

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Etude du mécanisme d'action des copolymères à
blocs amphiphiles pour le transfert de gène *in vivo***

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale BIOLOGIE-SANTE de NANTES

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

présentée

et soutenue publiquement par

Raphaël CHEVRE

Le mardi 27 Octobre 2009, devant le jury ci dessous

Président

Pr. Pierre PACAUD, Professeur à l'Université de Nantes

Rapporteurs

Dr. Eve-Isabelle PECHEUR, Chargée de Recherche CNRS, Lyon

Dr. Marie-Pierre ROLS, Directrice de Recherche CNRS, Toulouse

Examineurs

Pr. Philippe GUEGAN, Professeur à l'Université d'Evry

Pr. Pierre LEHN, Professeur à l'Université de Brest

Directeur de thèse

Dr. Bruno PITARD, Directeur de Recherche CNRS, Nantes

Sommaire

REMERCIEMENTS	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
SOMMAIRE.....	2
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
ABREVIATIONS	7
AVANT PROPOS.....	10
GENERALITES.....	12
CHAPITRE 1. TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES ET VECTORISATION	12
1. Le transfert d'acides nucléiques	12
2. Vectorisation synthétique d'acides nucléiques	14
3. Transfert de gène dans le muscle squelettique	16
4. Stabilité de l'expression du transgène	17
a. Perte du plasmide	17
b. Inhibition de la transcription	17
c. Transfert de gène et réponse immunitaire	17
CHAPITRE 2. LES VECTEURS SYNTHETIQUES CATIONIQUES.....	20
A. LES LIPIDES CATIONIQUES.....	20
1. Structure des lipides cationiques	20
a. Les lipides monocationiques.....	21
b. Les lipides polycationiques	22
c. Les dérivés du cholestérol.....	23
2. Les dérivés d'aminoglycosides pour le transfert d'acides nucléiques	24
a. Transfert d'ADN	24
b. ARN interférence et siRNAs	25
c. Les dérivés d'aminoglycosides pour le transfert de siRNA.....	27
3. Caractérisation des complexes lipide cationique/ADN.....	28
a. Complexation de l'ADN au sein des complexes lipide cationique/ADN.....	29
b. Stabilité colloïdale, taille et morphologie des lipoplexes.....	30
4. Efficacité de transfection des lipides cationiques in vitro	33
B. LES POLYMERES CATIONIQUES	34
a. Les polyéthylèneimine (PEI)	34
b. La polylysine (PLL).....	34
c. Les chitosans	35
d. Les dendrimères	35
CHAPITRE 3. LES GRANDES ETAPES CELLULAIRES DU TRANSFERT DE GENE	38
A. INTERNALISATION DES COMPLEXES.....	38
1. Interaction aux membranes.....	38
2. Internalisation cellulaire : endocytose et fusion	39
a. Internalisation des lipoplexes	39
b. Internalisation des polyplexes	41
B. ÉCHAPPEMENT ENDOSOMAL.....	42
1. Fusion membranaire par Flip-Flop.....	42
2. Mécanisme d'éponge à proton.....	44
3. Peptides fusogènes	44
4. Agents lysomotropiques	45
C. TRAFIC INTRACELLULAIRE ET TRANSLOCATION NUCLEAIRE	45
1. Devenir cytosolique du plasmide	46
2. Translocation nucléaire	48

CHAPITRE 4. LES COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES	51
A. PROPRIETES DES COPOLYMERES A BLOCS « PLURONICS »	51
1. <i>Structure générale</i>	51
2. <i>Nomenclature</i>	52
3. <i>Auto-assemblage en micelles</i>	53
4. <i>Activité biologique des copolymères à blocs</i>	55
a. Utilisation des copolymères à blocs amphiphiles	55
b. Inhibition de la résistance aux drogues dans les tumeurs MDR	57
c. Interaction des copolymères à blocs avec les membranes selon leur structure.....	59
B. COPOLYMERES A BLOCS ET TRANSFERT DE GENE.....	64
1. <i>Facilitateurs du transfert de gène par vecteurs viraux</i>	64
2. <i>Optimisation du transfert de gène non viral</i>	64
a. Facilitation de la transfection non virale.....	64
b. Systèmes multi-modulaires ADN / vecteur cationique / copolymère à blocs.....	65
3. <i>Vectorisation d'ADN plasmidique in vivo</i>	66
C. MECANISME D'ACTION DES COPOLYMERES A BLOCS.....	68
1. <i>Facilitation du trafic intracellulaire et / ou de l'expression du transgène</i>	68
2. <i>Facilitation des étapes initiales de la transfection</i>	70
3. <i>Facilitation de la diffusion tissulaire du plasmide in vivo</i>	72
MATERIELS ET METHODES.....	74
1. <i>Plasmides et siRNAs</i>	74
2. <i>Copolymères à blocs</i>	74
3. <i>Vecteurs cationiques</i>	74
4. <i>Formulation complexes vecteurs / ADN</i>	75
5. <i>Culture cellulaire et transfection in vitro</i>	76
6. <i>Animaux et transfections in vivo</i>	76
7. <i>PCR-quantitative</i>	77
8. <i>Dosage de la luciférase par chimioluminescence</i>	77
9. <i>Evaluation de l'expression de la Green Fluorescence Protein (GFP)</i>	77
10. <i>Visualisation du transfert de gène de la β-galactosidase</i>	78
11. <i>Visualisation de l'entrée des lipoplexes par microscopie électronique</i>	78
12. <i>Dosage de l'Interleukine 6 (IL-6)</i>	79
13. <i>Analyses histochimiques</i>	79
RESULTATS	80
1. PROBLEMATIQUE.....	81
2. MODELE D'ETUDE DU MECANISME D'ACTION DES COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES	84
1. <i>Développement du modèle</i>	84
a. Traitement des cellules avec le Lutrol [®]	84
b. Traitement des cellules avec des polymères de différentes tailles.....	86
c. <i>Influence des conditions de transfection</i>	86
2. <i>Hypothèses de travail</i>	89
3. IMPACT DU LUTROL [®] SUR LES ETAPES TARDIVES DE LA TRANSFECTION	91
1. <i>Le Lutrol[®] n'induit pas l'expression du transgène</i>	91
2. <i>Le Lutrol[®] stimule la transfection de siRNA in vitro</i>	93
3. <i>Le transfert de gène médié par le Lutrol[®] est indépendant du promoteur utilisé</i>	95
a. Promoteur indépendance du transfert de gène dans le modèle in vitro.....	96
b. Stimulation de voies de signalisation dans le modèle d'étude in vitro.....	96
c. Promoteur indépendance du Lutrol [®] dans le transfert de gène in vivo	97
4. EFFET DU LUTROL [®] SUR L'INTERNALISATION CELLULAIRE DU TRANSGENE	100
1. <i>Influence sur le nombre de cellules transfectées</i>	100
2. <i>Influence sur la quantité d'ADN internalisée</i>	101
5. NATURE DU MECANISME D'ACTION DU LUTROL [®] : ACTIF OU PASSIF ?	104
1. <i>Transfection à 4°C</i>	104
2. <i>Effet non saturable</i>	105
6. LE LUTROL [®] EST UN FACILITATEUR DE L'INTERACTION AVEC LES MEMBRANES.....	108

1. Le Lutrol [®] facilite l'interaction des lipoplexes avec les membranes.....	108
2. L'échappement endosomal constitue la barrière limitante à l'utilisation du Lutrol [®] in vitro.....	110
7. LE LUTROL [®] NE PROVOQUE PAS DE REPONSES INFLAMMATOIRES IN VIVO.....	113
1. Le Lutrol [®] n'active pas les sensors de l'ADN cytosolique.....	113
2. Transfection musculaire et inflammation : application au transfert du gène de l'EPO.....	114
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131
PUBLICATIONS.....	147

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma des voies de signalisations activées par la reconnaissance d'ADN double brin cytosolique par DAI (DLM1/ZBP)	18
Figure 2 : Structure schématique des lipides cationiques.	20
Figure 3 : Structure chimique de la DOPE.....	20
Figure 4 : Organisation des lipides cationiques en solution aqueuse, micelles et liposomes.	21
Figure 5 : Structure chimique des lipides monocationiques et polycationiques	22
Figure 6 : Structure chimique des dérivés du cholestérol.	23
Figure 7 : Structure chimique des lipides cationiques dérivés d'aminoglycosides pour le transfert d'acides nucléiques	24
Figure 8 : Les grandes étapes de l'ARN interférence	26
Figure 9 : Complexation de l'ADN au sein des lipoplexes.	29
Figure 10 : Stabilité colloïdale des lipoplexes lipopolyamine-ADN.	31
Figure 11 : Cryo-TEM des lipoplexes de BGTC/DOPE-ADN	32
Figure 12 : Représentation schématique de la phase hexagonale inversée proposée pour les lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN	32
Figure 13 : Schéma de la structure générale des dendrimères.....	35
Figure 14: Internalisation et trafic intracellulaire des lipoplexes	39
Figure 15 : Mécanisme d'échappement endosomal par fusion membranaire.....	43
Figure 16 : Mécanisme d'échappement endosomal dit d'éponge à proton	44
Figure 17 : Mécanisme du transport nucleo-cytoplasmique d'une protéine cargo via le NPC.....	49
Figure 18 : Modèle d'import nucléaire séquence spécifique d'un plasmide.....	50
Figure 19 : Schéma général des copolymères à blocs amphiphiles « Pluronic ».....	51
Figure 20 : Auto-assemblage des unimères en micelles.....	54
Figure 21 : Schéma de la solubilisation de drogues hydrophobes par les micelles de copolymères à blocs amphiphiles.	55
Figure 22 : Schéma représentant les multiples effets des pluronics sur les cellules MDR	58
Figure 23 : Schéma décrivant les interactions entre les cellules de la barrière hémato-encéphalique et les quatre groupes de copolymères à blocs amphiphiles (modifié d'après Batrakova et al., 2003b).	62
Figure 24 : Transfert de gène dans divers organes à l'aide de copolymères à blocs.....	67
Figure 25 : Effet promoteur dépendant du P85 sur l'expression d'un transgène	69
Figure 26 : Activation de la voie de signalisation NFκB par les pluronics.....	70
Figure 27 : Modelisation de l'induction de pores membranaires par le L61	71
Figure 28 : Influence du Lutrol® dans la distribution tissulaire d'un plasmide.....	73
Figure 29 : Efficacités de transfection comparée des copolymères à blocs et des lipides cationiques in vivo et in vitro	81
Figure 30 : Protocole de traitement avec les copolymères à blocs des cellules transfectées	84
Figure 31 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection de lipoplexes in vitro	85
Figure 32 : Effet de la concentration des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection in vitro.....	85
Figure 33 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection in vitro en fonction de leurs masses moléculaires	86
Figure 34 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection in vitro	87
Figure 35 : Les différentes étapes de la transfection in vitro	89
Figure 36 : Protocole de traitement avec les copolymères à blocs des cellules en amont ou en aval de la transfection	91
Figure 37 : Effet du traitement avec le Lutrol® sur l'expression d'un transgène.....	92
Figure 38 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur l'inhibition de gènes par siRNA	94
Figure 39 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection in vitro en fonction du promoteur du plasmide.....	96
Figure 40 : Suivi des transcrits de NFκB et de P53 dans les cellules traitées avec le Lutrol® in vitro	97
Figure 41 : Influence du promoteur sur l'efficacité de transfection des copolymères à blocs amphiphiles	98
Figure 42 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur le pourcentage de cellules transfectées évalué par cytométrie de flux	100

Figure 43 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur le pourcentage de cellules transfectées évalué par microscopie	101
Figure 44 : Visualisation par TEM de l'internalisation cellulaire de complexes DOSP-DOPE / plasmide / Nps (A-C) et après traitement avec le Lutrol [®] (D-F) dans des cellules H1299 observées 2h après la transfection.	102
Figure 45 : Effet de la complexation des plasmides aux Nps sur l'efficacité de la transfection et sur le prétraitement avec le Lutrol [®]	103
Figure 46 : Protocole de traitement avec les copolymères à blocs des cellules transfectées à 4°C.....	104
Figure 47 Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection à 4°C de cellules en culture	105
Figure 48 : Effet non saturable du Lutrol [®] sur l'internalisation des lipoplexes	106
Figure 49 : Transfection de cellules déplétées en Héparane-sulfate avec des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formulés avec du Lutrol [®]	109
Figure 50 : Protocole de précharge en lipides cationiques des cellules transfectées	110
Figure 51 : Transfection de cellules préchargées en lipides cationiques	111
Figure 52 : Activation de DAI lors du transfert de gène médié par le Lutrol [®]	113
Figure 53 : Variation de l'hématocrite de souris en fonction du temps après la multi-injection de formulations ADN/Lutrol [®]	115
Figure 54 : Réponse inflammatoire et analyse histopathologique de muscle de souris après transfert de gène médié par le Lutrol [®]	116
Figure 55 : Schéma récapitulatif	129

Abréviations

(+/-)	rapport de charges positives/charges négatives
AAV	« Adeno-Associated Virus »
ADN	Acide desoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARN db	ARN double brin
ARNm	ARN messenger
ATP	Adenosine triphosphate
BBMEC	« Blood brain microvessels endothelial cells »,
BCRP	« Breast Cancer Resistance Protein »,
BET	Bromure d'ethidium
BGTC	bis(guanidinium)-tren-cholesterol
CMC	« Critical Micellar Concentration »
CMH	Complexes majeurs d'histocompatibilité
CMT	« Critical Micellar Temperature »
CMV	Cytomegalovirus
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
cryo-TEM	cryo-microscopie électronique à transmission
Da	Dalton
DAI	« DNA Activator of IRFs »
DC-Chol	3[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholesterol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DOGS	dioctadécylamine-glycine-spermine
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOSK	DiOleylamine A-Succinyl-Kanamycine
DOSN	DiOleylamine A-Succinyl Neomycine
DOSP	DiOleylamine A-Succinyl-Paromomycine
DOSPA	2,3-dioléyloxy-N-2-(spermine-carboxamido)éthyl-N,N-diméthyl-1-propanammonium
DOST	DiOleylamine A-Succinyl-Tobramycine
DOTAP	chlorure de 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane
DOTMA	chlorure de N-[1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium
dsRNA	« double strand RNA
DTS	« DNA nuclear Targeting Sequences »
EPO	Erythropoïétine
EPR	« Enhanced Permeability and Retention effect »
F108	Pluronic F108, poloxamer 338
F127	Pluronic F127, poloxamer 407
F68	Pluronic F68, poloxamer 188, Lutrol®
F87	Pluronic F87, poloxamer 237
GAG	Glycosaminoglycannes
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GTP	Guanosine triphosphate
His-pLK	« Histidinated polylysine », Polylysine histidinylée
HLB	« Hydrophilic/Lipophilic Balance »

HS	Héparane-sulfate
IFN	Interféron
IRF	Interpheron Regulatory Factor
KanaChol	3 β -[6'-kanamycin-carbamoyl]cholesterol
L44	Pluronic L44, poloxamer 124
L61	Pluronic L61
L64	Pluronic L64, PE6400
MDR	« Multidrug Resistance », multidrogués résistantes
miRNA	« micro-RNA »
MRP	« Multidrug Resistance Proteins »,
MW	« Molecular Weight »
MyD88	« Myeloid Differentiation primary response gene 88 »
N/P	Rapport azotes/phosphates
NaCl	Chlorure de sodium
NF	« National Formulary »
NF κ B	« Nuclear Factor κ B »
NIS	« Na/I Symporteur »
NLS	« Nuclear Localisation Signal »
NPC	« Nuclear Pore Complex »
NPs	Nanoparticules
OE	Oxyde d'éthylène
OP	Oxyde de propylène
P85	Pluronic P85
PAMAM	Polyamidoamine
Pb	Paires de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
pCMV	Promoteur précoce du cytomégalovirus humain
pCMV-GFP	Plasmide codant pour le gène rapporteur de la GFP
pCMV-LacZ	Plasmide codant pour le gène rapporteur de la β -Galactosidase
pCMV-luc	Plasmide codant pour le gène rapporteur de la Luciférase
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PEG	poly(éthylène-glycol)
PEI	polyéthylèneimine
PEO	poly(éthylène oxyde)
PEVP	poly(N-ethyl-4vinylpyridinium)
Pgp	P-glycoprotéine
Phase HE	Phase Hexagonale inversée
PLL	Polylysine
PPIG3	Polypropylèneimine de troisième génération
PPO	poly(propylène oxyde)
pQE30	Plasmide vide
RISC	« RNA-induced silencing complex »
RLB	« Reporter Lysis Buffer »
ROS	« Reactive oxygen species »
SAXS	« Small Angle X-Rays Scattering »
SFM	« Scanning Force Microscopy »
shRNA	« short hairpin RNA »
siRNA	« short interfering RNA »

SP1017	Formulation Supratek Pharma de L61/F127 pour le transfert de gène
SP1049C	Formulation Supratek Pharma de L61/F127 pour le transfert de drogue
SV40	Simian Virus 40
SV40	promoteur précoce du virus simien SV40
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAT	peptides cationiques
TBK1	« TANK-binding kinase 1 »
Tf-PLL	Transferrine-Polylysine
TGKC	Triguanidinium-KanaChol
TLR	« Toll like Receptor »
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
w/v	« weight/volume »
wt	« Weight »
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
ZBP1	« Z-DNA Binding protein »

Avant propos

Les copolymères à blocs amphiphiles constituent aujourd'hui une classe de vecteurs synthétiques parmi les plus efficaces et les plus prometteuses pour le transfert de gènes *in situ* dans différents organes tels que le muscle (Lemieux *et al.* 2000; Pitard *et al.* 2002; Pitard *et al.* 2004; Yang *et al.* 2005), les poumons (Desigaux *et al.* 2005), le cœur (Pitard *et al.* 2002) ou encore les yeux (Liaw *et al.* 2001). S'ils sont efficaces *in vivo* pour acheminer un transgène dans des cellules au sein d'un organe, ces molécules sont en revanche révélées incapables de transfecter des cellules en cultures, et cette inefficacité *in vitro* demeure inexplicée. De fait, le mécanisme d'action suivant lequel ces nouveaux vecteurs potentialisent la transfection *in vivo* est encore peu connu, et peu de travaux ont été consacrés à la compréhension de ce mécanisme. Les récentes études menées par notre équipe ont démontré l'importance de bien maîtriser les différents paramètres inhérents aux vecteurs utilisés, en particulier *in vivo*, afin non seulement d'optimiser leur efficacité d'une part, mais également afin de mieux contrôler leurs niveaux de toxicité (Bello-Roufai *et al.* 2007; Barteau *et al.* 2008; Richard-Fiardo *et al.* 2008).

Ces copolymères à blocs constituent une famille de molécules hétérogène en termes de structure, de propriété physico-chimique, mais également d'activité biologique (**Chapitre 4 des Généralités**). Les connaissances acquises au cours de ces dernières années, notamment par l'équipe dirigée par Alexander Kabanov dans des domaines d'application extérieurs au transfert de gène (galénique, « drug delivery »...) ont révélé que ces molécules présentaient des propriétés multiples, et parfois opposées selon leur structure. Ces études représentent certes des pistes de recherche intéressantes afin d'identifier les leviers permettant à ces nouveaux vecteurs de transfecter un transgène *in vivo*, mais suggèrent avant tout que ces molécules agissent en transfert de gène suivant des modes d'action multiples étroitement liés à leur caractéristiques physico-chimiques.

Plusieurs hypothèses concernant différents polymères ont été émises par plusieurs groupes (Pitard *et al.* 2002; Yang *et al.* 2005; Gau-Racine *et al.* 2007; Bello-Roufai *et al.* 2007), mettant en avant des niveaux d'implication différents au cours de la transfection. La transfection peut en effet être décomposée en plusieurs étapes, matérialisées par différentes grandes barrières à l'expression d'un transgène depuis son interaction avec la cellule cible, son trafic intracellulaire jusqu'à sa translocation nucléaire et à sa transcription (**Chapitre 3 des Généralités**). Ces différentes barrières ont été particulièrement étudiées pour les vecteurs cationiques (décrits dans le **Chapitre 2 des Généralités**).

Au cours de cette thèse, j'ai mis au point un modèle d'étude permettant d'observer le rôle des copolymères à blocs sur les différentes étapes cellulaires de la transfection. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur le Lutrol[®], copolymère à blocs amphiphile non toxique et particulièrement efficace pour le transfert de gène musculaire, qui présente l'avantage d'être admis par les pharmacopées internationales et est déjà utilisé comme excipients dans de nombreux médicaments.

En utilisant plusieurs stratégies de transfection *in vitro* faisant intervenir le Lutrol[®] en association directe ou indirecte avec des vecteurs cationiques pour assurer un acheminement efficace du transgène jusqu'au noyau de cellules en culture, nous avons voulu déterminer son niveau d'implication dans la transfection, son rôle au niveau de la cellule et des acides nucléiques, mais également les raisons de son inaptitude à transférer des cellules en culture.

Une meilleure connaissance des propriétés propres aux différents copolymères à blocs permettra à terme de les utiliser de façon plus appropriée en choisissant des molécules correspondant au plus près à la problématique de la stratégie de vectorisation choisie, et de proposer des améliorations au niveau de la structure des différents modules qui les constituent.

Généralités

Chapitre 1. Transfert d'acides nucléiques et vectorisation

1. Le transfert d'acides nucléiques

La thérapie génique consiste à introduire dans des cellules cibles du matériel génétique sous forme d'ADN ou d'ARN pour compenser une déficience génétique ou pour médier indirectement un effet thérapeutique. Si le transfert de gène a été pensé dans un premier temps pour rétablir un ou plusieurs gènes altérés responsables de maladies génétiques, il peut également être employé comme « ADN-médicament ». En effet, les maladies traitées par médicaments protéiques tels que l'insuline ou l'érythropoïétine (EPO) peuvent en théorie l'être également par transfert du gène d'intérêt où l'ADN induira la synthèse de la protéine thérapeutique directement par les cellules de l'organisme.

De ce fait, le transfert d'acides nucléiques apparaît aujourd'hui comme une stratégie prometteuse pour traiter non seulement des maladies monogéniques mais également des maladies plus complexes. La thérapie génique peut être envisagée pour des pathologies ayant ou non des composantes génétiques (diabète, maladies cardiovasculaires) mais également pour des pathologies acquises comme le cancer et les maladies infectieuses.

La principale problématique du transfert de gène repose sur le fait que les acides nucléiques franchissent difficilement les membranes des cellules. Ces derniers comportent de nombreuses charges négatives apportées par les groupements phosphates des bases nucléiques, ce qui empêche leur interaction aux membranes biologiques, qui présentent elles-mêmes de nombreuses protéines anioniques à leur surface (Felgner *et al.* 1987; Farhood *et al.* 1992). *In vitro*, la transfection d'ADN nu ne conduit à aucune expression du transgène, et l'ADN internalisé dans les cellules se retrouve séquestré dans des endosomes. *In vivo* dans le muscle squelettique, les niveaux d'expression obtenus suite à l'injection d'ADN nu sont souvent trop faibles pour produire un effet thérapeutique (Davis *et al.* 1993). Seulement 1 à 2 % des fibres musculaires expriment le transgène, l'expression est limitée à la zone de l'injection (Levy *et al.* 1996), et l'ADN injecté présent dans l'espace extracellulaire est éliminé au bout de 90 minutes après injection intramusculaire (Manthorpe *et al.* 1993; Barry *et al.* 1999).

Le transfert de gène repose donc essentiellement sur la mise au point de stratégies de vectorisation efficaces et non toxiques pour le transport des acides nucléiques au sein des cellules cibles.

Deux grands types de vecteurs sont utilisés en transfert de gène, les vecteurs viraux qui concentrent la majorité des essais cliniques réalisés, et les vecteurs synthétiques dont l'avènement au cours de ces dernières années suscite de plus en plus d'intérêt.

L'utilisation des vecteurs viraux pour transporter un gène thérapeutique s'appuie sur la capacité naturelle des virus à pénétrer dans les cellules hôtes pour y transférer leur génome. Les virus sont capables de reconnaître une cellule hôte et d'y pénétrer, puis d'utiliser sa machinerie cellulaire pour se reproduire. Certains virus sont de plus capables d'intégrer leur propre matériel génétique dans le génome des cellules infectées, permettant la transfection stable de cellules mitotiques.

L'utilisation de virus comme vecteurs de transfert de gène implique leur modification afin qu'ils comportent la séquence du gène de la protéine thérapeutique à exprimer d'une part, et qu'ils n'aient plus la capacité de se multiplier au sein des cellules qu'ils ont infecté d'autre part. La production de ces vecteurs nécessite dans un premier temps une lignée cellulaire d'encapsidation exprimant les gènes de structure du virus afin de former des particules virales vides. Une construction génétique contenant la séquence d'ADN thérapeutique est introduite dans un deuxième temps dans les cellules d'encapsidation, permettant ainsi la production des virus recombinants comprenant le gène thérapeutique intégré à leur génome. Ces virus recombinants ne contiennent plus le matériel génétique viral nécessaire à la synthèse des protéines virales ainsi qu'à leur réplication, mais ils sont toujours capables de transférer leur matériel génétique aux cellules cibles.

Les vecteurs viraux les plus utilisés pour le transfert de gène dérivent principalement des rétrovirus, des adénovirus et des virus AAVs (Adeno-Associated Virus) et font l'objet de nombreux essais cliniques. S'ils permettent un transfert de gène très efficace *in vitro* et *in vivo* dans de nombreux types cellulaires, leur utilisation présente toutefois certaines limites. Leur pathogénicité ainsi que leur forte immunogénicité rendent en effet leur utilisation difficile, et interdisent les administrations répétées (Sakurai *et al.* 2008). De plus, la taille du transgène à transférer est limitée, leur production est difficile et coûteuse. En parallèle au développement des stratégies virales, une stratégie de vectorisation non virale s'appuyant sur des molécules de synthèse a donc émergé (Davis 2002; Li and Ma 2001).

2. Vectorisation synthétique d'acides nucléiques

Différentes stratégies ont été développées comme alternative aux vecteurs viraux. Les méthodes physiques telles que l'électroporation se sont montrées très efficaces pour transfecter des cellules en culture, mais également pour transfecter des fibres musculaires squelettiques *in vivo*. En marge de ces méthodes physiques, des méthodes dites chimiques se sont également considérablement développées aboutissant à une nouvelle classe de vecteurs : les vecteurs synthétiques.

Les vecteurs synthétiques, appelés également vecteurs non viraux présentent plusieurs avantages par rapport aux vecteurs viraux pour assurer un transfert de gène simple et efficace. Ils sont peu toxiques et peu immunogènes ce qui permet de réaliser des administrations répétées du transgène dont la taille n'est pas limitée en théorie. De plus, ils sont simples à élaborer, peu coûteux et faciles d'utilisation.

La conception d'un vecteur synthétique demande de prendre en considération la voie d'administration envisagée, *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*. La stratégie *in vitro* consiste à acheminer un transgène dans des cellules en culture, la transfection *in situ* consiste à transfecter les cellules d'un organe par injection directe, et enfin la stratégie *in vivo* consiste à acheminer le transgène à des cellules cibles après injection systémique.

La conception de vecteurs synthétiques doit répondre à un certain nombre de critères tenant compte de la voie d'administration. Idéalement, ces vecteurs doivent :

- (i) Condenser l'ADN, afin d'obtenir des particules de taille compatible à une internalisation cellulaire.
- (ii) Être furtifs, c'est-à-dire qu'ils doivent être le plus inertes possible, afin de ne pas interagir avec les fluides biologiques. De plus, ils ne doivent pas être immunogènes, doivent être non toxiques et provoquer un minimum d'inflammation.
- (iii) Être capables d'interagir avec les membranes des cellules ciblées, afin d'être internalisés.
- (iv) Être capables d'échapper à la séquestration endosomale du matériel génétique acheminé.
- (v) Permettre aux acides nucléiques de rallier le noyau, afin d'être transcrit.

Les vecteurs synthétiques sont principalement composés de molécules cationiques de nature lipidique ou polymérique, capables d'interagir avec les charges négatives de l'ADN (Chapitre 2). Il en résulte des complexes vecteur/ADN chargés positivement au sein desquels l'ADN est compacté et qui présentent pour la plupart une forte efficacité de transfection *in vitro*. C'est pourquoi aujourd'hui, la plupart des réactifs de laboratoire

commercialisés pour le transfert d'acides nucléiques *in vitro* sont constitués de ce type de molécules. La nature même de ces vecteurs, chargés positivement, limite cependant leur utilisation *in vivo*. En effet, leur injection locale au niveau d'un tissu, ou systémique directement dans la circulation sanguine, les amène à interagir avec les particules anioniques présentes dans le sang ou dans la matrice extracellulaire. Ce manque d'efficacité des vecteurs cationiques *in vivo* a provoqué l'émergence d'une nouvelle classe de vecteurs, formée de polymères non chargés et amphiphiles, les copolymères à blocs (Chapitre 4).

Ces molécules sont déjà utilisées pour de nombreuses applications chez l'homme, notamment en « drug delivery » ou comme excipients dans certains médicaments. Les copolymères à blocs amphiphiles ont été utilisés pour la première fois en 2000 pour vectoriser des acides nucléiques dans le muscle squelettique. La combinaison de deux copolymères à bloc amphiphiles a en effet permis de transfecter le muscle squelettique de souris de façon très efficace (Lemieux *et al.* 2000). Depuis, de nombreuses études ont démontré l'efficacité de ces polymères dans d'autres tissus (poumons, cœur...) et ils constituent aujourd'hui la classe de vecteurs synthétiques la plus efficace pour le transfert de gène *in vivo* (Kabanov *et al.* 2005).

A Nantes plus particulièrement, plusieurs études ont démontré l'efficacité de différents copolymères à blocs présentant des caractéristiques structurales et physicochimiques différentes (linéaires ou ramifiés, degré d'hydrophobicité différents...) (Pitard *et al.* 2002; Pitard *et al.* 2004) pour exprimer des gènes d'intérêt thérapeutique dans des tissus sains mais également pathologiques (Richard *et al.* 2005b; Desigaux *et al.* 2005). L'optimisation des conditions de transfection, des milieux de formulation, et de la stœchiométrie ADN/vecteur a permis d'obtenir des niveaux d'efficacité permettant un effet thérapeutique.

3. Transfert de gène dans le muscle squelettique

Le transfert de gène dans le muscle squelettique présente un fort potentiel pour différentes approches cliniques comme (i) le traitement local de maladie génétiques neuromusculaires, (ii) l'expression et la sécrétion locale ou dans la circulation sanguine de protéines thérapeutiques et (iii) l'expression d'antigènes pour des protocoles de vaccination prophylactiques ou thérapeutiques (Prud'homme 2000).

Le muscle représente un tissu cible de choix pour le transfert d'acide nucléique :

(i) il constitue un large volume facilement accessible (le muscle squelettique représente environ 40% de la masse corporelle).

(ii) contrairement aux autres cellules de l'organisme, les cellules musculaires possèdent plusieurs noyaux ce qui permet une bonne efficacité du transfert de gènes.

(iii) les fibres musculaires ont une longue durée de vie, car les cellules ne se divisent pas ce qui permet potentiellement une expression à long terme en l'absence de régénération musculaire importante. L'équipe dirigée par Wolff a rapporté que les cellules musculaires, après injection intramusculaire d'ADN nu chez la souris, étaient capables de prendre en charge l'ADN et de permettre son expression de façon stable pendant au moins deux ans (Wolff *et al.* 1990; Wolff *et al.* 1992; Hagstrom *et al.* 1996). En cas de lésion localisée, seule la partie endommagée de la fibre est régénérée, les noyaux des autres segments de la fibre restent viables et continuent à exprimer le transgène (Blaveri *et al.* 1999).

(iv) Outre les fibres musculaires et le tissu conjonctif qui le constituent, le muscle est parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Il possède ainsi une vascularisation sanguine importante permettant une délivrance du transgène par voie vasculaire. Cette caractéristique permet également d'utiliser le muscle squelettique comme organe sécréteur de protéines d'intérêt thérapeutique.

Dans le cadre du transfert de gène de protéines sécrétées en particulier, l'innocuité du vecteur est un des paramètres majeurs permettant de s'affranchir au maximum de réactions immunitaires dirigées contre la protéine transgénique. L'ADN est lui-même un puissant stimulant de la réponse immunitaire, n'ayant pas vocation à se retrouver dans le cytoplasme des cellules. Le vecteur se doit donc d'être assez efficace pour réduire au maximum la dose d'ADN injectée, tout en provoquant un minimum de toxicité et d'inflammation, délétères pour la pérennisation du transgène et pour l'intégrité de l'organe ciblé. Les nouvelles stratégies de vectorisation développées doivent donc répondre à un équilibre fragile entre efficacité, sécurité et furtivité.

4. Stabilité de l'expression du transgène

La stabilité de l'expression du transgène est une composante importante du transfert de gène. Elle est conditionnée par la transcription efficace du transgène et sa traduction en protéine. La diminution de l'expression du transgène après transfert non viral peut s'expliquer par (i) une dégradation ou une perte du transgène, (ii) un arrêt de la transcription du transgène dû à une inhibition de l'activité du promoteur ou (iii) une réponse immunitaire délétère à l'encontre de la protéine transgénique.

a. Perte du plasmide

Contrairement à certains vecteurs viraux, les processus d'intégration du transgène dans le génome après transfection non virale sont extrêmement rares. En l'absence d'intégration, la transfection par des techniques non virales aboutit à une perte progressive de l'expression de la protéine d'intérêt. En effet, les cellules mitotiques voient leur contenu en plasmide diminué de moitié à chaque division. Cependant, dans le cas de cellules post mitotiques telles que les cellules musculaires squelettiques, les cellules ne se divisent pas ce qui permet des durées d'expression beaucoup plus longues que dans des cellules en division. De plus, les cellules musculaires squelettiques sont plus pauvres en endonucléases que les cellules d'autres tissus (Barry *et al.* 1999). Cette faible quantité d'endonucléases, même si elle favorise essentiellement la transfection, participe à la bonne stabilité des plasmides transfectés dans le muscle.

b. Inhibition de la transcription

L'utilisation de promoteurs viraux comme CMV ou SV40 permet d'obtenir de fortes expressions du transgène. Ces promoteurs sont composés de motifs de fixation à de nombreux facteurs de transcriptions, ce qui leur permet d'être actifs dans l'ensemble des tissus, et pendant des périodes de temps longues. Cependant, certaines cytokines inflammatoires comme TNF α et l'INF γ inhibent l'activité de promoteurs d'origine virale (Qin *et al.* 1997). L'utilisation de promoteurs tissu-spécifiques permet une expression du transgène certes plus faible, mais indépendante de l'inhibition *via* les cytokines inflammatoires (Herweijer *et al.* 2001).

c. Transfert de gène et réponse immunitaire

Au cours de la dernière décennie, il était acquis que l'ADN nu en tant que tel ne provoquait pas de réponse immunitaire spécifique. L'essentiel des réponses inflammatoires et immunitaires dirigée contre l'ADN *in vivo* était expliqué par la présence de motifs CpG non

méthylés sur les séquences plasmidiques bactériennes (Krieg 1999; Barry *et al.* 1999). La réponse inflammatoire était dans ce cas médiée par les TLR9 (Toll like Receptor 9) situés au niveau de la membrane endosomale *via* l'activation de MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88).

En transfert de gène, une approche alternative consistait à utiliser des plasmides délétés en motifs CpG non méthylés (Thacker *et al.* 2006) ou encore des mini-plasmides circulaires, délétés pour la majorité des éléments plasmidiques superflus pour l'expression du transgène, contenant ainsi presque uniquement la cassette d'expression (Darquet *et al.* 1999; Chen *et al.* 2003).

En 2006, Ishii *et al.* ont découvert l'existence d'une réponse antivirale à l'ADN double brin indépendante des TLRs (Ishii *et al.* 2006). Stetson et Medzhitov ont démontré que la reconnaissance de l'ADN double brin avait lieu au niveau cytosolique et activait une réponse médiée par IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) (Stetson and Medzhitov 2006).

En 2007, le groupe de Takaoka a publié dans Nature des résultats démontrant l'existence d'une protéine cytosolique, anciennement connue sous le nom de DLM1 / ZBP1 (Z-DNA Binding protein), servant de sensor de l'ADN double brin. Ils ont baptisés ce sensor DAI pour « DNA-dependent Activator of IRFs » (Takaoka *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008; Takaoka and Taniguchi 2008). La présence d'ADN double brin cytosolique aboutit (i) à une réponse IFN (interféron) de type 1 *via* TBK1 (TANK-binding kinase 1) et IRF3, et (ii) à une réponse de type NF κ B dont les intermédiaires n'ont pas encore été identifiés (Figure 1).

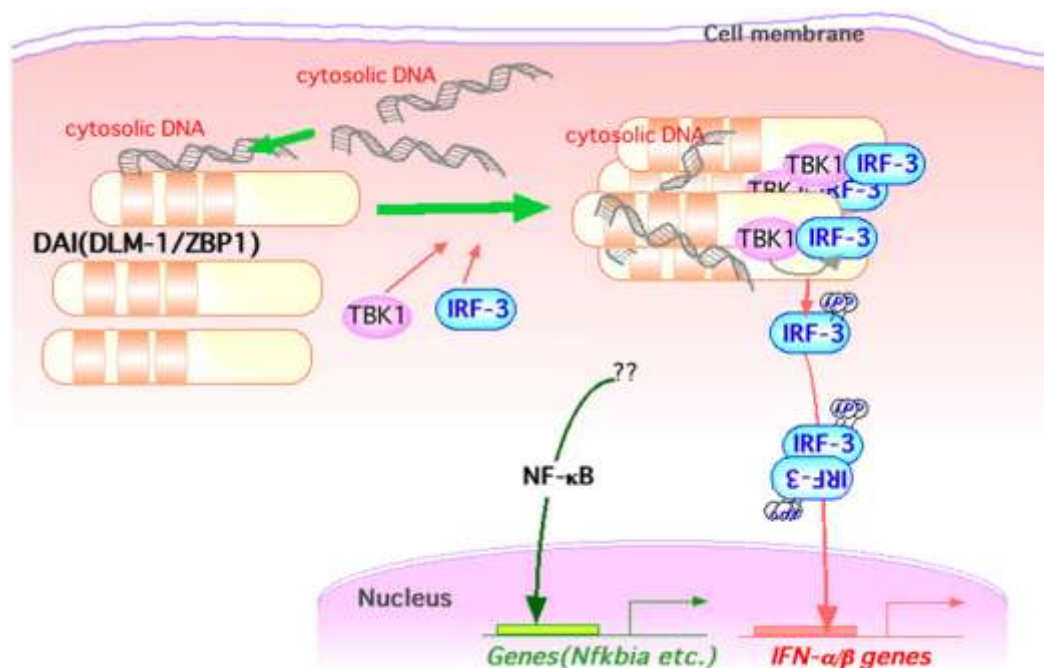


Figure 1 : Schéma des voies de signalisations activées par la reconnaissance d'ADN double brin cytosolique par DAI (DLM1/ZBP1). L'ADN double brin cytosolique se fixe à DAI (DLM1/ZBP1) et active (1) IFN de type 1 *via* TBK1 et IRF3 et (2) NF κ B *via* des intermédiaires encore inconnus (d'après Takaoka and Taniguchi 2008).

Ce sensor est exprimé dans de nombreux tissus tels que la rate, le thymus, le foie, les poumons ou le cœur, et son expression est elle-même activée par certains médiateurs de l'inflammation comme l'IFN- α/β ou NF κ B (Takaoka and Taniguchi 2008).

L'activation de voies inflammatoires – et notamment de ces sensors cytosoliques – représente une opportunité en vaccination ADN pour la production d'anticorps dirigés contre l'antigène exprimé. En revanche, dans une problématique d'expression d'une protéine d'intérêt, il est nécessaire de développer des vecteurs inertes, n'activant pas de cascades inflammatoires, tout en étant assez efficaces pour diminuer au maximum la quantité d'ADN injectée.

Chapitre 2. Les vecteurs synthétiques cationiques

A. Les lipides cationiques

1. Structure des lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles chargées positivement constituées de trois domaines fonctionnels : une tête hydrophile, chargée positivement, séparée par un bras espaceur à une queue hydrophobe (Figure 2).

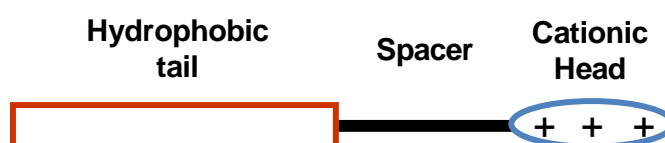


Figure 2 : Structure schématique des lipides cationiques. Les lipides cationiques sont constitués de 3 parties: la tête polaire qui porte les charges positives, le bras espaceur qui peut être utilisé pour introduire dans les lipides des fonctions biodégradables, et la partie hydrophobe constituée généralement de deux chaînes aliphatiques ou d'un groupement cholestérol.

La tête polaire est composée le plus souvent de fonctions amines protonables pouvant interagir avec les phosphates de l'ADN pour former des complexes lipide cationique/ADN. La tête polaire du lipide peut être monocationique ou polycationique.

Le bras espaceur influence la stabilité et la biodégradabilité du vecteur lipidique de par sa taille et sa nature.

La partie hydrophobe est composée soit de chaînes aliphatiques, soit d'un groupement cholestérol.

Les lipides cationiques développés ont souvent été associés à un co-lipide neutre, comme la **DOPE** (dioléoylphosphatidyléthanolamine) (Figure 3) pour permettre un transfert de gène efficace *in vitro*. En effet, la présence de la DOPE assure une meilleure efficacité de transfection de par ses propriétés fusogènes qui facilitent l'échappement endosomal par déstabilisation des membranes des endosomes (Hirsch-Lerner *et al.* 2005).

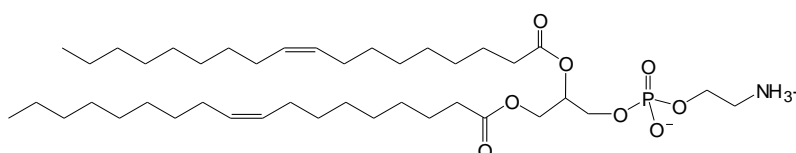


Figure 3 : Structure chimique de la DOPE

Les lipides cationiques seuls s'organisent en micelles en solution aqueuse. La formulation de ces lipides cationiques avec de la DOPE aboutit à la formation de liposomes (Figure 4).

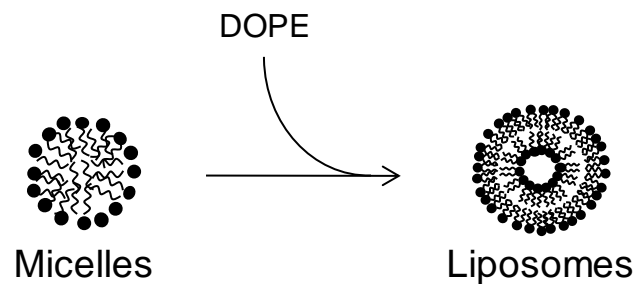


Figure 4 : Organisation des lipides cationiques en solution aqueuse, micelles et liposomes.

