PEGylated lipoplexes based on DOTAP and cholesterol lipid, which provide a sustained vaginal presence of lipoplexes and Infail which possible a standard original prediction [32]. These PEGylated, lipoplex-entropped alginate scalfolds (PLAS) were fabricated using a freeze-drying method. The use of PEGylated lipos enabled better particle stability in the mucus, and the alginate scaffold facilitated the retention of these particles in the vaginal cavity following intravaginal administration. The authors compared the efficiency of intravaginal siRNA delivery of the PLAS system with that of cationic lipoplexes. The results showed a six-fold increase in the percentage of uptake of siRNA into vaginal tissues for the PLAS system compared with cationic lipoplexes. To assess the level of siRNA knockdown, mice were treated with 8 µg famine A/C-siRNA formulated in PLAS system per dose, and two doses were administered intravaginally to each mouse on two consecutive days. Twenty four hours later, the knockdown of lamine A/C in vaginal tissues was of 85 % in mice receiving lamine A/C siRNA treatments compared with control mice. This study was the first to demonstrate vaginal siRNA delivery using biodegradable scaffold and liposomes. This novel system is a promising approach for vaginal siRNA delivery and its ease of administration offers vital features for rapid clinical development.

#### 3.2. Pathologies

The vaginal mucosa is one of the main entry points for numerous

Local siRNA delivery by non-viral vectors F. Belivert, M. Mével, B. Châtin, B. Pitard

viral and bacterial pathogens which cause infectious and inflammatory diseases.

Herpes simplex virus 2 (HSV-2) infection causes significant morbidity and is an important cofactor in the transmission of HIV infection. SiRNA based-therapies could be promising treatment for these diseases as the durability of an RNAi-based virucide does not require an administration just before sexual intercourse, limiting the problems of compliance which are usually encountered with the use of classical microbicide. To investigate the ability of anti-HSV-2 siRNA to protect mice from HSV-2 virus, Palliser et al. pretreated mice with a progesterone derivative to arrest the mice in the diestrous phase of the estrous cycle, which may facilitate epithelial penetration [26]. The mice were then infected with a lethal dose of HSV-2 virus and treated with anti-HSV-2 siRNA formulated with the commercial lipid Oligofectamine8, two hours before and four hours after viral infection. Two siRNA were tested, targeting different essential viral protein, UL29 (a DNA-binding protein) and UL27 (envelope glycoprotein B). The results showed that only 25 % of mice treated with 500 pmol (approximately 7.5 µg) UL29 siRNA died compared with 75 % in control groups. On day 11 after viral infection, analysis of the disease severity showed robust protection against HSV-2 infection in UL29 siRNA-treated mice. Of interest, mice treated with UL27 siRNA were less protected, with only 60 % survival. Analysis of the vaginal mucosa of siRNA-treated mice on day 6 showed an intact epithelium with few apoptotic bodies compared with control mice, which showed a denuded mucosal epithelium and a high level of inflammatory cells. In a second study, these authors investigated the effect of an anti-HSV-2 siRNA treatment post infection. In this case, siRNA were administered alone or as a mixture, three and six hours after viral infection. Mice receiving only one siRNA present no survival advantages compared with control mice but, interestingly, mice receiving a mixture of siRNA had 80 % of survival, showing that post-exposure treatment could also be effective. It is also important to note that siRNA treatment does not elicit an immune response and inflammatory infiltrate. Nevertheless, Wu et al. showed that a lipidic reagent facilitated viral infection by eliciting a slight inflammation, which may be sufficient to enhance viral uptake [33]. Wu et al. investigated improving the durability of protection and to optimizing delivery systems in a mouse model of herpes simplex virus [33]. They developed cholesterol-conjugated siRNA with a single phosphothiorate linkage that protects against siRNA degradation by genital fluid RNAses. They identified the cell surface receptor nectin-1 which is a receptor for HSV-2, as a possible target for RNAi-based therapy in the case of HSV-2. To assess the efficiency of chol-siRNA conjugated for vaginal delivery, mice were pretreated with a progesterone derivative, as previously described, and challenged with 2 × LD50 HSV-2. Mice receiving two times approximately 30 µg nectin-1-siRNA conjugated with cholesterol were efficiently protected against HSV-2 infection only when the siRNA was administered prior to infection (up to seven days prior to infection). The authors reported that combining nectin-1 and UL29 siRNA led to uniform and significant protection against HSV-2, irrespective of the time of siRNA administration, before or after HSV infection Moreover, intravaginal administration of chol-siRNA did not induce interferon or an inflammatory response. Thus, the use of cholesterolconjugated siRNA seems to improve protection against HSV-2 viral infection as cholesterol does not elicit an immune response

Altogether, the results of these studies present great promises for the prevention and/or treatment of sexually transmitted viral infections. Much work is required to optimize siRNA silencing efficiency, and to develop a delivery system suitable for an improved vaginal retention without pretreatment of the vaginal cavity, in order to be saitable for clinical application in humans.