Les lipides cationiques peuvent être classés en trois catégories, les lipides monocationiques, les polycationiques et les dérivés du cholestérol.

a. Les lipides monocationiques

Le **DOTMA** (chlorure de N-[1-(2,3-dioléoxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) (Figure 5A) est le premier vecteur lipidique monocationique synthétique à avoir été développé (Felgner *et al.* 1987). Ce lipide était composé de deux chaînes d'acides gras reliées à une amine quaternaire simple par un bras espaceur. Felgner et Ringold ont alors montré que ce lipide, associé à un lipide neutre, la DOPE avait la capacité de transférer des cellules en culture de façon efficace, et ce dans plusieurs lignées cellulaires (Felgner and Ringold 1989), apportant pour la première fois la preuve de l'efficacité des lipides cationiques dans le transfert d'ADN *in vitro*. Ce lipide a été commercialisé sous le nom de Lipofectin®.

De nombreux lipides monocationiques ont alors été synthétisés en faisant varier la longueur de la chaîne d'acides gras ainsi que la taille et la nature du bras espaceur. Par exemple, le **DOTAP** (chlorure de 1,2-dioléoyl-3-triméthylammonium-propane) (Figure 5B) est un lipide monocationique couramment utilisé en transfert de gène qui ne diffère de la DOTMA que de par la nature du bras espaceur (McLachlan *et al.* 1995).

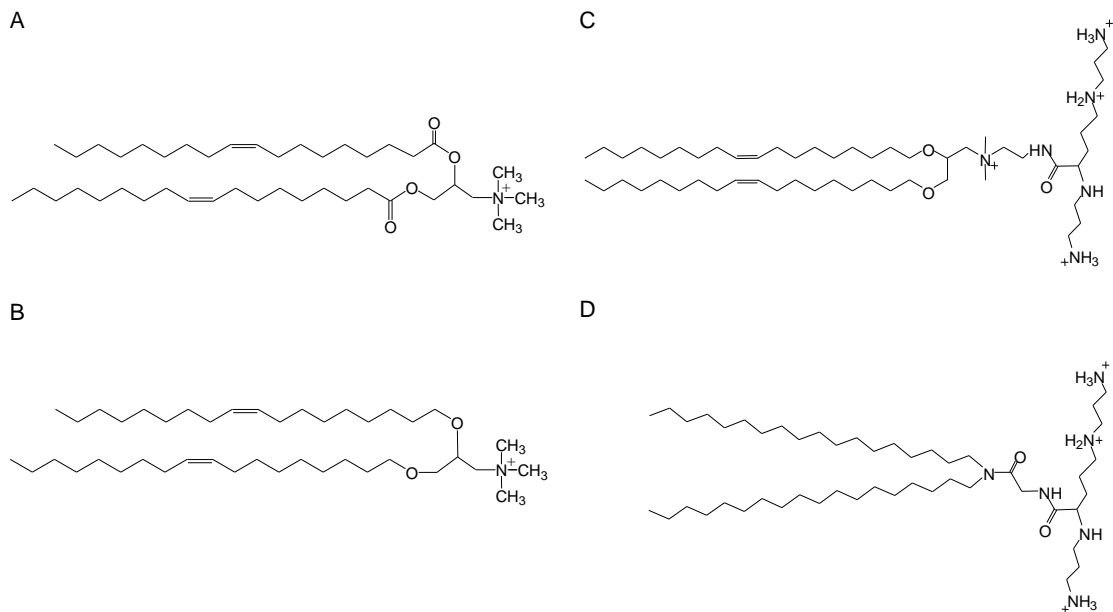


Figure 5 : Structure chimique des lipides monocationiques et polycationiques. (A) DOTMA, (B) DOTAP, (C) DOGS, (D) DOSPA

b. Les lipides polycationiques

L'augmentation du nombre de charges portées par la tête polaire du lipide en utilisant des composés polycationiques a alors été envisagée afin de faciliter la condensation de l'ADN. L'équipe française du Pr. J.P. Behr a mis au point le premier lipide polycationique, le **DOGS** (dioctadécylamine-glycine-spermine) (Figure 5C) constitué d'une polyamine de type spermine. Les nombreuses amines protonées de la spermine permettent une meilleure compaction de l'ADN ce qui permet un transfert de gène plus efficace, et ce même en absence de DOPE (Behr *et al.* 1989).

De plus, la tête spermine du DOGS est liée aux chaînes d'acides gras par une liaison peptidique métabolisable par la cellule, ce qui permet d'améliorer la biodégradabilité de ce vecteur lipidique. Ce lipide cationique est commercialisé sous le nom de Transfectam[®]. Le **DOSPA** (2,3-dioléyloxy-N-2-(spermine-carboxamido)éthyl-N,N-diméthyl-1-propanammonium) (Figure 5D) est un autre lipide polycationique, commercialisé sous le nom de Lipofectamine[®] lorsqu'il est mélangé à de la DOPE. La Lipofectamine[®] présente également une meilleure efficacité de transfection *in vitro* dans des cellules primaires ou en culture par rapport à celle obtenue avec les lipides monocationiques.

L'utilisation d'un composé polycationique naturel comme la spermine a permis non seulement de faciliter la compaction des acides nucléiques transfectés, mais également de générer des formulations moins toxiques.

c. Les dérivés du cholestérol

Le premier dérivé cationique du cholestérol est un lipide monocationique, le **DC-Chol** (3[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholesterol) (Figure 6A), utilisé en présence de DOPE pour former des liposomes qui conduisent à une forte efficacité de transfection dans de nombreux types cellulaires (Gao and Huang 1991; Gao and Huang 1995). L'utilisation de cholestérol pour former la partie hydrophobe du lipide cationique a été envisagée afin de faciliter la fusion des lipoplexes vecteur lipidique/ADN avec les membranes plasmiques permettant ainsi une meilleure internalisation cellulaire des lipoplexes (Chen and Rand 1997).

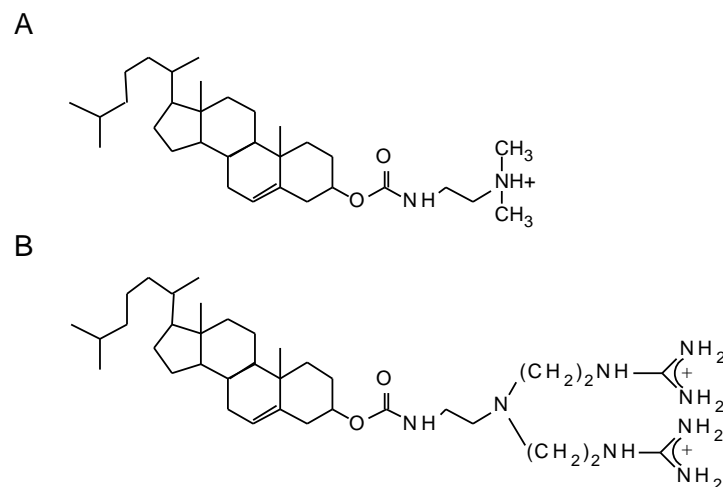


Figure 6 : Structure chimique des dérivés du cholestérol. (A) DC-Chol, (B) BGTC

La plupart des dérivés du cholestérol développés ensuite sont polycationiques, comportant une tête polaire de type spermine comme le cholestéryl-spermine, commercialisé sous le nom de Transfectall[®] (Moradpour *et al.* 1996). Afin d'améliorer l'efficacité de ces molécules dérivées du cholestérol, l'utilisation de tête polaire guanidinium a été testée. En effet, la fonction guanidine se trouve naturellement dans les arginines et joue un rôle important dans la liaison de l'ADN avec certaines protéines comme les histones. Différents dérivés lipidiques contenant une fonction guanidine ont donc été synthétisés, comme le **BGTC** (bis(guanidinium)-tren-cholesterol) (Figure 6B), qui associé à la DOPE a permis de transférer efficacement de nombreux types cellulaires *in vitro* (Vigneron *et al.* 1996; Pitard *et al.* 1999).

2. Les dérivés d'aminoglycosides pour le transfert d'acides nucléiques

a. Transfert d'ADN

En 2001, le KanaChol (3β -[6'-kanamycin-carbamoyl]cholesterol) (Figure 7A), un nouveau dérivé cationique du cholestérol comportant une tête polaire composée d'un aminoglycoside naturel, la kanamycin A, a été développé (Belmont *et al.* 2002). Les aminoglycosides sont des polyamines naturelles connues pour interagir avec les structures tridimensionnelles présentent sur de nombreux acides nucléiques comme les ARN. Il a alors été montré que ce nouveau lipide, tout comme son dérivé guanidinylé, le TGKC (triguanidinium-KanaChol) (Figure 7B), présentait une très bonne efficacité de transfection (Belmont *et al.* 2002).

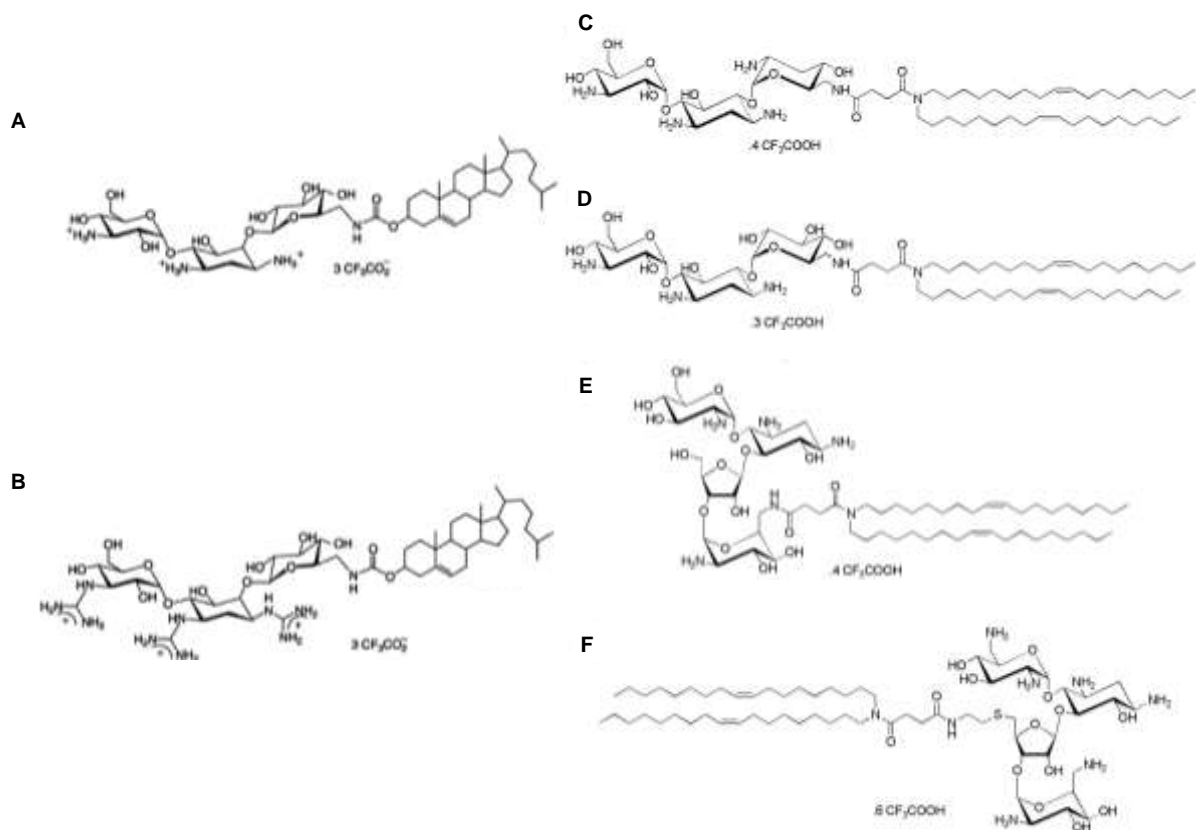


Figure 7 : Structure chimique des lipides cationiques dérivés d'aminoglycosides pour le transfert d'acides nucléiques. Lipides cationiques dérivés du cholestérol (A) KanaChol, (B) TGKC (d'après Belmont *et al.*, 2002) et dérivés de chaînes aliphatiques (C) DOST, (D) DOSK, (E) DOSP, (F) DOSN (d'après, Desigaux *et al.*, 2007).

Différents lipides cationiques dérivés de cholestérol ou de chaînes aliphatiques ont alors été synthétisés, utilisant une grande variété de têtes polaires constituées de composés naturels tels que la tobramycine, la kanamycine, la tobramycine, la néomycine et la paromomycine (Figure 7) (Belmont *et al.* 2002; Sainlos *et al.* 2005; Desigaux *et al.* 2007). Ces dérivés lipidiques d'aminoglycosides se sont révélés efficaces pour le transfert d'ADN *in vitro* dans différentes lignées cellulaires en culture mais également *in vivo* dans des

poumons de souris (Belmont *et al.* 2002; Sainlos *et al.* 2005). Parmi ces lipides cationiques, la **DOSP** (DiOleylamine A-Succinyl-Paromomycine) (Figure 7E) est dérivée de la paromomycine, et est une molécule particulièrement efficace et peu toxique. Au cours de ce travail de thèse, nous avons essentiellement utilisé ce lipide formulé avec de la DOPE pour la transfection d'ADN *in vitro*. Lors de certaines expérimentations, nous avons également été amenés à utiliser ces molécules pour le transfert d'un autre type d'acides nucléiques, les siRNAs.

b. ARN interférence et siRNAs

L'interférence ARN a été découverte fortuitement : en 1990, Napoli *et al.* souhaitant renforcer la couleur pourpre de pétunias introduisirent un gène encodant un pigment sous le contrôle d'un promoteur fort dans cette plante. De façon surprenante, certains pétunias devenaient partiellement ou totalement blancs, le gène introduit supprimant sa propre expression, mais également l'expression du gène endogène. Ce phénomène fut nommé « cosuppression » et s'est révélé agir au niveau post-translationnel dans plusieurs espèces de plantes et de champignons (Napoli *et al.* 1990; Cogoni *et al.* 1996; Cogoni and Macino 2000). En 1998, Fire *et al.* ont découvert le phénomène d'ARN interférence proprement dit (Fire *et al.* 1998). Ils ont démontré que l'on pouvait inhiber spécifiquement l'expression d'une protéine chez *Caenorhabditis elegans* en introduisant de l'ARN double brin. L'ARN interférent se lie spécifiquement avec l'ARN messager (ARNm) cible, conduisant à la dégradation de celui-ci et de ce fait à l'inhibition de l'expression de la protéine correspondante. Le phénomène d'ARN interférence s'est avéré être un processus naturel impliqué dans la régulation des gènes et dans les mécanismes de défense de la cellule contre les attaques virales. Andy Fire et Craig Mello ont reçu le 2 octobre 2006 le prix Nobel de médecine pour leurs travaux.

Dans les cellules de mammifères, la présence d'ARN double brin (ARN db) de grande taille induit cependant l'activation de la voie interféron qui aboutit à la dégradation non spécifique des ARN cellulaires et à la mort de la cellule (Moss and Taylor 2003). En 2001, Elbashir *et al.* introduisirent directement des siRNAs dans des cellules de mammifères, ce qui permit l'interférence ARN sans déclencher de réponse interféron majeure (Elbashir *et al.* 2001). L'introduction dans une cellule d'ARN db aboutit à son clivage par l'endonucléase DICER et à la formation de petits ARN db de 21 à 25 paires de bases appelés siRNAs (short interfering RNA) ou miRNAs (micro RNA) selon leur origine. L'un des brins du siRNA (le brin anti-sens) est alors assemblé au sein du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui permet de cliver l'ARNm ciblé (Figure 8). Au sein de ce complexe, le siRNA est le garant

de la spécificité du clivage de par sa complémentarité à l'ARN ciblé qui lui permet de s'y appaier.

Les miRNAs proviennent de gènes endogènes qui leurs sont propres et dont ils sont l'unique produit (Bartel 2004). Les siRNAs peuvent provenir de source endogène (parties exoniques du génome), ou de source exogène (virus, transposons). Les siRNAs peuvent également être introduits expérimentalement en vue d'inhiber l'expression d'un gène d'intérêt (siRNA duplex). Une autre façon d'inhiber expérimentalement l'expression d'un gène consiste à transfecter les cellules cibles à l'aide d'un vecteur d'expression encodant un shRNA (short hairpin RNA). Ces shRNAs sont également pris en charge par DICER pour générer des siRNAs.

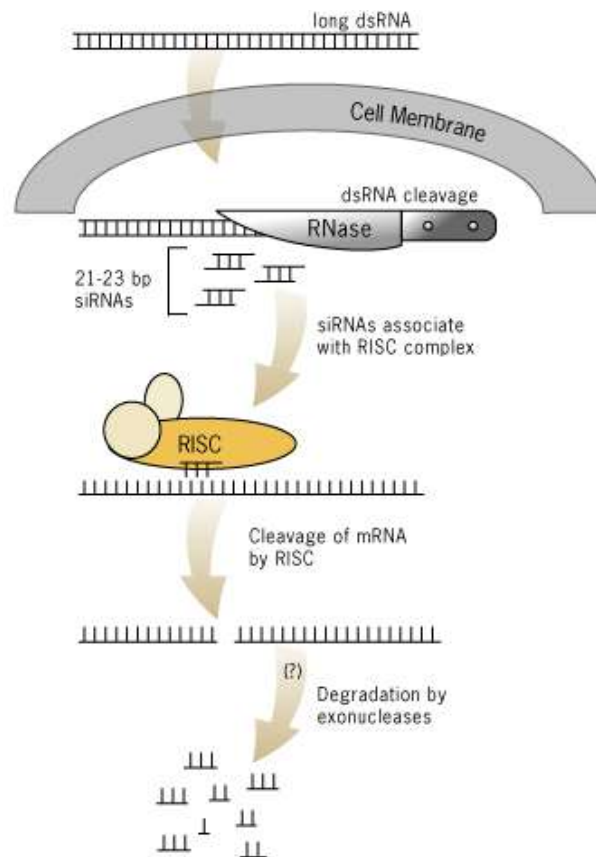


Figure 8 : Les grandes étapes de l'ARN interférence. L'ARN double brin (ARNdb ou dsRNA pour « double strand RNA ») est clivé en siRNAs qui sont associés au complexe RISC permettant l'inhibition spécifique de l'expression d'un gène ciblé par clivage de l'ARNm correspondant (<http://www.ambion.com/techlib/resources/RNAi/overview/index.html>).

L'utilisation d'ARN db de petite taille a ouvert la voie à l'inhibition spécifique de gènes d'intérêt, permettant dès lors l'étude de la fonction d'un gène précis par une méthode moins radicale que les techniques de « knock out » utilisées classiquement. L'utilisation d'ARN médicament pour inhiber l'expression de gènes d'intérêt thérapeutique représente également un des enjeux majeurs du développement d'outils de vectorisation efficaces.

Il est intéressant de noter que la transfection d'un plasmide pour exprimer un gène d'intérêt ou un shRNA et la transfection de siRNAs duplex ne relève pas des mêmes problématiques. En effet, l'ADN plasmidique et les siRNAs duplex présentent des tailles et des conformations spatiales très différentes, et ne ciblent pas les mêmes organites cellulaires. Ainsi, les acides nucléiques plasmidiques doivent être délivrés au niveau nucléaire, contrairement aux siRNAs qui ont leurs sites d'action au niveau cytosolique.

Dans le cadre de la réexpression d'un gène en vue de sécréter une protéine d'intérêt, la transfection de quelques cellules peut dans certain cas s'avérer suffisante ; en revanche le transfert de siRNA doit lui permettre d'atteindre l'ensemble des cellules exprimant le gène ciblé afin d'être efficace. Le développement d'outils de transfert de siRNA relève donc de contraintes différentes : si l'accession au site d'action demande de surmonter moins de barrières cellulaires que la transfection plasmidique, l'ensemble des cellules exprimant le gène ciblé doit être atteint.

c. Les dérivés d'aminoglycosides pour le transfert de siRNA

Le développement de lipides cationiques dérivés d'aminoglycosides pour le transfert de siRNA *in vitro* a fait l'objet d'une publication dans PNAS en 2007 : 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.

Les dérivés d'aminoglycosides composant la tête polaire de ces lipides sont connus pour interagir avec les structures tridimensionnelles présentes sur diverses molécules d'ARN (Belmont *et al.* 2002). La transfection de siRNA à l'aide de ces molécules a alors été envisagée. Quatre dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont été synthétisés à partir de quatre aminoglycosides différents, greffés sur une chaîne aliphatique diOleyle : la DiOleyleamine A-Succinyl-Tobramycine (DOST), DiOleyleamine A-Succinyl-Kanamycine (DOSK), DiOleyleamine A-Succinyl-Paromomycine (DOSP) et DiOleyleamine A-Succinyl-Neomycine (DOSN) qui présentent respectivement 4, 3, 4 et 6 amines protonables par groupement aminoglycoside (Figure 7 C, D, E, F). Ces lipides cationiques se sont révélés très efficaces pour la complexation de molécules de siRNAs et pour leur transfection *in vitro*. Nous avons en effet montré que la formulation de siRNAs marqués à l'aide de ces dérivés d'aminoglycosides permettait une très forte accumulation de siRNAs dans le cytoplasme des cellules transfectées. Cette forte accumulation de siRNAs était corrélée à une inhibition de plus de 80% de l'expression du gène ciblé, tant au niveau des transcrits que de la protéine (Desigaux *et al.* 2007).

3. Caractérisation des complexes lipide cationique/ADN

Une revue présentant les caractéristiques physicochimiques des complexes lipide cationique/ADN essentielles à une efficacité de transfection optimale a été publiée dans la revue *Current Gene Therapy* en 2008 : 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.

Les lipides cationiques représentent un outil efficace pour le transfert de gène dans des cellules en culture (Gao and Huang 1995) mais ils s'avèrent en général peu efficaces *in vivo*. L'efficacité de transfection des lipides cationiques dépend de nombreux paramètres. En effet, les variations des groupements cationiques constituant la tête polaire et la nature des chaînes acyles des lipides ainsi que le ratio lipide/ADN, la taille, la forme des lipoplexes et le type de cellules à transférer, déterminent les propriétés et l'efficacité de transfection de chaque lipide cationique (Katsel and Greenstein 2000; Pitard 2002).

Afin d'améliorer l'efficacité de ces vecteurs *in vivo*, les recherches se sont concentrées sur l'étude de la relation entre la structure du lipide et celle des lipoplexes, en fonction de son efficacité de transfection.

Les complexes lipide cationique/ADN sont formés à partir de lipides préparés sous forme de liposomes ou de micelles qui sont ensuite formulés à une solution d'ADN plasmidique (Pitard 2002). Les liposomes sont obtenus soit par réhydratation du film lipidique (Szoka, Jr. and Papahadjopoulos 1978), soit par extrusion.

Ils présentent une structure unilamellaire d'environ 100 à 200 nm de diamètre, et sont généralement préparés avec un lipide neutre tel que la DOPE. La formation des lipoplexes repose sur un mécanisme d'auto-assemblage faisant principalement intervenir des interactions électrostatiques entre l'ADN plasmidique et le lipide cationique. Il est donc important de définir pour chaque lipoplexe le rapport de charge lipide cationique/ADN (+/-), correspondant au nombre de moles de charges positives apportées par le lipide cationique par rapport au nombre de moles de charges négatives apportées par les groupements phosphates de l'ADN. Ce rapport de charge lipide cationique/ADN (+/-) détermine la taille et la charge globale des complexes ainsi que le degré de complexation de l'ADN et donc l'efficacité de transfection.

Différentes techniques ont été développées pour caractériser la structure supramoléculaire des lipoplexes et comprendre ainsi les mécanismes impliqués dans leur formation (Barteau *et al.* 2008) :

(i) La mesure de la taille des lipoplexes est généralement étudiée par diffusion quasi-élastique de la lumière et par microscopie électronique.

(ii) La complexation de l'ADN est évaluée par des expériences d'électrophorèse sur gel d'agarose et par mesure de l'extinction de la fluorescence du bromure d'éthidium (BET) en solution.

(iii) La charge de surface des lipoplexes est définie par la mesure du potentiel zéta.

a. Complexation de l'ADN au sein des complexes lipide cationique/ADN

L'état de complexation des molécules d'ADN au sein des lipoplexes est habituellement évalué par fluorescence (Eastman *et al.* 1997; Ferrari *et al.* 1998). Le BET est une sonde fluorescente très fréquemment utilisée, qui s'intercale entre les paires de bases de l'ADN lorsque ce dernier n'est pas complexé aux lipides cationiques. La fluorescence est exprimée en pourcentage à partir du niveau de fluorescence d'une solution d'ADN plasmidique non complexé aux lipides cationiques obtenue en présence de BET.

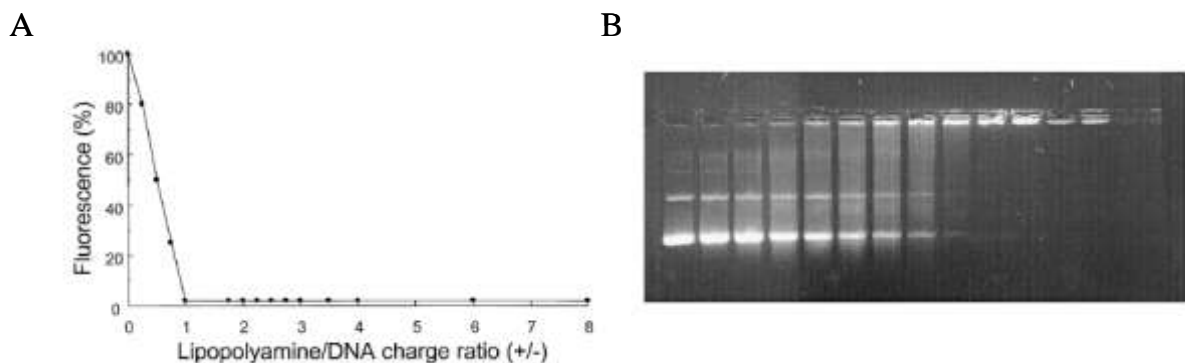


Figure 9 : Complexation de l'ADN au sein des lipoplexes. (A) Mesure de la fluorescence résiduelle du BET en fonction du rapport de charge (+/-). (B) Gel d'agarose des lipoplexes lipopolyamine-ADN en fonction du rapport de charge (+/-). Les puits contiennent des lipides et de l'ADN aux rapports de charge (+/-) suivants (gauche à droite) : 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9, 1 et 2. (d'après Barteau *et al.*, 2008).

La Figure 9 présente un résultat typique obtenu suite à la complexation d'ADN plasmidique à de la lipopolyamine (Barteau *et al.* 2008). L'intensité de fluorescence est mesurée en fonction du rapport de charge exprimé en mole de charge positive par mole de charge négative. Pour des rapports de charge compris entre 0 et 1, l'intensité de la fluorescence du BET diminue brutalement avec l'augmentation du rapport de charge (+/-), passant de 100% à des valeurs proches de 0. Pour des rapports de charge supérieurs à 1, l'intensité de fluorescence ne varie plus, restant proche de 0. Ce résultat montre que l'ADN plasmidique est accessible au BET pour des rapports de charges inférieurs à 1, indiquant que l'ADN plasmidique est peu complexé. En revanche, pour des rapports de charge plus élevés (supérieurs à 1), l'intensité de la fluorescence du BET en solution tend vers des valeurs très faibles. Par conséquent, la totalité des molécules d'ADN est complexée au sein des lipoplexes pour des rapports de charge (+/-) supérieurs à 1. Ces expériences de mesure de la fluorescence en solution permettent d'apporter des renseignements précis sur la

complexation des molécules d'ADN à des rapports de charge élevés. En revanche pour des rapports de charge plus faibles (de 0 à 1), il n'est pas possible de déterminer si la fluorescence mesurée résulte d'une faible complexation de l'ADN permettant un accès au BET ou de la présence d'ADN nu libre en solution.

Afin de caractériser plus précisément l'état de complexation de l'ADN par les lipides cationiques, le suivi des complexes peut être effectué par migration sur gel d'agarose 0,8% en présence de BET (Eastman *et al.* 1997). Une solution d'ADN plasmidique a la capacité de migrer à travers un gel d'agarose chargé en BET lorsqu'il est placé sous un champ électrique (premier puits en haut à gauche, Figure 9B). Dans le cas des lipoplexes lipopolyamine-ADN, l'ADN formulé en présence de lipide cationique à un rapport de charge (+/-) croissant migre de moins en moins dans le gel d'agarose. En effet, à partir du rapport de charge de 1, aucune molécule d'ADN ne migre dans le gel (Figure 9B), ce qui corrobore les mesures de fluorescence du BET en solution (Figure 9A). Ces expériences complémentaires permettent de plus de démontrer que pour des rapports de charge inférieurs à 1 (+/-), les solutions ne sont pas composées exclusivement d'ADN faiblement complexé, mais également d'ADN nu, comme le prouve la fluorescence émise au niveau des puits, mais également au niveau de l'ADN migrant librement dans le gel. En revanche, pour des rapports de charge fortement positifs, aucune émission de fluorescence n'est visible au niveau des puits, indiquant que l'ADN est fortement complexé par les lipides cationiques et n'est plus accessible au BET. Ces conclusions ont également été mises en évidence pour de nombreux lipides cationiques quelque soit leur structure supramoléculaire initiale (Pitard 2002; Barteau *et al.* 2008).

b. Stabilité colloïdale, taille et morphologie des lipoplexes

La taille et la charge globale des complexes lipide cationique/ADN dépendent directement du rapport de charge (+/-) auquel ils sont formulés. Le rapport de charge (+/-) utilisé conduit à la formation d'objets différents en terme de caractéristiques physico-chimiques et de stabilité colloïdale. Ces paramètres de charge, de taille et de stabilité colloïdale influencent directement l'efficacité de la transfection (Pitard 2002; Barteau *et al.* 2008). Le diamètre moyen des objets formés suite à la complexation de l'ADN plasmidique avec des lipides cationiques est habituellement évalué par diffusion quasi élastique de la lumière, et peut être également déterminé par visualisation en microscopie électronique. La stabilité colloïdale des objets formés peut être définie par trois zones principales A, B et C suivant le rapport de charge auquel sont formulés les lipoplexes (Figure 10), et prévaut pour l'ensemble des lipides mono ou polycationiques, organisés en micelles ou en liposomes.

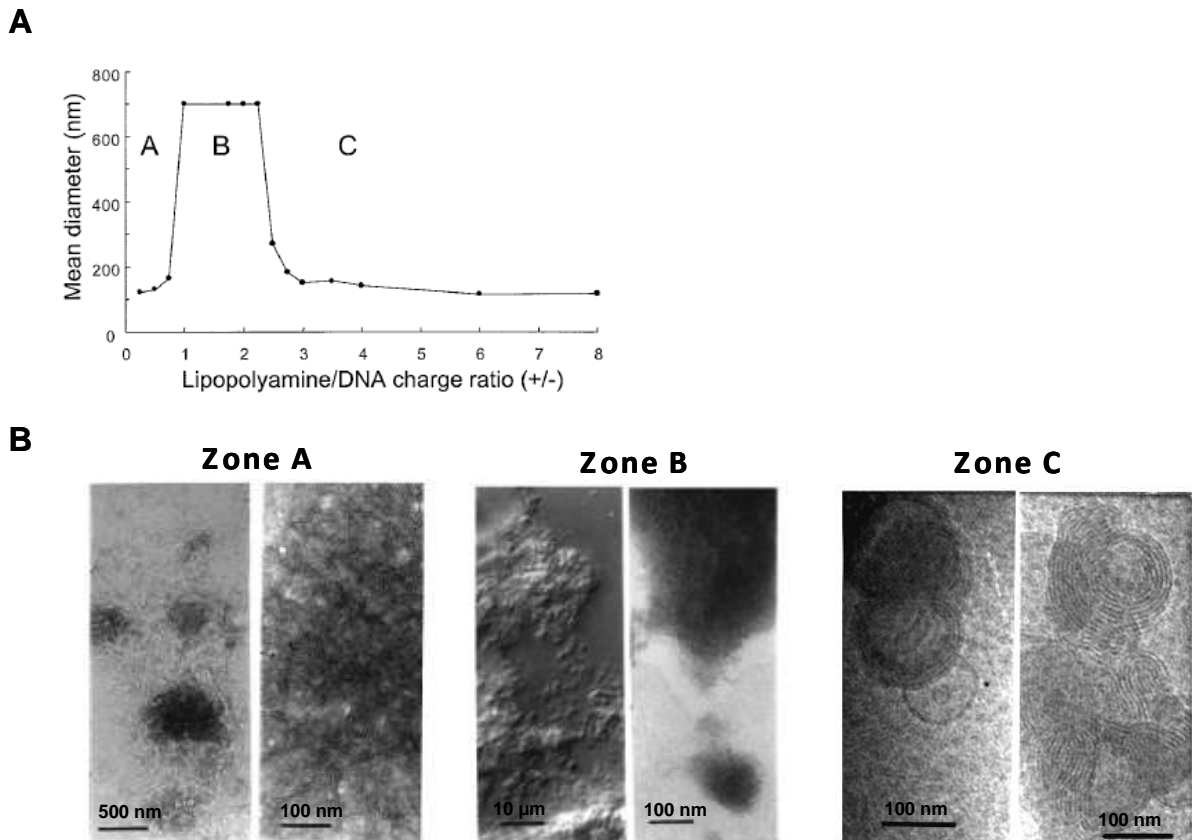


Figure 10 : Stabilité colloïdale des lipoplexes lipopolyamine-ADN. (A) La taille des lipoplexes lipopolyamine-ADN a été mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière en fonction du rapport de charge lipide cationique/ADN (+/-). (B) Visualisation des lipoplexes issus des trois zones de stabilité colloïdale A, B et C par cryo-TEM (Modifié d'après Barteau *et al.*, 2008; Pitard *et al.*, 1997; Pitard *et al.*, 2002).

- La zone A correspond à des objets de 200nm de diamètre environ, formés à des rapports de charge inférieur à 1. L'ADN est condensé au sein de lipoplexes comprenant une charge globale négative, et stables colloïdalement. Outre ces complexes ADN lipide, cette zone comprend également de l'ADN non condensé.
- Les objets de la zone B sont formés à des rapports de charges situés entre 1 et 2, proche de l'électroneutralité. Ces objets sont formés d'ADN condensé au sein de lipoplexes de charge globale essentiellement neutre, se qui interdit toute répulsion électrostatique. Cette zone est donc essentiellement constituée de complexes instables colloïdalement aboutissant à la formation d'agrégats.
- Enfin, les objets de la zone C comportent une charge globale positive et sont composés d'ADN condensé au sein de lipoplexes de 100 nm de diamètre environ. Les objets de la zone C sont stables colloïdalement de par la forte répulsion électrostatique engendrée. Ces lipoplexes chargés positivement sont capables de conduire à une transfection efficace de cellules *in vitro* de par leur internalisation *via* les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires chargées négativement (Pitard *et al.* 1997).

Le rapport de charge n'est cependant pas le seul paramètre déterminant la stabilité colloïdale des complexes. En effet, l'augmentation de la concentration en NaCl du milieu de formulation, du pH ou encore de la concentration de l'ADN complexé aboutit à une extension de la zone B et à une diminution de la zone C (Turek *et al.* 2000). Pour un rapport de charge similaire, des objets formés suivant deux formulations différentes pourront présenter des stabilités colloïdales différentes, et donc des efficacités de transfection différentes.

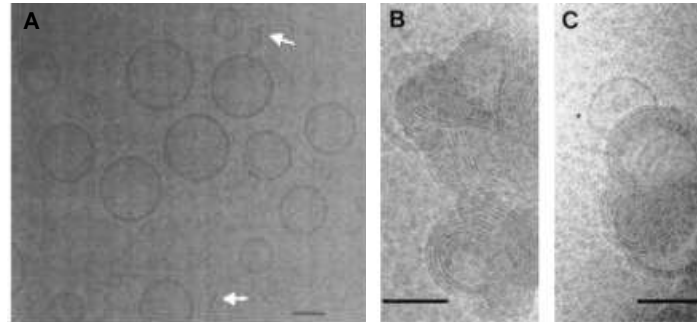


Figure 11 : Cryo-TEM des lipoplexes de BGTC/DOPE-ADN. (A) Liposomes de BGTC-DOPE ; (B) et (C) Lipoplexes BGTC/DOPE-ADN issus de la zone C (d'après Pitard B *et al.*, 1999).

Indépendamment du rapport de charge utilisé, les lipoplexes lipide cationique / ADN formulés à partir de lipides tels que la lipopolyamine ou de liposomes de BGTC-DOPE (Figure 11A) présentent une structure multilamellaire (Figure 11B et C). L'ADN est pris en sandwich entre deux couches de lipides, aboutissant à la formation de structures concentriques multilamellaires dites « en oignon » (Pitard *et al.* 1999).

D'autres structures supramoléculaires ont pu être observées notamment suite à l'utilisation de lipides cationiques en présence de DOPE. Une nouvelle structure de type hexagonale inversée (HE) a été mise en évidence pour les lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN (Figure 12) (Koltover *et al.* 1998).

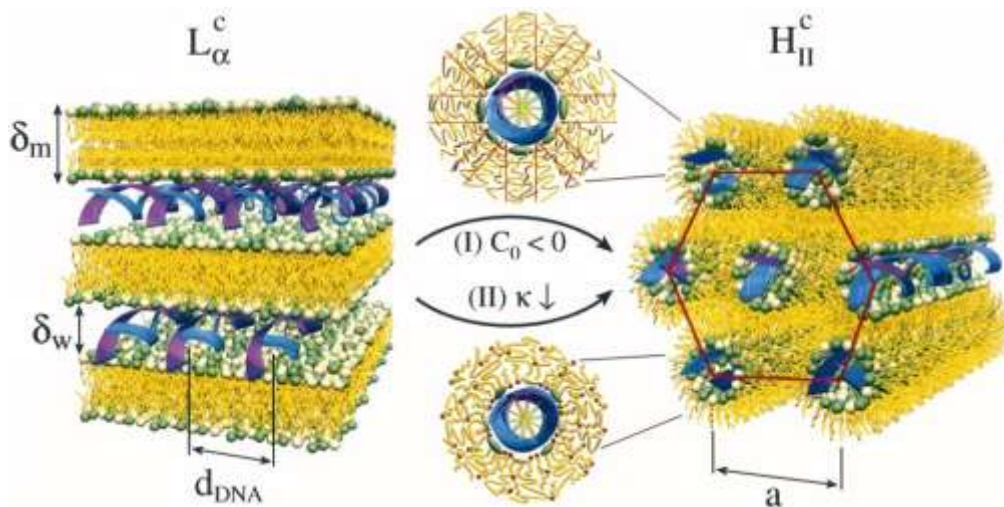


Figure 12 : Représentation schématique de la phase hexagonale inversée proposée pour les lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN. L'ADN (en bleu) s'organise avec les lipides (en jaune) en une structure de type lamellaire (L) ou hexagonale inverse (H) (d'après Koltover *et al.*, 1998).

La phase HE observée pour la formulation des lipoplexes DOTAP/DOPE-ADN serait due à la présence du co-lipide neutre, la DOPE. Cependant, il est difficile d'établir des règles générales quant à l'effet de la DOPE sur l'assemblage supramoléculaire des lipoplexes et de la formation de la phase HE. En effet, dans la majorité des études réalisées, ce sont des structures multilamellaires qui ont été le plus souvent caractérisées.

4. Efficacité de transfection des lipides cationiques *in vitro*

L'efficacité de transfection d'un lipide dépend de la lignée cellulaire utilisée (Liu D *et al.* 2003). Cependant, les données de la littérature permettent de définir l'effet de la structure des complexes lipide cationique/ADN sur l'efficacité de transfection (Bartreau *et al.* 2008). En effet, il a été largement montré que le rapport de charges +/- influençait la taille, la stabilité colloïdale, le potentiel zêta et donc les interactions des complexes lipide cationique/ADN avec les membranes cellulaires ainsi que leur internalisation (Pitard 2002). Les complexes lipide cationique/ADN qui présentent les meilleures efficacités de transfection sont les lipoplexes appartenant à la zone C. En effet, les lipoplexes issus de cette zone correspondent à des complexes assurant une condensation complète des molécules d'ADN, et comportent une charge globale positive, ce qui leur permet d'interagir avec les charges négatives présentes à la surface des membranes cellulaires. Les objets de la zone B, bien qu'instables colloïdalement, conduisent également à une transfection relativement efficace qui reste néanmoins nettement inférieure à celle obtenue avec les lipoplexes de la zone C. Dans la plupart des protocoles de transfection *in vitro* disponibles dans le commerce, les fournisseurs recommandent généralement d'utiliser un excès de lipide cationique par rapport à l'ADN. Une optimisation de la quantité d'ADN et du rapport de charge lipide cationique/ADN est également suggérée pour chaque lignée cellulaire. Afin de s'affranchir des effets néfastes engendrés par l'apport cellulaire d'une grande quantité de lipides cationiques, il faut déterminer les conditions idéales de transfection en se situant dans la zone C tout en amenant un minimum de lipides.

B. Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont également utilisés pour la transfection d'acides nucléiques *in vitro* et *in vivo*. Tout comme les lipides cationiques, les polymères cationiques s'auto-assemblent avec l'ADN par interactions de charges, pour conduire à la formation de complexes polymère cationique/ADN appelés polyplexes (Felgner PL *et al.* 1997). Les polymères cationiques généralement utilisés pour le transfert de gène sont les dérivés de polyéthylèneimine (PEI) ou de polylysine (PLL). D'autres types de polymères cationiques sont également utilisés, comme les dendrimères et les chitosans.

a. Les polyéthylèneimine (PEI)

Le PEI est un polymère cationique possédant une activité intrinsèque endosomolytique, et est utilisé depuis longtemps pour le transfert d'ADN (Boussif *et al.* 1995; Demeneix and Behr 2005). Le PEI est un polymère formé par la répétition d'une unité éthylène-imine présentant une fonction amine tous les trois atomes. Ainsi la présence de fonctions amines protonables à pH physiologique, lui confère une importante densité de charges cationiques qui assure la complexation de l'ADN par interactions électrostatiques. De plus, cette forte densité de charges participe à l'échappement endosomal des polyplexes lors du trafic intracellulaire en faisant du PEI une véritable « éponge à protons » (Boussif *et al.* 1995). Cette particularité contribue à l'efficacité de transfection du PEI à la fois pour le transfert de gène *in vitro* et *in vivo*.

b. La polylysine (PLL)

La PLL est un des polymères cationiques les plus utilisés pour le transfert d'ADN (Wolfert *et al.* 1999). En effet de par sa structure peptidique, la PLL possède une nature biodégradable, avantage non négligeable pour une utilisation *in vivo*. Les polyplexes PLL/ADN sont internalisés dans les cellules de façon comparable à celle des polyplexes PEI/ADN mais leur efficacité de transfection est plus faible. Cette faible activité serait due au nombre insuffisant de groupements amines constituant la PLL qui présenterait alors une activité endosomolytique trop faible pour assurer l'échappement endosomal des polyplexes PLL/ADN qui seraient donc dégradés par les lysosomes (Merdan *et al.* 2002; Morille *et al.* 2008). Afin d'améliorer l'efficacité de transfection de la PLL, les polyplexes PLL/ADN sont généralement transfectés en présence d'un agent endosomolytique comme la chloroquine dans le milieu de culture (Pouton *et al.* 1998; Wagner *et al.* 1992).

c. Les chitosans

Les chitosans sont des polysaccharides cationiques linéaires et biodégradables composés d'unités N-acétyl-glucosamine et D-glucosamine liées par des liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$. Ils sont capables d'interagir avec l'ADN par interactions électrostatiques et de former ainsi des petites particules stables. Ce polymère cationique offre également une protection contre la dégradation par les DNases qui est comparable à celle du PEI (Koping-Hoggard *et al.* 2001). Les chitosans permettent un transfert de gène efficace *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs types cellulaires. Cependant, leur efficacité reste plus faible que celle générée par les lipides cationiques ou par d'autres polymères cationiques (Li and Ma 2001).

d. Les dendrimères

Les dendrimères sont des polymères sphériques branchés qui ont la spécificité d'avoir une structure tridimensionnelle hiérarchique (Dykes *et al.* 2001). Le cœur de la molécule joue le rôle de point central à partir duquel les monomères se ramifient de façon ordonnée et symétrique (Figure 13). La plupart des dendrimères utilisés sont des polyamines, des polyamides ou des polyesters, mais le plus fréquemment utilisé est le polyamidoamine (PAMAM) qui a été développé en 1993 par l'équipe de Szoka pour être utilisé comme vecteur synthétique cationique pour le transfert de gène (Haensler and Szoka, Jr. 1993).

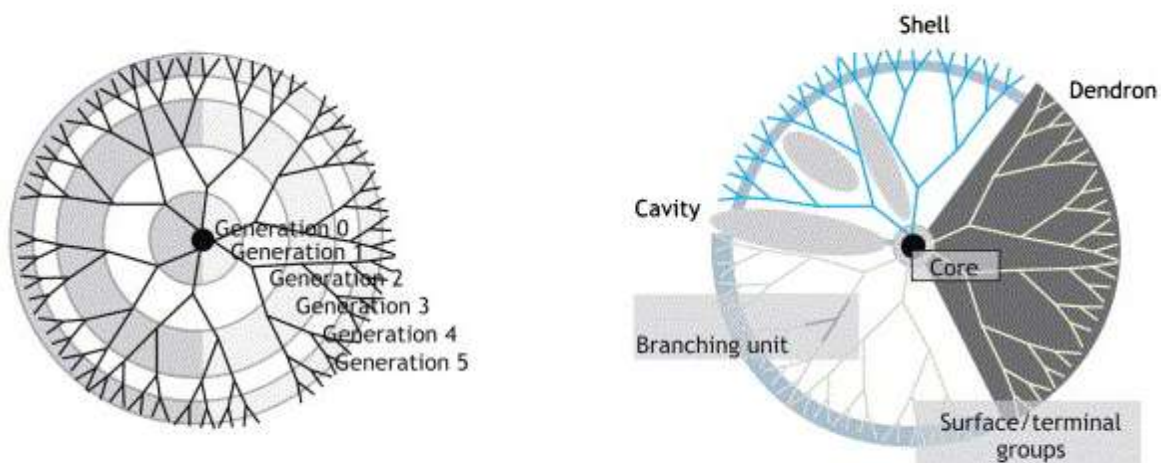


Figure 13 : Schéma de la structure générale des dendrimères. (d'après Dufes *et al.*, 2005).

Cette architecture moléculaire confère aux dendrimères des propriétés différentes par rapport à tous les autres polymères employés pour le transfert d'ADN. Leur méthode de synthèse permet de contrôler la formation des dendrimères puisqu'elle est réalisée génération par génération, et chaque point de ramification correspond à une génération

(Figure 13). En général, les dendrimères synthétisés sont cationiques avec une taille et une structure bien caractérisées ainsi qu'avec une faible polydispersité.

La densité de charges positives est plus importante au niveau de la surface de la molécule, c'est à dire au niveau des groupements amines terminaux. Les amines protonées à la surface permettent de condenser efficacement l'ADN, et les amines du cœur de la molécule auraient un rôle de neutralisation lors de l'acidification dans les endosomes, facilitant ainsi la libération des polyplexes dans le cytoplasme. La taille et le diamètre des dendrimères ont une influence sur leur efficacité de transfection. En effet, l'efficacité de transfection obtenue avec des dendrimères comptant entre 5 à 10 générations est nettement supérieure à celle obtenue pour des dendrimères n'en comptant que 5 au maximum (Kukowska-Latallo *et al.* 1996). Cependant, le dendrimère PAMAM interagit plus efficacement avec l'ADN de par sa partielle dégradation qui rend ses structures plus flexibles lors de la complexation avec l'ADN (Tang *et al.* 1996). Par conséquent, certaines équipes ont déjà développé des dendrimères dégradés appelés « fractured dendrimers » qui sont vraisemblablement plus flexibles et moins toxiques que les dendrimères non dégradés ce qui leur permet de former des polyplexes plus stables (Morille *et al.* 2008).

Une étude récente menée chez la souris a montré que des nanoparticules formées d'un dendrimère de polypropylenimine de troisième génération (PPIG3) complexant l'ADN, avait la capacité de transfecter des tumeurs sous-cutanées *in vivo* après injection systémique, et ce de manière spécifique. L'utilisation d'un transgène encodant un gène antitumoral permettait d'obtenir un effet thérapeutique sur les animaux traités (Dufes *et al.* 2005). Au cours de cette thèse, j'ai participé à un travail collaboratif ayant pour objectif de vérifier la spécificité de la transfection au niveau des tumeurs sous-cutanées, et d'expliquer l'affinité tumorale de l'expression du transgène. L'utilisation du gène rapporteur Na/I symporteur (NIS) a permis de visualiser les cellules transfectées *in vivo* sur animal entier par radiomarquage, et il a été observé que cette expression était cantonnée aux tumeurs sous-cutanées. Ces résultats ont été confirmés par recherche du plasmide transfecté par PCR quantitative dans de nombreux tissus (muscle, reins, foie, rate...). La caractérisation physicochimique de ces nanoparticules nous a permis de démontrer que leur diamètre était incompatible avec le passage au niveau des endothéliums des tissus sains, mais qu'en revanche il permettait un passage au niveau des endothéliums tumoraux *via* un effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect). L'effet EPR a été décrit pour la première fois par Matsumura et Maeda, et constitue un mécanisme fondamental permettant aux objets remplissant des caractéristiques précises en termes de taille et de surface de passer au travers la fenestration endothéliale du réseau vasculaire tumorale, qui présente la

caractéristique d'être plus grande et plus désorganisée que la fenestration des tissus sains (Matsumura and Maeda 1986). Les résultats obtenus ont ainsi permis de démontrer que de par leur taille, les complexes injectés dans la circulation n'étaient aptes à transfecter que les cellules des tumeurs sous-cutanées. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Cancer Research* en 2009 : Chisholm, E. J., Vassaux, G., Martin-Duque, P., **Chevre, R.**, Lambert, O., Pitard, B., Merron, A., Weeks, M., Burnet, J., Peerlinck, I., Dai, M. S., Alusi, G., Mather, S. J., Bolton, K., Uchegbu, I. F., Schatzlein, A. G., and Baril, P. (2009) **Cancer-specific transgene expression mediated by systemic injection of nanoparticles.** *Cancer Res* **69**, 2655-2662.

Chapitre 3. Les grandes étapes cellulaires du transfert de gène

A. Internalisation des complexes

1. Interaction aux membranes

Les complexes ADN/Lipides cationiques ou ADN/polymères cationiques interagissent avec les membranes des cellules *via* des interactions électrostatiques non spécifiques. Les complexes présentent une charge globale positive qui leur permet d'interagir avec les membranes cellulaires globalement chargées négativement.

En effet, les molécules anioniques présentent sur ces membranes, comme les protéoglycanes (héparane sulfates) et les intégrines, jouent un rôle déterminant dans la fixation des lipoplexes, des polyplexes, mais également des peptides cationiques comme TAT (Behr *et al.* 1989; Labat-Moleur *et al.* 1996; Tyagi *et al.* 2001; Richard *et al.* 2005a). Des cellules déficientes en protéoglycanes présentent une forte inhibition de la fixation de lipoplexes à leurs membranes, ce qui se traduit par une forte inhibition de la transfection (Mislick and Baldeschwieler 1996). De plus, la présence d'héparine et d'héparane-sulfate (HS) solubles dans le milieu, inhibe de façon compétitive la fixation de lipoplexes. Ces observations ont jusque là démontré que les molécules anioniques comme les héparane-sulfates jouent un rôle de récepteurs non spécifiques pour les macromolécules cationiques, mais leur rôle exact dans l'internalisation cellulaire des complexes contenant l'ADN demeure peu connu.

Il a été montré que des protéines transmembranaires, comme les syndecans, pouvaient se rassembler pour former des points focaux aux membranes pendant la fixation des complexes cationiques. Ce rassemblement induit leur interaction avec le cytosquelette d'actine aboutissant probablement à la formation de fibres de tension. C'est cette tension qui fournirait l'énergie nécessaire à l'internalisation des particules (Woods and Couchman 1994). De façon similaire, une étude plus récente suggère que l'internalisation de polyplexes de PEI soit réalisée *via* un mécanisme de phagocytose médié par l'actine, résultant de l'adhésion des polyplexes aux molécules de syndécan favorisant leur accumulation au sein de « lipids rafts » (Kopatz *et al.* 2004).

2. Internalisation cellulaire : endocytose et fusion

a. Internalisation des lipoplexes

De premières études avaient initialement émis l'hypothèse que l'internalisation cellulaire des complexes et la libération cytosolique de l'ADN vectorisé résultaient d'une **fusion** entre les lipides et la membrane plasmique (Felgner *et al.* 1987; Felgner *et al.* 1995). Il avait été suggéré que l'interaction entre les liposomes et l'ADN ou la membrane cellulaire déstabilisait les liposomes, facilitant dès lors leur fusion entre eux, ou avec les bicouches lipidiques membranaires. Cependant, la grande majorité des expérimentations ayant suivi ces premiers travaux ont clairement établi l'importance de l'**endocytose** dans l'internalisation des lipoplexes (Khalil *et al.* 2006) (Figure 14).

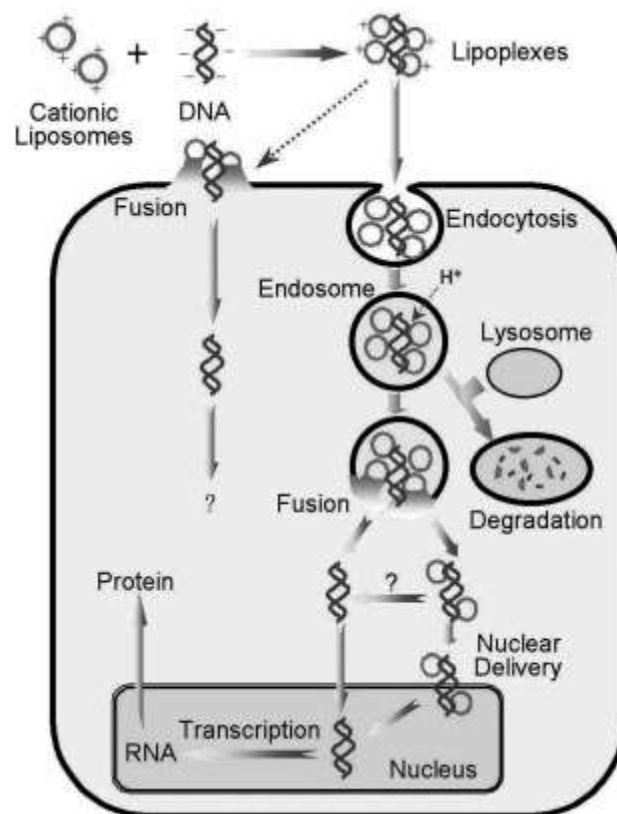


Figure 14: Internalisation et trafic intracellulaire des lipoplexes (D'après Khalil *et al.* 2006).

Il a en effet été montré par la suite que l'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose réduisait considérablement l'expression d'un gène rapporteur, et que l'utilisation de molécules lysomotropiques telles que la chloroquine stimule au contraire l'expression d'un gène rapporteur (Cotten *et al.* 1990). Friend *et al.* ont définitivement prouvé que l'endocytose était la principale voie d'entrée des lipoplexes, en montrant clairement par microscopie électronique la présence d'ADN marqué avec des billes d'or dans des vésicules intracellulaires (Friend *et al.* 1996). Ces résultats ont été reproduits récemment, en suivant

l'ensemble du processus d'internalisation de lipoplexes DOSP-DOPE-ADN par microscopie électronique, après marquage de l'ADN à des nanoparticules (Nps) denses aux électrons. L'utilisation de ces Nps a permis de suivre le trajet des lipoplexes depuis leur interaction aux membranes jusqu'au relargage cytosolique des molécules d'ADN (Le Bihan *et al.*, soumis). La présence de Nps au niveau du compartiment endosomal a pu être clairement établie.

Quelques études ont toutefois pris le contrepied de cette hypothèse générale. Almofti *et al.* ont en effet émis l'idée d'une internalisation par endocytose, mais conditionnée par une fusion membranaire majoritaire (72%) au niveau de la membrane plasmique (Almofti *et al.* 2003).

D'une manière générale, il est admis que la fusion membranaire est un processus pouvant survenir dans la transfection au niveau de la membrane plasmique, mais que la majeure partie des complexes est internalisée par endocytose.

L'internalisation des complexes peut dépendre de plusieurs voies d'**endocytose** qui sont réparties en deux catégories : la phagocytose ou processus « d'ingestion » impliquant l'internalisation de larges particules et la pinocytose ou « endocytose en phase fluide » correspondant à l'internalisation de solutés ou de petites particules. La pinocytose elle-même comprend quatre mécanismes d'internalisation, la macropinocytose, la micropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante et l'endocytose cavéole-dépendante (Conner and Schmid 2003). Ces voies endocytaires peuvent coexister dans une même cellule et les différentes vésicules formées peuvent être dirigées vers un même organite. La caractérisation de la voie d'entrée d'une particule se fait généralement par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'un type d'endocytose ou d'un groupe d'endocytose, et la combinaison de plusieurs inhibiteurs permet d'établir par élimination la principale voie empruntée. De nombreuses études ont tenté d'identifier la voie d'internalisation des lipoplexes, obtenant des résultats très divers et parfois contradictoires.

Rejman *et al.* ont montrés que les lipoplexes sont internalisés par endocytose *via* un mécanisme **clathrine-dépendant** exclusif ; l'internalisation de lipoplexes ADN-DOTAP est inhibée par la chlorpromazine et la déplétion en potassium, inhibant l'endocytose clathrine-dépendante, mais n'est pas affectée par les inhibiteurs de l'endocytose indépendante de la clathrine tels que la filipine et la genesteine (Rejman *et al.* 2005). Or, les particules internalisées par endocytose clathrine-dépendante aboutissent pour une grande partie d'entre elles au lysosome, ou elles sont dégradées. Rejman *et al.* ont émis l'hypothèse que l'orientation de l'internalisation des lipoplexes vers une voie d'endocytose indépendante de la clathrine permettrait d'optimiser le transfert de gène. Cette hypothèse est toutefois contestée par Zhou et Huang, qui ont suggéré que l'endocytose clathrine dépendante était la voie d'internalisation la plus performante pour l'internalisation (Zhou and Huang 1994).

Une autre étude a montré que l'internalisation de lipoplexes de LipofectACE avait lieu par **phagocytose** dans des cellules épithéliales bronchiques peu différenciées (Matsui et al. 1997). Ils ont en effet découvert que ces lipoplexes avaient le même comportement que des microsphères de 2 µm, marqueurs de la phagocytose.

L'ensemble de ces études démontre que la voie d'entrée endocytaire des lipoplexes dans les cellules n'est pas unique, et semble dépendre de la nature du lipide utilisé, du type cellulaire transfecté et de la taille des particules formées.

b. Internalisation des polyplexes

Les polyplexes sont également internalisés par endocytose, mais ne permettent pas la fusion avec les membranes plasmiques ; là encore, aucune voie d'endocytose générale n'a pu être identifiée. Il est généralement admis que les polyplexes de PLL et de PEI sont internalisés par endocytose dépendante de la clathrine. En revanche, des polyplexes de PLL Histidinylés (His-pLK) sont internalisés à la fois *via* un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine et un mécanisme d'endocytose indépendant (Goncalves *et al.* 2004).

Au cours de cette dernière étude, la voie indépendante de la clathrine empruntée était sans doute de la macropinocytose ; l'internalisation des polyplexes était inhibée par l'amiloride et stimulée par les phorbol esters, respectivement inhibiteur et stimulant de la macropinocytose. Goncalves *et al.* ont de plus montré que la macropinocytose ainsi que le recyclage de l'ADN provoquaient une perte de l'efficacité de transfection, et que là encore, l'endocytose médiée par la clathrine était la voie d'internalisation la plus efficace.

Rejman *et al.* ont également suggéré que l'internalisation de polyplexes de PEI suivait une voie d'endocytose à la fois dépendante et indépendante de la clathrine ; la voie clathrine indépendante était inhibée par la filipine et la genestéine indiquant donc une implication des cavéoles. Rejman *et al.* ont eux conclu que l'endocytose médiée par la clathrine était moins efficace, soulignant la capacité de l'endocytose cavéole-médiée à s'échapper du système lysosomal aboutissant à une transfection plus efficace.

La diversité de ces résultats suggère que la voie d'endocytose empruntée par les complexes ne dépend pas exclusivement du type de vecteur employé. Douglas *et al.* ont observé la voie d'internalisation empruntée de polyplexes de chitosan marqué dans trois lignées cellulaires différentes, et les efficacités de transfection respectives ont été comparées. Ils ont montré que les cellules internalisant les particules par endocytose clathrine dépendante présentaient la meilleure efficacité de transfection, mais que les cellules internalisant les particules par la voie des cavéoles n'étaient pas transfectées (Douglas *et al.* 2008). Les polyplexes nécessitent en effet une acidification des endosomes

pour rejoindre le cytosol (voir Chapitre 3, B.2. des Généralités), expliquant le meilleur rendement transfectionnel de la voie endolisosomale clathrine dépendante. Les auteurs ont conclu que contrairement aux lipoplexes, les polyplexes de chitosans nécessitent d'être internalisés par la voie clathrine médiée, et que le mode d'internalisation dépendait du type cellulaire transfecté.

La taille des particules est également un paramètre essentiel à leur internalisation par telle ou telle voie. Or, si la nature des polymères ou des lipides cationiques utilisés influence la taille des objets formés, la nature du milieu de formulation, la quantité d'ADN transfecté ainsi que le rapport de charge utilisé conditionne également très fortement la taille des objets formés, et donc la voie d'endocytose empruntée (Turek *et al.* 2000).

Quelque soit la voie d'endocytose empruntée, il est intéressant de noter que l'ADN transfecté se retrouve cependant majoritairement séquestré dans des vésicules, et l'échappement endosomal demeure une des étapes les plus limitantes du transfert de gène.

B. Echappement endosomal

L'efficacité de la transfection dépend en effet largement de l'accessibilité du noyau aux molécules d'ADN afin qu'elles puissent y être transcrites, ce qui implique en premier lieu leur relarguage des endosomes vers le cytosol.

Les endosomes subissent une acidification progressive, et peuvent terminer leur maturation en fusionnant avec le lysosome pour dégrader leur contenu, ou recycler ce contenu en le ramenant vers la surface cellulaire. L'échappement endosomal du matériel génétique internalisé est donc un pré requis majeur à l'efficacité de la transfection.

1. Fusion membranaire par Flip-Flop

Le principal mécanisme retenu pour expliquer la déstabilisation membranaire et l'échappement endosomal des lipoplexes est la fusion (Figure 15). L'augmentation de la charge des lipoplexes durant le processus d'acidification provoque le flip des lipides anioniques de la membrane de la vésicule vers la partie intra-endosomale ; la formation de paires de charge neutre entre la membrane et les lipides déstabilise cette membrane, aboutissant à sa réorganisation. Cette réorganisation permet alors à l'ADN de se retrouver dans le cytosol (Xu and Szoka, Jr. 1996).

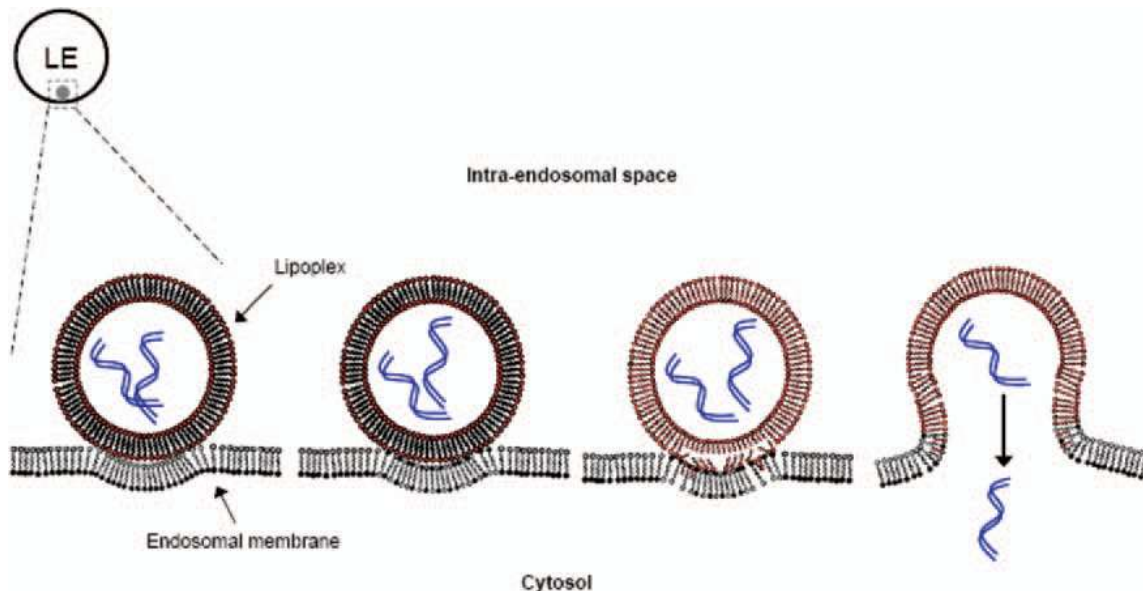


Figure 15 : Mécanisme d'échappement endosomal par fusion membranaire (D'après Douglas 2008)

La formulation d'ADN avec des lipoplexes comprenant de la DOPE, lipide fusogène pH-sensible, permet un meilleur relargage de cet ADN dans le cytosol (Farhood *et al.* 1995). La DOPE est un lipide neutre formant en effet des bicouches lipidiques stables à pH 7 ; cependant, à des pH plus acides (pH 5-6) il provoque une transition de l'état de bicouche à une structure en phase hexagonale inversée (Figure 12, Chapitre 2 des Généralités) , ce qui permet la fusion avec la membrane endosomale et sa déstabilisation, aboutissant au relargage de son contenu dans le cytosol (Cullis *et al.* 1986). Il a été clairement établi que la fusion avec les membranes endosomales était une composante essentielle à l'efficacité de lipoplexes comprenant de la DOPE (Wrobel and Collins 1995; Almofti *et al.* 2003). Il est possible que l'ADN seul ou le lipoplexe entier soit relargué dans le cytosol, après la fusion, mais dans le deuxième cas, la dissociation doit avoir lieu dans le cytosol ou au niveau de la membrane nucléaire pour permettre une transfection efficace.

De récentes données obtenues en microscopie électronique ont permis de caractériser la fusion membranaire de lipoplexes de DOSP-DOPE ; un changement de la période entre les différentes phases lamellaires a en effet été clairement observé suite à la fusion avec les membranes endosomales. De façon intéressante, il a pu être également observé que l'ADN se retrouvait libre dans le cytosol, et que les bicouches néo-assemblées entre les lipides internalisés et les membranes endosomales étaient expulsées par la cellule. Ce dernier travail a été soumis pour publication dans la revue *Nucleic Acids Research* en Juin 2009 : Le Bihan, O., Chevre, R., Mornet, S., Garnier, B., Pitard, B., Lambert, O. (2009) **Probing the mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale.** *Nucleic Acids Res*, En révision.

2. Mécanisme d'éponge à proton

Les polymères cationiques tels que le PEI présentent également la capacité de provoquer l'échappement endosomal du transgène, mais *via* un mécanisme différent de celui des lipides (Behr *et al.* 1989). En effet, contrairement à la transfection médiée par les lipides cationiques, la transfection médiée par le PEI n'est pas améliorée par l'utilisation de peptides fusogènes ou de chloroquine (Kichler *et al.* 2001). L'hypothèse d'un mécanisme basé sur l'hyper-acidification des endosomes contenant du PEI a été proposée, le PEI jouant un rôle d'éponge à proton (Boussif *et al.* 1995). Cette hypothèse suggère que le PEI devient plus protoné aux pH faibles des endosomes, ce qui entraîne un influx d'ions Cl^- avec les protons aboutissant à une entrée massive d'eau dans les endosomes ; il en résulte une rupture des membranes endosomales, et le relargage du matériel génétique internalisé dans le cytosol (Figure 16). Douglas *et al.* ont montré que des polyplexes de chitosans internalisés *via* une voie d'endocytose ne subissant pas d'acidification aboutissent à la séquestration vésiculaire des particules et à une transfection inefficace (Douglas *et al.* 2008).

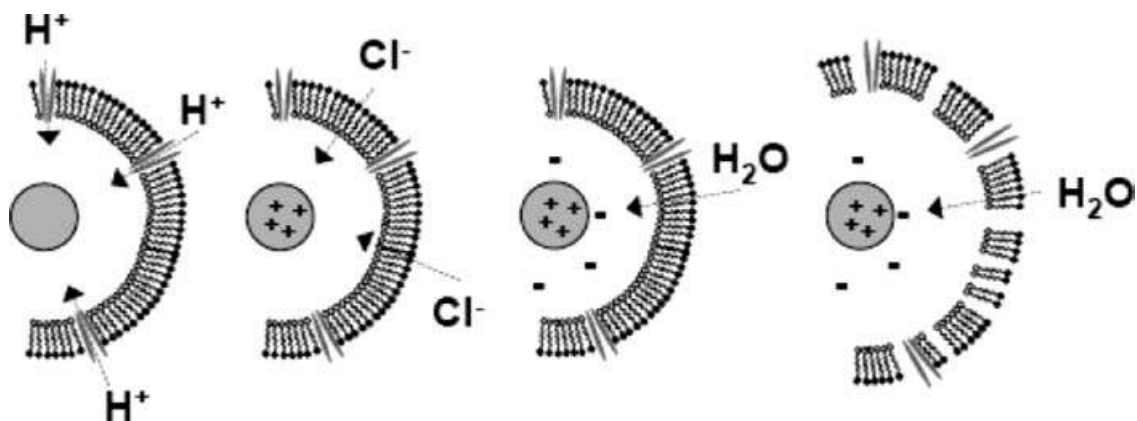


Figure 16 : Mécanisme d'échappement endosomal dit d'éponge à proton (D'après Douglas 2008)

3. Peptides fusogènes

Les lipoplexes formés à partir de lipides non fusogènes et les polyplexes ne permettant pas la séquestration de protons ne sont pas efficacement relargués des endosomes vers le cytosol. Les virus, comme le virus de l'influenza et l'adénovirus, présentent des dispositifs fonctionnels leur permettant de s'échapper des endosomes en utilisant leur acidification. Ces dispositifs spécifiques sont des peptides présentant des caractéristiques fusogènes, qui ont pu être utilisés comme facilitateurs de l'échappement endosomal. Ces peptides fusogènes peuvent être directement dérivés de virus, comme le peptide dérivé de la partie N-terminale de la sous-unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus de l'influenza, soit directement synthétisés comme les peptides KALA ou GALA (Wagner *et al.* 1992; Simoes *et al.* 1999). Aux pH plus faibles, ces peptides changent de conformation et permettent d'interagir avec les membranes endosomales et de les déstabiliser. L'utilisation de la sous unité HA-2 du

virus de l'influenza a ainsi permis de stimuler l'efficacité du transfert de gène médié par du Tf-PLL (transferrine-polylysine) dans des cellules exprimant un récepteur à la transferrine (Wagner *et al.* 1992). De plus, la présence du peptide synthétique GALA sur la membrane de liposomes a permis de faciliter le relargage cytosolique du matériel internalisé (Kakudo *et al.* 2004).

4. Agents lysomotropiques

La chloroquine est une base faible hydrophobe qui peut entrer dans le lysosome et se protoner en milieu acide. Elle permet d'inhiber l'acidification et la maturation des endosomes (Mellman *et al.* 1986), retardant ainsi la dégradation lysosomale du matériel génétique transporté. D'une manière générale, l'utilisation de chloroquine permet d'augmenter l'efficacité de la transfection. Son action facilitatrice peut être due à une déstabilisation des membranes endosomales et lysosomales, ou plus sûrement à un ralentissement de l'arrivée de l'ADN transfecté vers le compartiment lysosomal, laissant alors plus de temps à son échappement.

Cependant, la chloroquine ne facilite pas la transfection de polyplexes de PEI, car l'inhibition de l'acidification des endosomes interdit la mise en place du mécanisme d'éponge à proton (Kichler *et al.* 2001).

C. Trafic intracellulaire et translocation nucléaire

Une fois dans le cytoplasme, le transgène doit atteindre le noyau pour être transcrit. Cette dernière étape représente une des principales limites à l'efficacité de la transfection. Dès 1980, Mario Capecchi avait observé que l'injection nucléaire d'un plasmide dans des fibroblastes de souris permettait une expression du transgène dans la quasi-totalité des cellules, mais que l'injection cytoplasmique de la même quantité de plasmide ne conduisait à aucune expression du transgène, et ce dans aucune des 1000 cellules injectées (Capecchi 1980). De même, l'injection dans une cellule de 1000 à 3000 copies de plasmide au niveau du cytoplasme ne conduisait qu'à 3% de l'expression détectée suite à leur injection au niveau nucléaire (Graessmann *et al.* 1989). De nombreuses autres études ont par la suite confirmé ces observations, dans différents types cellulaires non-mitotiques (Zabner *et al.* 1995; Labat-Moleur *et al.* 1996; Dean *et al.* 1999). La transfection de cellules *in vitro* repose essentiellement sur leur capacité de division qui engendre une rupture de la membrane nucléaire. Différentes études portant sur des cellules synchronisées au niveau du cycle cellulaire ont révélé que la transfection utilisant des vecteurs cationiques de type lipidique ou polymérique était de 50 à 3000 fois plus efficace lorsqu'elle avait lieu en phase G2 ou G2-M plutôt qu'en phase G1 (Brunner *et al.* 2000; Escriou *et al.* 2001). Cependant, même dans des

cellules en division, il a été démontré que la microinjection intracytoplasmique d'un plasmide encodant la β -galactosidase permettait une transfection extrêmement réduite par rapport à la microinjection intranucléaire (Pollard *et al.* 1998).

1. Devenir cytosolique du plasmide

La dose de plasmide délivrée dans la cellule après lipofection a été évaluée entre 2000 et 10000 copies selon les études (Coonrod *et al.* 1997; Tseng *et al.* 1997; James and Giorgio 2000). Cependant, quelque soit le type cellulaire transfecté, des expériences de PCR quantitative, de Southern Blots et de microscopie électronique ont montré que seuls 1 à 10% des plasmides délivrés atteignent le noyau 12 à 36 h après la transfection (Labat-Moleur *et al.* 1996; Tachibana *et al.* 2001). Même dans des cellules en division, le processus d'import nucléaire du plasmide semble donc assez inefficace. Dean *et al.* ont estimé que la quantité de plasmide injectée dans le cytoplasme devait être 30 à 100 fois supérieure à celle injectée dans le noyau pour obtenir une expression du transgène similaire (Dean *et al.* 1999). Trois obstacles majeurs rencontrés par le plasmide au moment d'atteindre le noyau expliquent la pauvreté de ce rendement : (i) sa faible capacité de diffusion cytosolique, (ii) sa sensibilité aux nucléases et (iii) la présence de la membrane nucléaire.

La mobilité de l'ADN dans le cytosol est très limitée, d'autant plus que le plasmide transfecté est de grande taille. Il a en effet été observé qu'un plasmide microinjecté dans le cytoplasme de myotubes restait principalement au niveau du site d'injection (Dowty *et al.* 1995), mais que des oligonucléotides de petite taille (<250pb) entraient rapidement dans le noyau après leur délivrance cytoplasmique (Lukacs *et al.* 2000). La microinjection d'un plasmide à proximité de la membrane nucléaire, ou la réduction de la taille de la cassette d'expression permet en effet de favoriser la transfection (Dowty *et al.* 1995; Darquet *et al.* 1999). La relative immobilité du plasmide dans le cytoplasme semble être due au maillage fin que constitue le cytosquelette ; il a en effet été montré que la diffusion du plasmide était facilitée après la perturbation ou la réorganisation du cytosquelette d'actine (Dauty and Verkman 2005; Geiger *et al.* 2006).

De par son incapacité à diffuser facilement, le plasmide reste un long moment dans le cytoplasme ce qui favorise sa dégradation. Il a été montré que 50% des plasmides cytosoliques étaient éliminés en 1 à 2 heures dans des cellules HeLa et Cos-7 (Lechardeur *et al.* 1999) et en 4 heures dans des cellules C2C12 et dans des myotubes (Pampinella *et al.* 2002). Ces résultats étaient indépendants à la fois (i) de la quantité de plasmide microinjecté, mais également (ii) de la conformation tridimensionnelle des acides nucléiques

utilisés (linéarisé et super-enroulé, simple brin et double brin) et cette faible pérennité du transgène dans le cytoplasme a pu de plus être observée après arrêt du cycle cellulaire.

De façon intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs des DNAses permet de stimuler l'expression d'un gène rapporteur après transfection. La présence de DNAses au niveau cytosolique en absence de contamination éventuelle d'autres organites cellulaires a par ailleurs été établie (Lechardeur *et al.* 1999; Pollard *et al.* 2001). Ces nucléases sont dépendantes du calcium et dégradent l'ADN qui a une demi-vie cytosolique estimée à 2 heures (Pollard *et al.* 2001). Le groupe de Todd Giorgio a estimé que les plasmides cytosoliques étaient dégradés par les nucléases au rythme de 30 à plus de 1000 molécules par minute selon la quantité préalablement délivrée (Tseng *et al.* 1997; James and Giorgio 2000; Banks *et al.* 2003). L'ensemble de ces résultats montre que le trajet à effectuer depuis la délivrance cytosolique du transgène jusqu'à son entrée nucléaire représente une limite conséquente à l'efficacité de la transfection, l'équipe dirigée par David Dean estimant la demie vie cytosolique d'un plasmide à 5 heures (Dean *et al.* 2005). La balance dégradation cytosolique / efficacité de l'import nucléaire représente de fait un des leviers majeurs de l'augmentation de l'efficacité de la transfection.

Plusieurs stratégies peuvent être mise en œuvre pour pallier cet effet néfaste de la stagnation cytosolique du transgène. L'utilisation de vecteurs complexant l'ADN par interaction électrostatique, tels que les lipides ou les polymères cationiques, permet une protection efficace contre les DNAses. La complexation d'un plasmide avec du PEI permet d'empêcher sa dégradation par les nucléases (Pollard *et al.* 2001).

Cependant, la séparation ADN-vecteur suit une cinétique encore mal définie. Il semble toutefois que dans le cas des lipides cationiques, de l'ADN libre se retrouve dans le cytosol directement après l'échappement endosomal (Le Bihan *et al.*, soumis) confirmant le modèle d'échappement endosomal proposé par Xu et Szoka (Xu and Szoka, Jr. 1996). L'injection nucléaire d'un transgène complexé à des lipides cationiques s'est avérée moins efficace que l'injection d'ADN nu, suggérant que si les lipides cationiques présentaient un effet bénéfique en protégeant le transgène des nucléases au niveau cytosolique, ils provoquaient en revanche un effet délétère au niveau nucléaire (Zabner *et al.* 1995). Au contraire, dans le cas de polymères cationiques comme le PEI, des complexes ADN-vecteur sont encore visibles au niveau péri-nucléaire et nucléaire, permettant une protection optimale aux DNAses tout au long du transport, sans pour autant provoquer d'effet néfaste au niveau nucléaire (Breuzard *et al.* 2008). Aucun indice ne peut cependant laisser supposer que les complexes PEI-ADN observés au niveau nucléaire soient responsables de l'expression du gène rapporteur dosée. On peut toutefois envisager un relarguage de l'ADN par le PEI au niveau nucléaire, probablement suite à un échange avec de l'ADN endogène. Il a en effet été

montré que contrairement à l'injection de lipoplexes, l'injection nucléaire de polyplexes n'affecte pas l'efficacité de la transfection (Zabner *et al.* 1995).

2. Translocation nucléaire

Une autre stratégie visant à s'affranchir de la perte d'efficacité engendrée par l'instabilité métabolique du plasmide consiste à réduire cette étape de trafic cytosolique en facilitant son accès au compartiment nucléaire.

L'enveloppe du noyau comporte des pores nucléaires (NPC pour « Nuclear Pore Complex ») qui permettent le transport passif de molécules au poids moléculaire inférieur à 70kDa et d'un diamètre de 10nm (Melchior and Gerace 1995). Cette limite de taille ne permet pas le passage d'un ADN plasmidique, même condensé par des lipides ou polymères cationiques.

Deux possibilités existent pour permettre le passage d'un compartiment cellulaire à l'autre. (i) Durant la division cellulaire, la membrane nucléaire est rompue de façon transitoire, permettant l'entrée du transgène. Cependant, la transfection efficace de cellules post-mitotique *in vivo* et *in vitro* suppose que si la rupture de la paroi nucléaire facilite la transfection, elle n'est pas une condition *sine qua non* à l'accès du transgène au noyau. (ii) Il semble qu'un plasmide nu puisse également rejoindre le noyau sans rupture de la membrane nucléaire par transport actif *via* le NPC (Brisson and Huang 1999).

Il a en effet été démontré que de l'ADN était détectable dans le noyau 1 heure après la transfection médiée par des lipides cationiques *in vitro*, suggérant l'existence d'un mécanisme précoce, indépendant de la rupture de la membrane nucléaire (Akita *et al.* 2004). Il a notamment été mis en évidence que les lipoplexes avaient la capacité de fusionner avec la membrane nucléaire et de relarguer directement l'ADN dans le noyau (Kamiya *et al.* 2002). Dowty *et al.* ont montré que la microinjection d'un plasmide nu dans des cellules post-mitotiques comme des myoblastes primaires permet une expression du transgène. Cette expression du transgène était dépendante de la température, suggérant un mécanisme actif, et était inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs du transport *via* le NPC (Dowty *et al.* 1995). Cette dernière étude a notamment permis de visualiser par microscopie électronique la présence de plasmide marqué à des billes d'or de part et d'autre du NPC.

Le transport *via* le NPC est basé sur les importines et dépend de la présence de NLS (Nuclear Localisation Signal) sur les peptides importés (Jans and Hubner 1996). Les protéines comprenant un NLS sont liées au niveau cytosoliques par des protéines importines qui font la navette entre le cytosol et le noyau *via* le NPC par fixation de GTP ou de GDP

(Figure 17) (Whittaker and Helenius 1998). Pendant ce trafic, la taille du pore est augmentée (jusqu'à atteindre un diamètre de 30 nm) permettant le passage de protéines nucléaires (Dworetzky *et al.* 1988).

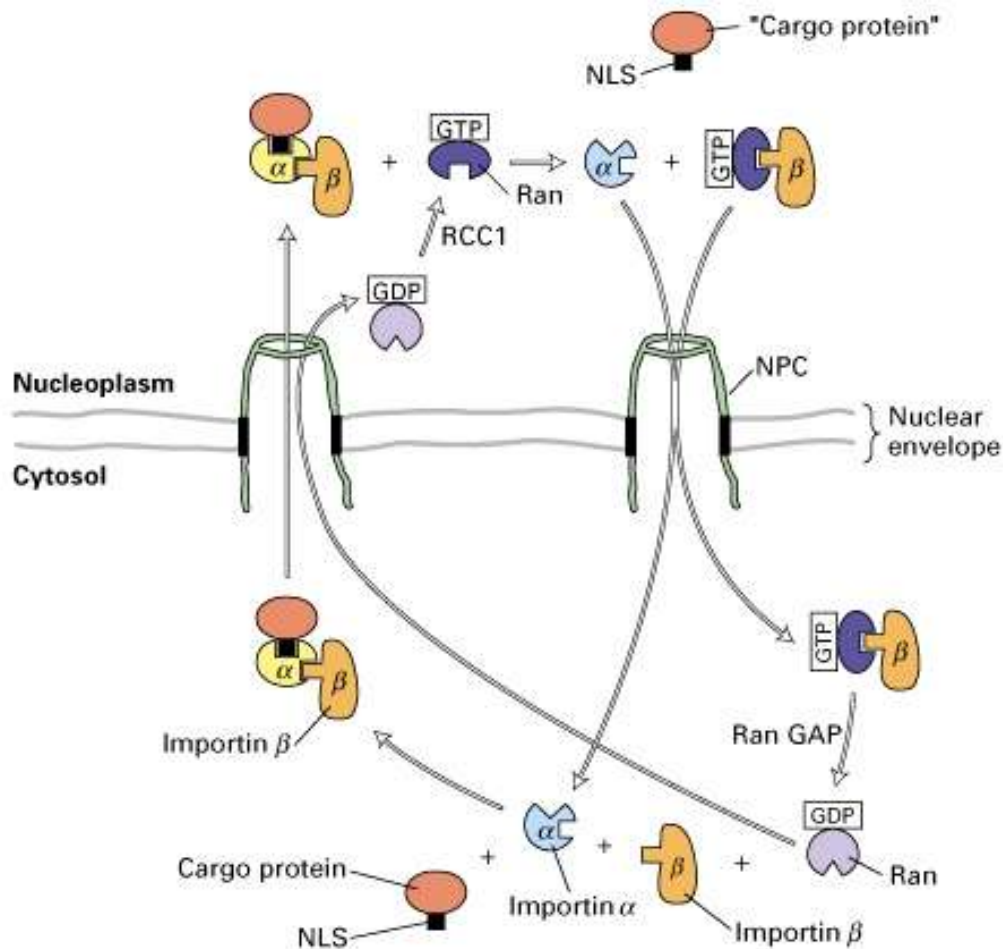


Figure 17 : Mécanisme du transport nucleo-cytoplasmique d'une protéine cargo via le NPC (Nuclear pore complex). L'importine- α interagit directement avec le NLS, le complexe NLS-importine- α se lie alors à l'importine- β . Ce complexe ternaire peut alors interagir avec le complexe de pore nucléaire pour pénétrer dans le noyau. Cette pénétration fait intervenir un mécanisme énergie-dépendant grâce à l'intervention d'une phosphatase GTP-dépendante. (Source : <http://bioweb.wku.edu/courses/biol22000/23NuclearTransport/images/F11-37.JPG>).