#### 4. Intravesical

Intravesical siRNA delivery is a promising approach compared

Local siRNA delivery by non-vital vectors F. Beilvert, M. Mével, B. Châtin, B. Pitard

with systemic delivery. Indeed, intravesical siRNA delivery seems to achieve a similar effect to systemic delivery, with a 50- to 100-fold lower done of siRNA complex. Moreover, the procedure of transurethnal administration is quite simple and repeatable in the clinic, although administration into the murine bladder is rather difficult. As described by Nogawa et al., in mice, the bladder was catheterized and the formulation was administered. A purse-string suture was then placed around the urethra to occlude it. After four boars, the sutures were removed and the neutrace load to south so

The majority of bladder cancer diagnoses are made in the early stage of the disease, but 30 % of cases recur at more advanced stages and form invasive cancers. In this case, the standard treatment is cystectomy, with numerous undesired side effects such as urinary dysfunction. The development of non-invasive treatments that preserve the bladder are, thus, desirable. In this way siRNA-based therapies are promising tools for the treatment of bladder cancer.

Nogawa et al. were the first to report intravesical delivery of siRNA from an investigation of the intravesical delivery of an anti-polo-like kinase-1 (PLKI-1) siRNA for the treatment of bladder cancer [34]. PLK-1 protein is a regulator of mitotic progression in manunalian cells. It has been reported that over expression of PLK-1 is usually associated with the development of numerous human tumors and in particular bladder cancer [35]. Nogawa et al. formulated anti-PLK-1 siRNA with the cationic liposome LIC-101 which contains 2-O-(2-diethylaminoethyl)-carbamoyl-1,3-O-dioleoylglycerol and egg phosphatidylcholine. The formulation was administered intravesically in an orthotopic bladder cancer mouse model. Mice were administered with UM-UC-3Luc tumor cells at day 0. Transurchral treatment with siRNAs was performed five times, once on each of days five to nine. Mice received 9 to 90 µg nl PLK-1 siRNA. PLK-1 siRNA was successfully delivered into the tumors, leading to a weak expression of PLK-1 associated with fewer cancer cells observed in the siRNA-treated mice compared with control mice. Moreover, some treated mice showed a total eradication of the cancer cells without adverse effects, indicating PLK-1 siRNA as a promising tool for the treatment of bladder cancer. This study was the first demonstration of the inhibition of cancer growth in the murine bladder by intravesical siRNA/cationic liposomes delivery.

#### II. NON-MUCOSAL siRNA DELIVERY

We will described in this section local non-viral siRNA delivery strategies that do not concern mucosal varfaces, including intracerebral, intraocular and intranamoral siRNA delivery (see *Table II*).

#### 1. Central nervous system

Numerous genes expressed in the brain and central nervous system (CNS) have been identified as potential target for the treatment of neurological and psychiatric puthologies such as Huntington's or Alzheimer's disease. While siRNA have been widely used to investigate gene function in neuronal culture, the development of *in vivo* siRNAdelivery systems to the brain has been impaired by the existence of the blood-brain barrier and the specific metabolism of the brain. Taking these factors into account, some reports have described the development of siRNA delivery systems optimized for the treatment of cerebral pathologies.

Hassani et al. were able to knockdown reporter gene expression in new born mouse brain using the JetSITM-lipid-based delivery system following intracerebroventricular injection [36]. Using only 7.5 pg siRNA formulated with JetSI TM, the expression of the basiferase reporter gene was reduced by 78 % at 24 h post-delivery in the brain. In further development, Cardoso et al. have developed a cationic-based siRNA delivery system that enhances siRNA delivery in neurons [37]. Intrastriatal injection of 3 µg siRNA formulated with DOTAP-cholesteroi liposomes functionalized with Transferin (ITlipoptexes) in the ipsilateral hemisphere of mouse brain enableda 40 % J. DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

inhibition of luciferase expression in the striatum of endogenouslyluciferase-expressing mice. Taken together, these studies suggest that local delivery of siRNA to the CNS is a feasible option for targeting CNS-based diseases.

Based on these preliminary studies, some authors have assessed the ability of RNAi-based therapies to treat neurological diseases such as Huntington's and Alzheimer's disease.

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disease characterized by aloss of brain neurons, caused by expansion of a CAG repeat in the Huntingtin (Htt) gene. Inhibition of Hintingtin expression in brain neurons reduces the severity of the disease. Efficient siRNA targeting of the Htt protein has been identified in vitra. Wang et al. delivered Htt-siRNA to brain neurons of newborn HD mice to assess the benefits of siRNA on HD severity [38]. The formulation, comprising 0.2  $\mu$ g Hn-siRNA with the cationic lipid Lipofectamine, was administered to newborn mice into the lateral ventricle, as reported by Shen et al. [39]. Ninety-six hours after siRNA delivery, the body weight loss of HD mice treated with Hit-siRNA was slowed as compared with control mice, and the life-span of treated mice was extended by two weeks. Moreover, siRNA treatment re-established motor function by delaying the onset and reducing the frequency of feet-clasping behavior of HD mice By measuring Htt mRNA residual expression levels, the authors reported Htt mRNA was maintained for more than one week in the stratium but not in remote areas of the ventricle such as the cortex. This study was the first report of the successful use of an siRNA-based therapy in a HD mouse model using only one intraventricular injection, just after birth. However, further investigations are required to improve the biodistribution of the delivered siRNA and to develop a less-invasive delivery method.