Plusieurs études ont étudié la fixation de plasmides à des polypeptides comprenant un NLS afin de faciliter leur transport *via* la machinerie importine (Hebert 2003). Il a été démontré que l'ajout d'un peptide NLS par liaison covalente permettait de stimuler l'import nucléaire d'un plasmide d'un facteur 1000 (Zanta *et al.* 1999). Il a de plus été montré que l'ajout de peptides NLS dérivés du « Large T antigen » d'SV40 sur le plasmide permettait l'accumulation d'ADN dans des cellules perméabilisées à la digitonine, et ce en empruntant bien le trajet des protéines karyophiles (Sebestyen *et al.* 1998). Une autre stratégie consiste à lier ces peptides non pas à l'ADN, mais au vecteur. Ainsi, un peptide NLS d'adénovirus, « l'adénovirus hexon protein », a été greffé sur du PEI, et les poliplexes ainsi fonctionnalisés ont montré une efficacité de transfection 10 fois supérieure aux poliplexes non greffés, sans

pour autant augmenter le nombre de particules internalisées par la cellule ; les auteurs ont par ailleurs démontré que cette augmentation de la transfection dépendait bien de l'activité du NPC (Carlisle *et al.* 2001).

Une stratégie prometteuse consiste à utiliser les NLS des protéines déjà présentes dans le cytoplasme et capables d'interagir de façon spécifique avec les plasmides tels que les facteurs de transcription. Il a été montré que la fixation de facteurs de transcription sur les séquences non codantes du plasmide permettait de faciliter son import nucléaire (Dean 1997; Dean *et al.* 1999; Dean *et al.* 2005) (Figure 18).

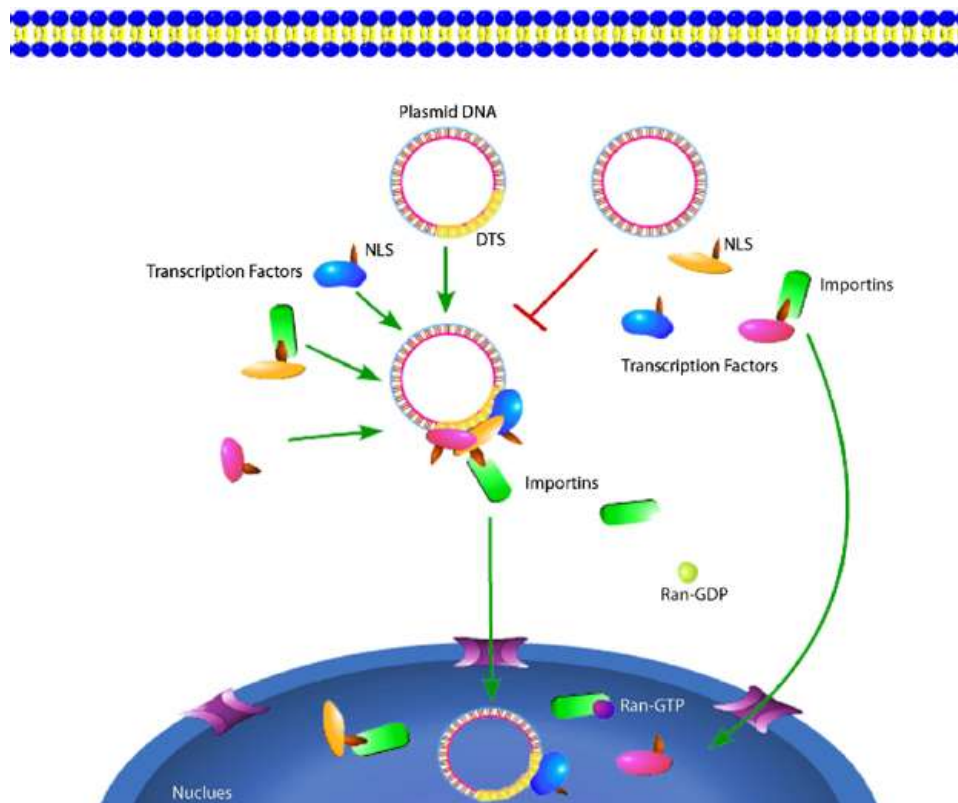


Figure 18 : Modèle d'import nucléaire séquence spécifique d'un plasmide. Les plasmides présentant des DTS (DNA nuclear targeting sequences) interagissent avec les facteurs de transcription cytosoliques pour former des complexes protéine-ADN. Les facteurs de transcription comportant des NLS, les complexes protéine-ADN sont pris en charge par la machinerie importine qui les achemine au noyau *via* le pore nucléaire. En revanche, l'absence de séquence DTS sur le plasmide ne permet pas son import *via* le pore nucléaire (D'après Dean *et al.*, 2005).

L'ajout de 5 motifs de fixation au facteur de transcription NF κ B au niveau du plasmide permet de multiplier par 10 l'efficacité de la transfection (Mesika *et al.* 2005) ; de la même manière, la stimulation de la translocation du facteur NF κ B par l'ajout de TNF α permet là encore de faciliter la transfection de plasmides contenant des séquences de fixation à ce facteur (Mesika *et al.* 2005). L'activation de facteurs de transcriptions au cours de la transfection permet donc de faciliter la translocation d'un plasmide.

Chapitre 4. Les copolymères à blocs amphiphiles

A. Propriétés des copolymères à blocs « Pluronic »

1. Structure générale

Les copolymères à blocs amphiphiles sont composés de motifs hydrophobes d'oxyde de propylène (OP) et des motifs hydrophiles d'oxyde d'éthylène (OE). Les polymères formés de blocs d'OE et d'OP agencés selon une structure linéaire A-B-A sont appelés **Pluronic** : $(EO)_x-(PO)_y-(EO)_x$ (Figure 19A). La variation du nombre de motifs d'OE et d'OP aboutit à la formation de polymères très différents de par leur masse moléculaire (**Molecular Weight MW** de 200 à 2000 Da) et de par leur balance hydrophile/hydrophobe (**Hydrophilic/Lipophilic Balance HLB** de 1 à plus de 27, valeur correspondant à des polymères comportant 10 à 80% d'OE).

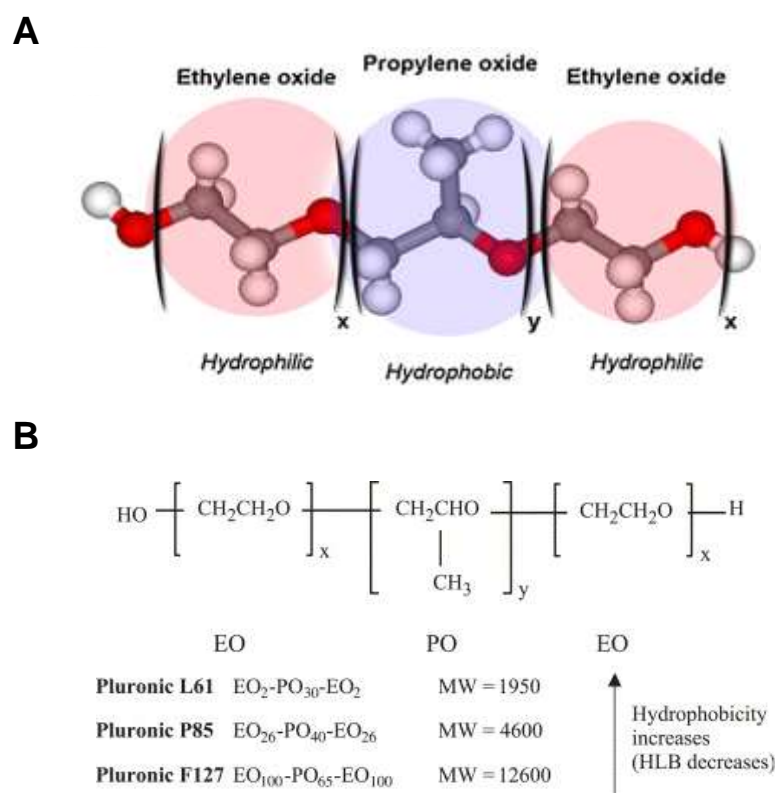


Figure 19 : Schéma général des copolymères à blocs amphiphiles « Pluronic ». (A) Les pluronic sont composés d'un bloc central hydrophobe d'oxyde de propylène encadré de chaque côté par des blocs hydrophiles d'oxyde de propylène. (B) La variation du nombre x d'OE et y d'OP conduit à des polymères présentant des masses moléculaires (MW) et des balances hydrophile/hydrophobe (HLB) variables. L'hydrophobicité globale de ces polymères est d'autant plus forte que leur HLB est faible (D'après Batrakova and Kabanov 2008).

Les polymères comportant une forte proportion de blocs d'OP comme le L61 présentent une HLB faible (HLB=3), et sont plus hydrophobes que des polymères comportant une faible proportion de blocs d'OP comme le F127 qui présentent une HLB élevée (HLB=22) (Figure 19B).

L'échelle HLB de Davies est une échelle de valeur permettant d'estimer la balance hydrophile/hydrophobe d'un surfactant (Davies 1959). Elle peut être estimée en calculant la contribution de chaque groupement, les groupements EO ayant une valeur de 0,33 et les groupements d'OP ayant une valeur de -0,15. La valeur de HLB de chaque polymère peut ainsi être obtenue en utilisant la formule suivante : $HLB=7+\Sigma(\text{groupes})$. Cette formule permet d'approcher la valeur de HLB des polymères de HLB faible, mais n'est plus applicable pour des polymères très hydrophiles comme le F127.

2. Nomenclature

On compte plus de 30 Pluronic différents disponibles chez BASF, classés suivant les lettres F (solides), P (pâtes) ou L (liquides) suivis de 2 ou 3 chiffres qui définissent leurs paramètres structuraux. Le dernier chiffre donne une approximation de la proportion massique de blocs d'OE en dizaine de pourcent (si le dernier chiffre est 8, cela signifie que le polymère comporte 80% wt. d'OE ; si le dernier chiffre est 1, cela signifie que le polymère comporte 10% wt. d'OE). Le ou les premiers chiffres codent la masse moléculaire des blocs centraux d'OP, la multiplication de ce nombre par 300 donne la masse approximative en Da. Cette nomenclature permet d'estimer les structures et les propriétés physicochimiques des molécules en l'absence de données bibliographiques.

Le terme de « poloxamères » est utilisé pour les Pluronic listés par la pharmacopée américaine et pour qui le grade NF (National Formulary) est attribué. Depuis 2004, 5 Pluronic sont listés dans la pharmacopée américaine : le poloxamer 124 (Pluronic L44), le poloxamer 188 (Pluronic F68), le poloxamer 237 (Pluronic F87), le poloxamer 338 (Pluronic F108) et le poloxamer 407 (Pluronic F127).

D'autres nomenclatures existent également dans la littérature ; par exemple la firme Supratek Farma Inc. (Montreal, PQ, Canada) utilise des codes SP, comme SP1049C ou SP1017 pour ses formulations à bases de copolymères à blocs amphiphiles (Danson *et al.* 2004; Lemieux *et al.* 2000). La formulation SP1017 est composée d'un mélange de deux copolymères en solution aqueuse, un polymère hydrophobe, le Pluronic L61 (0.25% w/v) et un copolymère hydrophile, le Pluronic F127 (2% w/v).

D'autres familles de copolymères à blocs amphiphiles composés de blocs d'OE et d'OP ont également été synthétisées et sont disponibles chez BASF. La famille des **Pluronic R** présente une structure B-A-B inverse à celle des Pluronic (A-B-A).

La famille des **Tetronics**, également appelés « poloxamines », présente une structure tétrafonctionnée, des motifs d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène (EO)_x-(PO)_y étant branchés par leur extrémité hydrophobe sur une éthylendiamine centrale. Contrairement aux poloxamères, les poloxamines comportent une charge positive portée par l'amine centrale. Malgré cette charge, les tetronics présentent des caractéristiques semblables à celles de Pluronic.

3. Auto-assemblage en micelles

Les polymères de la famille des Pluronic ont la capacité de s'auto-assembler en micelles en solution aqueuse à partir de molécules individuelles nommées « unimères », ce processus est appelé « micellisation » (Alexandridis *et al.* 1994; Linse 1993). Le nombre d'unimères contenu dans une micelle est appelé « nombre d'agrégation » (aggregation number), et peut varier de quelques-uns à plus d'une centaine suivant les propriétés physico-chimiques intrinsèques à chaque polymère. Les micelles ainsi formées présentent un cœur hydrophobe formé des blocs d'OP entouré d'une couronne hydrophile formée des blocs d'OE, et peuvent présenter une morphologie sphérique ou lamellaire, selon la taille des blocs d'OP et d'OE.

Ce processus de micellisation ainsi que le nombre d'unimères agrégés sont directement influencés par la HLB des polymères, qui détermine leur « *critical micellar concentration* » ou CMC (Figure 20). La concentration micellaire critique est la concentration au dessus de laquelle les unimères d'un polymère donné s'auto-assemblent en micelles. Les polymères présentant une HLB faible comme le L61 (HLB=3) ont ainsi une CMC plus basse que des polymères présentant une HLB forte comme le F127 (HLB=22).

L'auto-assemblage des polymères en micelles est également influencé par la température ; les chaînes d'OP sont hydratées et solubles dans l'eau à basse température (4°C), mais se déshydratent quand la température augmente jusqu'à devenir insolubles, aboutissant à la formation du cœur de la micelle. La température à laquelle ces micelles se forment est appelée « *Critical Micellar Temperature* » ou CMT.

Le cœur hydrophobe des micelles peut servir de transporteur pour des molécules hydrophobes et sont utilisées en *drug delivery* (voir Figure 21) ; ce processus d'incorporation de molécules insolubles dans l'eau dans des micelles est appelé « *solubilisation* ». Cette solubilisation aboutit à une augmentation de la solubilité, mais également de la stabilité de la molécule transportée et de son temps de circulation.

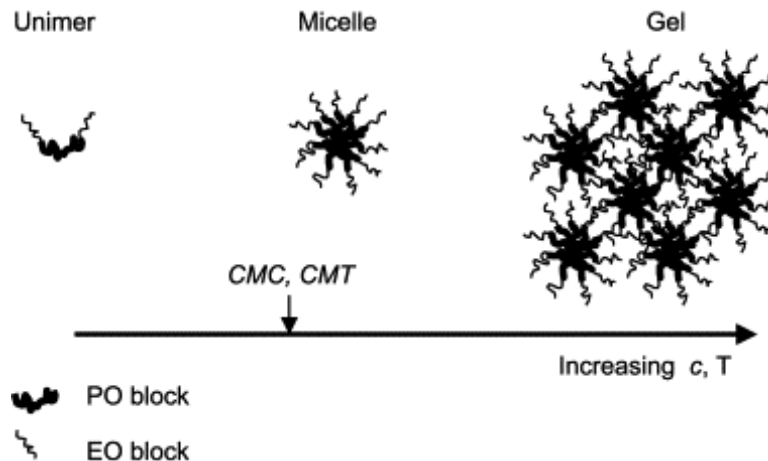


Figure 20 : Auto-assemblage des unimères en micelles. Les unimères s'auto-assemblent en micelles quand leur concentration atteint la CMC et quand la température atteint la CMT. L'élévation de leur concentration au-delà de la CMC provoque leur gélification (d'après Kabanov *et al.*, 2005).

Avec l'augmentation de la concentration, les micelles forment des structures de plus en plus compactes jusqu'à dépasser un seuil aboutissant à la formation d'un gel. De façon similaire, la formation de gels n'est observée que lorsque la température de gélification est atteinte (Schillen *et al.* 2008). Ces gels sont généralement biocompatibles et des polymères gélifiés tels que le F127 ont été administrés par voie systémique, intra-péritonéale, sous-cutanée, oculaire, nasale et intramusculaire afin de faciliter la délivrance de diverses drogues de faible poids moléculaire, des biomacromolécules notamment protéiques et polynucléotidiques, des virus et même des cellules vivantes (Epperson *et al.* 2001; Johnston and Miller 1989; Rill *et al.* 1998; Van Belle *et al.* 1998; Cellesi and Tirelli 2005). Les unimères sont toutefois présents en solution pour des concentrations en deçà de la CMC, mais également pour des concentrations supérieures. En effet, quand les micelles se forment, un équilibre s'établit avec les unimères. En cas de dilution de la solution micellaire (par exemple dans les fluides biologiques), les micelles servent de source à la production de nouveaux unimères. De par la présence de blocs d'OP, les unimères de pluronic peuvent s'adsorber aux surfaces cellulaires, interagir avec les lipides membranaires, et dans certains cas être transloqués dans la cellule (Batrakova *et al.* 2001b; Batrakova *et al.* 2003b).

La structure des copolymères à blocs détermine directement les processus de micellisation et de gélification. L'augmentation du nombre de motifs d'OP facilite la formation de micelles et de gels, ce qui se traduit par un abaissement des valeurs de CMC et de CMT, ainsi que des concentrations et températures de gélification (Alexandridis *et al.* 1994; Linse 1993). Au contraire, l'augmentation du nombre de motifs d'OE aboutit lui à une déstabilisation facilitée des micelles.

4. Activité biologique des copolymères à blocs

a. Utilisation des copolymères à blocs amphiphiles

Les copolymères à blocs se sont révélés responsables de réponses biologiques d'importance majeure et sont utilisés pour des applications très variées.

De par leurs propriétés physicochimiques, certains poloxamères sont utilisés en pharmacie comme **excipients** ce qui permet d'**augmenter la stabilité de la durée de vie** de certaines drogues ou molécules hydrophobes dans la circulation sanguine. Il a été montré que le poloxamère P188 (ou F68 ou Lutrol®) permet une augmentation de la biodisponibilité de certaines drogues dans le cerveau après administration par voie orale et ce grâce à l'interaction de ces drogues avec le cœur des micelles formées par le poloxamère, par l'intermédiaire de liaisons non covalentes (Kabanov *et al.* 2005).

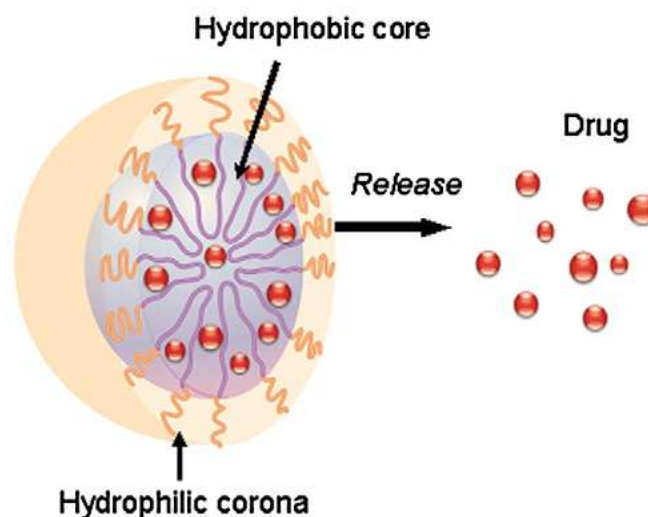


Figure 21 : Schéma de la solubilisation de drogues hydrophobes par les micelles de copolymères à blocs amphiphiles. Les unimères s'assemblent en micelles pour des concentrations supérieures à la CMC, formant un cœur hydrophobe d'OP et une couronne hydrophile d'OE. Les drogues insolubles se retrouvent piégées au niveau du cœur hydrophobe de la micelle.

Des micelles de pluronic P85 ont également été utilisées pour délivrer des drogues au travers de la barrière hémato-encéphalique (Kabanov *et al.* 2003). Des micelles de F127 ont aussi montré leur capacité à augmenter la biodistribution de drogues peu solubles telles que la genestein après délivrance orale (Kwon *et al.* 2007).

Le SP1049C, formulation comprenant un mélange de pluronics L61 et F127 sous forme micellaire, a permis de faciliter l'accès des drogues transportées comme la Doxorubicine au niveau des sites tumoraux par un effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect). L'utilisation de micelles permet dans ce cas de concentrer le relargage de la drogue au niveau des sites tumoraux et non pas au niveau des tissus sains en exploitant (i) la perméabilité anormale des systèmes vasculaires tumoraux (effet EPR) et (ii) la diminution

de la clairance rénale (Valle *et al.* 2004). Le SP1049C est la première formulation micellaire antitumorale à être entrée en phase d'essai clinique.

En **vaccination**, de nombreuses études ont établi que la formulation de divers antigènes avec des copolymères à blocs permettait de stimuler de manière significative les réponses humorales et cellulaires après injection intraveineuse. L'**activité adjuvante** des copolymères à blocs semble être influencée par leur masse moléculaire et leur contenu en groupements OE. L'activité maximale a été obtenue pour des copolymères de 10 à 12 kDa et comprenant 5 et 15% d'OE (Newman *et al.* 1998). De plus, le contenu en groupements d'OE semblerait diriger le type de réponse immune, humorale (réponse TH2) ou cellulaire (réponse TH1) ; les copolymères comprenant 10% d'OE augmentent de façon significative la réponse lymphocytaire de type TH2, alors que les copolymères encore plus pauvres en groupements d'OE induisent à la fois des réponses lymphocytaires de type TH1 et TH2. Newman *et al.* ont conclu que les copolymères à blocs permettaient d'orienter la réponse vaccinale vers une voie préférentielle, TH1 ou TH2, en jouant le rôle d'adjuvants spécifiques (Newman *et al.* 1998).

Le ou les mécanismes par lesquels les copolymères auraient un rôle adjuvant restent encore à élucider, mais il semble que certains copolymères à blocs soient capables d'interagir à la fois avec l'antigène et avec les membranes par interactions hydrogènes et interactions hydrophobes, et que seuls ces copolymères présentent un caractère adjuvant significatif (Hunter and Bennett 1984; Hunter and Bennett 1986). Ke *et al.* ont développé un modèle d'étude *in vitro* montrant que l'utilisation de copolymères à blocs permettait de faciliter l'internalisation cellulaire d'un antigène et sa présentation par les molécules des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (Ke *et al.* 1997).

Il a de plus été proposé que les copolymères à blocs faciliteraient le chargement des peptides antigéniques sur les molécules du CMH de classe II des macrophages et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) en déstabilisant leur membrane plasmique ou la membrane des vacuoles (pinosomes ou phagolysosome). En effet, le P188 (F68 ou Lutrol®) a été décrit comme pouvant stimuler l'activité phagocytaire des neutrophiles humains et des macrophages tissulaires de rongeurs (Ingram *et al.* 1992; Moghimi and Gray 1997). En outre, ces polymères seraient également capables d'activer la cascade du complément par la voie du facteur de complément C3 (Hunter and Bennett 1984; Vercellotti *et al.* 1982). Il semble cependant difficile d'exclure que l'activité d'activation du complément soit liée au degré d'impureté du polymère en solution (Moghimi and Hunter 2000).

Certains copolymères à blocs comme le F127 ont été ajoutés à certaines formulations pour le traitement de **brûlures** et comme adjuvant de la **réparation tissulaire** (Nalbandian *et al.* 1987; Cao *et al.* 1998; Rodeheaver *et al.* 1980). Ces formulations à base de

copolymères à blocs ont également montré leur efficacité quant au traitement des plaies post-opératoires (Vlahos *et al.* 2001).

Les copolymères à blocs comme le P188 ont de plus montré leur capacité à **sceller les membranes radio-perméabilisées ou électroporées** de façon dose dépendante, permettant de prévenir la fuite des composés énergétiques cellulaires responsable de phénomènes de nécrose cellulaire (Lee *et al.* 1999) ; cette capacité des copolymères à blocs à restaurer l'intégrité membranaire des cellules électroporées en fait des agents prometteurs pour optimiser les techniques de transfert de gène musculaire. Une étude a en effet montré que le P188, en facilitant la **réparation membranaire**, préviendrait les phénomènes de nécrose cellulaire dans les fibres musculaires squelettiques après radiations ionisantes (Greenebaum *et al.* 2004). Ce même poloxamère jouerait également un rôle **neuroprotecteur** (inhibition de l'apoptose et prévention de la nécrose par inhibition indirecte de la MAPkinase p38 après un traumatisme mécanique) (Serbest *et al.* 2006). De nombreux travaux ont montré que les poloxamères étaient capables de s'incorporer dans les bicouches lipidiques de façon à **stabiliser ou réparer des membranes** lésées (Maskarinec *et al.* 2002; Wu *et al.* 2005; Greenebaum *et al.* 2004). Yasuda *et al.*, ont notamment montré que les poloxamères administrés par voie intraveineuse améliorent les fonctions hémodynamiques et myocardiques chez la souris myopathe en stabilisant les membranes cellulaires des myocytes (Yasuda *et al.* 2005).

b. Inhibition de la résistance aux drogues dans les tumeurs MDR

L'équipe d'Alexander Kabanov a démontré au cours de plusieurs études l'effet de potentialisation de l'effet de drogues propre à certains pluronics comme le P85 ou SP1049C qui ont la capacité d'interagir avec les membranes des cellules tumorales dites multidrogues résistantes (MDR). Ces polymères agissent en **inhibant les mécanismes de résistance aux drogues** des cellules ciblées. Des protéines membranaires telles que la P-glycoprotéines (Pgp) sont en effet responsables de l'efflux des drogues administrées aux cellules cibles (drug efflux system) ; les polymères en se liant aux membranes cellulaires, altèrent la viscosité membranaire, et provoquent une déplétion énergétique des cellules MDR et inhibent certaines protéines membranaires énergie dépendante comme la Pgp (Alakhov *et al.* 1996; Batrakova *et al.* 1996; Batrakova *et al.* 1999; Batrakova *et al.* 2001a; Batrakova *et al.* 2001b; Batrakova *et al.* 2003b; Venne *et al.* 1996). En plus d'augmenter la bio-disponibilité de certaines drogues, ils induisent donc une sensibilisation des tumeurs MDR (Kabanov *et al.* 2002a).

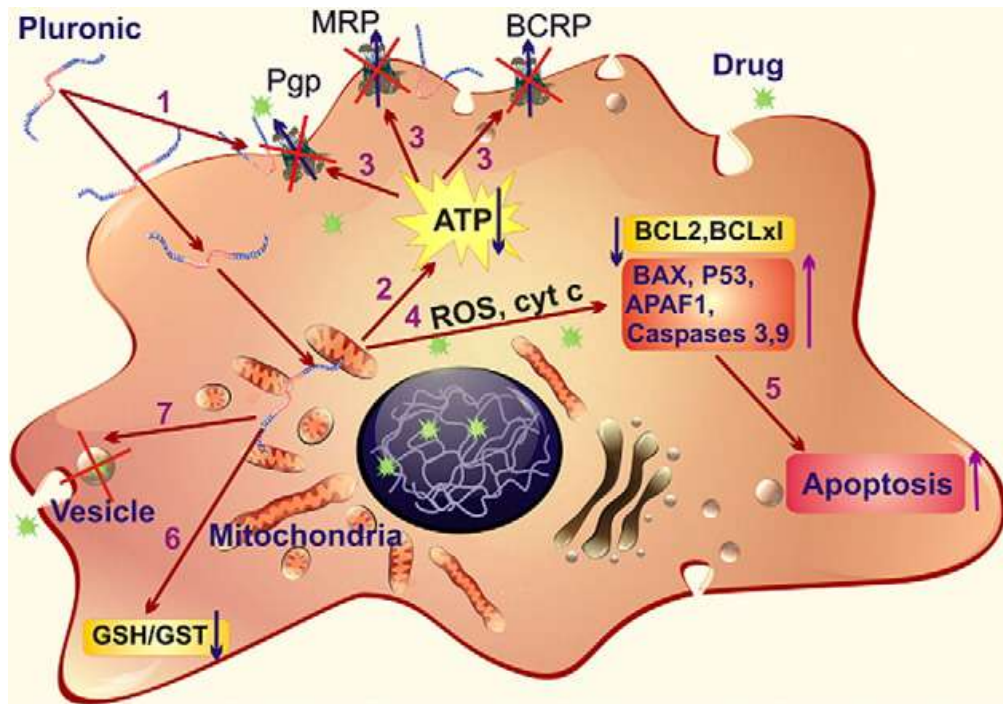


Figure 22 : Schéma représentant les multiples effets des pluronics sur les cellules MDR. (1) modification de la microviscosité membranaire, (2) diminution des niveaux d'ATP intracellulaires, (3) inhibition de Pgp (P-glycoprotéine), MRP (Multidrug Resistance Proteins) et BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), (4) induction du relargage du cytochrome C et de ROS (Reactive Oxygen Species), (5) stimulation de l'apoptose, (6) inhibition du système de détoxification glutathion / glutathion S-transférase, (7) abolition de la séquestration vésiculaire (D'après Batrakova and Kabanov 2008).

Le mode d'action des pluronics sur les cellules MDR a été largement étudié, et leurs différents effets ont pu être synthétisés (Figure 22) par Batrakova et Kabanov (Batrakova and Kabanov 2008).

- (i) Incorporation dans les membranes cellulaires modifiant la microviscosité membranaire.
- (ii) Diminution des niveaux d'ATP intracellulaires (Batrakova *et al.* 2001a; Batrakova *et al.* 2001b).
- (iii) Inhibition des systèmes d'efflux de drogues comme Pgp, MRP (Multidrug Resistance Proteins) ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein).
- (iv) Induction du relargage du cytochrome C et de l'augmentation des niveaux cytoplasmiques de ROS (Reactive oxygen species) par perturbation des membranes mitochondriales et de la chaîne respiratoire (Batrakova and Kabanov 2008).
- (v) Stimulation de la signalisation pro-apoptotique (BAX, P53...) et inhibition du système anti apoptotique (BCL2, BCLxL) (Minko *et al.* 2005).
- (vi) Inhibition du système de détoxification glutathion / glutathion S-transférase (Batrakova *et al.* 2003a).
- (vii) Abolition de la séquestration vésiculaire des drogues délivrées (Venne *et al.* 1996).

De façon intéressante, l'ensemble de ces effets a été observé pour des concentrations en deçà de la CMC (Batrakova *et al.* 1999), suggérant que l'activité biologique des copolymères est dû aux formes unimères et non aux formes micellaires. Il a été suggéré que le rôle crucial des unimères était déterminé par leur capacité à interagir et à s'incorporer dans les membranes plasmiques (Batrakova *et al.* 2001a; Batrakova *et al.* 2001b).

c. Interaction des copolymères à blocs avec les membranes selon leur structure

Les copolymères à blocs amphiphiles représentent une famille de molécules très hétérogène aux propriétés extrêmement variables. Au cours de ses nombreuses études portant sur les cellules tumorales MDR (Multidrug resistance) et sur les cellules BBMEC (Blood Brain Microvessels Endothelial Cells), l'équipe dirigée par Alexander Kabanov a pu établir une classification des différents copolymères à blocs étroitement liée à leurs caractéristiques physicochimiques en fonction de leur capacité d'interaction aux membranes.

En 2001, Batrakova *et al.* avaient émis l'hypothèse que le P85 fluidifiait la membrane des cellules, ce qui aboutissait à une diminution de l'activité de la Pgp ATPase et à une déplétion en ATP cellulaire (Batrakova *et al.* 2001b). En 2003, cette équipe a testé différents polymères (Tableau 1) présentant des HLB et des MW variables sur des cultures de BBMEC afin de déterminer le rapport entre les caractéristiques des copolymères à blocs étudiés et leurs effets sur les cellules (Batrakova *et al.* 2003b).

Copolymer	MW	Average no. of EO units (N_{EO})	Average no. of PO units (N_{PO})	HLB	CMC, % wt
F88	11400	207.27	39.31	28	0.28
F108	14600	265.45	50.34	27	0.032
F38	4700	37.56	17.1	25	N.A
F127	12600	200.45	65.17	22	0.004
L35	1900	21.59	16.38	19	1
P85	4600	52.27	39.66	16	0.03
L64	2900	26.36	30.00	15	0.14
P105	6500	73.86	56.03	15	0.004
L43	1850	12.61	22.33	12	0.4
P103	4950	33.75	59.74	9	0.003
L81	2750	6.25	42.67	2	0.0063
L101	3800	8.64	58.97	1	0.0008
L121	4400	10.00	68.28	1	0.0004

Tableau 1 : Caractéristiques physicochimiques des copolymères à blocs amphiphiles (modifié d'après Batrakova *et al.*, 2003b).

Plusieurs paramètres ont été suivis :

- (i) L'accumulation cellulaire de R123, substrat de la Pgp, utilisé couramment pour évaluer son activité fonctionnelle.
- (ii) Variation de l'activité Pgp ATPase
- (iii) Variation de la microviscosité de la membrane plasmique
- (iv) Variation de la concentration d'ATP intracellulaire

Au regard de ces paramètres, les différents copolymères à blocs étudiés ont pu être classés en 4 groupes, I, II, IIIa et IIIb suivant leur degré d'hydrophobicité.

Dans un premier temps, ils ont pu observer une accumulation cellulaire de R123 pour des concentrations croissantes de polymères approchant la CMC, et une accumulation décroissante pour des concentrations dépassant la CMC. Ce résultat confirme les données précédemment obtenues suggérant que les copolymères à blocs amphiphiles ont une activité biologique sous forme d'unimères, et non pas sous forme micellaire (Batrakova *et al.* 1998; Batrakova *et al.* 1999). Cette accumulation de R123 était très marquée pour les polymères hydrophobes comme le P85, mais était quasi nulle pour des polymères hydrophiles présentant une HLB élevée comme le F108 ou le F127. De façon intéressante, ces résultats se sont retrouvés étroitement corrélés à la modification de la microviscosité membranaire observée, les polymères hydrophiles engendrant une solidification des membranes plasmiques, et les polymères hydrophobes une fluidification. Les paramètres de modification de l'activité de la Pgp ATPase ainsi que la variation de la concentration intracellulaire en ATP – marqueurs de la déplétion en énergétique et de l'activité de la Pgp – ont été synthétisés dans le Tableau 2.

Les résultats obtenus montrent que polymères du premier groupe, comme le F108 ou le F127 adhèrent à la surface des cellules et réduisent la mobilité latérale des bicouches lipidiques, aboutissant à une rigidification des membranes. Les auteurs de cette étude ont conclu que ces polymères ne s'incorporaient pas aux bicouches lipidiques, et n'étaient que faiblement internalisés dans les cellules, aboutissant à un effet négligeable sur la Pgp. Les polymères du second groupe, comme le P85 ou le L64 (plus hydrophobes) adhèrent aux membranes et s'y incorporent, provoquant sa fluidification. Cette incorporation dans la bicouche lipidique perturbe l'environnement de la Pgp et l'activité de la Pgp ATPase. Ces polymères sont de plus internalisés et retrouvés au niveau du cytoplasme et de différentes organelles cellulaires comme le noyau et les membranes mitochondriales, provoquant une inhibition de la synthèse d'ATP (Figure 23). C'est cette combinaison d'effets qui aboutit à l'inhibition du drug efflux transporteur Pgp et qui facilite la délivrance de drogues au travers de la barrière hémato-encéphalique (Batrakova *et al.* 2001b).

		Polymères		Accumulation R123 Efficacité du système d'extrusion	Activité Pgp ATPase	Microviscosité membrane plasmique	[ATP] intracellulaire
Groupe	I	HLB 20-29	F38 F88 F108 F127	Quasi-nulle	Augmentation	Rigidification	Augmentation
	II	HLB < 20 n OP = 30-60	L64 P85 L81 P105	Très forte	Forte diminution	Fluidification	Diminution
	IIIa	HLB <20 n OP <30	L35 L43	Faible	Augmentation	Rigidification	Augmentation
	IIIb	HLB <20 n OP >60	L121 L101	Faible	Forte diminution	Forte Fluidification	Diminution

Tableau 2 : Comportement de différents groupes de copolymères à blocs amphiphiles classés selon leurs propriétés physicochimiques en fonction de différents paramètres marquant la perturbation membranaire de cellules BBMEC. Des cellules BBMEC ont été incubées avec des polymères classés selon leur taux d'hydrophobicité en quatre groupes I, II, IIIa et IIIb, et l'accumulation de R123, l'activité de la Pgp ATPase, la variation de la microviscosité membranaire et l'évolution de la concentration cellulaire en ATP ont été évalués.

Les polymères du groupe IIIa ont pu être classés entre les polymères hydrophiles du groupe I et les polymères plus hydrophobes du groupe II à la lumière de leur effet sur l'activité de la Pgp. Ils causent une rigidification des membranes plasmiques et activent l'activité de la Pgp ATPase ; cependant, contrairement aux polymères du groupe I, ils sont internalisés dans ces cellules, sans toutefois provoquer d'effet notamment au niveau des membranes mitochondriales. Enfin, les polymères du groupe IIIb, extrêmement hydrophobes de par l'importance du nombre de motifs d'OP qu'ils contiennent, provoquent une très forte fluidification membranaire et une très forte inhibition de la Pgp ATPase. Cependant, de par leur très forte affinité envers les bicouches lipidiques, ils sont peu retrouvés au niveau du cytoplasme, et provoquent une faible déplétion en ATP, aboutissant à un effet moindre au niveau de l'activité de la Pgp. Les polymères de ce dernier groupe présentent toutefois des CMC extrêmement faibles, et il est possible que le peu d'effet observé provienne d'un décalage de l'équilibre unimères-micelle vers la forme micellaire. Or il a été démontré que l'effet biologique des polymères provenait essentiellement des formes unimères et non des formes micellaires (Miller *et al.* 1997; Batrakova *et al.* 1998; Batrakova *et al.* 1999; Batrakova *et al.* 2001a; Batrakova *et al.* 2001b).

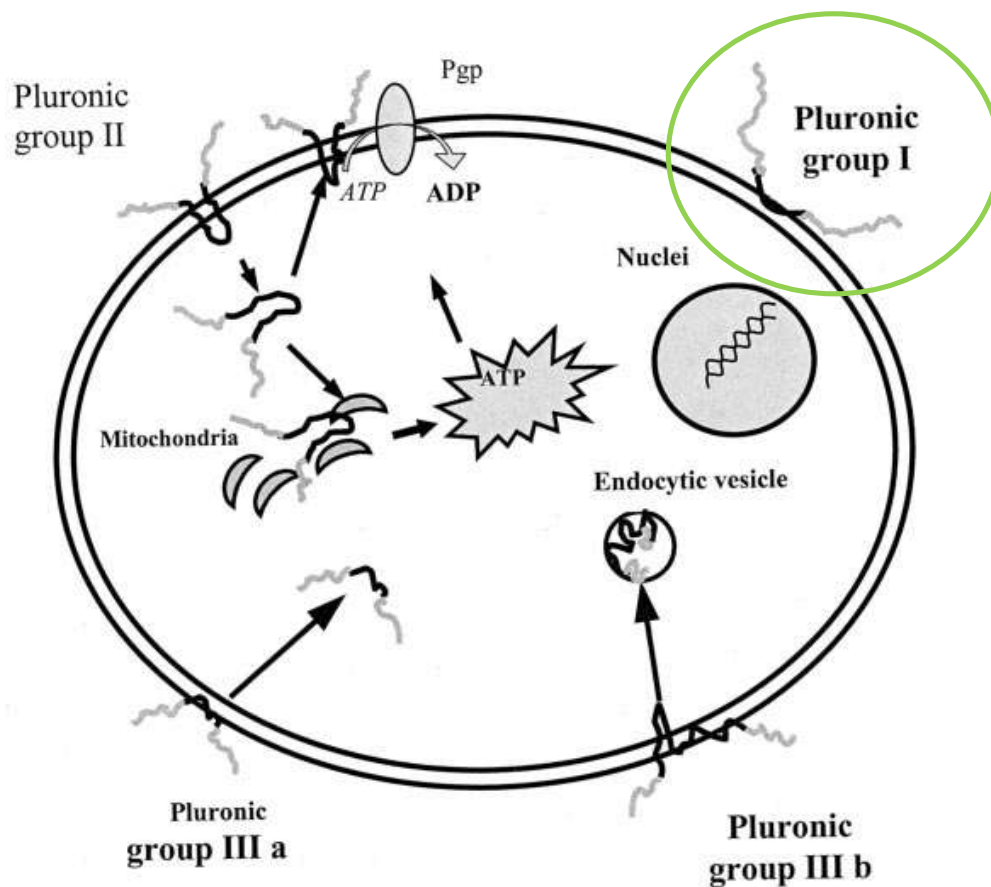


Figure 23 : Schéma décrivant les interactions entre les cellules de la barrière hémato-encéphalique et les quatre groupes de copolymères à blocs amphiphiles (modifié d'après Batrakova *et al.*, 2003b).

Il avait été précédemment montré que les copolymères à blocs amphiphiles modifiaient la perméabilité membranaire d'ions et de solutés de manière structure dépendante ; trois polymères avaient été étudiés, le L61, le P85 et le F68, et il avait été observé que l'effet de perméabilisation était directement corrélé au taux d'OP (Erukova *et al.* 2000). D'autres études ont par la suite porté sur l'interaction de ces copolymères à blocs hydrophobes avec les membranes plasmiques. En 2003, Krylova *et al.* ont montré que le L61 interagissait avec les bicouches lipidiques et induisait une augmentation du taux de flip-flop par les lipides membranaires (Krylova *et al.* 2003). De par leur intérêt en cancérothérapie, la plupart des études se sont consacrées sur l'étude de polymères hydrophobes tels que le P85 ou le L61. De façon intéressante, MacDonald avait cependant mis en évidence dans les années 80 que des chaînes d'OE à des concentrations relativement forte (>5%) avaient la capacité d'induire des déshydratations au sein de bicouches lipidiques aboutissant à des phénomènes de fusion membranaire. De plus, l'incubation de bicouches lipidiques avec des chaînes d'OE à des concentrations plus faibles (0,1-1%) aboutissait à des perturbations de la fluidité membranaire (MacDonald 1985).

Il est intéressant de noter qu'en 1985, Johnston et Miller avait également élaboré une classification des copolymères à blocs amphiphiles, en fonction de leur toxicité ; ils avait mis en évidence que le niveau de toxicité de ces molécules était directement corrélé à leur quantité et à leur proportion de motifs d'OP (Johnston and Miller 1985), les polymères présentant des HLB faibles (comme le L61, le L64 ou le P85) s'avérant plus toxiques que les polymères présentant des HLB très élevées (comme le F127, le F68 ou le F108).

L'ensemble de ces études apportent des renseignements de première importance quand au comportement des copolymères à blocs amphiphiles :

- (i) L'ensemble de ces polymères sont capables d'interagir avec les membranes.
- (ii) L'hétérogénéité structurale des polymères leurs confère des propriétés physicochimiques extrêmement variées aboutissant à des effets biologiques parfois opposés.
- (iii) Les polymères plus hydrophiles – classés dans le premier groupe – comme le F108 ou le F127 semblent inertes, ne provoquant que très peu d'effets au niveau cellulaire, contrairement aux polymères plus hydrophobes comme le P85 ou le L64. Ces polymères hydrophiles sont donc capables d'interagir avec les membranes, sans provoquer de perturbations cellulaires majeures, et présentent une toxicité cellulaire très faible.

De par l'ensemble de leurs propriétés, de nombreux copolymères à blocs aux structures très différentes ont alors été évalué en transfert de gène.

B. Copolymères à blocs et transfert de gène

Ces polymères se sont révélés efficaces pour de nombreuses applications en transfert de gène. Initialement, ils ont été utilisés en synergie avec d'autres stratégies de vectorisation, virales et non virales, mais également avec des techniques physiques telles que l'électroporation et la sonoporation.

A partir des années 2000, l'utilisation des copolymères à blocs amphiphiles s'est étendue au transport d'ADN plasmidique, et ils sont aujourd'hui reconnus à part entière comme une nouvelle classe de vecteurs synthétiques parmi les plus efficaces pour le transfert de gène non viral *in vivo*. Ces nouveaux vecteurs ont en effet montré leur efficacité pour le transfert de gène dans de nombreux organes tels que le muscle squelettique (Lemieux *et al.* 2000; Pitard *et al.* 2004; Pitard *et al.* 2002; Yang *et al.* 2005), le cœur (Pitard *et al.* 2004; Piron *et al.* 2008), les poumons (Desigaux *et al.* 2005), les yeux (Liaw *et al.* 2001) ou encore les intestins (Chang *et al.* 2004).

1. Facilitateurs du transfert de gène par vecteurs viraux

Historiquement, les poloxamères ont d'abord été utilisés pour augmenter l'efficacité de **transfection des adénovirus et des lentivirus** (Maillard *et al.* 2000; Dishart *et al.* 2003). Le poloxamère 407 (F127) a été utilisé sous forme de gel (15% wt) servant de réservoir pour les virus, et a permis d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes *in vitro* en maintenant une concentration suffisante de vecteurs autour des cellules cibles (March *et al.* 1995). Ce même vecteur, également sous forme de gel, a aussi permis de faciliter la transfection médiée par des adénovirus *in vivo* (Feldman *et al.* 1997). L'utilisation de ce polymère à des concentrations élevées a permis de réduire le temps d'incubation en présence du virus et d'augmenter son efficacité de transfection, sans provoquer de toxicité.

2. Optimisation du transfert de gène non viral

a. Facilitation de la transfection non virale

Des études ont montré que ces vecteurs co-délivrés avec des polymères cationiques permettaient d'améliorer le transfert de gène *in vitro* (Gebhart *et al.* 2002). Astafieva *et al.* ont également observé l'effet du P85 sur l'internalisation et l'efficacité de la transfection de polyplexes de poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium) (PEVP) dans différents types cellulaires. Ils ont émis l'hypothèse que le P85 **faciliterait l'internalisation** des complexes **polymère cationique/ADN** par endocytose ainsi que leur **relarguage des compartiments endocytaires vers le cytoplasme** de la cellule (Astafieva *et al.* 1996). Dans cette étude, les

auteurs supposent que le poloxamère P85 interagit avec les motifs hydrophobes des polyplexes formés par l'ADN et le PEVP ; cependant, la présence d'objets triassemblés ADN/PEVP/P85 n'a pas été mise en évidence.

Il a été également montré au sein de notre laboratoire que les copolymères à blocs permettaient **la stabilisation stérique** de complexes cationiques. Les chaînes hydrophiles d'OE provoqueraient une dispersion des complexes et préviendraient ainsi leur agrégation (Pitard *et al.* 2001). Kuo *et al.* ont de plus mis en évidence que les poloxamères à une certaine concentration (1 à 3 % w/v dans l'eau) amélioreraient le transfert de gène des polyplexes PEI/ADN (Kuo 2003). En effet, les polyplexes ont une charge globale positive qui entraîne leur fixation aux protéines sériques du milieu de culture par interactions électrostatiques, aboutissant à leur agrégation et à une inhibition de leur efficacité de transfection. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les copolymères à blocs s'incorporeraient aux polyplexes, permettant d'assurer leur stabilisation stérique en présence de sérum. De façon intéressante, la capacité de ces polymères à stimuler la transfection était d'autant plus importante qu'ils présentaient une hydrophobicité faible (F68>F127>P105>P94>L122).

D'autres études ont également montré la capacité de ces polymères à faciliter le transfert de gène médié par des **lipides cationiques** ; ainsi, des émulsions formés de DOPE et de DC-Chol ont été stabilisées en présence de sérum par des surfactant non ioniques dont les polymères F127 et F68 (Liu *et al.* 1996). Dans cette étude, l'ajout de ces copolymères à blocs aux formulations lipidiques a également permis de faciliter la transfection de cellules en culture.

Enfin, il a été montré que les poloxamères en association avec une méthode physique non virale de type **électroporation** ou **sonoporation** permettaient d'augmenter l'efficacité de transfection *in vivo* et de réduire les dommages tissulaires (Lee *et al.* 1992; Hartikka *et al.* 2001; Chen *et al.* 2006).

b. Systèmes multi-modulaires ADN / vecteur cationique / copolymère à blocs

Plusieurs approches ont été envisagées afin d'associer des vecteurs cationiques – de type lipidique ou polymérique – et des copolymères à blocs amphiphiles. Des copolymères à blocs ont été greffés de façon covalente sur des polymères cationiques, et récemment des copolymères à blocs amphiphiles ont été associés à des lipoplexes de façon non covalente.

Le rationnel de ces approches repose sur le fait que les vecteurs cationiques permettent une transfection efficace *in vitro* en complexant les acides nucléiques, mais que de par leur charge globale positive, ils sont susceptibles de subir des perturbations dans un environnement chargé de molécules anioniques telles que les protéines sériques. *In vivo*, la présence de sérum provoque leur agrégation, pouvant aboutir dans ce cas à des

phénomènes d'embolie pulmonaire, et les données actuelles de la littérature mettent en évidence la faible biodistribution des complexes cationiques *in vivo* qui sont essentiellement phagocytées par les cellules de Kupffer au niveau hépatique (Mahato *et al.* 1997; Verbaan *et al.* 2001).

Nguyen *et al.* ont alors proposé de stabiliser ces objets en **greffant de manière covalente un copolymère à bloc**, le P123, sur du PEI (Nguyen *et al.* 2000). Ce système était par ailleurs complété par l'ajout à la formulation de P123 ou de F127 libre. Le système P123-PEI / ADN s'est avéré plus efficace *in vitro* et *in vivo* que le système PEI / ADN seul (Nguyen *et al.* 2000; Gebhart and Kabanov 2001).

Au sein de notre laboratoire, une approche similaire a été envisagée. Des lipoplexes ont été formés à un rapport de charge neutre, aboutissant à la formation de structures agrégées, puis étaient stabilisés par l'ajout de **copolymères à blocs amphiphiles associés de façon non-covalente** (Letrou-Bonneval *et al.* 2008). Les objets obtenus étaient stables colloïdalement et non chargés. L'utilisation *in vitro* de polymères fonctionnalisés avec un ligand galactose a permis de transférer de manière efficace et spécifique des cellules hépatiques exprimant le récepteur aux asialoglycoprotéines. Ces derniers résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue Journal of Gene Medicine en 2008 : 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.

3. Vectorisation d'ADN plasmidique *in vivo*

Les copolymères à blocs peuvent à eux seuls augmenter l'expression de l'**ADN plasmidique** après injection intramusculaire d'un mélange copolymère à blocs/ADN. De nombreux poloxamères ont été utilisés tels que le SP1017, composé de L61 et de F127, le PE6400, le P85, ou encore le F68. (Lemieux *et al.* 2000; Pitard *et al.* 2004; Pitard *et al.* 2002; Yang *et al.* 2005). Bien que les poloxamines ou Tétronics soient utilisés pour les mêmes applications que les poloxamères, de rares publications concernent leur utilisation pour le transfert d'ADN dans le muscle squelettique (Prokop *et al.* 2002; Pitard *et al.* 2004; McIlroy *et al.* 2009).

Il a été montré au sein de notre laboratoire que des formulations copolymères à blocs/ADN ont permis d'augmenter le niveau d'**expression** du **gène rapporteur** de la β -galactosidase par rapport à une injection d'ADN nu dans le muscle squelettique de souris, dans le muscle cardiaque de rat ainsi que dans des poumons de souris (Figure 24).

Ces polymères se sont en outre montrés efficaces pour **exprimer des protéines d'intérêt thérapeutique** au niveau local ou sécrétées dans des modèles murins de

pathologies humaines. Les copolymères a blocs se sont en effet révélés capables d'exprimer la minidystrophine dans un modèle murin de myopathie de Duchenne (Richard *et al.* 2005b). Cette dernière étude a par ailleurs montré l'efficacité des copolymères à blocs pour la transfection de tissus pathologiques.

De plus, Le F68 a montré son efficacité pour restaurer un taux d'hématocrite normal après transfection d'un plasmide encodant l'érythropoïétine chez des souris anémiques présentant une insuffisance rénale induite (Richard-Fiardo *et al.* 2008). L'injection musculaire d'une forte dose d'ADN encodant l'EPO aboutit à une réponse immunitaire dirigée contre la protéine néo-synthétisée, mais également contre l'EPO endogène. L'utilisation de Lutrol® a permis de s'affranchir de cet effet délétère en autorisant la multiinjection de quantités plus faibles d'acides nucléiques, aboutissant au rétablissement d'un hématocrite physiologique sans provoquer de réactions immunitaires.

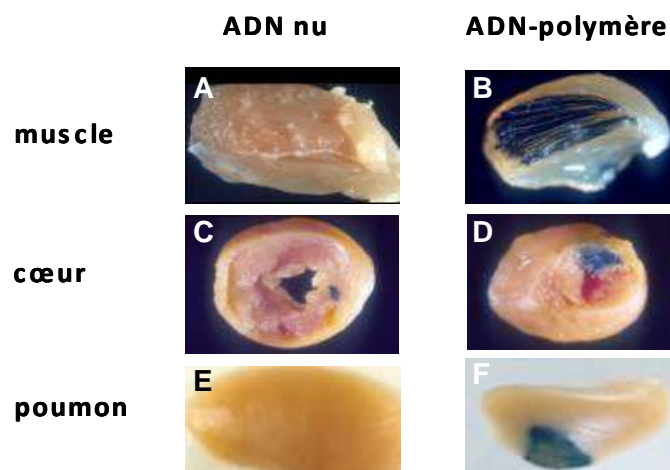


Figure 24 : Transfert de gène dans divers organes à l'aide de copolymères à blocs. Le gène codant la β -galactosidase est injecté dans le tibial antérieur de souris, le cœur et les poumons en absence (A, C et E) ou en présence de poloxamère F68 à 3% (B et F) ou de poloxamine 304 à 0,5% (D).

A contrario, dans des protocoles de **vaccination ADN**, la réponse immunitaire doit être stimulée, et le polymère doit alors dans ce cas servir d'adjuvant afin d'assurer une production d'anticorps optimale. La poloxamine 704 s'est révélée particulièrement efficace pour transférer un plasmide encodant une protéine antigénique modèle, la β -galactosidase, dans un protocole de vaccination ADN (McIlroy *et al.* 2009). Dans ce cadre, l'antigène d'intérêt est directement produit au niveau des fibres musculaires transfectées, ce qui conduit à la production massive d'anticorps polyclonaux spécifiques. Outre le 704, le pluronic P85 a également été utilisé en vaccination, pour l'expression d'un antigène tumoral (Kabanov *et al.* 2005).

C. Mécanisme d'action des copolymères à blocs

Des polymères de structures très différentes tels que le P85, le F68 ou le PE6400 ont tous montré *in vivo* une forte capacité à augmenter l'efficacité de transfection par rapport à l'ADN nu. Malgré leur utilisation croissante, le mécanisme d'action des copolymères à blocs dans le transfert de gène est encore peu connu. La multitude d'effets parfois opposés qu'ils sont susceptibles de provoquer, et ce dans des champs d'applications très variés (drug delivery, capacité adjuvante, réparation tissulaire, inhibition des systèmes drug efflux transporteur), suggère qu'ils agissent en transfert de gène suivant des modes d'actions différents, dépendants de leurs caractéristiques structurales.

L'ensemble des données obtenues dans la littérature montre en effet que les copolymères à blocs amphiphiles sont susceptibles de faciliter le transfert de gène à différents niveaux de la transfection (décrits dans le Chapitre 3 des Généralités), depuis l'accès du transgène à la cellule jusqu'à son expression.

1. Facilitation du trafic intracellulaire et / ou de l'expression du transgène

L'hypothèse d'une facilitation du trafic intracellulaire du transgène a été émise pour la première fois dans notre laboratoire en 2002 (Pitard *et al.* 2002). Il avait été observé que la microinjection cytoplasmique de PE6400 (L64) permettait de faciliter la transfection d'un plasmide et d'augmenter le nombre de cellules exprimant le transgène. Cependant, l'injection de ce polymère au niveau du noyau ne permettait pas de meilleure transfection que l'injection d'ADN nu (Pitard *et al.* 2002). Il est possible que dans ce cas, le PE6400 facilite l'accès au noyau (i) en facilitant l'échappement endosomal du transgène, (ii) en facilitant la diffusion cytosolique du plasmide, (iii) en stimulant l'import du transgène par les importines, ou (iv) en stimulant l'expression du transgène.

Comme décrit dans le Chapitre 3, l'échappement endosomal ainsi que la mobilité cytosolique du plasmide sont deux barrières majeures à une transfection efficace. Il a été décrit que certains polymères comme le L61, présentant une HLB très faible, facilitait le flip-flop des lipides des membranes (Krylova *et al.* 2003). En 1996, Venne *et al.* avaient mis en évidence que le L61 réduisait la séquestration vésiculaire de drogues par les cellules MDR et facilitait sa diffusion cytoplasmique (Venne *et al.* 1996). La facilitation de l'échappement endosomal d'un transgène par les pluronics a également déjà été évoquée ; en 1996, Astafieva *et al.* ont en effet démontré que l'ajout simultané de P85 et de polyplexes facilitait la transfection *in vitro* (Astafieva *et al.* 1996). Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse d'une facilitation de l'échappement endosomal des complexes par le P85.

Cependant, en 2005, l'équipe de Kabanov a mis en évidence que la transfection musculaire médiée par le P85 était dépendante à la fois du promoteur du plasmide injecté, et de la souche de souris utilisée, suggérant une activation de cascades signalétiques transcriptionnelles spécifiques par les pluronics (Yang *et al.* 2005). Cette équipe démontrait une année plus tard que les pluronics activaient des voies de signalisation aboutissant à la stimulation de l'expression de gènes rapporteurs dans des cellules transfectées stables (Sriadibhatla *et al.* 2006).

L'injection de plasmides encodant la luciférase sous la dépendance de différents promoteurs complexés au P85 ou au P123 dans des muscles de souris Balb/c a montré des niveaux de potentialisation de la transfection extrêmement variés. Le P85 était en effet capable de stimuler très fortement (x8 à x20) la transfection d'un plasmide sous la dépendance des promoteurs CMV, NFκB ou p53, mais ne permettait pas de stimuler de façon significative la transfection de plasmides sous la dépendance de promoteurs SV40, CRE ou AP1 (Figure 25).

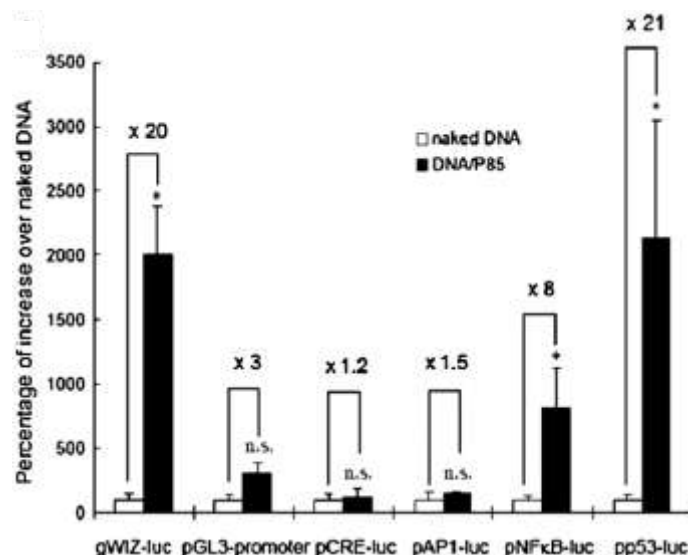


Figure 25 : Effet promoteur dépendant du P85 sur l'expression d'un transgène. Les plasmides encodant le gène rapporteur de la luciférase sous la dépendance de différents promoteurs ont été formulés (barres noires) ou non (barres blanches) à du P85 puis injecté dans des muscles de souris Balb/c. L'expression de la luciférase a été évaluée 24h après l'injection (D'après Yang *et al.*, 2005)

Ce différentiel d'efficacité était conditionné par la présence d'éléments de réponse à NFκB sur ces différents promoteurs, le P85 activant la voie de signalisation NFκB. (Figure 26). La voie de signalisation NFκB joue un rôle central dans les mécanismes de défense cellulaire et de réponse immunitaire, étant un des premiers médiateurs de l'inflammation (Gilmore 1999).

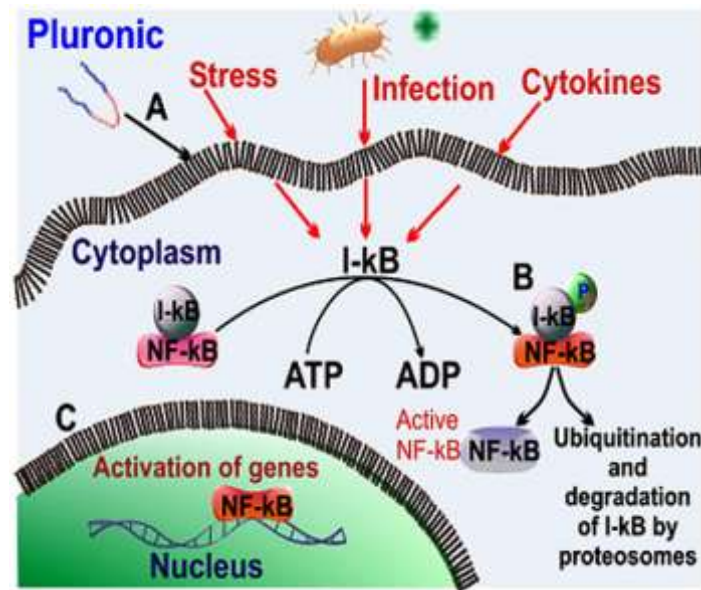


Figure 26 : Activation de la voie de signalisation NFκB par les pluronics. (A) Les Pluronic activent NFκB en perturbant les membranes plasmiques, aboutissant à (B) la phosphorylation rapide d'IκB qui libère NFκB ; (C) ce dernier est transloqué vers le noyau et active la transcription de gènes comprenant ses motifs de fixation (D'après Batrakova and Kabanov 2008).

Il a également été montré que les pluronics tels que le P85 activent les gènes sous la dépendance d'éléments de réponse à P53 (Sriadibhatla *et al.* 2006) ; or l'activation de la cascade apoptotique (P53, BAX...) par les pluronics avait été mise en évidence un an auparavant dans des cellules MDR (Minko *et al.* 2005).

La fixation du plasmide à des facteurs de transcription cytosoliques permet de faciliter sa translocation nucléaire en détournant le système des importines (Dean *et al.* 2005). De plus, l'activation de facteurs de transcription capables de se lier au plasmide transfecté permet de stimuler l'efficacité de la transfection (Mesika *et al.* 2005). L'activation de facteurs de transcription par les pluronics est donc non-seulement susceptible de stimuler l'expression d'un transgène, mais également l'import nucléaire d'un plasmide. En 2008, Yang *et al.* ont pu démontrer que le P85 stimulait la transfection de polyplexes *in vitro* en facilitant l'import nucléaire du transgène (Yang *et al.* 2008).

2. Facilitation des étapes initiales de la transfection

L'interaction entre les pluronics et les membranes biologiques facilite l'internalisation d'adénovirus et de polyplexes (Astafieva *et al.* 1996; Gebhart *et al.* 2002). Les poloxamères pourraient également faciliter l'internalisation de l'ADN au niveau de la membrane du sarcolemme.

En 2004, Krylova et Pohl ont montré la capacité de perméabilisation membranaire du L61 (Krylova and Pohl 2004). Gau-Racine *et al.* ont émis l'hypothèse que les pluronics tels que le

L61 et le L64 facilitaient le transfert de gène en provoquant des pores dans les membranes des cellules, facilitant ainsi l'internalisation des acides nucléiques (Gau-Racine *et al.* 2007).

L'activité ionophore du L64 a été mise en évidence en mesurant la conductance électrique de part et d'autre d'une membrane lipidique, et les résultats ont montré que le L64 à de faibles concentrations avait la capacité de provoquer des pores de 1 à 2,2 nm dans les membranes, et que ces pores étaient stables pendant plusieurs secondes.

Un modèle de perméabilisation membranaire par le L64 a été par ailleurs été proposé, imaginant deux mécanismes différents, « carpet-like » et tonnel stave » (Figure 27).

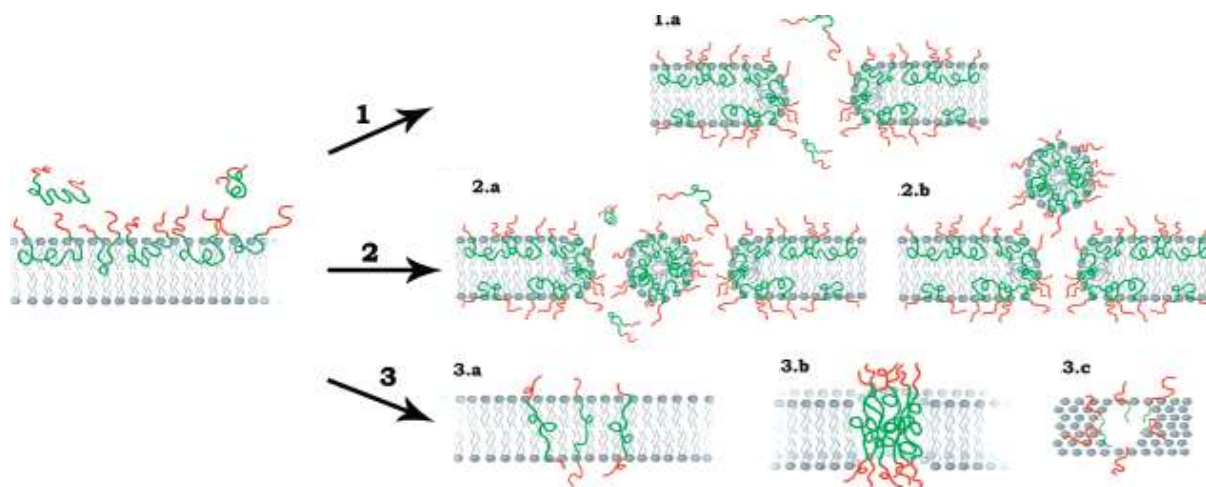


Figure 27 : Modélisation de l'induction de pores membranaires par le L61 (Modifié d'après Gau-Racine *et al.*, 2007).

Le premier mécanisme, dit « carpet like » (Figure 27.1 et 2), supporte l'idée que les polymères viennent tapisser les bicouches lipidiques aboutissant à la formation de pores, ou à l'extrusion de parcelles membranaires. Le second mécanisme, dit « barrel stave » (Figure 27.3), émet l'hypothèse selon laquelle les polymères s'incorporent dans la bicouche, aboutissant à la formation de structures similaires aux canaux ioniques biologiques ; les motifs d'OP tapissent la face interne du pore et stabilisent la membrane. Ce dernier mécanisme ne peut cependant être envisagé que pour des polymères présentant des segments hydrophobes d'OP suffisamment longs pour traverser la membrane de part en part. Gau-Racine *et al.* se sont d'ailleurs prononcés en faveur du premier mécanisme modélisé, « carpet-like ».

Gau-Racine *et al.* ont également démontré que le L64 n'interagissait pas avec les acides nucléiques. On peut toutefois relever que les expérimentations visant à déterminer les interactions entre les acides nucléiques et les polymères n'ont pas été effectuées sur de l'ADN plasmidique, mais sur des fragments d'ADN double brin linéaires de 146 paires de bases. Cette absence d'interaction entre l'ADN et les pluronics confirme cependant les

données obtenues par Kabanov, qui supportent un rôle des polymères indépendant du transgène (Batrakova and Kabanov 2008). Gau-Racine *et al.* n'ont d'ailleurs pas exclu que le L64 puisse agir au niveau des étapes plus tardives de la transfection en favorisant le relargage cytosolique du transgène.

De plus, la formulation d'un plasmide avec le L64 n'a pas provoqué de ralentissement de la migration sur gel d'agarose par rapport à un plasmide non formulé. Il a également été observé que la fluorescence émise par l'incorporation de BET aux acides nucléiques n'était pas modifiée par l'ajout de L64, démontrant bien que ce dernier n'exerce aucun effet de complexation sur l'ADN (Brissault *et al.* 2006).

Cependant, une autre étude menée au sein de notre laboratoire sur des polymères beaucoup plus hydrophiles comme le F68 a également porté sur les interactions entre l'ADN et les copolymères à blocs (Bello-Roufai *et al.* 2007). S'il a été mis en évidence que le F68 n'était pas capable de complexer l'ADN, il avait toutefois la capacité d'interagir avec ce dernier par l'intermédiaire des blocs d'OP pour des températures supérieures à 25°C et dans un milieu de formulation mimant les conditions physiologiques ; de plus, cette interaction dépendait des concentrations d'ADN et de polymère employées (Bello-Roufai *et al.* 2007).

3. Facilitation de la diffusion tissulaire du plasmide *in vivo*

Il a été démontré qu'une grande part de l'efficacité des copolymères à blocs reposait sur leur **capacité à faciliter la diffusion** de l'agent transfectant. Les polymères sous formes gélifiées ont d'ailleurs été utilisés pour faciliter la transfection d'adénovirus (Feldman *et al.* 1997). Il est en outre important de noter que l'injection musculaire non conjointe d'un plasmide encodant un gène rapporteur et de copolymère à blocs ne permet pas d'augmenter la transfection (Pitard *et al.* 2002). Ces résultats indiquent que les mélanges doivent impérativement être réalisés avant l'injection pour avoir un effet synergique. Il a en effet été montré que les polymères SP1017, PE6400 et F68 (Lutrol®) facilitent la distribution tissulaire d'un plasmide injecté dans le muscle chez la souris (Lemieux *et al.* 2000; Pitard *et al.* 2002; Bello-Roufai *et al.* 2007).

La Figure 28 montre en effet que l'injection d'ADN marqué à la rhodamine est accessible à un plus grand nombre de fibres lorsqu'il est formulé à du Lutrol®.

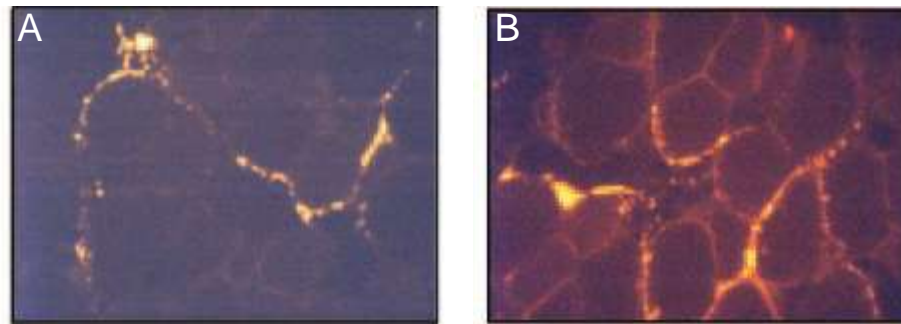


Figure 28 : Influence du Lutrol® dans la distribution tissulaire d'un plasmide. La figure représente des sections de muscles injectées avec 5 μ g de plasmide marqué à la rhodamine (A) non formulé ou (B) formulé au Lutrol®.

De plus, si l'application d'agents myotoxiques préalable à l'injection intramusculaire d'un plasmide nu résulte en une augmentation de l'efficacité de sa transfection *in vivo*, elle inhibe l'efficacité de transfection des copolymères à blocs amphiphiles. Par exemple, la cardiotoxine - issue d'un venin de serpent "Naja nigricollis" - permet une augmentation de l'efficacité du transfert d'ADN nu de 2 à 10 fois (Danko *et al.* 1994). *A contrario*, la préinjection de cardiotoxine inhibe la transfection d'ADN formulé au Lutrol® (Bello-Rouffai *et al.* 2007). Le traitement à la cardiotoxine des myocytes *in situ* abolit toute structure conjonctive, suggérant l'importance de la matrice du tissu dans l'efficacité de ces vecteurs.

L'étonnante capacité de vectorisation des copolymères à blocs semble donc en partie reposer sur une facilitation de la diffusion plasmidique d'un plasmide au sein d'un tissu, et Bello Rouffai *et al.* ont suggéré que les polymères comme le Lutrol® permettaient de masquer les charges négatives de l'ADN facilitant ainsi son accès aux membranes des cellules.

L'ensemble des hypothèses rapportées suggèrent que l'action de ces polymères repose sur des mécanismes agissant au niveau tissulaire, mais également au niveau cellulaire. De plus, les leviers déterminants ces mécanismes semblent étroitement liés à leurs caractéristiques physico-chimiques.

Matériels et méthodes

1. Plasmides et siRNAs

Les plasmides pCMV-luc (Ferrari *et al.* 1997), pCMV-LacZ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), pCMV-GFP (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) encodent, respectivement, les gènes rapporteurs de la luciférase, de la β -galactosidase et de la green fluorescent protein (GFP) sous la dépendance du promoteur cytomégalovirus CMV-*ie*. Le plasmide pGL3 (Promega, Madison, WI) et NF κ B-Luc encodent le gène rapporteur de la luciférase sous la dépendance d'un promoteur SV40 ou NF κ B. Le plasmide pQE30 (Qiagen, Courtaboeuf, France) est un plasmide vide construit sans promoteur eucaryote. Le plasmide pCMV-EPO encode le gène de l'EPO murine sous la dépendance du promoteur CMV-*ie*. La séquence encodant l'EPO murine a été clonée dans un vecteur pcDNA-3 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Tous les plasmides sont amplifiés chez *E.Coli*, puis purifiés à l'aide de colonnes endotoxines free (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'utilisation du kit Qiagen endotoxines free permet de limiter les réactions immunitaires lors de l'injection des plasmides dans les muscles de souris.

Les siRNA anti-Lamine A/C et anti-GFP ont été obtenu chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Le siRNA contrôle a été obtenu chez Qiagen (Chatsworth, CA).

2. Copolymères à blocs

Trois poloxamères comportant 80% d'OE ont été utilisés au cours de cette thèse. Le F38 (P(EO)₃₇-P(PO)₁₅-P(EO)₃₇, 4 700 Da), le F68 ou Lutrol[®] (P(EO)₇₅-P(PO)₃₀-P(EO)₇₅, 8 400 Da) et le F108 (P(EO)₁₂₇-P(PO)₅₀-P(EO)₁₂₇, 14600 Da). Un poloxamère comportant 40% d'OE a également été utilisé, le PE6400 ou L64 (P(EO)₁₃-P(PO)₃₀-P(EO)₁₃, 2900 Da). Ces polymères proviennent de chez BASF (Mount Olive, NJ).

Pour les expérimentations *in vitro*, les solutions de polymères sont préparées aux concentrations données dans du milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté en glucose 4,5 g/l, FBS 10%, L-glutamine 2 mM, streptomycine 10 μ g/ml, pénicilline 100 μ g/ml.

Pour les expérimentations *in vivo*, les solutions stock de polymères sont préparées aux concentrations données dans de l'eau injectable. Les solutions sont stockées à 4°C.

3. Vecteurs cationiques

Le dérivé lipidique d'aminoglycosides DOSP (dioleylamine-succinyl-paromomycine) dont la synthèse a été précédemment décrite (Sainlos 2004; Sainlos *et al.* 2005), présente 4

groupements d'amines protonables par molécule. Ce lipide cationique est utilisé, soit sous forme de liposomes, soit sous forme de micelles. La formation des liposomes requiert la présence d'un co-lipide neutre, la DOPE (DioleoylPhosphatidylEthanolamine) (Avanti[®] Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA). La DOSP et la DOPE sont mélangées dans une solution de chloroforme à un rapport molaire de 1:1. La solution de chloroforme est ensuite évaporée sous vide, puis le film lipidique formé est resuspendu dans de l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C. La solution est ensuite vortexée puis placée dans un bain à ultra-sons pendant 10 min, pour obtenir les liposomes à une concentration finale de 5 g/L. Pour former les micelles, la DOSP est dissoute dans de l'eau distillée puis placée dans un bain d'ultra-sons pendant 10 min. La concentration finale des micelles est également de 5 g/L.

Le BGTC (bis-guanidinium-tren-cholesterol), lipide cationique dont la synthèse a été précédemment décrite par Vigneron *et al.* (Vigneron *et al.* 1996), présente deux charges positives portées par les groupements guanidinium constituant la tête polaire. Le BGTC est seulement préparé sous forme de liposomes, dans les mêmes conditions que pour la DOSP, mais à un rapport lipide cationique/DOPE de 3:2 et à une concentration finale de 20 g/L.

Le Jet-PEI[®] a été obtenu chez Polyplus (Illkirch, France). L'ICAFectin[®] 442 a été obtenue chez IN-CELL-ART (Nantes, France).

4. Formulation complexes vecteurs / ADN

- Formulation des lipoplexes

La formulation de l'ADN avec les lipides cationiques (DOSP, DOSP-DOPE et BGTC-DOPE) est obtenue par mélange équimoléculaire des différentes solutions de liposomes ou de micelles avec l'ADN, à la concentration désirée dans du NaCl 125mM.

Les formulations de l'ADN avec le Jet-PEI[®] et des siRNA avec l'ICAFectin[®] 442 ont été réalisées selon les instructions données par le fournisseur.

- Formulation de l'ADN avec les copolymères à blocs pour le transfert de gène musculaire.

Les complexes copolymère à blocs/ADN sont obtenus par un mélange équimoléculaire des solutions de copolymères à blocs aux concentrations données avec l'ADN préparé dans une solution isotonique (Bello-Roufai *et al.* 2007).

- Formulation des lipoplexes avec les copolymères à blocs

Les complexes ADN-Lipides-polymères sont obtenus par mélange équimoléculaire des solutions de copolymères à blocs avec les lipoplexes préalablement préparées aux concentrations d'ADN et de lipides désirées dans du NaCl 125mM.

Les différentes formulations sont incubées 15 à 20 minutes à température ambiante avant d'être transfectées.

5. Culture cellulaire et transfection *in vitro*

Les cellules HeLa (cellules tumorales humaines), C2C12 (cellules musculaires murines), COS-7 (fibroblastes de reins de singe vert) et d2GFP (cellules cancéreuses pulmonaires humaines de la lignée H1299 exprimant la GFP de façon stable) ont été mises en culture à 37°C / 5% de CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté en glucose (4.5g/l), en L-glutamine (2mM), streptomycine (10 µg/ml), pénicilline (100 µg/ml/ml) (GIBCO et Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) et en FBS 10 % (Eurobio, Courtaboeuf, France). Les cellules CHO (cellules d'ovaire de hamster chinois) et CHO-2241 (cellules CHO déplétées en heparane-sulfate (CHO HS⁻)) ont été mises en culture dans les mêmes conditions, en remplaçant le milieu DMEM avec du milieu Kaighn's F12 (GIBCO, Carlsbad, CA). Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits à 60000 cellules/puits de façon à obtenir des cellules à 70-80% de confluence. Deux heures avant la transfection, les cellules sont incubées avec les copolymères à blocs aux concentrations données dans du milieu DMEM supplémenté en sérum ou Kaighn's F12 supplémentés en sérum pour les cellules CHO et CHO HS⁻.

Les cellules ont été transfectées en ajoutant 50 µl de complexes acides nucléiques/lipide cationique dans 450µl de milieu de culture sans sérum dans chaque puits. Les cellules CHO et CHO HS⁻ ont été transfectées en ajoutant 100µl de lipoplexes complexé ou non au Lutrol[®] dans 450µl de milieu de culture sans sérum dans chaque puits.

Après 2 heures d'incubation, le milieu de transfection a été remplacé par 500 µl de milieu supplémenté en sérum. Les cellules sont alors incubées 20 heures supplémentaires avant que le niveau d'expression du gène rapporteur soit déterminé. Les expériences de transfection ont été réalisées en duplicats ou triplicats et répétées au moins deux fois.

6. Animaux et transfections *in vivo*

Des souris CD1 (Charles River, Chatillon-sur-Chalaronne, L'Arbresle, France) ou Swiss (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) de 8 semaines ont été anesthésiées par injection intra péritonéale d'étomidate (hypnomidate, 40 mg/kg, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France). Après avoir rasé les pattes postérieures de l'animal, les tibiaux antérieurs droit et gauche de la souris sont injectés, en un seul site, avec 50 µl de solution contenant la formulation ADN/polymère, à l'aide d'une seringue à insuline (U/100, Becton Dickinson, Rungis, France). Au moins 10 muscles sont inclus pour l'analyse de chaque groupe expérimental, et chaque expérience a été réalisée au moins deux fois.

7. PCR-quantitative

L'ARN total a été extrait des cellules et des muscles transfectés par traitement au TRIzol[®]. L'ARN a été rétro-transcrit en utilisant des primers oligo(dT)₂₀ et l'enzyme Superscript III (SuperScript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen). L'expression des gènes de la lamin A/C, de NFκB, de P53 et de DAI (DLM1/ZBP1) a été quantifiée par RT-PCR (ABI prism7000, Applied Biosystems, Foster City, CA) en utilisant le PCR Master Mix d'Applied Biosystems avec 300nm de chaque primer et 250 nM de sonde TaqMan RGB (Applied Biosystems). Les résultats ont été normalisés suivant le niveau de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1) et exprimés selon la méthode des $2^{-\Delta(\Delta C(T))}$ (Livak and Schmittgen 2001).

8. Dosage de la luciférase par chimioluminescence

Vingt-quatre heures après la transfection *in vitro*, les cellules sont lavées deux fois avec 500 µL de PBS (Phosphate Buffer Saline) (Promega, Madison, WI) puis lysées dans 300 µL du tampon de lyse RLB (Reporter Lysis 1X Buffer, Promega, Madison, WI) complété avec un cocktail d'anti-protéase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La lyse complète des cellules a été assurée par un cycle de refroidissement -80°C/20°C. Chaque échantillon est centrifugé 5 min à 10000 rpm.

Trois jours après la transfection *in vivo*, chaque muscle disséqué est broyé à l'Ultra-Thurax dans 1ml de tampon de lyse. Le broyat est alors centrifugé pendant 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C.

L'activité de la luciférase est détectée à l'aide du kit Luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA) où 100 µL du substrat de la luciférase sont mélangés à 20 µL de surnageant de l'échantillon. Elle est ensuite mesurée par luminométrie sur le lecteur multi-plaque Victor2 (Perkin Elmer, les Ulis, France), et est normalisée avec la quantité de protéine totale.

La concentration en protéine totale de chaque échantillon est dosée à l'aide du kit Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

9. Evaluation de l'expression de la Green Fluorescence Protein (GFP)

Dosage de la GFP

Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont lysées selon le même protocole que pour le dosage de la luciférase. Chaque échantillon est transféré dans un tube eppendorf puis centrifugé 5 min à 10000 rpm. La fluorescence de la GFP a été quantifiée sur

un aliquot de surnageant de 180µl au Victor2 (PerkinElmer, Les Ulis, France). Le niveau de fluorescence a été normalisé avec la concentration en protéine totale.

Cytométrie de flux

Vingt-quatre heures après la transfection, 10^5 à 10^6 cellules sont collectées et suspendues dans du PBS. Les cellules exprimant la GFP sont alors quantifiées par cytométrie de flux (FACScalibur flow cytometer, Becton Dickinson). Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est déterminé en utilisant le logiciel CellQuest (BD Biosciences).

10. Visualisation du transfert de gène de la β -galactosidase

Le transfert du gène de la β -galactosidase a été évalué par microscopie optique 24h après la transfection. Les cellules sont lavées 2 fois au PBS et fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules fixées sont rincées 2 fois au PBS puis incubées avec le réactif X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) pendant 12h à 37°. Les cellules sont ensuite observées au microscope optique pour visualiser la β -galactosidase.

11. Visualisation de l'entrée des lipoplexes par microscopie électronique

Marquage des lipoplexes avec les Nanoparticules (Nps)

3.68×10^{11} Nanoparticules aminées $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ de 15nm ont été mélangées à 0,5 µg de plasmide pCMV-Luc au ratio Np/pDNA de 5 (mole/mole) dans 300 mM de NaCl. Des liposomes de DOSP-DOPE ont été ajoutés par mélange équivolumétrique pour obtenir un rapport de charge de 4 (+/-).

Microscopie électronique à transmission (TEM)

Deux heures après la transfection, les cellules ont été trypsinées et les cellules de 8 puits ont été poolées et fixées 2 heures dans un mélange de glutaraldehyde (2,5 %) et de paraformaldehyde (4 %) dans du tampon cacodylate à 0,2M (pH 7.4).

Les échantillons fixés ont été traités et analysés par Olivier Lambert et Olivier Le Bihan au laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets de Talence. Les échantillons ont été centrifugés et les culots ont alors été post-fixés 1 h à 4 °C avec de l'osmium tetroxide à 1% dans le même tampon et ont été deshydratés avec de l'éthanol avant d'être inclus en Epon-Araldite. Des coupes de 65nm d'épaisseurs ont alors été traitées successivement avec de l'uranyl acetate à 5% et du lead citrate à 1%. L'observation en TEM a été réalisée en utilisant un microscope FEI tecnai F20.

12. Dosage de l'Interleukine 6 (IL-6)

Les muscles sont prélevés, plongés dans l'azote liquide et broyés dans 1 ml de RLB supplémenté avec un cocktail d'anti-protéases (Roche Diagnostic). Le broyat est centrifugé pendant 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C. Le dosage de l'IL-6 musculaire est réalisé dans le surnageant grâce à l'utilisation d'un kit ELISA utilisé selon les instructions du fournisseur (R&D Systems, Minneapolis, USA). Une gamme étalon est incluse dans chaque plaque de dosage.

13. Analyses histochimiques

Les muscles des souris injectées sont disséqués et inclus dans le Tissue-Teck® (Sakura Finetek, USA, Torrance, CA) avant d'être plongés dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Des sections de 8 µm d'épaisseur sont obtenues, fixées avec le paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes, colorées avec une solution contenant l'hématoxyline et l'éosine et observées par microscopie optique (Zeiss AxioVision).

Résultats

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont donné lieu à la publication originale suivante, actuellement en révision dans la revue *Nucleic Acids Research* :

Chevre, R., Le Bihan, O., Beilvert, F., Chatin, B., Barteau, B., Lambert, O., Pitard, B. (2009) Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. *Nucleic Acids Res*, en révision.

Les résultats présentés dans la partie 7B des résultats ont donné lieu à la publication suivante dans la revue *Human Gene Therapy*:

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.

Au cours de cette thèse, j'ai également participé à différentes collaborations qui ont donné lieu :

- aux publications suivantes :

Le Bihan, O., **Chevre, R.**, Mornet, S., Garnier, B., Pitard, B., Lambert, O. (2009) Probing the mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. *Nucleic Acids Res*, en révision.

Chisholm, E. J., Vassaux, G., Martin-Duque, P., **Chevre, R.**, Lambert, O., Pitard, B., Merron, A., Weeks, M., Burnet, J., Peerlinck, I., Dai, M. S., Alusi, G., Mather, S. J., Bolton, K., Uchegbu, I. F., Schatzlein, A. G., and Baril, P. (2009) Cancer-specific transgene expression mediated by systemic injection of nanoparticles. *Cancer Res* **69**, 2655-2662.

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.

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.

- ainsi qu'aux revues suivantes :

Labas, R., Barteau, B., Beilvert, F., David, S., **Chevre, R.**, Pitard, B. (2009) Nature as an inspiration for the development of cationic transfection lipids. *Genetica*, sous presse.

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.