As an alternative to the use of the cationic lipid Lipofectamine, which could be toxic for neuronal cells, DiFiglia et al. reported the use of a cholesterol-conjugated siRNA targeting bit in a new virus-mediated transgenic model of HD in adult mice [40]. A single administration of 0.2 µg cholesterol-conjugated-har-siRNA in the right striatum of mice was sufficient to inhibit thit mRNA expression in the striatum for at least three days, leading to the amelioration of multiple neuropathological features and aberrant motor features for three weeks. Contrary to the findings of Wang et al., DiFiglia demonstrated that siRNA treatment enabled therapeutical benefits in an adult mouse model of HD with a single pulse of siRNA delivery.

Similarly, in a mouse model of Alzheimer's diseases, Uno et al. reported efficient delivery of siRNA in the brain by combining high density lipoprotein (HDL) with an α-tocopherol-conjugated siRNA (Toc-siRNA) [41]. These authors identified a target gene encoding the b-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme1 (BACE1), which is implied in Alzheimer's disease pathology. To assess the efficiency of Toe-siRNA HDL in vivo, these particles were administered to the mouse brain by direct intracerebroventricular infusion with osmotic pumps, as described by Thakker et al. [42]. As compared with free Toc-siRNA, continuous injection of approximately 45 µg Toc-siRNA/ HDL particles for seven days led to a broader and intense transduction of Toc-siRNA with a significant reduction in target BACE1 mRNA expression at the hippocampal and parietal cortex (up to 60 % with Toc-siRNA/HDL compared with free Toc-siRNA in the parietal cortex). Thus Toe-siRNA/HDL particles enabled efficient gene-silencing in the brain using a 1000-fold lower amount of siRNA than in a previous study. Improvements in gene-silencing efficiency could be explained by a better uptake of siRNA, as the Toc-siRNA/HDL vector system may utilize the physiological lipid metabolism. Indeed, a-toconherol may be transferred from glial cells to neurons via the receptor-mediated pathway with HDL-like particles.

As reported by DiFiglia et al., the next challenge is to improve the safe delivery of siRNA in the brain to maximize target specificity. Autosomal neurodegenerative diseases such as HD require treatment for years with adjustment or discontinuation when side effects arise.

J DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

#### Local siRNA delivery by non-viral vectors F. Beilvert, M. Mével, B. Châtin, B. Pitard

Delivery system	Animal/route	Molecular target/model	Dosage/effect	flot.
		Lipid		
JetSi	Mouse/intracer- ebral	Luciferase/transgenic Luciferase mice	-7.5 ng siRNA 78 % reduction of Luciferase expression	[36]
T1-lipoplexes	Mouse/intracer- ebral	Luciferase/transgenic Luciferase mice	3 µg siRNA 40 % of luciferase expression inhibition	[37]
Lipofectamine	Mouse/intracer- ebral	Ht/Newborn mice	0.2 µg siRNA Life span increased by 2 weeks	[38]
	Mouse/intraocular	VEGF- induced anglogenesis mouse model	1 µg siFINA Significant inhibition of VEGF expression	[46]
Cationic liposome	Mouse/intratumoral	Integrin alphaV/Human PC3 can- oer cell model	<ul> <li>1 µg siRNA Reduction of 75 % of tumor growth</li> </ul>	
Folate-linked nano- particles	Mouse/intratumoral	Her-2: KB tumor xenograft model	10 µg siFINA Significant inhibition of lumor growth at day 4 to 10 after siFINA administration	[50]
		Polymer		
PEI	Rat/intrathecal	NR28/ Rat	5 µg siRNA 83 % of NR28 mRNA expression reduction	[43]
	Mouse/intratumoral	PTN/glioblastoma mouse model	8 µg siRNA Inhibition of xenograft tumor growth	[51]
	Mouse/intratumoral	Ras1/subcutaneous prostate caro- noma model	20 µg siRNA - twice weekly sPEI/anti-rast diminished the growth of PC-7 xenograft significantly when compared with other groups	[53]
	Mouse/initiatumoral	CUX1 /subcutaneous pancreatic cancer model	10 µg siRNA – 3 times a week over 3 weeks significantly decreased tumor volume accompanied by a marked reduction in CUX1 expression	[54]
Chilosan-based hydrogel	Mouse/intratumoral	TG2/melanoma and breast tumor mice model	<ul> <li>- 3 µg siRNA - twice weekly Significant inhibition of turnor growth (72 % reduction and 92 % reduction in melanoma and breast turnoral model, respectively)</li> </ul>	[57]
		Conjugated siRM	A	
Cholesterol-conju- gated	Mouse/intracer- ebral	Htt/mouse model of Huntington's disease	<ul> <li>- 75 µg siRNA Inhibition of Htt mRNA expression Improvement of neuropathological features for 3 weeks</li> </ul>	[40]
Tocopherol-siRNA	Mouse/intracer- ebral	BACE-1/mice	-45 µg sIRNA for 7 days 60 % reduction of BACE-1 mRNA expression	[41]
Chol-MPG	Mouse/intratumoral	Cyclin B1/human prostate carci- noma mice model	S µg siPNA siRNA targeting of cyclin B1 compromises tumor cell proliferation	[58]
		Other		
Atelocollagen	Mouse/intratumoral	HPV/cervical cancer mouse model	15 µg siRNA Suppression of tumor growth	10,21
	Mouse/intratumoral	E6, E7/cervical cancer mouse model	7.5 µg siBNA – once every 7 days for 30 days Significant reduction of tumor growth	[55]
	Mouse/intratumoral	VEGF/prostate cancer mouse model	750 ng to 7.5 µg siRNA Suppression of tumor angiogenesis and tumor growth	[56]

#### Table B - Overview of siRNA delivery systems for non mucosal target.

Hence the modulurity of action of siRNA therapeutics is a promising tool for the treatment of these diseases. Using different approach, Tan *et al.* used branched PEI for in-

Using different approach. Tan et al., used branched PEI for intrathecal siRNA delivery [43]. In a rat model, the delivery of 5  $\mu$ g siRNA targeting the N-methyl-D-aspartate receptor submit protein NR2B/formulated with a branched PEI through an intraduceal injection (subarachnoid), led to an 83 % inhibition of NR2B protein expression and to the modulation of pain.