1. Problématique

Dans le cadre du transfert de gène *in vitro*, les vecteurs cationiques de nature lipidique ou polymérique ont largement montré leur efficacité et sont utilisés en routine comme agent transfectant dans la plupart des laboratoires. Ils compactent l'ADN et forment des objets chargés positivement, aptes à interagir avec les molécules anioniques qui décorent la surface des membranes cellulaires (glycosaminoglycanes ...) (Labat-Moleur *et al.* 1996; Mislick and Baldeschwieler 1996; Kopatz *et al.* 2004). Contrairement aux cellules *in vivo*, les cellules *in vitro* n'ont pas à leur disposition de système vasculaire dédié à leur approvisionnement en nutriments ; elles développent donc une activité endocyttaire exacerbée afin de capter les éléments essentiels à leur développement, présents dans leur milieu de culture. C'est par ce processus d'endocytose que les lipoplexes ou polyplexes sont internalisés, et l'efficacité de ces vecteurs repose grandement sur leur capacité à provoquer l'échappement endosomal du transgène transfecté (Xu and Szoka, Jr. 1996; Kichler *et al.* 2001) (voir Chapitre 3 des généralités). Les lipides cationiques sont en revanche très peu efficaces pour des applications de transfert de gène *in vivo*. Par exemple dans le muscle squelettique, l'ajout de lipides cationiques conduit a une inhibition de l'expression obtenue avec de l'ADN nu.

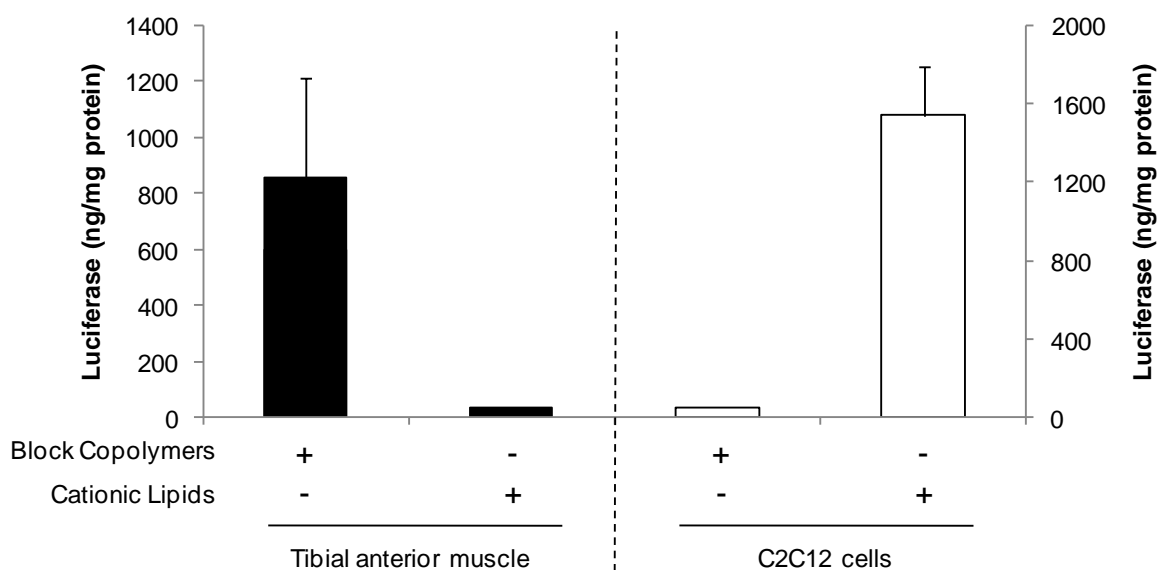


Figure 29 : Efficacités de transfection comparée des copolymères à blocs et des lipides cationiques *in vivo* et *in vitro*. L'efficacité du Lutrol® et de la DOSP-DOPE a été évaluée en dosant le gène rapporteur de la luciférase 7 jours après la transfection *in vivo* dans des muscles tibiaux antérieurs de souris (barres noires) ou 24 heures après la transfection *in vitro* dans des cellules musculaires murines de la lignée C2C12 (barres blanches). Un plasmide encodant la luciférase a été formulé à du Lutrol® 3% ou à de la DOSP-DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). Les quantités de plasmides transfectées *in vitro* et *in vivo* étaient respectivement de 1 et de 10µg.

La Figure 29 montre en effet que la transfection de cellules musculaires en culture à l'aide d'un lipide cationique, la DOSP-DOPE, formulé avec un plasmide encodant le gène rapporteur de la luciférase au rapport de charge de 4 (+/-), conduit à une forte expression du

transgène, mais que l'injection de lipoplexes formulés dans les mêmes conditions dans le muscle tibial antérieur de souris ne conduit à aucune expression. La forte charge globale des complexes lipidiques cationiques / ADN conduit en fait à leur interaction avec les molécules anioniques présentes massivement *in vivo*, ce qui provoque leur agrégation. Plutôt que de favoriser l'internalisation cellulaire du transgène, ils inhibent sa diffusion tissulaire.

Les polymères non chargés tels que les copolymères à blocs amphiphiles permettent au contraire de faciliter la diffusion tissulaire d'un plasmide (Bello-Roufai *et al.* 2007), et sont très efficaces pour transfecter le muscle squelettique. En effet, l'injection musculaire de 10 µg de plasmide encodant le gène rapporteur de la luciférase formulé avec un copolymère à blocs amphiphile, le Lutrol[®], dans le muscle tibial antérieur de souris conduit à une forte expression du transgène par les fibres musculaires (Figure 29). *A contrario*, le Lutrol[®] formulé dans les mêmes conditions est inefficace *in vitro* et n'aboutit à aucune expression du gène rapporteur dans des cellules musculaires murines de la lignée C2C12 (Figure 29).

L'incapacité de vecteurs comme les lipides cationiques à transfecter des cellules au sein d'un organe comme le muscle squelettique est aisément appréhendable : la charge globale positive des complexes formés à l'aide de ces vecteurs conduit à leur interaction électrostatique avec les éléments anioniques de la matrice extracellulaire, ce qui inhibe la diffusion de l'ADN.

En revanche, l'incapacité de vecteurs tels que les copolymères à blocs à transfecter des cellules en culture dans une boîte de plastique est plus surprenante.

Il est difficilement envisageable que le rôle de ces polymères dans la transfection se limite à **faciliter la diffusion tissulaire** au sein d'un organe et qu'ils n'aient aucune implication au niveau des cellules elles-mêmes. Il est en effet important de remarquer que les copolymères à blocs amphiphiles ont déjà démontré de nombreuses activités au niveau cellulaire, en « drug delivery » dans des cellules MDR (Batrakova and Kabanov 2008), mais également en transfert de gène (Pitard *et al.* 2004; Yang *et al.* 2005; Yang *et al.* 2008).

Il est en fait probable que ces polymères facilitent le processus de transfection des acides nucléiques *in vitro* comme *in vivo*, mais que **la voie d'internalisation empruntée dans des cellules en culture soit différente et improductive**. De par leur capacité endocytaire exacerbée, les cellules *in vitro* internalisent les éléments présents dans le milieu de culture, dont les acides nucléiques, mais ces derniers sont séquestrés dans les vésicules endosomales et sont détruits par le lysosome. La séquestration dans les endosomes du matériel internalisé représente en effet une des principales barrières limitant la transfection. Or, comme nous l'avons déjà remarqué, si les vecteurs cationiques permettent de complexer les acides nucléiques et de favoriser leur internalisation, ils permettent surtout de faciliter leur échappement endosomal.

Ce travail de thèse s'est donc articulé autour de deux hypothèses :

(i) L'inaptitude des copolymères à blocs amphiphiles comme le Lutrol® à assurer la transfection efficace de cellules en culture pourrait résider dans leur incapacité à libérer les acides nucléiques des endosomes. Cela impliquerait dès lors que l'ADN transfecté à l'aide de ces copolymères à blocs *in vivo* emprunte une voie d'internalisation indépendante de l'endocytose.

(ii) Les copolymères à blocs amphiphiles n'agissent pas uniquement en facilitant la diffusion tissulaire des acides nucléiques mais ils seraient également capables de faciliter la transfection au niveau cellulaire *in vivo* comme *in vitro* dès lors que l'échappement endosomal est assuré de manière efficace.

Afin de déterminer le niveau d'implication du Lutrol® dans la transfection au niveau cellulaire, nous avons développé un modèle d'étude sur des cellules en culture impliquant plusieurs stratégies de transfection *in vitro* faisant intervenir le Lutrol® en association directe ou indirecte avec des vecteurs cationiques afin d'assurer un échappement endosomal efficace.

2. Modèle d'étude du mécanisme d'action des copolymères à blocs amphiphiles

1. Développement du modèle

Afin de dépasser les barrières cellulaires limitant l'efficacité des copolymères à blocs *in vitro* telle que la séquestration endosomale, nous avons utilisé des lipides cationiques, permettant ainsi l'acheminement du transgène jusqu'au noyau. Lors de la transfection, les acides nucléiques sont internalisés par les cellules par endocytose, sortent des endosomes puis rejoignent le noyau afin d'être transcrits (chapitre 3 des généralités).

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si le Lutrol[®] avait une influence la progression des acides nucléiques transfectés. Nous avons développé un protocole de traitement des cellules en culture avec le Lutrol[®] permettant d'observé son effet sur la transfection d'un plasmide encodant un gène rapporteur.

a. Traitement des cellules avec le Lutrol[®]

Nous avons incubé des cellules en culture en présence de Lutrol[®] 3%, concentration permettant une efficacité de transfection optimale *in vivo*. Le milieu de culture a ensuite été changé puis les cellules ont été transfectées avec 1µg de plasmide encodant le gène rapporteur de la luciférase au moyen de liposomes DOSP-DOPE formulés au rapport de charge 4 (+/-). L'efficacité de transfection a été évaluée par dosage du gène rapporteur de la luciférase 24h après la transfection (Figure 30).



Figure 30 : Protocole de traitement avec les copolymères à blocs des cellules transfectées. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits pendant 24h jusqu'à atteindre 70 à 80% de confluence. Les cellules sont incubées pendant 2h avec du Lutrol[®] 3% dans le milieu de culture, puis le milieu est changé. Les cellules sont alors transfectées pendant 2h avec 1µg de plasmide complexé à un lipide cationique, puis le milieu est changé. Les cellules sont incubées pendant 22h dans du milieu de culture. Les cellules sont alors lysées, et le gène rapporteur dosé.

La transfection de cellules en culture à l'aide de lipoplexes formés de DOSP-DOPE complexés à 1µg de plasmide au rapport de charge 4 (+/-) permet l'expression de la luciférase par les cellules. La Figure 31 montre clairement que le traitement des cellules avec le Lutrol[®] en amont de la transfection permet d'obtenir une plus forte expression de la luciférase dosée par rapport aux cellules non traitées.

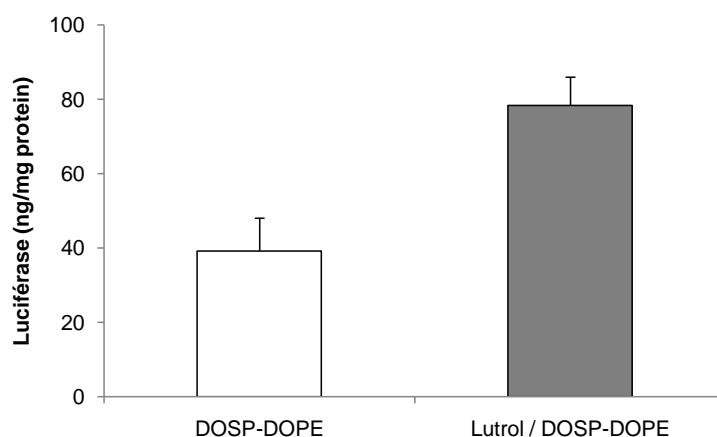


Figure 31 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection de lipoplexes *in vitro*. Les cellules ont été transfectées avec 1µg plasmide gwizz encodant la luciférase complexé à de la DOSP/DOPE au rapport de charge 4 (+/-). Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol® (barre grise) ou sans avoir été traitées (barre blanche). Les cellules ont été traitées pendant 2h avant la transfection avec du Lutrol® 3% dilué dans du milieu de culture. La luciférase a été dosée 24h après la transfection.

Nous avons alors observé l'effet de l'incubation des cellules transfectées avec différentes doses de Lutrol® ; nous avons pu mettre en évidence une stimulation de l'expression de la luciférase dépendante de la dose de Lutrol® employée (Figure 32).

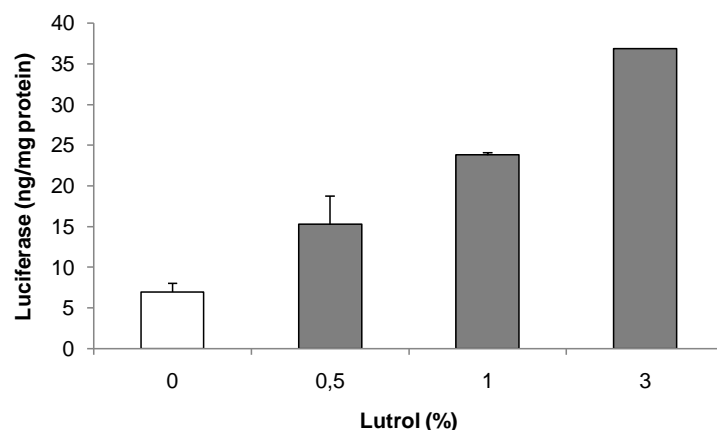


Figure 32 : Effet de la concentration des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection *in vitro*. Les cellules ont été transfectées avec 1µg plasmide gwizz encodant la luciférase complexé à de la DOSP/DOPE au rapport de charge 4 (+/-). Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol® à différentes concentrations (barre grise) ou sans avoir été traitées (barre blanche). Les cellules ont été traitées pendant 2h avant la transfection avec du Lutrol® 0.5, 1 et 3% dilué dans du milieu de culture. La luciférase a été dosée 24h après la transfection.

Le Lutrol® permet donc de faciliter l'expression d'un transgène *in vitro* de manière dose dépendante, et son effet maximal est observé pour des concentrations similaires à celles permettant une transfection optimale *in vivo*.

b. Traitement des cellules avec des polymères de différentes tailles

Nous avons alors évalué l'impact d'autres polymères présentant des caractéristiques physico-chimiques similaires à celles du Lutrol[®]. Le F38 et le F108 présentent une HLB identique à celle du Lutrol[®] (80% OE), mais des masses moléculaires respectivement plus faible (4700) et plus forte (14600). Les cellules ont subi le même protocole d'incubation/transfection précédemment décrit pour le Lutrol[®], et la luciférase a été dosée.

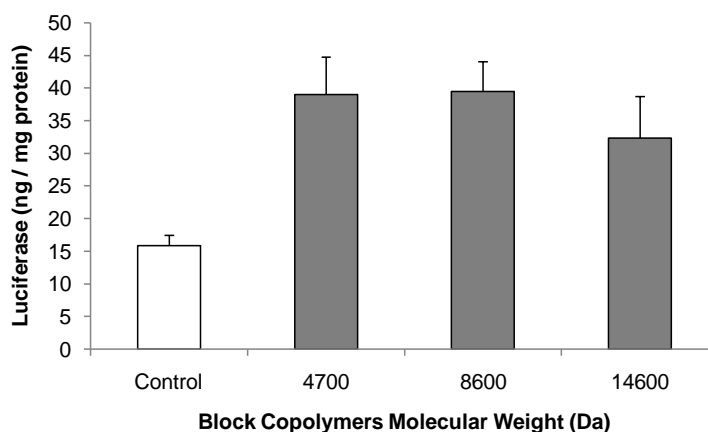


Figure 33 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection *in vitro* en fonction de leurs masses moléculaires. Les cellules ont été transfectées avec 1 μ g plasmide gwizz encodant la luciférase complexé à de la DOSP/DOPE au rapport de charge 4 (+/-). Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec les copolymères à blocs (barres grises) ou sans avoir été traitées (barres blanches). Les cellules ont été traitées pendant 2h avant la transfection avec du F38 1% (4700 Da), du Lutrol[®] 3% (8600 Da) ou du F108 1% (14600 Da) dilués dans du milieu de culture. La luciférase a été dosée 24h après la transfection.

La Figure 33 montre que les cellules préincubées avec le F38, le Lutrol[®] ou le F108 présentent une plus grande expression du gène rapporteur de la luciférase que les cellules non traitées. Les copolymères à bloc amphiphiles présentant une HLB élevée (80% PEO) semblent donc potentialiser la transfection d'un plasmide *in vitro* indépendamment de leur masse moléculaire.

Ces résultats préliminaires suggèrent que les copolymères à blocs amphiphiles tels que le Lutrol[®] n'agissent pas exclusivement en facilitant la diffusion tissulaire d'un plasmide *in vivo*, mais présentent une certaine capacité à faciliter la progression d'un plasmide au niveau de la cellule. Afin de garantir que l'effet observé n'était pas spécifique des conditions de transfection employées, nous avons alors fait varier différents paramètres tels que le type cellulaire ou le type de vecteur cationique utilisé.

c. Influence des conditions de transfection

Nous avons comparé l'effet du traitement avec le Lutrol[®] sur la transfection de différents types cellulaires et de différents plasmides encodant différents gènes rapporteurs. Il a en effet été clairement établi que les voies d'internalisation empruntées lors de la transfection

d'acides nucléiques *in vitro* étaient multiples, et étaient étroitement corrélées au type cellulaire ciblé (Douglas *et al.* 2008). La Figure 34B montre que le prétraitement avec le Lutrol[®] de cellules provenant de quatre lignées différentes (cos-7, C2C12, HeLa et H1299) permet de stimuler l'expression du gène rapporteur de la luciférase. De plus, la transfection de deux plasmides encodant deux gènes rapporteurs différents, la luciférase et la GFP, est dans les deux cas stimulée par le prétraitement des cellules avec le Lutrol[®] (Figure 34A).

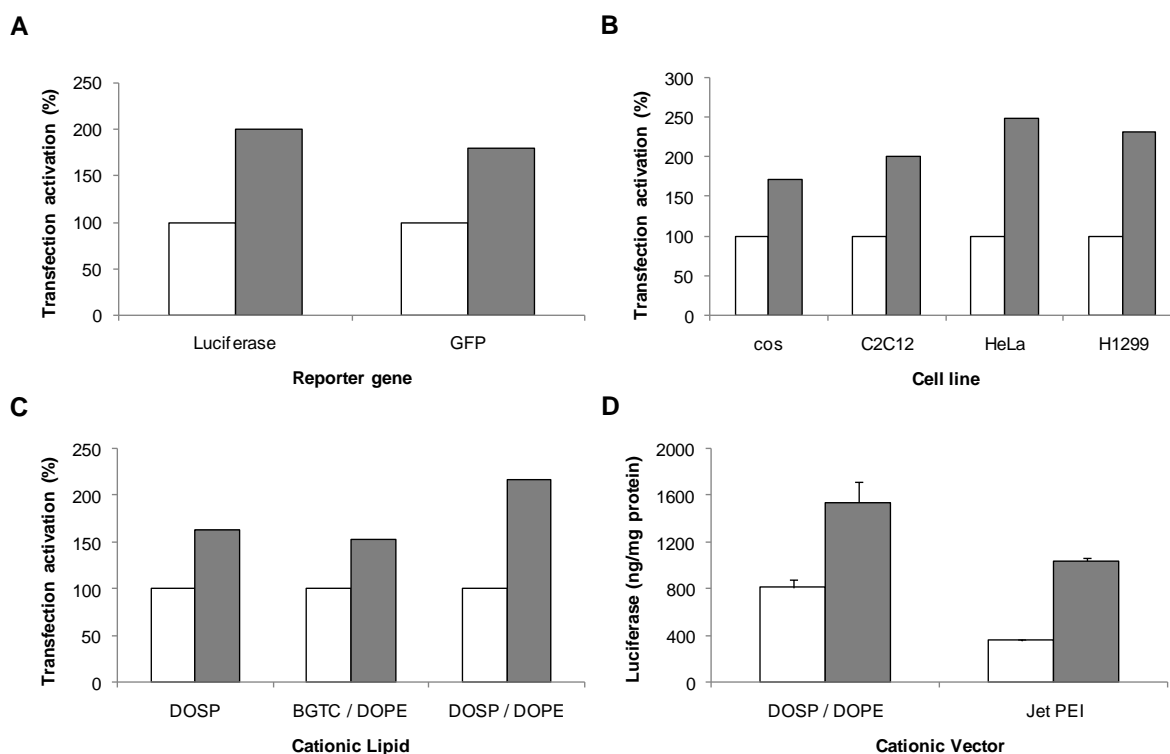


Figure 34 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection *in vitro* en fonction (A) du gène rapporteur, (B) de la lignée cellulaire, (C) du lipide cationique et (D) de la structure chimique du vecteur cationique. Le gène rapporteur a été dosé sur des cellules transfectées ayant subi un prétraitement au Lutrol[®] (barres grises) ou n'ayant pas subi de prétraitement (barres blanches). (A) Des cellules C2C12 ont été transfectées avec 1µg de plasmide encodant la luciférase ou la GFP complexés avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). (B) Des cellules COS-7, C2C12, HeLa or H1299 ont été transfectées avec 1µg de plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). (C) Des cellules HeLa ont été transfectées avec 1µg de plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP, de la DOSP/DOPE et du BGTC/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). (D) Des cellules H1299 ont été transfectées avec 1µg de plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-) ou avec du Jet PEI selon les instructions du fournisseur. Le gène rapporteur a été dosé 24h après la transfection.

De la même manière, le type de vecteur cationique utilisé influence directement la voie d'internalisation empruntée (Rejman *et al.* 2006). Nous avons alors voulu savoir si le Lutrol[®] favorisait de manière spécifique la transfection des lipoplexes formés à partir de liposomes de DOSP-DOPE. Pour ce faire, nous avons comparé l'impact du traitement des cellules avec le Lutrol[®] sur la transfection de lipoplexes formés à partir de micelles (DOSP seule), ou de liposomes composés de lipides de nature différente (BGTC-DOPE). La Figure 34C montre

que l'ensemble des lipoplexes transfectés conduit à une expression du gène rapporteur dosée supérieure lorsque les cellules sont préalablement traitées avec le Lutrol[®].

Nous avons alors entrepris d'utiliser un autre type de vecteur cationique afin d'acheminer le transgène rapporteur jusqu'au noyau. Si les polymères cationiques ont également démontré leur efficacité dans le cadre du transfert de gène *in vitro*, leur mode d'action est cependant différent de celui décrit pour les lipides cationiques. Il s'appuie notamment sur l'acidification progressive des endosomes pour provoquer la libération cytosolique du transgène (proton sponge) (Kichler *et al.* 2001). Nous avons donc évalué l'impact du Lutrol[®] sur la transfection de polyplexes formés à partir de JetPEI[®] (Figure 34D), et là encore, le prétraitement des cellules avec le Lutrol[®] conduit à une forte augmentation du gène rapporteur de la luciférase dosé.

L'ensemble de ces résultats montre bien que le Lutrol[®] permet de stimuler le processus de transfection d'un transgène au niveau cellulaire, indépendamment du type cellulaire ou du vecteur cationique employé. Cela indique que l'effet du Lutrol[®] sur la transfection n'est pas lié à une voie d'internalisation spécifique d'un vecteur ou d'une cellule, mais relève d'un processus plus général.

2. Hypothèses de travail

Nous avons alors entrepris de déterminer d'une part (i) l'étape de la transfection stimulée par le Lutrol[®], et d'autre part (ii) l'étape limitante *in vitro* nécessitant la présence d'un vecteur cationique.

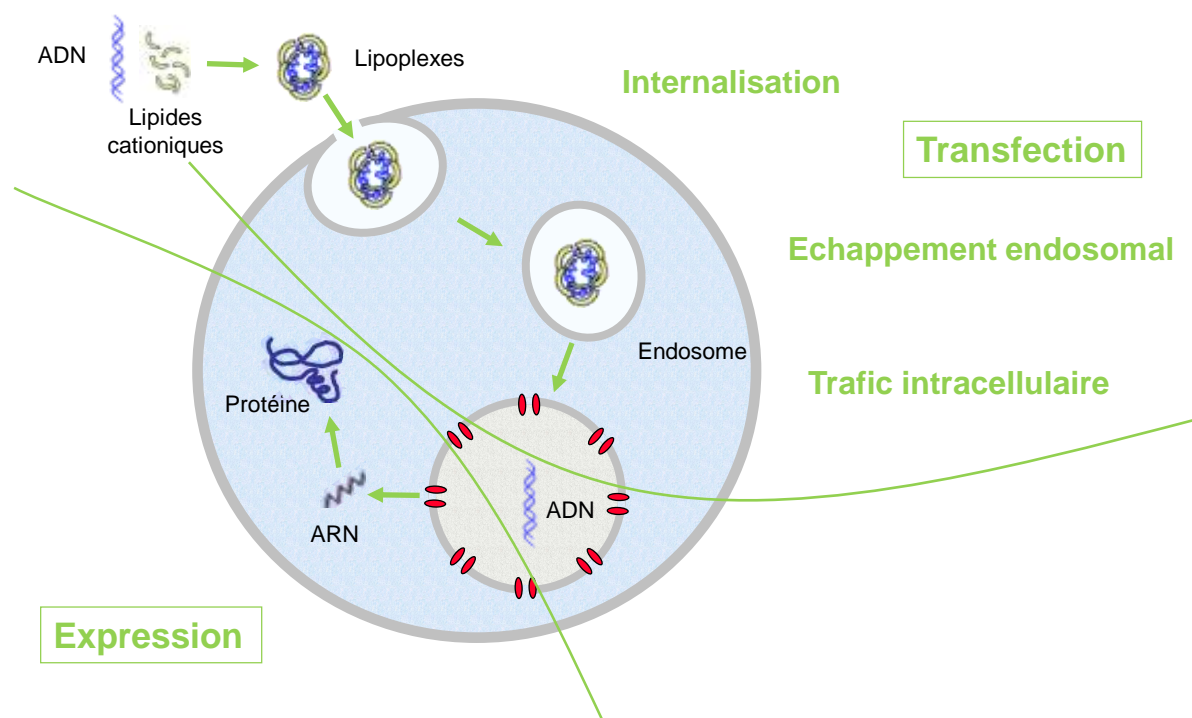


Figure 35 : Les différentes étapes de la transfection *in vitro*. La transfection médiée par les lipides cationiques *in vitro* peut se décomposer en plusieurs grandes étapes. L'ADN est complexé par les lipides cationiques, et les particules formées interagissent avec les membranes des cellules pour être endocytées. Les lipides cationiques permettent à l'ADN de sortir de l'endosome *via* un mécanisme de « flip-flop ». Une fois relargué dans le cytosol, l'ADN doit rejoindre le noyau afin d'y être transcrit.

Les molécules de Lutrol[®] en solution sont susceptibles de faciliter différents stades du processus aboutissant à la synthèse de la protéine d'intérêt (Figure 35) :

Facilitation de l'interaction aux membranes

Les copolymères à bloc amphiphiles sont capables d'interagir avec les membranes cellulaires. Ils ont été classés en quatre grandes classes, en fonction de leur masse moléculaire et de leur balance hydrophile/hydrophobe, suivant leur capacité d'interaction et d'incorporation aux membranes cellulaires. Les polymères à blocs présentant une HLB élevée comme le Lutrol[®] se sont montrés capables d'interagir aux membranes sans s'y incorporer (Batrakova *et al.* 2003b). Il a de plus été démontré que les molécules de Lutrol[®] avaient la capacité d'interagir avec les acides nucléiques, et que cette interaction dépendait de la présence des blocs d'oxyde de propylène (Bello-Roufai *et al.* 2007). On peut donc

envisager le Lutrol[®] comme un facilitateur de l'interaction des acides nucléiques avec les membranes.

Facilitation de l'échappement endosomal

Une fois les lipoplexes internalisés, ces derniers se retrouvent séquestrés dans des endosomes. Les lipides cationiques permettent la libération endosomale du transgène, par un mécanisme de flip-flop décrit par Xu et Szoka (Xu and Szoka, Jr. 1996). Cette étape limite cependant fortement l'efficacité de la transfection, et la facilitation de cette étape par les copolymères à blocs doit être envisagée. Venne *et al.* ont notamment montré que le L61 était susceptible de faciliter le relargage cytoplasmique de drogues séquestrées dans des vésicules (Venne *et al.* 1996). Toutefois, le Lutrol[®] ne permettant pas de transfecter des cellules en culture, il est peu probable que la capacité de transfection du Lutrol[®] repose sur une facilitation de l'échappement endosomal. Il semblerait au contraire que cette étape constitue la principale limite à l'utilisation des copolymères à blocs amphiphiles *in vitro*.

Facilitation du trafic du transgène du cytoplasme au noyau

Le trafic du transgène vers le noyau demeure une étape importante de la transfection. De façon intéressante, il a été montré que l'injection cytoplasmique de PE6400 facilitait la transfection d'un plasmide, émettant ainsi l'hypothèse d'une facilitation de la diffusion cytoplasmique (Pitard *et al.* 2002).

D'autre part, il a également été montré que les molécules d'ADN cytoplasmiques pouvaient être prises en charge par des facteurs de transcription au niveau de leurs séquences promotrices. L'activation des voies de signalisation activatrices de ces facteurs entraîne leur importation vers le noyau, et le plasmide fixé est alors transloqué vers le noyau de concert (Dean *et al.* 1999; Vacik *et al.* 1999; Miller and Dean 2008; Young *et al.* 2003; Young *et al.* 2008). Or, il a récemment été mis en évidence que certains polymères comme le P85 avaient la capacité de fortement perturber les membranes cellulaires et aboutissaient à l'activation de cascades de signalisation inflammatoires entraînant la facilitation de la transfection de plasmides comportant au niveau de leur promoteur des motifs de fixation à ces facteurs, tel que NF κ B sur le promoteur CMV.

Stimulation de la transcription

L'activation de voies de signalisation intracellulaires est susceptible d'activer la transcription du transgène. Il a été démontré que certains copolymères à block amphiphiles activaient la transcription de gènes rapporteurs transfectés de façon stable dans des cellules en culture (Sriadibhatla *et al.* 2006).

3. Impact du Lutrol® sur les étapes tardives de la transfection

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si le Lutrol® permettait de stimuler les étapes tardives de la transfection que sont l'import nucléaire et l'expression du transgène, comme cela a déjà été décrit dans la littérature pour des polymères plus hydrophobes tels que le PE6400 ou le P85 (Pitard *et al.* 2002; Yang *et al.* 2005; Sriadibhatla *et al.* 2006; Batrakova and Kabanov 2008; Yang *et al.* 2008).

1. Le Lutrol® n'induit pas l'expression du transgène

Afin de déterminer si l'augmentation du niveau de luciférase dosé provenait d'une stimulation de l'expression du transgène ou d'une stimulation de la transfection proprement dite, nous avons observé l'effet du Lutrol® sur des cellules pré-transfectées exprimant déjà le transgène.

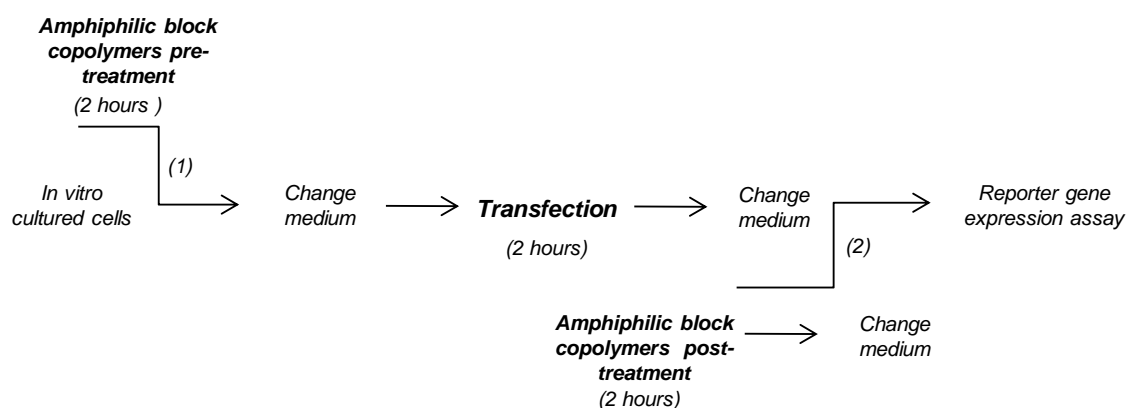


Figure 36 : Protocole de traitement avec les copolymères à blocs des cellules en amont ou en aval de la transfection. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits pendant 24h jusqu'à atteindre 70 à 80% de confluence. (1) Les cellules sont incubées pendant 2h avec du Lutrol® 3% dans le milieu de culture, puis le milieu est changé. Les cellules sont alors transfectées pendant 2h avec 1µg de plasmide complexé à un lipide cationique, puis le milieu est changé. (2) Les cellules sont transfectées pendant 2h avec 1µg de plasmide complexé à un lipide cationique, puis le milieu est changé. Les cellules sont alors incubées pendant 2h avec du Lutrol® 3% dans le milieu de culture, puis le milieu est changé. Les cellules sont incubées pendant 22h dans du milieu de culture. Les cellules sont alors lysées, et le gène rapporteur dosé.

Nous avons transfecté des cellules avec un plasmide encodant la luciférase complexé aux lipides cationiques. Après 2 heures d'incubation, les cellules commencent déjà à exprimer le gène rapporteur transfecté (données non présentées). Ensuite, nous les avons mises en présence de Lutrol® dans du milieu de culture (Figure 36).

Nous avons pu observer que le Lutrol® appliqué dans ces conditions ne permettait pas de stimuler l'expression de la luciférase (Figure 37A), mais qu'en revanche, la préincubation des cellules en présence du Lutrol® avant la transfection des lipoplexes provoquait bien une augmentation de la luciférase dosée, confirmant les résultats précédemment obtenus (Figure 37A).

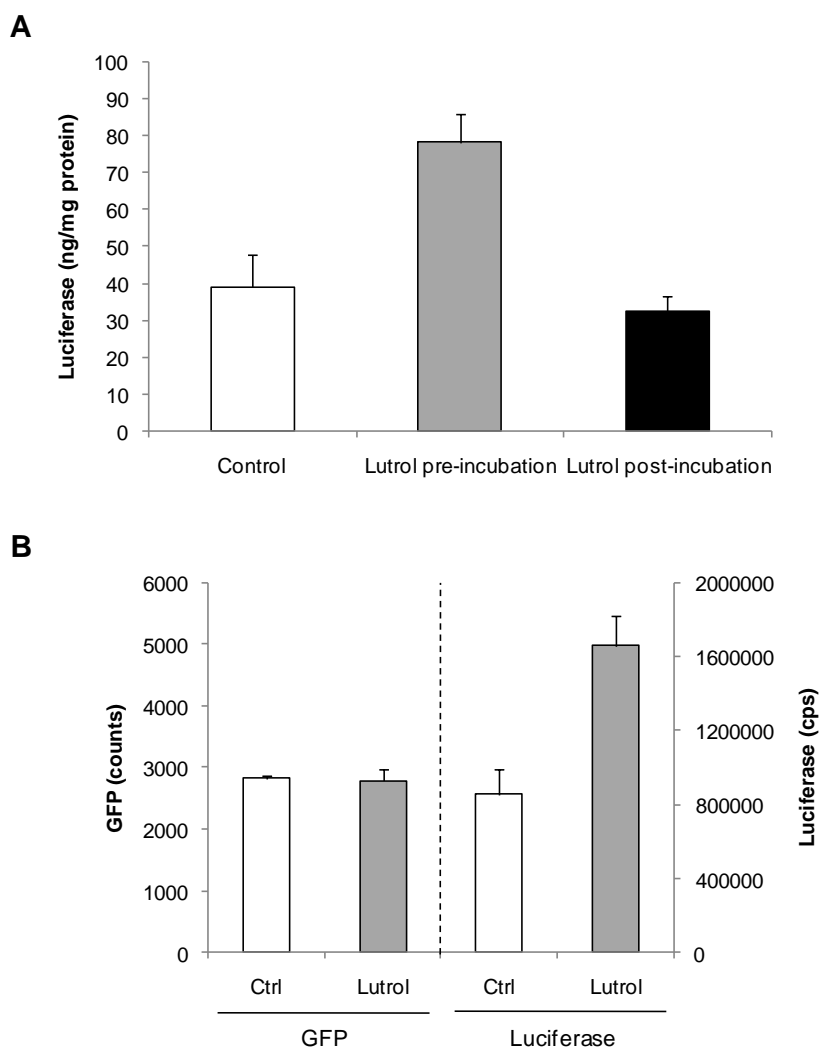


Figure 37 : Effet du traitement avec le Lutrol® sur l'expression d'un transgène. (A) Des cellules C2C12 ont été transfectées avec 1µg de plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). La transfection a été réalisée après le traitement au Lutrol® (barres grises), avant le traitement au Lutrol® (barres noires) ou sans traitement au Lutrol® (barres blanches). (B) Des cellules H1299 exprimant la GFP de façon stable (d2GFP) ont été prétraitées (barres grises) ou non (barres blanches) avec le Lutrol® puis transfectées avec 1µg de plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). Le dosage des gènes rapporteurs de la luciférase et de la GFP ont été réalisés 24h après la transfection.

Forts de ces résultats, nous avons alors transfecté un plasmide encodant la luciférase dans des cellules H1299 exprimant la GFP de façon stable (cellules d2GFP). Le gène de la GFP étant sous le control du même promoteur que le gène de la luciférase transfecté (promoteur CMV), une éventuelle stimulation de l'expression par le Lutrol® devrait être observée à la fois pour la GFP et pour la luciférase. En revanche, une stimulation de la transfection proprement dite ne permettra d'observer qu'une surexpression du gène de la luciférase, le gène de la GFP étant déjà situé au niveau nucléaire.

Nous avons observé que le traitement des cellules à l'aide du Lutrol[®] permet bien d'augmenter la quantité de luciférase dosée, mais ne permet pas d'augmenter la quantité de GFP dosée (Figure 37B). Ces deux gènes rapporteurs étant tous deux sous la dépendance d'un promoteur CMV, et la luciférase étant seule surexprimée, nous pouvons conclure que le Lutrol[®] ne provoque pas d'augmentation de la luciférase dosée en stimulant l'expression du transgène (transcription), mais bien les étapes de la transfection proprement dite. Ces résultats confirment les résultats observés suite à la variation de la période d'incubation du Lutrol[®], en amont ou en aval de la transfection.

2. Le Lutrol[®] stimule la transfection de siRNA in vitro

Les résultats précédemment obtenus nous ont permis d'affirmer que l'augmentation du gène rapporteur dosé provenait d'une stimulation des étapes concernant le transport du transgène, et non pas d'une stimulation de son expression. Une précédente étude avait révélé que l'injection cytosolique de PE6400 facilitait la transfection d'un transgène (Pitard *et al.* 2002). Nous avons alors voulu déterminer si les étapes de trafic intracellulaire et d'import nucléaire pouvaient être impliquées dans notre modèle.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé l'effet du Lutrol[®] sur la transfection de deux types d'acides nucléiques – ADN plasmidique et siRNA – dont les sites d'action sont respectivement nucléaire et cytosolique. La facilitation par le Lutrol[®] des étapes en aval de la transfection, telle que la diffusion cytoplasmique vers le noyau et l'import nucléaire, devra être marquée par une stimulation de la transfection d'ADN mais pas par une stimulation de la transfection de siRNA. En revanche, la facilitation des étapes situées en amont de la transfection, et communes aux voies d'internalisation de ces deux acides nucléiques, devra être révélée à la fois par une plus forte expression du gène rapporteur dosé dans le cas de l'ADN, mais également par une inhibition plus marquée de l'expression du gène ciblé dans le cas du siRNA.

Nous avons observé l'effet du Lutrol[®] sur la transfection de siRNA, en nous plaçant dans des conditions de transfection compatibles avec la révélation d'un éventuel effet stimulant. Nous avons travaillé dans des conditions limitantes, en transfectant une quantité très faible de siRNA, 37,5ng, complexé à un lipide cationique, ICAfectin[®] 442 commercialisé par la société In Cell Art.

La transfection de cellules d2GFP (cellules H1299 exprimant le gène de la GFP de façon stable) dans ces conditions avec un siRNA anti-GFP permet une inhibition de 40% de la GFP dosée par cytométrie de flux. La transfection dans les mêmes conditions de ces cellules préalablement traitées avec le Lutrol[®] permet d'augmenter cette inhibition jusqu'à 60% (Figure 38A). De plus, la transfection d'un siRNA anti lamine A/C dans des cellules C2C12

dans les mêmes conditions (37,5ng siRNA complexés à de l'ICAFectin® 442) permet également une stimulation de l'inhibition en présence de Lutrol®, passant de 30% d'inhibition dans les cellules non traitées à 60% d'inhibition dans les cellules prétraitées (Figure 38B).

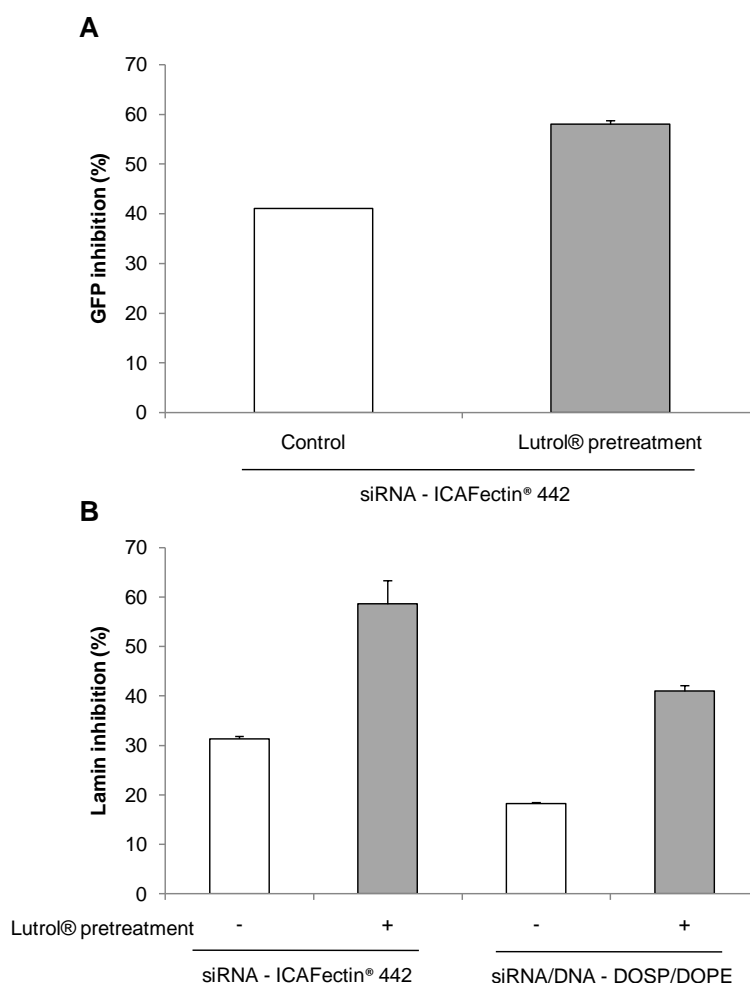


Figure 38 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur l'inhibition de gènes par siRNA. Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol® (barres grises) ou sans avoir été traitées (barres blanches). (A) Analyse FACS de cellules H1299 exprimant la GFP de façon stable (d2GFP cells) 24h après la transfection de 37.5ng de siRNA anti-GFP complexé avec de l'ICAFectin® 442 (B) Dosage par RT-PCR quantitative des transcrits de la lamin A/C 24h après la transfection de cellules H1299 avec 37.5ng de siRNA anti lamin A/C complexés avec de l'ICAFectin® 442 ou avec 500ng de siRNA anti Lamine A/C mélangés à 500ng plasmide complexés avec de la DOSP-DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). Les valeurs ont été normalisées par les niveaux d'hyoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1) dans chaque condition. Les valeurs sont relatives aux cellules transfectées dans les mêmes conditions avec un siRNA contrôle.