#### 2. Ocular

The use of siRNA-based therapies is a very promising treatment for ocular diseases, such as cytomegalovirus infection or age-related macular degeneration (AMD). However, the administration method in the posterior segment of the eye is invasive and harmful if repeated. Indeed, in the most cases, the target site for siRNA treatment is on the posterior segment of the eye and siRNA is not able to penetrate alone into the cornea so it has to be delivered introvirreally. Moreover, siRNA have a short intravitreal half-life which implies repeated administratism to obtain efficient modulation of targeted gene expression, with an increased risk of endophthalmitis and retinal detachment. Thus, optimized vectors have been developed to ensure cellular penetration, protection against degradation and long-term delivery.

SiRNA-based therapies are currently being tested in clinical trials, notably for the treatment of AMD [44]. VEGF is an endothelial

Local siRNA delivery by non-vital vectors F. Belivert, M. Mével, B. Châtin, B. Pitard

growth factor cell specific mitogen implicated in modulation of the angiogenic process, notably in AMD diseases. Many studies have shown successful intraoenlar delivery of siRNA targeting VEGF or the VEGF receptor, leading to the inhibition of neovascularization in several validated, preclinical models [45, 46]. Murata et al. reported that using a subconjunctival administration of 1 µg VEGF siRNA formulated with Lipefectamine, the expression of VEGF was significantly inhibited in an induced corneal model of angiogenesis without damage to the conjunctiva [46]. However, Kleinman et al. have recently shown that the inhibition of VEGF expression in these models using naked siRNA was not due to a sequence-specific RNA interference mechanism but rather to the intrinsic properties of siRNA molecules mediated by the TLR3 receptor [47]. Indeed, the authors demonstrated that 21-nucleotide or longer ds-RNAs displayed antiangiogenic properties via TLR3 receptor dsvitation.

#### 3. Intratumoral

Many tumor models have been developed to study various cancers, including prostate, brain and puncreatic cancer. SiRNA-based therapeutics present a promising approach to the treatment of these diseases, as described in the report of numerous studies [48]. While most of these studies have shown systemic delivery of siRNA, local delivery is a promising alternative to increase target specificity and reduce off-targets effects. As reported below, various intratumonal delivery systems have been developed.

In the case of prostate cancer, which is the most frequently diagnosed cancer in men in the USA, tumor metastasis usually appe in bone, with skeletal metastases identified at autopsy in up to 90 % of patients who have died from the disease. Bisanz et al, reported intratumoral siRNA delivery in a model of human PC3 cancer prostate cells induced in tibia [49]. One microgram of anti-integrin alphaV siRNA was formulated with a cationic liposome-based formulation composed of dipalmitoylethylphosphocholine.dioleoylphosphoethan olamine, dipalmitovlphospho-ethanoamine, and polyethyleneglycol. The authors reported a reduction of integrin alphaV expression and of 75 % reduction in tumor growth. To improve the targeting of siRNA delivery and considering that some tumoral cells have high folate receptor expression, Yoshizawa reported intratumoral siRNA delivery using folate-linked lipid-based nanoparticles in a model of human oral epidermoid carcinoma cell (KB) xenograft [50]. Another strategy consisted of using PEI-based delivery systems. Based on a tumor mos del of brain cancer, specifically a mouse model of glioblastoma with U87 cells growing intracranially, Grzelinski et al. demonstrated that intratumoral administration of 8 µg siRNA targeting the growth factor pleiotrophin complexed with PEI, led to the inhibition of xenograft growth [51]. In the same way, PEI-based delivery systems have been widely used for intratumoral siRNA delivery, as reported by Kim et al. in a mouse model of subcutaneous prostate carcinoma xenograft [52], by Zhu et al, in a mouse model of subcutaneous runcreatic carcinonial \$31 and by Ripka et al. in a model of subcutaneous puncreatic cancer [54]. Fujii et al. have also developed an original siRNA delivery system for intratumoral siRNA delivery in a model of cervical cancer [50]. SiRNA targeting human papillomavirus (HPV) protein was formulated with atelocollagen which is a highly purified type I collagen of ealf dermis. The authors reported efficient suppression of tumor growth using only 15 µg siRNA. Similary, Yamato et al. efficiently inhibited tumor growth using siRNA formulated with atelocollagen

J. DRUG DEL. SOI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

in a similar model of cervical cancer [55] and Takei et al., in a mouse model of prostate cancer [56]. Interestingly, Han et al. have developed a chitosan-based hydrogel which displays a temperature-dependant liquid-solid phase transition and could be directly injected into the tumor site and gradually degraded by enzymes at tumor sites after complete release of siRNA [57]. In another approach, Crombez et al. used an N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) peptide-based delivery vector for intratumoral administration of siRNA formulated with the peptide currier MPG functionalized with cholesterol promoted efficient delivery of siRNA and reduced tumor growth in the different mouse tumor models.

#### III. CLINICAL STUDIES

While numerous studies have achieved the development of local siRNA delivery systems using non-viral vectors, only a few delivery systems have been tested in clinical trials (*Table III*). This is notably the case for siRNA therapeutic siRNA 027 (termed AGN211745), which is a chemically modified siRNA targeting the VEGF receptor 1 and which has entered a phase II trial seemingly proving a clinically significant improvement in visual acuty with no serious adverse events or dose-limiting toxicity in a relevant subset of patients [44].

As reported here, various synthetic vectors for local siRNA delivery have been developed to improve efficiency of gene siles ing. However, most of the synthetic vectors used for local siRNA delivery have been essentially optimized for in vitro applications, including Oligofectamine, TransIT-KO, chitosan or PLGA delivery systems. Moreover, some of them are commercial reagents without known composition, which would impair their optimization for further clinical development. Concerning nucessal siRNA delivery, lipid based delivery vectors are not the ideal vectors due to possible interaction with surfactants, notably in the lung. In the case of lung siRNA delivery, polymer-based delivery systems such as chitosan and conjugated delivery systems would be preferred. In the same way, vaginal administration of siRNA requires the use of polymer-based delivery systems, such as PLGA nanoparticles that are biodegradable and biocompatible. The use of PEGylated lipoplexes also seems to be efficient for vaginal siRNA delivery. Conversely, non-mucosal siRNA delivery does not require the development of sophisticated siRNA delivery systems. Indeed, efficient siRNA delivery in the central nervous systems is achieved using the commercially available vectors Lipofectamine and JetSL or with conjugated siRNA as an alternative method. Nevertheless, intracerebral administration of siRNA is a highly invasive method that must be improved. In the same way, efficient intratumoral siRNA delivery is achieved using polymer-based delivery systems such as PEI or chitosan. All of these systems have previously been used for gene delivery but need to be optimized in order to reduce toxicity and improve efficiency. In this way, some studies have developed synthetic siRNA delivery especially designed for siRNA delivery such as an inoglycowides derivatives [59]. In the same way, GeRPS particles derived from baker's yeast or NiMos particles composed of b-gelatin nanoparticles have been specifically designed for oral siRNA delivery in order to avoid degradation of the siRNA by gastrointestinal enzymes, while promoting siRNA internaliza-

Table III - Non-viral siRNA delivery s	systems undergoing cli	nical triats.
--	------------------------	---------------

Disease	Stage	Target	Delivery	Product name	Company/Institution
Age-related macular	Phase VII	VEGF receptor 1	Intravitreal	AGN211748 (SiRNA-027)	siRNA/Merck
degeneration	Phase II		intravitreal	PF-4523665	Quark Pharmaceutical
RSV intection	Phase II	RSV	Intranasal	ALN-RSV01	Ainytam Pharmaceuticals

J. DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

tion into target cells. This review clearly shows that siRNA delivery systems must be optimized depending on the route of administratio by considering the specificity of each system. The major challenge remains the improvement of safety, which currently clearly impairs further clinical development of siRNA delivery systems. Moreover, it remains difficult to translate the results obtained in animal models to the human, because of anatomical and physiological differences between humans and other animals. Routes of administration used in experimental animals are also generally not suitable for the future administration of the treatment in humans.

#### ABBREVIATIONS

Akt1, protein kinase 1; AMD, age-related macular degeneration; BACE1, b-site amytoid precursor protein cleaving enzyme 1: CNS, central nervous system; CPP, cell-penetrating peptide; DSW, dextrose 5 % in water; DPI, dry-powder inhalers; DOTAP, dioleoyl trimethylammonium propane; EGFP, enhanced green fluorescent protein; FITC, fluoresceine isothiocyanate; GeRPs, §1.3-D-glucan-encapsulated s/RNA particles; GFP, green fluorescent protein; HD, Hungtington disease; HDL, high density lipoprotein; HSV, herpes simplex virus; IL, interleukin; MDI, metered-dose inhalers; MPG, N-methylpurine-DNA glycosylase; NMOS, nanoparticles-in-microsphere oral system: NR2B, N-methyl-D-aspartate receptor 2B; PEG, polyethylene glycol; PIV, parainfluenza virus: PLAS, PEGylated lipoplex-entrapped alginate scaffolds. PEJ, polyethylenimine; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid); PTD-DABD, peptide transduction domain-double stranded RNA-binding domain; RNAi, RNA interference; ROS, reactive oxygen species; RSV, respiratory synotial virus; TAT, transactivator of transcription; TNF, tumor necrosis factor; TLR, toll-like receptor; TKN, thicketal nanoparticles; SARS, severe acute respiratory syndrome: SCV, SARS corona virus; Toc. tocopherol; siRNA, small interlering RNA; VEGF, vascular endothelial growth factor