Le Lutrol® semble donc stimuler à la fois la transfection de lipoplexes formés d'ADN et de siRNA, suggérant une action au niveau des étapes communes de leur internalisation de l'extérieur de la cellule jusqu'à son cytosol. Afin de renforcer cette hypothèse, nous avons observé l'effet du Lutrol® sur des particules hybrides composées d'un mélange de siRNA et d'ADN. Cinq-cents ng de siRNA et 500ng d'ADN plasmidique ont été complexés à de la DOSP-DOPE au rapport de charge 4 (+/-), mimant ainsi les particules obtenues avec de l'ADN seul. Ces particules comportent en effet la même quantité d'acides nucléiques finale et la même quantité de DOSP-DOPE que les particules utilisées précédemment pour la

transfection d'ADN. De façon intéressante, le prétraitement des cellules transfectées avec le Lutrol[®] permet là encore de stimuler l'inhibition du gène ciblé, la lamine A/C ; l'expression de la lamine A/C est inhibée de 20% dans les cellules non traitées et de 40% dans les cellules traitées (Figure 38B).

Le Lutrol[®] a donc un effet de facilitation des étapes communes de la transfection des ces deux types d'acides nucléiques, excluant les étapes propres à la transfection d'un plasmide que sont l'import nucléaire ou l'expression.

3. Le transfert de gène médié par le Lutrol[®] est indépendant du promoteur utilisé

Les travaux menés par l'équipe de Kabanov ont montré que le P85 permettait de transfecter efficacement le tissu musculaire avec un plasmide sous la dépendance d'un promoteur CMV. En revanche, il a été observé que la transfection d'un plasmide sous la dépendance d'un autre promoteur, SV40, était inefficace. Cette dépendance au promoteur de l'efficacité de transfection du P85 était également associée à une dépendance à la souche de la souris injectée (Yang *et al.* 2005). Ces études ont démontré que ce polymère n'était pas inerte et permettait d'assurer une transfection efficace *via* l'activation de certaines voies de signalisation, notamment inflammatoires, et que l'efficacité du transfert dépendait de la présence de motifs de fixation à des facteurs de transcription spécifiques, présents sur CMV et absent sur SV40 tel que NFκB (Tableau 1) (Yang *et al.* 2005; Batrakova and Kabanov 2008; Sriadibhatla *et al.* 2006).

<i>Transcription factor binding sites</i>	<i>CMV Promoter</i>	<i>SV40 Promoter</i>
Octamer-binding factor 1	+	+
Activation protein 1 (AP1)	+	+
Zinc finger-containing protein SP1	+	+
NF-E2 p45	-	+
GC box elements	-	+
CRE-binding protein 1/c-jun heterodimer	+	-
cAMP-responsive element binding protein	+	-
NFκB	+	-
c-Rel	+	-
Avian C-type LTR TATA box	+	-
Cellular and viral TATA box elements	+	-
E4BP4, bZIP domain, transcription repressor	+	-
Activating transcription factor	+	-

Tableau 3 : Sites de fixation aux facteurs de transcriptions présents sur les promoteurs CMV et SV40. Les promoteurs CMV et SV40 comprennent des sites de fixation à des facteurs de transcription communs (AP1, SP1...) ou différents (NFκB, CRE-BP...) (d'après base de donnée Promega, Yang *et al.* 2005).

Les résultats obtenus jusqu'alors dans ce travail de thèse démontrent cependant que les polymères apparentés au Lutrol[®] ne permettent pas de stimuler l'expression d'un transgène, et sont capables de faciliter la lipofection de siRNA *in vitro*. Nous avons voulu déterminer si la stimulation de la transfection des acides nucléiques observée dans notre modèle d'étude

in vitro dépendait du promoteur situé en amont du transgène transfecté, comme cela a déjà été décrit pour des polymères plus hydrophobes.

a. Promoteur indépendance du transfert de gène dans le modèle *in vitro*

Nous avons donc comparé l'effet du traitement des cellules avec le Lutrol[®] sur la transfection de trois plasmides encodant la luciférase sous la dépendance des promoteurs CMV, SV40 et NFκB. Nous avons observé que les cellules prétraitées avec le Lutrol[®] présentaient une meilleure expression du gène rapporteur dosé que les cellules non traitées, et ce indépendamment du promoteur utilisé, CMV, SV40 ou NFκB (Figure 39A). Ces résultats ont pu être reproduits dans une autre lignée cellulaire, cos7 (Figure 39B).

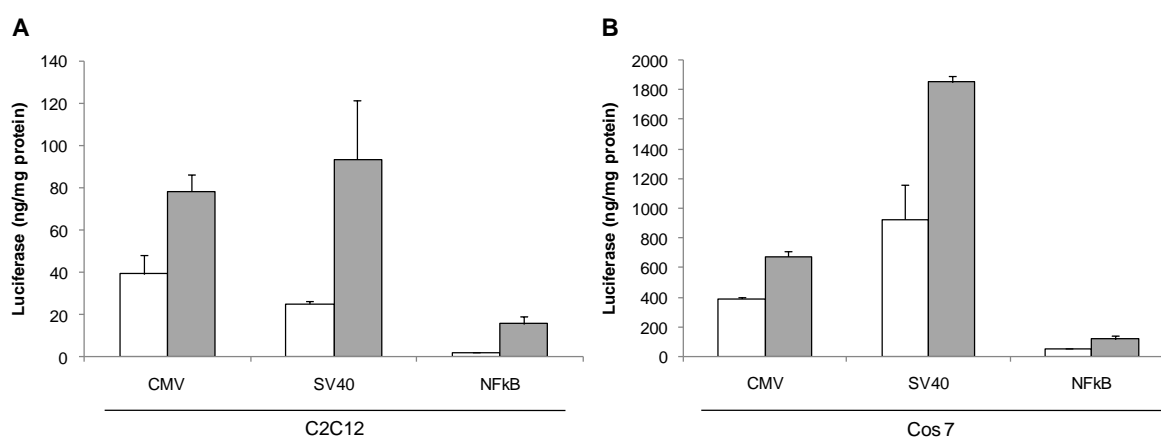


Figure 39 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection *in vitro* en fonction du promoteur du plasmide. Des cellules C2C12 (A) ou cos 7 (B) ont été transfectées avec 1µg plasmide complexé à de la DOSP/DOPE au rapport de charge 4 (+/-). Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol[®] (barres grises) ou sans avoir été traitées (barres blanches). Les cellules ont été traitées pendant 2h avec du Lutrol[®] 3% dans du milieu de culture avant la transfection de deux plasmides encodant la luciférase sous la dépendance des promoteurs CMV, SV40 ou NFκB. La luciférase a été dosée 24h après la transfection.

Le Lutrol[®] semble donc faciliter l'expression du gène rapporteur de la luciférase transfecté de façon indépendante du promoteur situé en amont du transgène, contrairement aux polymères plus hydrophobes.

b. Stimulation de voies de signalisation dans le modèle d'étude *in vitro*

L'indépendance au promoteur du Lutrol[®] suggère que ce dernier n'active pas de voies de signalisation inflammatoires faisant intervenir NFκB, contrairement aux polymères plus hydrophobes. De plus, il a été montré que ces polymères hydrophobes activaient également des cascades de signalisation pro-apoptotiques (BAX, P53) dans des cellules MDR (Minko *et al.* 2005).

Nous avons alors quantifié les transcrits des protéines NFκB et P53 dans les cellules traitées avec le Lutrol[®]. Pour ce faire, les cellules ont été prétraitées avec le Lutrol[®], puis

transfectées à l'aide de lipoplexes comme décrit précédemment, et les transcrits d'NFκB et de P53 ont été quantifiés par RT-PCR quantitative.

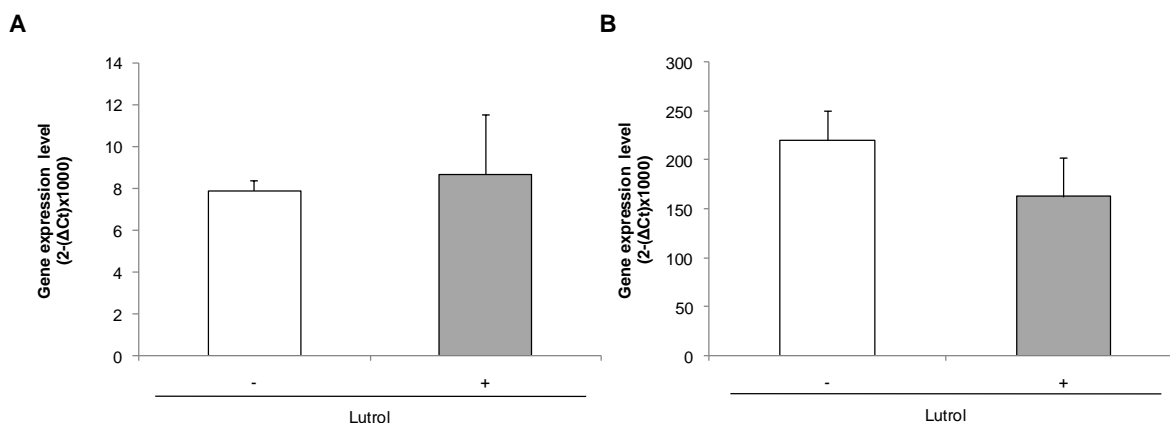


Figure 40 : Suivi des transcrits de NFκB et de P53 dans les cellules traitées avec le Lutrol® *in vitro*. Dosage par RT-PCR quantitative des transcrits de NFκB (A) et P53 (B) 1h après la transfection de cellules C2C12 avec 1µg de plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). La transfection a été réalisée dans des cellules prétraitées avec le Lutrol® (barres grises) ou non traitées avec Lutrol® (barres blanches). Les valeurs ont été normalisées par les niveaux d'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) dans chaque condition.

Comme attendu, aucune augmentation des transcrits de ces deux gènes n'a pu être décelée (Figure 40), confirmant que le Lutrol® n'active pas ces voies de signalisation contrairement aux polymères présentant une HLB plus faible. Ce résultat explique la promoteur-indépendance du Lutrol® observée dans notre modèle.

Les polymères hydrophobes facilitent l'import nucléaire du transgène suivant le mécanisme décrit par Mesika *et al.* qui parvenaient à faciliter la transfection de plasmides comprenant des sites de fixation à NFκB en traitant les cellules transfectées avec du TNFα (Mesika *et al.* 2001; Mesika *et al.* 2005). Le Lutrol® semble au contraire inerte, étant capable de faciliter la transfection sans activer de cascades signalétiques.

Forts de ce résultat, nous avons alors voulu comparer *in vivo* le comportement vis-à-vis du promoteur situé en amont du plasmide transfecté (i) de polymères présentant des HLB élevées dont le Lutrol® et (ii) de polymères présentant des HLB plus faibles.

c. Promoteur indépendance du Lutrol® dans le transfert de gène *in vivo*

Les copolymères à blocs amphiphiles représentent une famille de molécules aux structures variables. L'agencement de motifs d'oxyde d'éthylène (A-) et de motifs d'oxyde de propylène (-B-) aboutit à des molécules très différentes de par leur taille (de 200 à 20000 Da) et de par leur balance hydrophile / hydrophobe (de 1 à plus de 24). Ces variations structurelles leur confèrent des propriétés physico-chimiques très hétérogènes

(concentration micellaire critique et température micellaire critique), aboutissant à des propriétés biologiques diverses. Il a notamment été démontré que la balance hydrophile / hydrophobe de ces molécules déterminait leur capacité d'interaction aux bicouches lipidiques (Batrakova *et al.* 2003b), mais était également étroitement corrélée à leur niveau de toxicité (Johnston and Miller 1985).

Nous avons comparé l'efficacité de transfection de trois polymères structurellement éloignés, le Lutrol® et le PE6400. Ces deux polymères varient fortement en termes de HLB, le PE6400 présentant une HLB relativement faible, et le Lutrol® une HLB très élevée. Nous avons comparé leurs capacités respectives à transférer deux plasmides encodant la luciférase sous la dépendance de deux promoteurs différents, CMV et SV40.

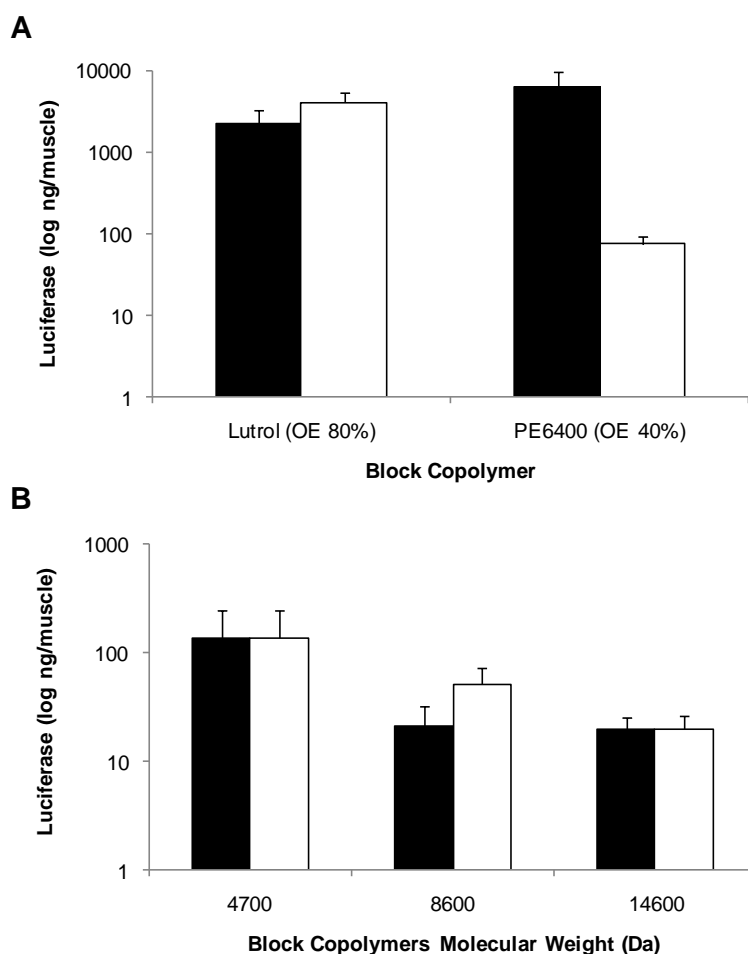


Figure 41 : Influence du promoteur sur l'efficacité de transfection des copolymères à blocs amphiphiles. Efficacité de transfection après l'injection musculaire d'un plasmide encodant la luciférase sous la dépendance d'un promoteur CMV (barres noires) ou SV40 (barres blanches). 10µg de plasmide formulés aux copolymères à blocs ont été injectés dans les muscles tibiaux antérieurs de souris et l'expression de la luciférase a été dosée dans les broyats musculaire 3 jours après l'injection. (A) Polymères présentant des HLB différentes : Lutrol® (80% d'OE) et PE6400 (40% d'OE). (B) Polymères présentant des masses moléculaires différentes pour une HLB identique (80% PEO) : F38 (3600 Da), Lutrol® (8600 Da) et F108 (14600 Da).

La Figure 41A montre que ces deux polymères permettent de transférer un plasmide encodant la luciférase sous la dépendance d'un promoteur CMV avec des niveaux

d'efficacité comparables. Cependant, le PE6400 présente une efficacité de transfection respectivement faible pour un plasmide encodant la luciférase sous la dépendance d'un promoteur SV40, confirmant les données obtenues pour le P85 (Yang *et al.* 2005). En revanche, le Lutrol[®] qui présente une balance hydrophile / hydrophobe nettement plus élevée, transfecte de manière similaire ces deux plasmides indépendamment de leur promoteur. Cette observation souligne l'importance de la teneur en motifs d'oxyde d'éthylène et donc de la HLB dans le mécanisme à l'origine des capacités de vectorisation de ces molécules. La HLB – régissant les aptitudes d'interaction des polymères avec les membranes biologiques et par la même leur niveau de toxicité – semble également directement déterminer le mécanisme sous jacent aux capacités transfectantes de ces molécules.

Nous avons alors comparé l'influence du poids moléculaire du polymère utilisé sur la transfection de plasmides comportant des promoteurs CMV ou SV40 en utilisant des polymères présentant une balance hydrophile hydrophobe identique au Lutrol[®]. Le Lutrol[®] ayant un poids moléculaire de 8600 Da, nous avons utilisé un polymère plus grand, le F108 (14600 Da), et un plus petit, le F38 (4700 Da) (Figure 41B).

Nous avons pu observer que ces deux polymères présentent un profil de transfection identique au Lutrol[®], leur efficacité n'étant pas conditionnée par la présence du promoteur CMV sur le plasmide, confirmant les résultats précédemment obtenus *in vitro*. Contrairement aux polymères présentant une balance hydrophile / hydrophobe plus faible, les polymères présentant une HLB élevée, similaire à celle du Lutrol[®], agissent par un mécanisme d'action indépendant de l'activation de voies de signalisation.

4. Effet du Lutrol® sur l'internalisation cellulaire du transgène

Nous avons précédemment démontré que le Lutrol® ne stimulait pas l'expression du transgène et que son incapacité à activer des cascades de signalisation inflammatoires ne facilitait pas les étapes tardives de la transfection comme l'import nucléaire. Nous avons donc voulu caractériser son effet au niveau des étapes précoces de la transfection dans notre modèle d'étude *in vitro*.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'aspect qualitatif de la stimulation de la transfection observée, et nous avons voulu déterminer si la préincubation des cellules avec le Lutrol® aboutissait à (i) un plus grand nombre de cellules transfectées ou (ii) à une plus grande internalisation du transgène dans les cellules transfectées.

1. Influence sur le nombre de cellules transfectées

Nous avons observé l'effet du prétraitement avec le Lutrol® sur le nombre de cellules transfectées avec un plasmide encodant le gène rapporteur de la GFP en comptant par cytométrie de flux les cellules exprimant la GFP.

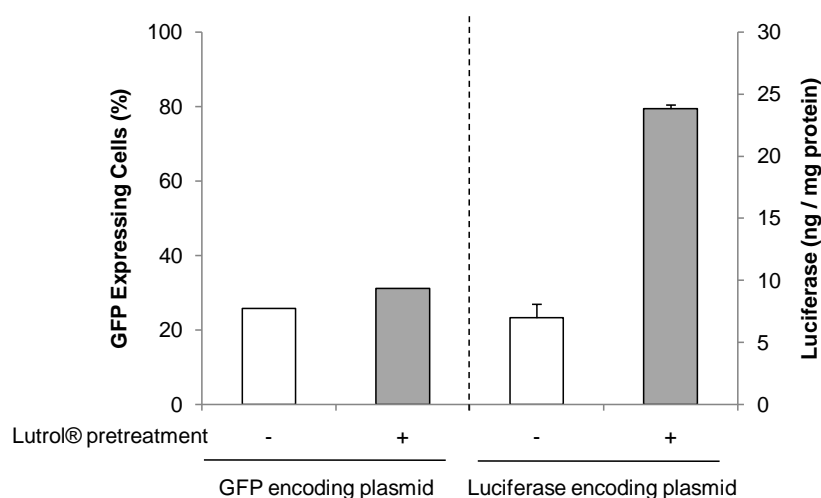


Figure 42 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur le pourcentage de cellules transfectées évalué par cytométrie de flux. Des cellules C2C12 ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol® (barre grise) ou sans avoir été traitées (barre blanche). Un µg de plasmide encodant la GFP ou la luciférase ont été complexé à de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). 24h après la transfection, les cellules exprimant la GFP ont été comptées par cytométrie de flux et l'expression du gène rapporteur de la luciférase a été dosée.

La Figure 42 montre que le prétraitement avec le Lutrol® ne permet pas d'augmenter significativement le nombre de cellules transfectées, qui passe de 26 à 30%. En revanche, la transfection d'un plasmide encodant la luciférase au cours de la même expérience s'est révélée être très fortement stimulée par le prétraitement avec le Lutrol®. Le Lutrol® semble faciliter l'internalisation des molécules d'ADN au sein des cellules transfectées, sans toutefois permettre une augmentation du nombre de cellules transfectées.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons observé par microscopie optique la transfection d'un plasmide encodant la β -galactosidase (β -gal) sur des cellules prétraitées ou non avec le Lutrol[®]. La présence de β -gal dans les cellules transfectées est révélée par une coloration bleue après ajout de son substrat. La Figure 43 présente deux champs représentatifs des cellules transfectées avec ou sans prétraitement au Lutrol[®]. Il apparaît nettement que les cellules ayant été en contact avec le Lutrol[®] présentent une coloration bleue plus intense que les cellules contrôle, mais le nombre de cellules exprimant la β -gal reste constant. Or, nous avons précédemment démontré que le Lutrol[®] ne permet pas de stimuler l'expression ou le trafic intracellulaire d'un transgène ; ce résultat suppose donc qu'un plus grand nombre de plasmides a été internalisé par les cellules transfectées.

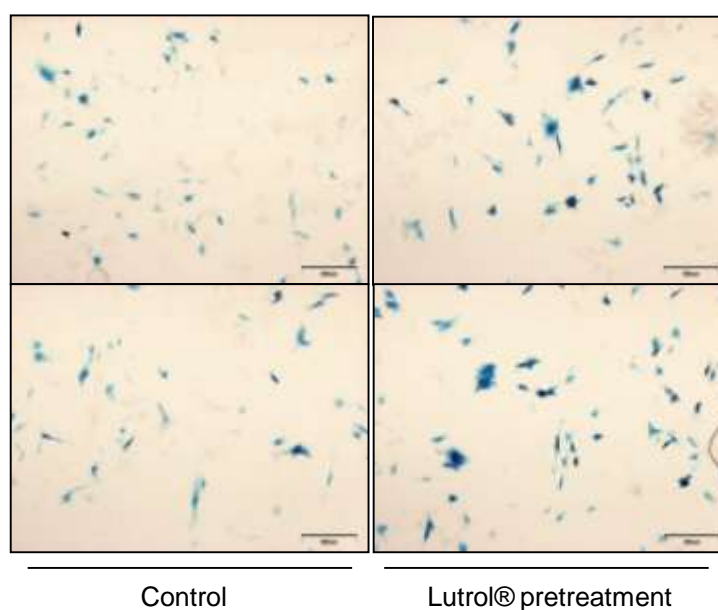


Figure 43 : Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur le pourcentage de cellules transfectées évalué par microscopie. Champs représentatif de cellules C2C12 transfectées avec un plasmide encodant la β -galactosidase. Un μ g de plasmide encodant la β -galactosidase a été complexé avec de la DOSP-DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). L'activité de la β -galactosidase a été révélée 24 h après la transfection. Les barres d'échelle représentent 200 μ m.

2. Influence sur la quantité d'ADN internalisée

Nous avons alors entrepris de quantifier la quantité d'acides nucléiques internalisée par les cellules ayant ou non subi un prétraitement au Lutrol[®]. Pour ce faire, nous avons utilisé une nouvelle technique de marquage de l'ADN à l'aide de nanoparticules aminées γ Fe₂O₃@SiO₂ (Nps) avec un ratio (n Np) / (n plasmide) = 5. Ces Nps de 15nm de diamètre sont denses aux électrons et permettent de suivre l'internalisation de l'ADN par microscopie électronique. Cette technique a été mise au point par l'équipe d'Olivier Lambert et rapportée par Le Bihan *et al.* (Le Bihan *et al.*, soumis).

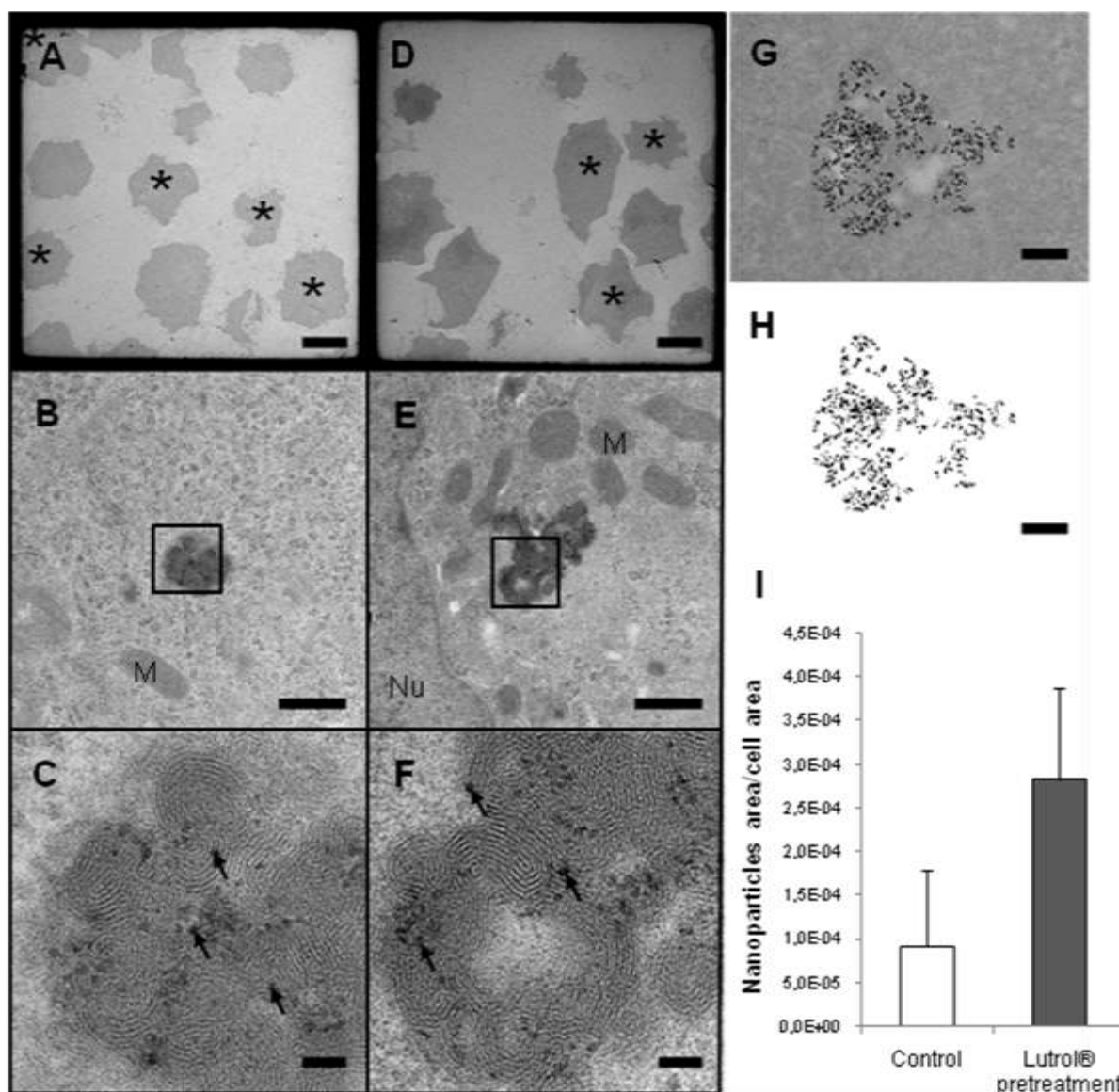


Figure 44 : Visualisation par TEM de l'internalisation cellulaire de complexes DOSP-DOPE / plasmide / Nps (A-C) et après traitement avec le Lutrol® (D-F) dans des cellules H1299 observées 2h après la transfection. Les cellules ont été transfectées avec un plasmide complexé avec des Nps (1/5) et avec de la DOSP-DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). Des coupes très fines ont été observées à faible (A, D), moyen (B, E) et fort (C, F) grossissement et ont révélé la présence de lipoplexes marqués contenant des Nps denses aux électrons (flèches noires). Les Nps ont été recherchées dans les coupes de cellules (astérisques dans A et D). Les lipoplexes marqués ont été observés dans le cytoplasme et forment des assemblages multilamellaires. (C, F sont des agrandissements des zones marquées par les rectangles noirs dans B and E). Les mesures de la quantité de Np par section cellulaire ont été réalisées et analysées en s'affranchissant du bruit de fond (G, H). Les résultats sont exprimés suivant le ratio de la surface de Np par surface de cellule. Ce ratio augmente dans les cellules traitées au Lutrol®. (I). Les barres d'échelles représentent 10 µm (A, D) 500 nm (B, E) and 50 nm (C,F). Nu Nucleus, M Mitochondria.

Des cellules traitées ou non avec le Lutrol® ont donc été transfectées avec des lipoplexes marqués aux Nps, et 2 heures après le début de la transfection, les cellules ont été centrifugées et fixées. De fines sections de 65nm d'épaisseur ont alors pu être observées par microscopie électronique à transmission.

Dans un premier temps, l'aspect des lipoplexes internalisés a été observé dans les cellules traitées au Lutrol® et dans les cellules non traitées, et aucune différence morphologique n'a pu être mise en évidence, suggérant que le Lutrol® ne modifie pas l'aspect des lipoplexes (Figure 44C, F). Nous avons de plus voulu nous assurer que la complexation des acides nucléiques aux Nps n'avait pas d'incidence sur la transfection médiée par les lipides cationiques d'une part, et sur l'effet du prétraitement des cellules avec le Lutrol® sur la transfection d'autre part. La Figure 45 montre que la présence de Nps n'a pas d'incidence majeure sur la transfection (barres blanches), et n'a aucune incidence sur la stimulation par le Lutrol® de cette transfection (barres grises).

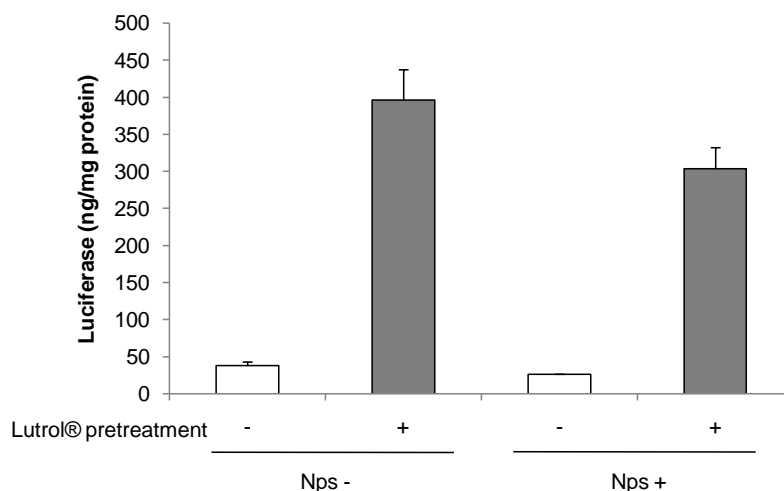


Figure 45 : Effet de la complexation des plasmides aux Nps sur l'efficacité de la transfection et sur le prétraitement avec le Lutrol®. Les cellules ont été transfectées avec 1µg de plasmide gwizz encodant la luciférase complexé ou non avec des Nps (1/5) et à de la DOSP/DOPE au rapport de charge 4 (+/-). Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol® (barre grise) ou sans avoir été traitées (barre blanche). Les cellules ont été traitées pendant 2h avant la transfection avec du Lutrol® 3% dilué dans du milieu de culture. La luciférase a été dosée 24h après la transfection.

Afin de quantifier l'internalisation des lipoplexes dans ces deux conditions, la quantité de Np par cellule a été estimée en mesurant la surface comprenant des Nps et la surface comprenant des cellules. L'analyse quantitative de ces données révèle une augmentation de l'internalisation des lipoplexes dans les cellules prétraitées au Lutrol® (Figure 44E, I). Ce résultat suggère que le Lutrol® provoque une plus forte internalisation des particules au travers de la membrane plasmique.

Enfin, nous avons mesuré la surface de cellules contenant des Nps, rapportée à la surface cellulaire totale. Nous avons pu mettre en évidence que le nombre de cellules contenant des Nps équivaut à 30% de la surface cellulaire totale, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment en cytométrie de flux et en microscopie pour les cellules transfectées avec les plasmides β-gal et GFP respectivement qui indiquent que 30% des cellules expriment le transgène (Figure 42, Figure 43).

5. Nature du mécanisme d'action du Lutrol[®] : actif ou passif ?

Les résultats présentés jusqu'à présent nous ont permis d'identifier les étapes de la transfection influencées par le Lutrol[®], que l'on a pu situer au niveau des phases initiales de la transfection.

Nous nous sommes alors intéressés à la nature du mécanisme d'action du Lutrol[®], et plus particulièrement sur sa capacité à agir de manière active ou passive. Les mécanismes actifs présentent deux caractéristiques majeures : (i) ils sont dépendants de la température car ils nécessitent de l'énergie, et sont donc tributaires de l'ATP, supporté par le métabolisme de la cellule. (ii) Ils sont saturables, car ils dépendent des ressources de la cellule qui sont elles même limitées. Les lipides cationiques permettent l'internalisation d'acides nucléiques par endocytose, mécanisme actif ATP dépendant et saturable. Nous avons donc observé dans un premier temps l'effet d'une baisse de la température d'incubation des cellules – de 37°C à 4°C – sur la transfection médiée par les lipides cationiques d'une part, et sur l'effet de stimulation observé dans les cellules traitées avec le Lutrol[®] d'autre part.

1. Transfection à 4°C

Les cellules ont d'abord été prétraitées au Lutrol[®], puis transfectées avec des complexes lipides cationiques-ADN pendant une période de deux heures à 4°C (Figure 46).

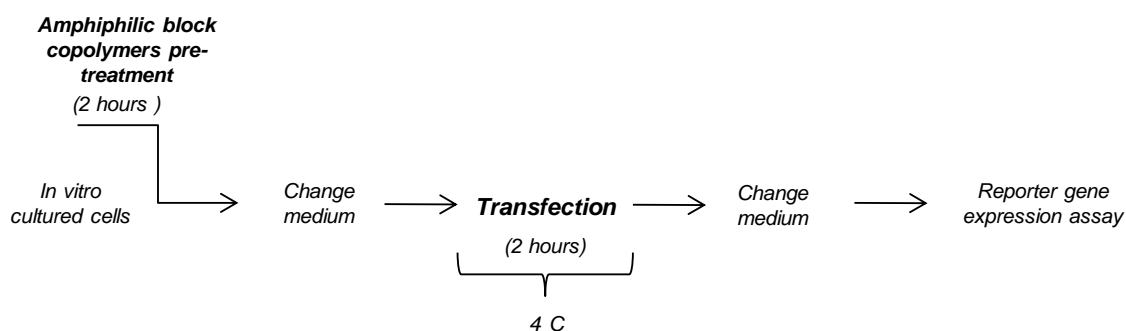


Figure 46 : Protocole de traitement avec les copolymères à blocs des cellules transfectées à 4°C. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits pendant 24h jusqu'à atteindre 70 à 80% de confluence. Les cellules sont incubées pendant 2h avec du Lutrol[®] 3% dans le milieu de culture, puis le milieu est changé. Les cellules sont alors transfectées pendant 2h à 4°C avec 1µg de plasmide complexé à un lipide cationique, puis le milieu est changé. Les cellules sont incubées pendant 22h dans du milieu de culture. Les cellules sont alors lysées, et le gène rapporteur dosé

Comme attendu, on a pu observer une inhibition de la transfection médiée par les lipides cationiques à 4°C dans des cellules non traitées. En revanche, l'intensité de la luciférase dosée n'a pas été altérée par la température de transfection dans les cellules prétraitées avec le Lutrol[®] (Figure 47). Ce résultat montre que le Lutrol[®] facilite la transfection médiée par

les lipides cationiques indépendamment de la température, et donc indépendamment de l'ATP, ce qui suggère un mécanisme passif.

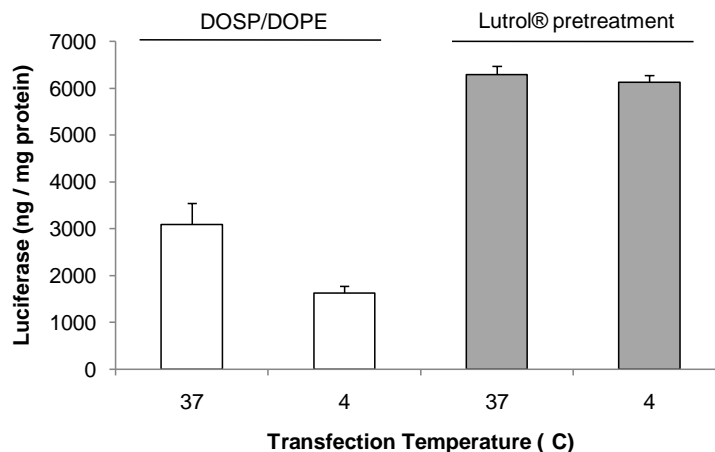


Figure 47 Effet des copolymères à blocs amphiphiles sur la transfection à 4°C de cellules en culture. Les cellules ont été transfectées avec 1µg plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge 4 (+/-). Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol® (barre grise) ou sans avoir été traitées (barre blanche). Les cellules ont été incubées à 2h à 37°C ou 4°C juste après l'ajout des lipoplexes DOSP-DOPE-ADN.

2. Effet non saturable

Nous avons observé l'efficacité de transfection de deux types de particules formées par deux stratégies de formulation différentes (Figure 48A):

(i) Un premier type de particules a été formé à partir de doses croissantes de plasmides encodant la luciférase (pCMV-Luc), et formulées avec un lipide cationique afin de conserver un rapport de charge identique de 4 (+/-). Cette première stratégie de formulation permet de faire varier le nombre de particules contenant le transgène.

(ii) Un second type de particules a été formé, contenant également des doses croissantes de plasmides encodant la luciférase (pCMV-Luc), mais mélangées à des doses décroissantes de plasmide non codant (pQE30) afin de conserver une quantité d'ADN total stable. Ces particules contiennent donc une quantité de lipide cationique identique dans chaque condition, permettant là encore de conserver un rapport de charges de 4 (+/-). Ce second type de formulation nous permet d'avoir un nombre de particule constant dans chaque condition, avec une dose croissante de plasmide encodant la luciférase par particule. Le plasmide pQE30 est un plasmide dépourvu de toute séquence codante et ne dispose pas non plus de séquence régulatrice eucaryote ; il n'a au sein de ces particules qu'un rôle d'ADN « carrier » (Figure 48A).

La quantité maximale d'ADN transfectée a été fixée à 1µg/puits, cette dose présentant une efficacité de transfection maximale pour une mortalité cellulaire négligeable. Au-delà de cette quantité, et dans ces conditions de transfection – DOSP-DOPE, rapport 4 (+/-) – le

nombre de cellules vivantes commence à décliner, ce qui fausse la quantité de luciférase dosée.

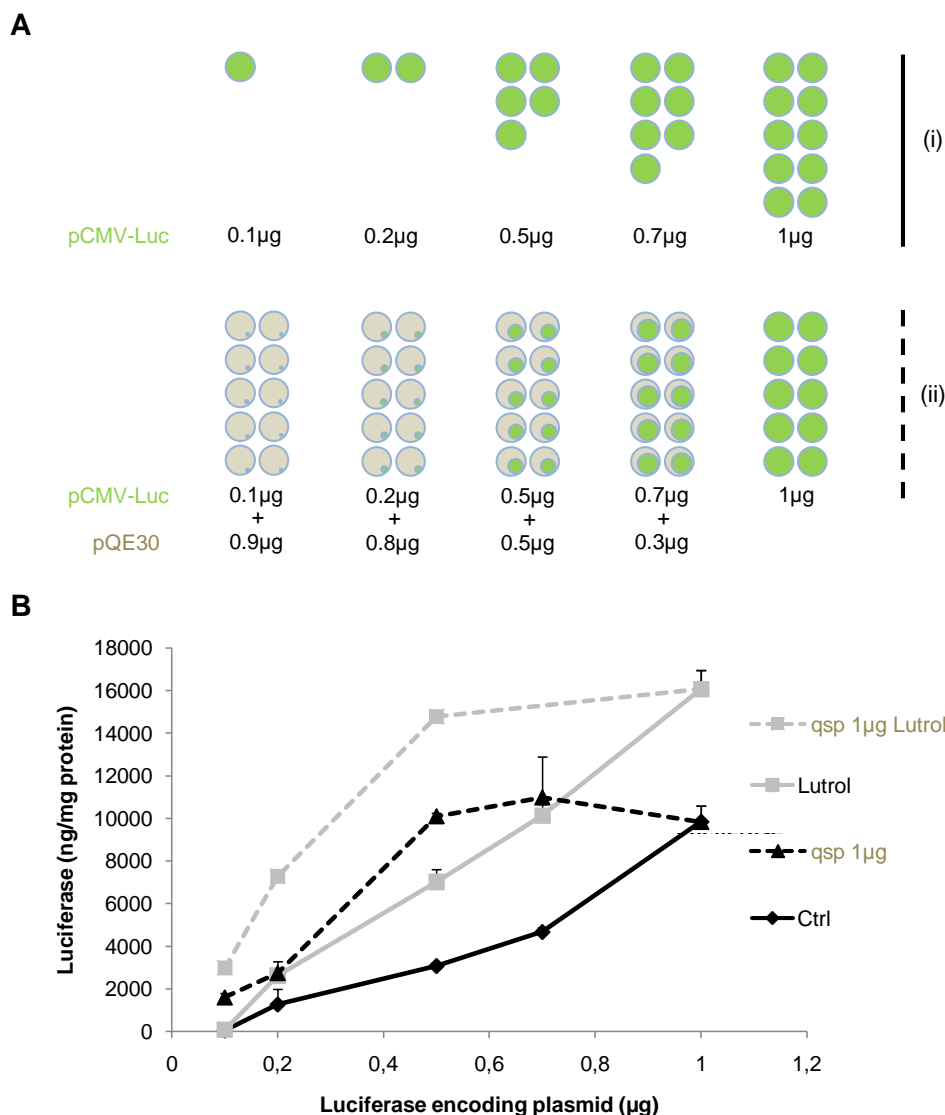


Figure 48 : Effet non saturable du Lutrol® sur l'internalisation des lipoplexes. (A) Représentation schématique des deux protocoles de transfection utilisés. Deux types de particules ont été formés. (i) Un premier type de particule comprenant une quantité d'ADN codant (pCMV-Luc, vert) croissante. (ii) Un second type de particules comprenant une quantité d'ADN codant (pCMV-Luc, vert) croissante et une quantité décroissante de plasmides « carrier » (pQE30, beige) aboutissant à des particules présentant une quantité d'ADN totale fixe. (B) Les cellules ont été transfectées avec de l'ADN plasmidique complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge 4 (+/-). Les cellules ont été transfectées après avoir été traitées avec le Lutrol® (courbes grises) ou sans avoir été traitées (courbes noires). Des quantités croissantes de plasmide encodant la luciférase (courbes continues) et des quantités croissantes de plasmides encodant la luciférase mélangées à des quantités décroissantes de plasmides pQE30 non codant permettant d'obtenir une quantité finale d'ADN d'1µg/puits ont été transfectées (courbes discontinues). Le gène rapporteur de la luciférase a été dosé 24h après la transfection.