#### REFERENCES

- Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O., Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered s/RNA. Nat Med., ٩. 11 50-55 2005
- Jensen D.M., Cun D., Mattesen M.J., Frokjaer S., Nielsen H.M. Foged C - Spray drying of siRNA containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. - J. Control. Release, 142, 138-145. 2010.
- 3. Deviskas E., Anderson S.D., Brannan J.D., Chan H.K., Eberl S., Bautovich G. - Inhalation of dry-powder n annitol increase C. Sabovin G. - Infantoni un grypowate nametic inclusion mucociliary clearance. - Eur. Respir. J., 10, 2449-2454, 1997. Lam J.K., Liang W., Chan H.K. - Pulmonary delivery of there-peutic siRNA. - Adv. Drug Deliv. Rev., 2011. 4
- 5.
- Beste sinkk Adv. Urup Denv. Hev., 2011.
  Bivas-Benita M., Zwier R., Junginger H E., Borchard G. Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotrachseal route. Eur. J. Pharm. Biopharm., 61, 214-218, 2006.
  Okabe M., Ikuwa M., Kominami K., Nakarishi T., Nashimune V. Stevenson, Nature M., Kominami K., Nakarishi T., Nashimune
- 6 Y. - 'Green mice' as a source of ubiguitous green cells. - FEBS .ett., 407, 313-319, 1997.
- Beyerle A., Braun A., Merkel O., Koch F., Kissel T., Stoeger 7. T. - Comparative in vivo study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. - J. Control. Release. 151 (1), 51-56, 2011.
- Eguchi A., Dowdy S.F. Efficient siRNA delivery by novel PTD-8. DRBD fusion proteins. - Cell Cycle, 9, 424-425, 2010. Akinc A., Zumbuehl A., Goldberg M., Leshchiner E.S., Busini V.,
- 9. Hossain N. et al. - A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. - Nat. Biotechool., 26, 561-569, 2008
- Kulken T., Fouchier R.A., Schutten M., Rimmelzwaan G.F., van 10. Amerongen G., van Riel D. et al. - Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. -Lancet, 362, 263-270, 2003. Zheng B.J., Guan Y., Tang Q., Du C., Xie F.Y., He M.L. et al. -
- 11

Local siRNA delivery by non-viral vectors F. Beilvert, M. Mével, B. Châtin, B. Pitard

Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. - Antivir. Ther., 9, 365-374, 2004. Li B.J., Tang Q., Cheng D., Qin C., Xie F.Y., Wei Q. et al. - Using siFNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS 12

- coronavirus in Rhesus macaque. -Nat. Med., 11, 944-951, 2005. Ge O., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibi-12.
- tion of influenza virus production in virus-inflected mice by RNA interlerence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 8676-81, 2004. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N. et al. - RNA interference of influenza virus production by 14
- directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 2718-2723. 2003.
- 15. Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L. - Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. - Proc. Natl. Acad. Soi. USA, 101, 8682-8686, 2006.
- 16 Gautschi O., Betticher D.C. - Molecular thempy in lung cancer. Ther. Umsch., 61, 365-371, 2004.
- Xu C.X., Jere D., Jin H., Chang S.H., Chung Y.S., Shin J.Y. ef al. Poly(ester amine)-mediated, serosol-delivered Akt1 small 17. Interfering RNA suppresses lung tumorigenesis. - Am. J. Respir. Crit. Care Med., 178, 60-73, 2008.
- Tehrani A.M., Hwang S.K., Kim T.H., Cho C.S., Hua J., Nah W.S. et al. Aerosol delivery of Akt controls protein translation 18. in the lungs of dual luciferase reporter mice. - Gene Ther., 14, 451-458, 2007
- Moschos S.A., Jones S.W., Perry M.M., Williams A.E., Erjefalt 19 J.S., Turner J.J. et al. - Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity.
- Bioconjug, Chem., 18, 1450-1459, 2007. Saklatvala J. The p38 MAP kinase pathway as a therapoutic 26 target in inflammatory disease. - Curr. Opin. Pharmacol., 4. 372-377, 2004
- 21. Acuadi M., Tesz G.J., Nicoloro S.M., Wang M., Chouinard M., Soto E. et al. - Orally delivered siRNA targeting macrophi Map4k4 suppresses systemic inflammation. - Nature, 458. 1180-1184, 2009.
- Wesche-Soldato D.E., Chung C.S., Lomas-Neira J., Doughty L.A., Gregory S.H., Ayala A. In vivo delivery of caspase-8 or Fas sIRNA improves the survival of septic mice. Blood, 106, 22 2295-2301, 2005.
- Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., 23. Donoghue M. et al. - Therspeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. - Nature, 432, 173-178, 2004.
- Wilson D.S., Dalmasso G., Wang L., Sitaraman S.V., Merlin 24. D., Murthy N.- Orally delivered thicketal nanoparticles loaded with TNF-alpha-siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. - Nat. Mater., 9, 923-926, 2010. Kriegel C., Amiji M. - Oral TNF-alpha gene silencing using a
- 25. polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. - J. Control. Release, 150, 77-86, 2011
- Palliser D., Chowdhury D., Wang Q.Y., Lee S.J., Bronson R.T., 26. Knipe D.M. et al. - An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. - Nature, 439, 89-94, 2006
- 27 Breunig M., Lungwitz U., Liebl R., Goepferich A. - Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 14454-14459, 2007
- LvH., Zhang S., Wang B., Cui S., Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene detivery. J. Control. Release, 28 114 100-199 2006
- Li S., Rizzo M.A., Bhattacharya S., Huang L. Characterization 29. of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene derivery. - Gene Ther., 5, 930-937, 1998.
- 30 Zhang J.S., Liu F., Huang L. - Implications of pharmacokinetic behavior of lipoplex for its inflammatory toxicity. - Adv. Drug Delly Rev. 57, 689-698, 2005.
- Woodrow K.A., Cu Y., Booth C.J., Saucier-Sawyer J.K., Wood 31. M.J., Saltzman W.M. - Intravaginal gene silencing using bio degradable polymer nanoparticles densely loaded with small-

Local siRNA delivery by non-vital vectors F. Belivert, M. Mevel, B. Châtin, B. Pitard

- interlering RNA. Nat. Mater., 8, 526-533, 2009. Wu S.Y., Chang H.I., Burgess M., McMillan N.A.-Vaginal delivery of siRNA using a novel PEGylated lipoplex-entrapped alginate scatfold system. J. Control. Release, 155 (3), 418-426, 2011. 32
- WuY, Nevero F, Lal A., Baser E., Pandey R.K., Mancharan M. et al. Durable protection from Herpes Simplex Virus-2 trans-33. mission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. - Cell Host Microbe, 5, 84-94, 2009.
- Nogewa M., Yuasa T., Kimura S., Tanaka M., Kuroda J., Sato K. et al. Inhavesical administration of small interfering RNA 34 targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. - J. Clin. Invest., 115, 978-985, 2005.
- Holtrich U., Wolf G., Brauninger A., Kam T., Bohme B., Rub-samen-Waigmann H. et al. Induction and down-regulation of 35 PLK, a human series/threonine kinase expressed in proliferating cells and turnors. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 1736-1740. 1004
- Hassani Z., Lemkine G.F., Erbacher P., Palmier K., Alfama G., 36. Giovannangel C. et al. - Lipid-mediated siRNA delivery down-regulatos exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. - J. Gene Med., 7, 198-207, 2005. Gardoso A.L., Simoes S., de Almeida L.P., Piesnita N., Pedroso
- 37. de Lima M.C., Wagner E. et al. - Thipoplexes for neuronal siRNA delivery: a promising system to mediate gene silencing in the CNS. - J. Control. Release, 132, 113-123, 2006. Wang Y.L., Liu W., Wada E., Murata M., Wada K., Kanazawa
- 38 Cirvico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. - Neurosci. Res., 53, 241-249, 2005.
- Shen J.S., Watabe K., Ohashi T., Eto Y. Intraventricular ad-ministration of recombinant adenovirus to neonatal twitcher 30. mouse leads to clinicopathological improvements - Gene Ther. 8, 1081-1087, 2001.
- 40 DiFiolu M. Sana-Esteves M. Chase K. Saco E. Pfister E. Sasa M. et al. - Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 17204-17209, 2007.
- 41. Uno Y., Piao W., Miyata K., Nishina K., Mizusawa H., Yokota T. - High-density lipoprotein facilitates in vivo delivery of alphatocopherol-consugated short-interfairing RNA to the brain. - Hum. Gene Ther., 22 (5), 711-719, 2011. Thakker D.R., Natt F., Husken D., Maier R., Multer M., van der
- 42 Putten H. ef al. - Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using noriviral RNA interference. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 17270-17275, 2004
- Tan FH, Yang LC, Shih H.C, Len K.C, Cheng J.T. Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR28 subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. Gene 43 Ther. 12, 59-66, 2005.
- Kaiser P.K., Symons R.C., Shah S.M., Quinlan E.J., Tabandeh H., Do D.V. et al. RNAi-based treatment for neovascular age-44 ted macular degeneration by Sima-027. - Am. J. Ophthalmol., 150, 33-39 e2, 2010.
- 45 Kim B., Tang Q., Biswas P.S., Xu J., Schiffelers R.M., Xie F.Y. ef at - Inhibition of ocular angiogenesis by sPINA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratita. - Am. J. Pathol., 165, 2177-2185. 2004
- Murata M., Takanami T., Shimizu S., Kubota Y., Horluchi S., 46. Hebano W. et al. - Inhibition of ocular angiogenesis by diced small interfering RNAs (siRNAs) specific to vascular endothelial
- smail memory involutions specific to vascular endomesia growth factor (VEGF) Curr, Eye Rea., 31, 171–180, 2008. Kolonman M.E., Yamada K., Takada A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Balfi J.Z. et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by sIRNA via TLR3. Nature, 452, No. 400. 47 591-597, 2008

#### J. DRUG DEL. SCI. TECH., 22 (1) 17-27 2012

- 48 Oh Y.K., Park T.G. - siRNA delivery systems for cancer treat-
- ment. Adv. Drug Delv. Rev., 61, 850-862, 2009. Bisanz K., Yu J., Edlund M., Spohn B., Hung M.C., Chung L.W. et al. Targeting ECM-integrin interaction with liposome-49 encepsulated small interfering RNAs inhibits the growth of human prostate cancer in a bone xenograft imaging model. - Mol. Ther., 12, 654-643, 2005. Yoshizawa T., Hattori Y., Hakoshima M., Koga K., Maitani Y.
- 50. Folate-Bried lipid-based nanoparticles for synthetic sIRNA delivery in KB tumor xenografts. - Eur. J. Pharm. Biopharm., 70, 718-725, 2008. Grzelinski M. Urban-Klein B., Martens T., Lamszus K., Bekowsky
- 51. U., Hobel S. et al. - RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interleting RNAs in vivoe exits antitumoral effects in globlastoma aenografts. - Hum. Gene Ther., 17, 751-766, 2006. Kim S.H., Jeong J.H., Lee S.H., Kim S.W., Park T.G. - Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex
- 69 nicelles for effective treatment of cancer. - J. Control. Release, 129, 107-116, 2008.
- Zhu H., Liang Z.Y., Ren X.Y., Liu T.H. Small interfering RNAs targeting mutant K-ras inhibit human pancreatic carcinoma cells 53. growth in vitro and in vivo. - Cancer Biol. Ther., 5, 1693-1698, 2006.
- 54 Ripka S., Neesse A., Riedel J., Bug E., Aigner A., Poulsom R. et al. - CUX1: target of Akt signaling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. - Gut, 59, 1101-1110, 2010. Yamato K., Yamada T., Kizaki M., Us-Tei K., Natori Y., Fujino M.
- 55. et al. - New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. - Cancer Gene Ther., 15, 140-153, 2008.
- Takei Y., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Matsuo S., Muramatau T.-56. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. - Cancer Res., 64, 3365-3370. 2004
- Han H.D., Mora E.M., Roh J.W., Nishimura M., Lee S.J., Stone 67. R.L. et al. - Chitosan hydrogel for localized gene silencing. -Cancer Biol. Thec., 11, 839-845, 2011.
- Crombez L, Morris M C, Dufort S, Aldrian-Herrada G, Nguyen O., Mc Master G, et al. Turgeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents turnour growth. Nucleic 58. Acids Res., 37, 4559-4569, 2009. Desigaux L., Samlos M., Lambert D., Chevre R., Latrou-Bonneval
- 59. E., Vigneron J.P. et al. - Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104, 16534-16539, 2007.
- 60. Nielsen E.J., Nielsen J.M., Bocker D., Karlas A., Prakash H. Glud S.Z. et al. - Pulmonary gene silencing in transgenic EGFP mice using aerosolised chitosan/siRNA nanoparticles - Pharm, Res., 27, 2520-2527, 2010.
- Howard K.A., Rahbek U.L., Liu X., Damgaard C.K., Glud S.Z., Andersen M.O. et al. RNA interference in vitro and in vivo us-61. g a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. - Mol. Ther., 14.476-484.2006.
- Fuji T., Saito M., Iwasaki E., Ochiya T., Takei Y., Hayashi S. et al. Intratumo: injection of amal interforing RNA-targeting human papillomevirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. Int. J. Oncol., 29, 541-548, 2006. 82

#### MANUSCRIPT

Received 24 June 2011, accepted for publication 10 August 2011.

### Résumé

Les biothérapies constituent un domaine de la médecine en plein essor, basé sur l'utilisation de produits issus du vivant. Ces biothérapies reposent notamment sur la délivrance intracellulaire de macromolécules biologiques tels les acides nucléiques ou les protéines. Ces composés sont pour la plupart incapables de franchir les membranes biologiques et nécessitent l'utilisation de vecteurs aptes à les véhiculer jusqu'à leur cible intracellulaire. Les copolymères à blocs constituent une classe de vecteurs particulièrement efficaces pour le transfert de gènes in vivo. Leur mode d'action étant encore mal compris, nous nous sommes attachés à l'étude de leur mécanisme et avons observé qu'ils sont capables de délivrer de l'ADN directement dans le cytosol des cellules visées. Nous les avons ensuite exploités dans le développement d'un protocole de vaccination à ADN pour le traitement de l'asthme allergique. L'autre grande classe de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes est constituée par les lipides cationiques. Largement utilisés in vitro, leur efficacité demeure limitée in vivo. L'étude de leurs propriétés physicochimiques nous a amenés à participer au développement rationnel de nouveaux lipides cationiques peu toxiques et utilisables pour le transfert de gènes in vivo. En parallèle, nous avons exploité ces composés dans le développement de nanovecteurs capables de délivrer des protéines dans des cellules vivantes, et avons étudié leurs propriétés physicochimiques afin de comprendre leur mode d'action. Nos observations nous ont conduits à exploiter ces composés afin de cibler la kératine 8, une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la mucoviscidose.

Mots clés : vecteur, délivrance intracellulaire, protéine, acide nucléique, vaccination, lipide cationique, copolymère à blocs, mucoviscidose.

# Summary

Biotherapies are an expanding field of medicine based on life-derived products. Notably, they rely on the intracellular delivery of biological macromolecules such nucleic acids or proteins. These compounds cannot cross biological membranes and need a vector to bring them to their intracellular target. Block copolymers constitute a class of very efficient vectors for in vivo gene delivery, but their mechanism of action is ill-defined. We have studied their mechanism and have shown that they are able to deliver DNA directly into cell cytosol. Then, we have used these vectors to develop a protocol of DNA-based vaccination for the treatment of allergic asthma. Synthetic vectors also comprise cationic lipids, widely used in vitro but rather inefficient in vitro. By studying the relationships between their efficacy and their physicochemical properties, we participated to the development of new, non toxic cationic lipids which could be used for in vivo gene transfer. We also used these compounds to develop vectors for the intracellular delivery of proteins into living cells, and studied their properties to get a better view of their mechanism of action. Finally, we exploited these new vectors to target keratin 8, a potential therapeutic target for the treatment of cystic fibrosis.

Keywords : vector, intracellular delivery, protein, nucleic acid, vaccination, cationic lipid, block copolymer, cystic fibrosis.