Nous avons d'abord évalué l'effet de l'augmentation de la quantité de plasmide sur la transfection et nous avons observé que cette augmentation du nombre de particules transfectées était corrélée à une augmentation du gène rapporteur dosé, et donc de l'efficacité de transfection (Figure 48B, courbe continue noire).

L'augmentation de la quantité de plasmide codant au sein de particules présentant une quantité fixe d'ADN (particules (ii)) permet d'atteindre le maximum d'expression observé pour des quantités d'ADN codant deux fois plus faibles (Figure 48, courbe noire discontinue). Des particules comportant une quantité d'ADN totale « carrier » identique (1 µg) pour une quantité d'ADN codant variant du simple au double (0,5 et 1 µg) présentent une efficacité de transfection similaire. L'augmentation de la proportion d'ADN codant au sein de la particule ne permet pas d'augmenter l'efficacité de la transfection au-delà de ce seuil. Ce résultat montre que les lipoplexes, internalisés par endocytose, ont des capacités transfectantes limitées par les capacités d'endocytose de la cellule, et que le maximum de leur efficacité de transfection est atteint lorsqu'ils saturent l'ensemble des voies d'endocytoses dont dispose la cellule.

Or, de façon très intéressante, le traitement des cellules avec le Lutrol[®] permet de stimuler la transfection des particules formées suivant la première stratégie de formulation (i) de manière équivalente (Figure 48, courbe grise), mais permet également de stimuler la transfection des particules formées suivant la seconde stratégie de formulation (ii). Le Lutrol[®] facilite la transfection de particules saturant les capacités endocytaires de la cellule (Figure 48, courbe grise discontinue). Cette observation démontre que le Lutrol[®] potentialise la transfection des acides nucléiques indépendamment des capacités endocytaires de la cellule, *via* un mécanisme non saturable.

Dans ce modèle, les copolymères à blocs amphiphiles tels que le Lutrol[®] semblent donc stimuler la transfection *in vitro* par un mécanisme passif (température indépendant) non saturable (indépendant du nombre de particules transfectées) contrairement aux lipides cationiques qui dépendent étroitement des capacités endocytaires de la cellule. Il semble que la présence de Lutrol[®] permette de faciliter l'interaction des complexes avec les membranes plasmiques, permettant *in vitro* d'internaliser un plus grand nombre de complexes au sein de chaque endosome, corroborant les données obtenues en microscopie électronique (Figure 44).

6. Le Lutrol[®] est un facilitateur de l'interaction avec les membranes

1. Le Lutrol[®] facilite l'interaction des lipoplexes avec les membranes

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail tend à montrer que le Lutrol[®] faciliterait l'interaction des lipoplexes avec les membranes des cellules. C'est cette interaction optimisée qui provoquerait l'endocytose d'une plus grande quantité d'acides nucléiques dans chaque vésicule. Nous avons alors voulu démontrer que le Lutrol[®] permettait une meilleure interaction aux membranes des complexes transfectés dans notre modèle.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous sommes affranchis de la capacité des lipoplexes à interagir avec les membranes en utilisant des cellules déplétées en héparane sulfate. En effet, les glycosaminoglycanes (GAG) membranaires et les héparane sulfates en particulier sont des molécules anioniques présentes à la surface des membranes cellulaires. Ces molécules servent de récepteurs non spécifiques aux lipoplexes, *via* des interactions électrostatiques (Labat-Moleur *et al.* 1996; Mislick and Baldeschwieler 1996; Kopatz *et al.* 2004). L'absence de ces molécules aboutit à une inhibition totale de l'efficacité de transfection de l'ensemble des vecteurs cationiques, de nature lipidique ou polymérique.

Nous avons dans un premier temps évalué l'efficacité de la transfection des lipoplexes ADN/DOSP-DOPE dans des cellules déplétées en héparane sulfate (CHO HS⁻). Comme attendu, l'absence d'HS membranaires provoque une inhibition quasi-totale (97,5%) de la transfection (Figure 49, barres blanches).

Dans cette expérience, les lipoplexes ont perdu leur capacité à être internalisés par les cellules, étant incapables d'interagir avec les membranes plasmiques. En théorie, si notre hypothèse faisant du Lutrol[®] un agoniste de l'interaction des complexes transfectés est valide, la formulation de ces lipoplexes avec du Lutrol[®] devrait restaurer leur capacité transfectante.

Nous avons formulé des lipoplexes ADN/DOSP-DOPE avec le Lutrol[®], en mélangeant une solution de lipoplexes avec une solution de Lutrol[®] de façon équimoléculaire pour obtenir des particules contenant 1 µg d'ADN final / puits, complexé à de la DOSP-DOPE au rapport de charge 4 (+/-) et au Lutrol[®] 3%. Les particules ADN / Lipides / polymères ainsi formées ont alors été transfectées sur des cellules CHO HS⁻. La Figure 49 montre clairement que la présence de Lutrol[®] au sein des lipoplexes transfectés dans les cellules déplétées en héparane sulfate augmente considérablement leur capacité transfectante, permettant une expression du gène rapporteur stimulé d'un facteur 12 (Figure 49, barre grise). En d'autres

termes, le Lutrol[®] a permis de restaurer 30% de l'expression du gène rapporteur observée dans des cellules CHO non déplétées.

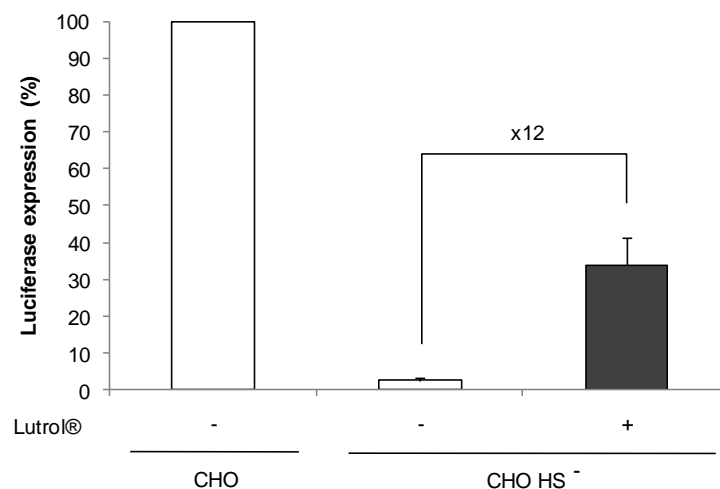


Figure 49 : Transfection de cellules déplétées en Héparane-sulfate avec des lipoplexes DOSP/DOPE-ADN formulés avec du Lutrol[®]. Des cellules CHO déplétées en héparane sulfate (CHO HS⁻) ont été transfectées avec 1 µg de plasmide encodant la luciférase complexé avec de la DOSP/DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). Les lipoplexes ont été formulés avec du Lutrol[®] 3% (barres grises) ou en absence de Lutrol[®] (barres blanches). 24h après la transfection, la luciférase a été dosée et les résultats exprimés en pourcentage d'expression par rapport à des cellules CHO transfectées sans Lutrol[®].

Cette expérience démontre le rôle du Lutrol[®] en tant que facilitateur de l'interaction des particules comprenant les acides nucléiques aux membranes des cellules. En effet, l'utilisation de cellules HS⁻ permet d'abolir la capacité d'interaction des lipoplexes avec les membranes, ce qui se traduit par une altération drastique de la transfection. L'ajout de Lutrol[®] à la surface de ces particules permet de restaurer la capacité transfectante des lipoplexes en restaurant leur capacité à interagir avec les cellules.

Ces résultats démontrent également que les polymères permettent aux particules d'interagir avec les membranes et d'être internalisées, suggérant alors que le lipide joue principalement un rôle de facilitateur de l'échappement endosomal dans ces conditions.

Il semble donc que la principale limite à l'utilisation du Lutrol[®] *in vitro* réside dans son incapacité à permettre la sortie des endosomes du transgène. Ce résultat suggère surtout que la voie d'internalisation empruntée *in vivo* serait indépendante de l'endocytose.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'efficacité de transfection d'ADN non complexé directement formulé au Lutrol[®] sur des cellules préalablement chargées en lipides cationiques.

2. L'échappement endosomal constitue la barrière limitante à l'utilisation du Lutrol® *in vitro*.

Les résultats précédemment obtenus suggèrent donc que le Lutrol® permet de faciliter l'interaction des lipoplexes avec les membranes dans notre modèle d'étude *in vitro* de prétraitement des cellules avec le Lutrol® (Figure 31), ce qui aboutit à une meilleure internalisation des complexes (Figure 44). Nous avons alors émis l'hypothèse que le Lutrol® permet également de faciliter la transfection d'ADN plasmidique *in vivo* en facilitant son internalisation cellulaire *via* une meilleure interaction aux membranes des cellules cibles. Nous avons alors voulu observer l'impact du Lutrol® sur la transfection d'ADN non complexé aux lipides cationiques *in vitro*. Cependant, le Lutrol® seul (en absence de lipides cationiques) étant inefficace *in vitro*, nous avons supposé que l'échappement endosomal représentait la principale barrière à son utilisation, et que la potentialisation de la transfection observée dans notre modèle d'étude *in vitro* n'était observable que par la présence d'un facilitateur de l'échappement endosomal : les lipides cationiques.

En effet, les lipides cationiques sont des molécules adaptées à la transfection de cellules en culture qui permettent non seulement d'interagir avec les membranes par interaction électrostatique, mais également de faciliter l'échappement endosomal du transgène. L'efficacité de transfection de cellules déplétées en héparane sulfates observée des lipoplexes formulés avec le Lutrol® démontre cependant que le Lutrol® est capable d'assurer seul cette étape de la transfection dans des cellules en culture. Partant de ce principe, nous avons observé la transfection *in vitro* d'ADN nu ou d'ADN formulé au Lutrol® sur des cellules préalablement prétraitées avec des lipides cationiques, afin d'assurer un échappement endosomal efficace.

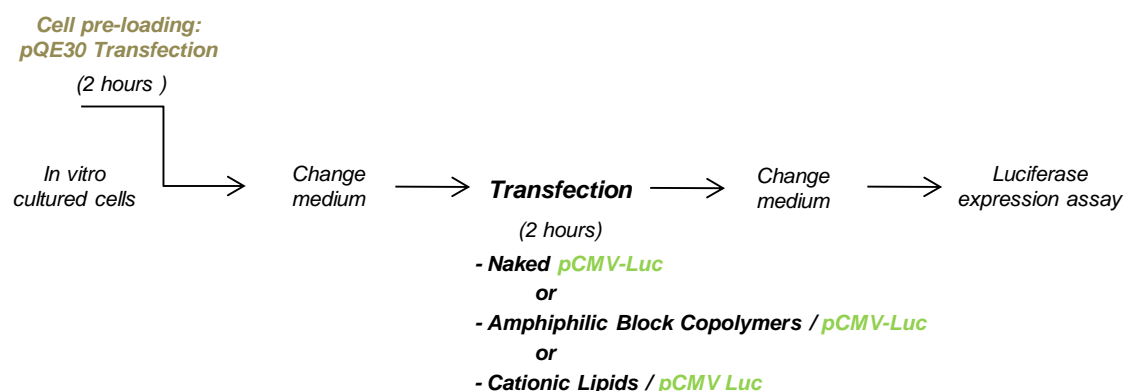


Figure 50 : Protocole de précharge en lipides cationiques des cellules transfectées. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits pendant 24h jusqu'à atteindre 70 à 80% de confluence. Les cellules subissent une première transfection pendant 2h avec 1µg de plasmide non codant complexé à un lipide cationique, puis le milieu est changé. Les cellules sont alors transfectées pendant 2h avec 1µg de plasmide encodant le gène rapporteur (i) nu, (ii) complexé au Lutrol® 3% ou (iii) complexé à un lipide cationique, puis le milieu est changé. Les cellules sont incubées pendant 22h dans du milieu de culture. Les cellules sont alors lysées, et le gène rapporteur dosé.

Le traitement des cellules avec des lipides cationiques avant l'ajout de molécules d'ADN nu nous permet de dissocier l'effet de complexation des lipides et leur effet de facilitateurs de l'échappement endosomal. Nous avons ainsi pu observer l'effet du Lutrol® sur des molécules d'ADN nu. Pour cela, nous avons dans un premier temps transfecté des cellules à l'aide d'un plasmide pQE30 non codant complexé à de la DOSP-DOPE au rapport de charge de 4 (+/-). Les cellules internalisent par endocytose des lipides cationiques au sein de leurs endosomes. Puis, dans un deuxième temps, nous avons transfecté ces cellules avec un plasmide encodant la luciférase (i) complexé à de la DOSP-DOPE au rapport de charge 4 (+/-), (ii) non complexé et (iii) formulé avec du Lutrol® selon les conditions utilisées pour le transfert de gène *in vivo* (Figure 50).

La Figure 51 montre que la transfection médiée par les lipides cationiques dans des cellules prétraitées est inhibée par rapport à la transfection de cellules non traitées, mettant en évidence une compétition entre le plasmide non codant et le plasmide encodant le gène rapporteur dosé. (Figure 51B). Cela suggère que la capacité d'endocytose de nouvelles particules est réduite, et que les endosomes sont saturés de lipoplexes.

Nous avons alors transfecté ces cellules – prétraitées avec des lipides cationiques – avec de l'ADN nu, et nous avons pu observer une expression significative du gène rapporteur encodé (Figure 51A). Les cellules *in vitro* semblent donc capables d'internaliser de l'ADN de façon autonome, mais cet ADN a besoin d'un lipide cationique pour sortir de l'endosome.

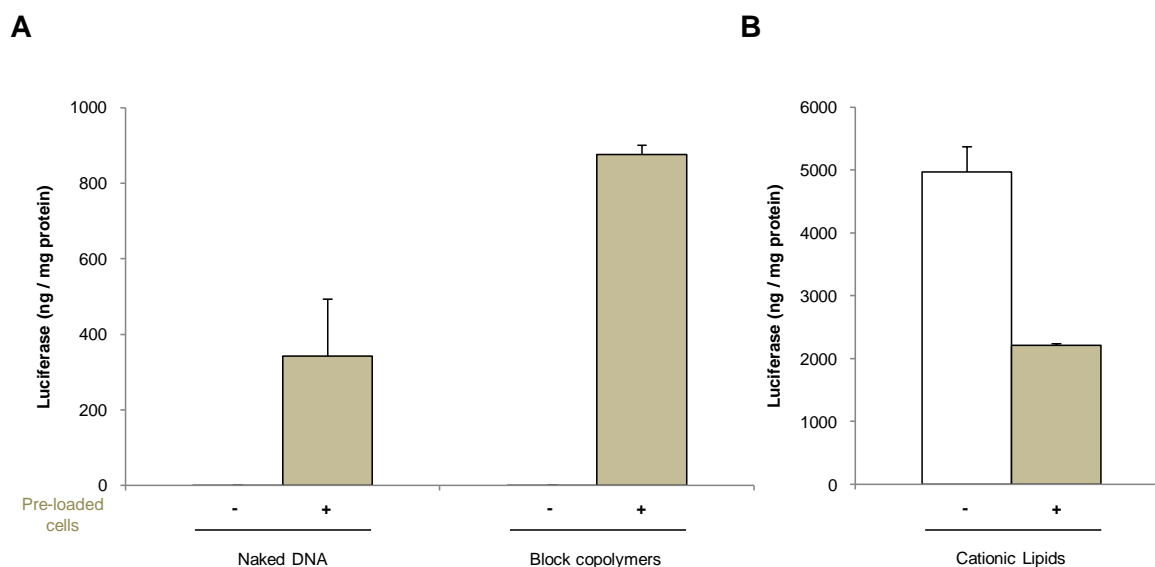


Figure 51 : Transfection de cellules préchargées en lipides cationiques. Les cellules ont subi une pré-transfection avec un plasmide pQE30 non codant complexé à de la DOSP-DOPE au rapport de charge de 4 (+/-) (barres beiges), les cellules contrôle n'ont pas subi de pré-transfection (barres blanches). Les cellules ont alors été transfectées avec un plasmide encodant la luciférase complexé ou non avec du Lutrol® 3% (A) ou complexé à de la DOSP-DOPE au rapport de charge de 4 (+/-) (B). La luciférase a été dosée 24h après la transfection.

Nous avons alors formulé ce plasmide encodant le gène rapporteur de la luciférase avec du Lutrol[®], suivant les conditions du transfert *in vivo*, et nous avons comparé l'efficacité de transfection de cellules préchargées et non préchargées. L'effet de potentialisation du Lutrol[®] observé précédemment sur la transfection de lipoplexes a pu être ré-observé, le Lutrol[®] permettant une transfection deux fois plus efficace que l'ADN nu dans des cellules préchargées.

Cette expérience démontre que le Lutrol[®] facilite l'interaction des acides nucléiques avec les membranes des cellules ce qui permet de faciliter la transfection. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus au sein de notre laboratoire qui avaient démontrés la capacité des copolymères à blocs présentant une HLB élevée à interagir avec les acides nucléiques. De plus, cette dernière expérience démontre la capacité des acides nucléiques formulés avec le Lutrol[®], mais également des acides nucléiques nus à transférer des cellules en culture dès lors qu'un échappement endosomal efficace est assuré.

Les polymères présentant une HLB élevée tels que le Lutrol[®] agissent donc *in vivo* par un mécanisme physicochimique inerte, contrairement aux polymères plus hydrophobes qui dépendent de l'activation de cascades signalétiques. Le Lutrol[®] représente un vecteur de choix pour le transfert de gène d'intérêt thérapeutique, et nous avons alors voulu nous assurer de son innocuité *in vivo*.

7. Le Lutrol[®] ne provoque pas de réponses inflammatoires *in vivo*

Le Lutrol[®] n'activant pas les cascades inflammatoires comme NFκB *in vitro* (Figure 40), nous avons voulu déterminer son niveau d'inflammation *in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons observé l'effet du Lutrol[®] sur les sensors de l'ADN cytosolique (Chapitre 1 des Généralités). En effet, l'expression de ces sensors est activée par certains médiateurs de l'inflammation tels que l'IFN-α/β et NFκB (Takaoka and Taniguchi 2008). L'activation de ces sensors déclenchant une réponse inflammatoire forte, nous avons dans un deuxième temps suivi l'activation de marqueurs de l'inflammation comme l'IL6 ou le recrutement lymphocytaire dans le cadre du transfert de gène musculaire de l'EPO, particulièrement sensible aux réactions immunitaires.

1. Le Lutrol[®] n'active pas les sensors de l'ADN cytosolique

Takaoka *et al.* ont démontré que DAI (DLM1/ZBP1), protéine cytosolique, était un des principaux médiateurs de la réponse immunitaire engendrée par l'ADN double brin (Takaoka *et al.* 2007). Cette protéine est exprimée dans de nombreux tissus mais de façon intéressante, n'est que très peu exprimée dans le muscle squelettique. L'expression de cette protéine étant sous la dépendance des cascades signalétiques inflammatoires, nous avons voulu déterminer si les copolymères à blocs tels que le Lutrol[®] l'activaient (Figure 52).

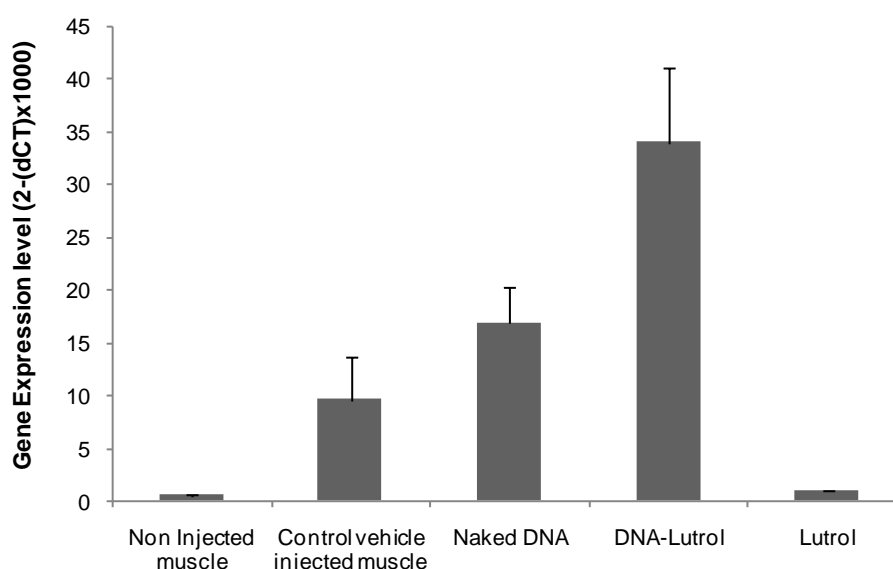


Figure 52 : Activation de DAI lors du transfert de gène médié par le Lutrol[®]. Des muscles tibiaux antérieurs de souris ont été injecté avec de l'ADN plasmidique formulé ou non avec du Lutrol[®] et du 704. Les transcrits de DAI ont été quantifiés par RT-PCR-quantitative 24h après l'injection. Les valeurs ont été normalisées par les niveaux d'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) dans chaque condition.

Bien que le muscle squelettique présente des niveaux d'expression de DAI très faibles, l'injection d'une solution saline contrôle provoque son activation. L'injection d'ADN nu conduit à une activation plus marquée, l'ADN étant reconnu par son sensor cytosolique DAI qui s'auto-active. L'injection d'ADN formulé au Lutrol[®] conduit à une activation sensiblement plus marquée de ce sensor, suggérant qu'un plus grand nombre de plasmide a été internalisé au niveau cytosolique. Mais de façon très intéressante, l'injection de Lutrol[®] seul n'active pas DAI, et permet même d'avoir un niveau d'expression de cette protéine sensor plus faible que lorsque le muscle est injecté avec une solution saline contrôle.

Cette expérience démontre que les polymères hydrophiles, tels que le Lutrol[®], n'activent pas les sensors d'ADN comme DAI. De par leur faible capacité inflammatoire, ils semblent particulièrement indiqués pour l'expression musculaire de protéines d'intérêt thérapeutique.

2. Transfection musculaire et inflammation : application au transfert du gène de l'EPO

Le transfert musculaire du gène de l'érythropoïétine représente une solution alternative à la protéothérapie, faisant du muscle une glande secondaire, capable de suppléer le rein en cas de défaillance conduisant à une anémie.

L'injection musculaire de quantités d'ADN massives (10 µg) engendre cependant une réponse immunitaire forte dirigée contre la protéine transgénique, aboutissant à la chute brutale de l'hématocrite des souris injectées et à l'apparition de phénotypes anémiques (Figure 53).

De façon intéressante, le taux de réticulocytes (précurseurs des hématies) était lui aussi fortement affecté, suggérant la présence d'auto-anticorps dirigés non seulement contre l'EPO transgénique secrétée au niveau musculaire, mais également dirigés contre l'EPO endogène. Cette hypothèse a pu être vérifiée en utilisant des cellules DaE-7, dont la croissance est conditionnée par la présence d'EPO dans le milieu de culture : l'incubation de ces cellules en présence d'EPO recombinante et des sérums des souris présentant un phénotype anémique provoquait l'inhibition de leur croissance (Richard-Fiardo *et al.* 2008).

Nous avons élaboré au sein de l'équipe un protocole de multi-injection permettant de diminuer les quantités d'ADN injectées, en passant d'une dose unique de 10 µg à 4 doses de 2,5 µg.

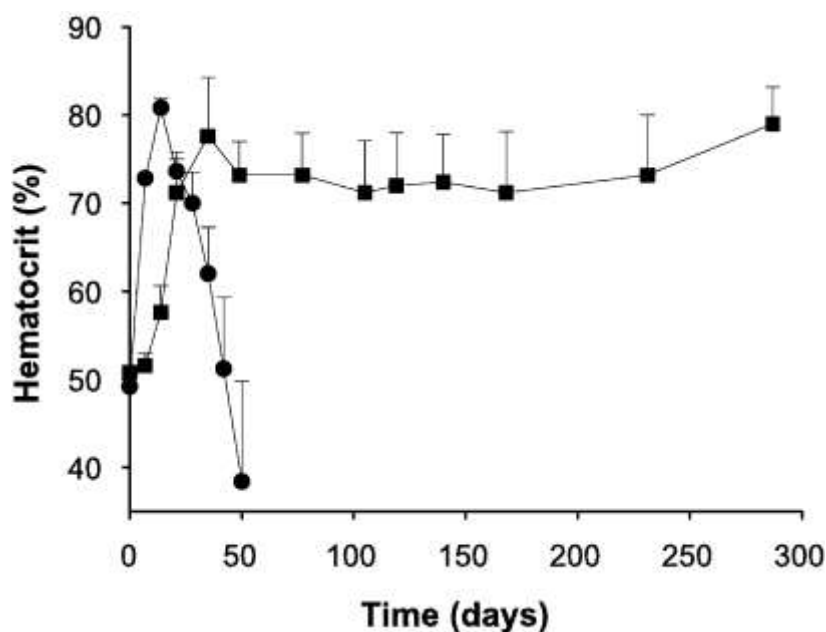


Figure 53 : Variation de l'hématocrite de souris en fonction du temps après la multi-injection de formulations ADN/Lutrol®. Des souris Swiss ont subi 4 injections de 2,5 µg à J0, J7, J14 et J21 (carrés) ou 1 injection de 10 µg à J0 (ronds) de plasmide pCMV-mEPO formulé avec du Lutrol® 3% au niveau des muscles tibiaux antérieurs. Chaque point représente la moyenne des hématocrites d'un groupe de 5 souris.

Nous avons montré que les souris subissant ce protocole d'injection présentaient une élévation de l'hématocrite des souris de même ampleur que les souris ne recevant qu'une seule injection de 10 µg, mais qu'elles ne développaient pas de réponse immunitaire contre l'EPO néo-sécrétée (Figure 53). Ces souris présentaient un hématocrite stable pendant au moins 300 jours.

Il est intéressant de noter que si ce protocole permet de réduire la dose d'ADN administrée à chaque injection, en revanche, la quantité de polymère utilisée – en l'occurrence le Lutrol® – reste fixe, ces vecteurs n'obéissant pas à une relation stœchiométrique avec l'ADN transfecté (Bello-Roufai *et al.* 2007). Ainsi, le protocole de multi-injection mis en place ne modifiait pas la dose globale d'ADN transfecté (4 x 2,5 µg ou 10 µg), mais multipliait par 4 la quantité de Lutrol® totale reçue par le muscle.

Nous avons alors observé l'effet inflammatoire de la transfection médiée par le Lutrol® sur le tissu musculaire en évaluant deux paramètres, le niveau d'IL-6, cytokine inflammatoire, et la présence d'infiltrats lymphocytaires dans le muscle injecté.

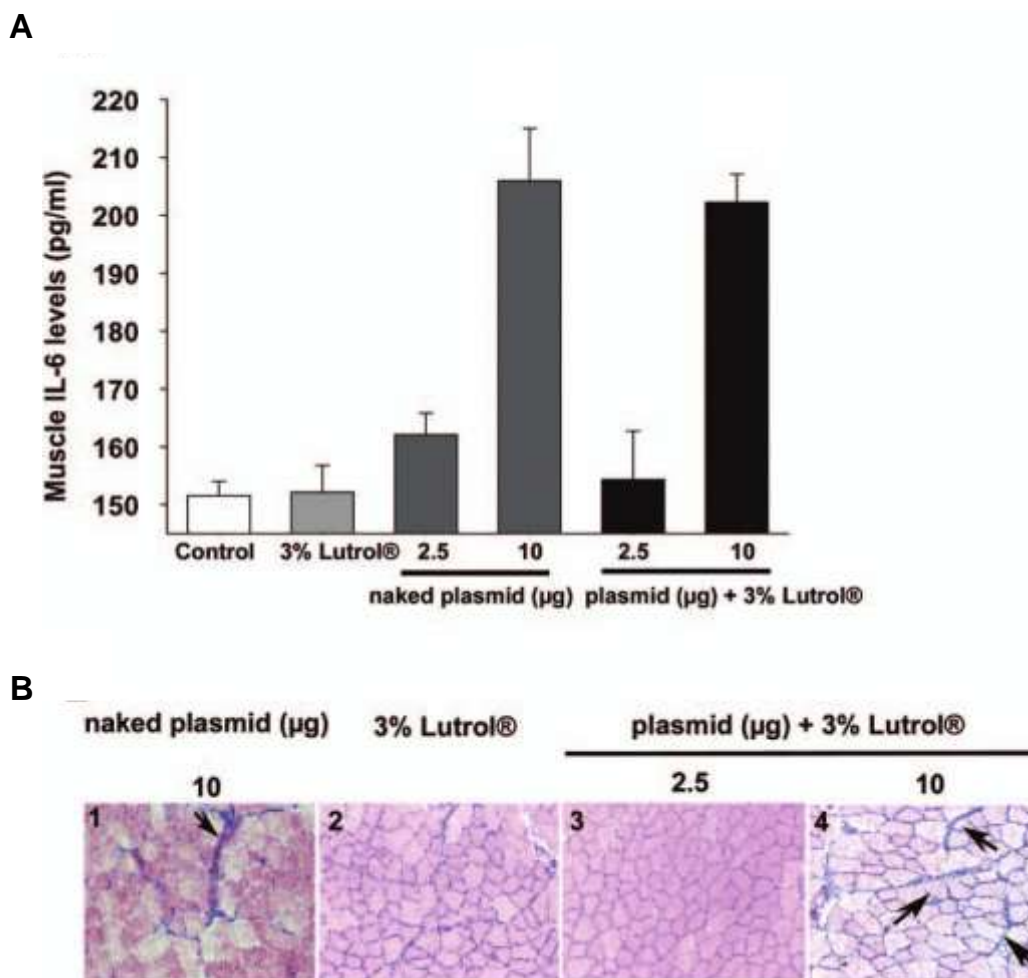


Figure 54 : Réponse inflammatoire et analyse histopathologique de muscle de souris après transfert de gène médié par le Lutrol®. (A) Le taux d'IL-6 est mesuré dans le broyat musculaire de souris Swiss injectées avec 2.5 µg ou 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol® 3%. Les valeurs d'IL-6 musculaire de souris injectées avec le Lutrol® 3% seul ne sont pas significativement différentes par rapport à une injection contrôlée de Tyrode. (B) Une coloration hématoxyline-éosine est réalisée sur des coupes de muscles de souris Swiss injectées avec le Lutrol® 3% seul ou en présence de 2.5 ou 10 µg de pCMV-mEPO. Les muscles ont été prélevés 7 jours après le transfert de gène. Les flèches indiquent un infiltrat lymphocytaire.

La Figure 54A montre que l'injection d'ADN nu provoque une sécrétion d'IL6 proportionnelle à la quantité d'ADN injectée. En revanche, l'injection d'une solution de Lutrol® 3% ne provoque pas plus de sécrétion d'IL6 que l'injection d'une solution contrôlée. De plus, les taux d'IL6 dosés suite à l'injection d'ADN formulé au Lutrol® 3% ne sont pas supérieurs aux taux d'IL6 dosés suite à l'injection d'ADN nu.

De façon intéressante, ces résultats sont corrélés au niveau histopathologique. La Figure 54B montre en effet que si l'injection d'une dose de 10 µg d'ADN nu ou d'ADN formulé avec du Lutrol® 3% provoque un infiltrat lymphocytaire, l'injection de Lutrol® seul ne provoque pas d'infiltrat. Ces résultats révèlent donc un double intérêt au Lutrol® en termes de sécurité : c'est un vecteur assez efficace pour considérablement réduire la dose d'ADN injectée et

permettre une sécrétion efficace d'Epo, mais c'est également un vecteur inerte ne provoquant aucune réaction inflammatoire.

Contrairement aux polymères plus hydrophobes qui activent d'importantes cascades signalétiques inflammatoires, les copolymères à blocs amphiphiles présentant des HLB élevées tels que le Lutrol[®] permettent de transférer efficacement un transgène *via* un mécanisme passif et inerte, autorisant leur utilisation pour des approches de transfert de gène d'intérêt thérapeutique, difficiles à mettre en œuvre car particulièrement sujettes aux réactions immunitaires.

L'ensemble de ces résultats apporte deux éléments de réponse très importants quant au mécanisme d'action des copolymères à blocs amphiphiles :

(i) La stimulation de la transfection observée *in vitro* repose sur l'amélioration des capacités d'interaction aux membranes des particules transfectées, ce qui induit leur meilleure internalisation.

(ii) L'incapacité des copolymères à blocs amphiphiles – comme de l'ADN nu – à transfecter des cellules en culture provient de leur incapacité à faciliter l'échappement endosomal du transgène internalisé, les cellules en culture ayant développé une capacité endocytaire exacerbée.

Cette dernière observation suggère donc que les caractéristiques du mécanisme d'action du Lutrol[®] décrites dans ce modèle s'appliquent *in vivo*, et nous amène à proposer le mécanisme d'action de ce copolymère à bloc amphiphile. Le Lutrol[®] permet de faciliter la diffusion tissulaire du plasmide comme cela a déjà été décrit, mais il permet également de faciliter son interaction aux membranes plasmiques. En outre, la nécessité d'utiliser un lipide cationique dans des cellules *in vitro* présentant une endocytose exacerbée suggère que les copolymères à blocs amphiphiles comme le Lutrol[®] facilitent l'internalisation cellulaire du plasmide par un mécanisme indépendant de l'endocytose.

De façon intéressante, on peut ajouter que la transfection de plasmides nus présente une certaine capacité transfectante *in vivo*, mais comme les copolymères à blocs amphiphiles, ils sont inefficaces *in vivo*. Or, les principales hypothèses émises dans la littérature concernant le transfert musculaire d'ADN plasmidique nu font état de mécanismes d'internalisation également indépendants de l'endocytose (Wolff *et al.* 1992; Karpati and Acsadi 1993).

Contrairement aux polymères plus hydrophobes, les copolymères à blocs hydrophiles comme le Lutrol[®] agissent donc par un mécanisme inerte ne déclenchant pas de cascades signalétiques, notamment inflammatoires. Ces vecteurs semblent donc particulièrement indiqués pour le transfert de gène musculaire de protéines sécrétées, très sensibles au déclenchement de réponses immunitaires dirigées contre le transgène.

Discussion et perspectives

Ce travail de thèse avait pour premier objectif de déterminer le mécanisme par lequel les copolymères à blocs amphiphiles permettent de potentialiser la transfection d'un plasmide *in vivo*. De fait, bien que ces molécules représentent aujourd'hui une des classes de vecteurs synthétiques les plus efficaces pour transférer des acides nucléiques au sein d'un organe, très peu d'études ont porté sur leur mécanisme proprement dit.

De nombreux travaux ont montré depuis 2000 que les copolymères à blocs amphiphiles permettaient de transférer de nombreux organes présentant des structures tissulaires très variées telles que les muscles squelettiques et cardiaques ou encore les poumons (Lemieux *et al.* 2000; Pitard *et al.* 2002; Pitard *et al.* 2004; Desigaux *et al.* 2005). En outre, ces vecteurs permettent également de transférer des tissus pathologiques présentant des altérations structurelles telles que des muscles squelettiques dans un modèle murin de myopathie de Duchenne ou des poumons dans un modèle murin de mucoviscidose (Richard *et al.* 2005b; Desigaux *et al.* 2005).

Si les premières études se cantonnaient à la néo-expression de gènes rapporteurs, il a ensuite été démontré par notre équipe que ces nouveaux vecteurs avaient la capacité de restaurer l'expression d'un gène d'intérêt, et de médier un effet thérapeutique. En effet, il a été démontré au sein de notre équipe que la transfection musculaire d'un plasmide encodant la minidystrophine dans des souris MDX à l'aide de ces copolymères permettait de restaurer l'expression de cette protéine, mais aboutissait également à la restauration des complexes protéiques associés (Richard *et al.* 2005b). Les copolymères à blocs permettent donc d'acheminer un transgène dans un grand nombre de fibres, et permettent une expression suffisante compatible avec la physiologie du tissu ciblé. Nous avons également montré que les copolymères à blocs – et le Lutrol[®] en particulier – étaient des vecteurs particulièrement adaptés à la transfection musculaire d'EPO, dans un modèle murin d'insuffisance rénale chronique. Ils permettent en effet une expression et une sécrétion de l'EPO par les fibres musculaires de façon dépendante de la quantité d'ADN délivrée. L'injection de différentes quantités d'ADN formulés avec le Lutrol[®] a permis d'obtenir des niveaux de sécrétion d'EPO modulant l'hématocrite des souris injectés dans des proportions physiologiques (Richard-Fiardo *et al.* 2008).

Il est important de relever que l'ensemble des études de transfert de gènes à l'aide de ces vecteurs a été réalisé avec des polymères aux propriétés physico-chimiques (HLB, CMC...) très éloignées. La première étude ayant montré la capacité de ces molécules à transférer un plasmide *in vivo* utilisait une formulation nommée SP1017, mélange de deux polymères structurellement opposés, Le L61 et le F127 (Lemieux *et al.* 2000). Le L61 ((OE)₂–

(OP)₃₀–(OE)₂) est en effet un polymère très hydrophobe, quasi exclusivement composé d'oxyde de propylène. Au contraire, le F127 ((OE)₁₀₀–(OP)₆₀–(OE)₁₀₀) est lui très hydrophile de par ses deux segments de blocs d'OE encadrant un segment de blocs d'OP proportionnellement plus réduit. La structure très éloignée de ces deux polymères suggère fortement que cette formulation stimulait la transfection à des niveaux multiples. Par la suite, il a été montré que des polymères présentant une hydrophobicité intermédiaire tels que le P85 ou le PE6400 ainsi que des polymères hydrophiles comme le F127, le F68 ou le F108 permettaient de transférer le muscle de façon également très efficace (Pitard *et al.* 2002; Yang *et al.* 2005; Bello-Roufai *et al.* 2007; Richard-Fiardo *et al.* 2008).

L'utilisation de ces polymères dans de nombreux domaines avait déjà permis de relever une multitude de propriétés et avait abouti à une première classification en fonction de leur degré d'hydrophobicité (Batrakova *et al.* 2003b; Batrakova and Kabanov 2008). L'équipe de Kabanov avait alors observé que les polymères présentant une proportion d'OE et d'OP sensiblement équivalente tels que le P85 ou le L64 avaient la capacité de s'incorporer aux membranes plasmiques et de les fluidifier, déclenchant une cascade d'effets biologiques. *A contrario*, les polymères plus hydrophiles, tels que le F108 ou le F127, interagissaient avec les membranes mais ne provoquaient pas d'effets biologiques notables.

Mécanisme d'action du Lutrol[®]

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action de ces copolymères à blocs plus hydrophiles et plus particulièrement au Lutrol[®], qui présente l'avantage d'être non seulement un vecteur de transfert de gène très efficace, mais d'être également déjà approuvé par les grandes pharmacopées internationales. Nous avons voulu identifier son ***niveau d'implication dans la transfection*** et avons conçu un modèle d'étude permettant de déterminer *in vitro* l'impact du Lutrol[®] sur les différentes étapes du trafic d'un transgène. Les voies d'internalisation des lipides cationiques étant déjà bien connues, nous avons utilisés ces vecteurs afin d'acheminer le transgène rapporteur jusqu'au noyau, et nous avons observé l'influence du Lutrol[®] sur les différents stades de sa progression.

Nous avons pu observer que le Lutrol[®] était capable de faciliter la transfection de différents types d'acides nucléiques, ADN plasmidique et siRNA, supposant que le Lutrol[®] permet de potentialiser les étapes précoces de la transfection communes à ces deux molécules. De fait, les siRNA ont leur site d'action au niveau du cytosol, et ne sont pas concernés par les étapes d'import nucléaire ou d'expression. Nous avons pu mettre en évidence par microscopie électronique que le Lutrol[®] provoquait une accumulation plus importante de lipoplexes au niveau cellulaire. Cependant, cette accumulation accrue des

complexes n'était pas corrélée à une augmentation du nombre de cellules transfectées observées en microscopie optique et quantifiée par cytométrie de flux. Nous avons donc émis l'hypothèse que si le Lutrol[®] est capable de stimuler l'internalisation d'acides nucléiques, il ne semble pas faciliter leur accès au cytosol de la cellule.

Il est intéressant de noter que l'internalisation de complexes lipides cationiques/ADN se fait majoritairement par endocytose, mécanisme actif ATP dépendant et saturable. L'ajout d'un ADN « carrier » lors de la formulation des complexes Lipide cationique/ADN multiplie le nombre d'objets formés, ce qui aboutit à une meilleure efficacité de transfection, qui dépend cependant des capacités endocytaires de la cellule. En effet, une fois les voies d'endocytose saturées, nous avons montré que l'augmentation du nombre de particules transfectées ne permettait plus d'augmenter la quantité de transgène dosée. De la même manière, la transfection de lipoplexes est considérablement réduite lorsque les cellules sont incubées à 4°C et que l'endocytose est inhibée. Le traitement des cellules avec le Lutrol[®] a quant à lui permis d'augmenter l'efficacité de la transfection au-delà du niveau de saturation de l'endocytose des lipoplexes, et la stimulation observée survenait indifféremment dans des cellules transfectées à 4°C ou à 37°C. L'accumulation de complexes au sein des cellules transfectées traitées avec le Lutrol[®] ne provient donc pas d'une stimulation des voies endocytaires, mais semble provenir d'une facilitation de l'interaction des particules avec les membranes des cellules *via* un mécanisme passif et indépendant de l'ATP, qui permet dès lors d'augmenter la quantité assimilée au sein de chaque vésicule.

La conception d'un système hybride composé de lipoplexes directement formulés en présence de Lutrol[®] a permis d'observer que la transfection était stimulée de manière plus importante lorsque les complexes étaient directement associés au Lutrol[®] que lorsque les cellules étaient simplement traitées avec le Lutrol[®], suggérant un rôle direct du Lutrol[®] dans l'interaction complexes-membranes. En effet, ce système s'est surtout révélé capable de transfecter des cellules déplétées en héparane sulfate qui interdisent toute interaction de type électrostatique avec les lipoplexes (Kopatz *et al.* 2004). Ce résultat nous a permis de rétablir le rôle du Lutrol[®] dans notre modèle d'étude, montrant que sa capacité de transfection était directement liée à sa capacité à interagir avec les membranes des cellules ciblées.

Les données que nous avons obtenues dans notre modèle ne permettent cependant pas de déterminer la forme – unimérique ou micellaire – sous laquelle les copolymères amphiphiles parvenaient à stimuler l'internalisation des acides nucléiques transfectés. En effet, les valeurs de CMC rapportées dans la bibliographie sont déterminées pour des polymères en solution dans l'eau, et nous avons utilisé ces polymères dans différents milieux de formulations et d'incubation qui présentent notamment des teneurs en ions différentes. Il

est souvent rapporté que l'efficacité de transfection des copolymères à blocs est optimale *in vivo* lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations avoisinant la CMC, soutenant un rôle prépondérant de la forme micellaire en transfert de gène (Liaw *et al.* 2001). Toutefois si les unimères s'auto-assemblent en micelles pour des concentrations avoisinant leur CMC, les deux formes obéissent à un équilibre et coexistent, formant des structures dynamiques. Ainsi les unimères alimentent la formation de nouvelles micelles, qui demeurent elles mêmes une source à la production de nouveaux unimères en cas de dilution de la solution dans des fluides biologiques par exemple (Kabanov *et al.* 2005). Or, les études menées par l'équipe de Kabanov ont démontrées une influence déterminante des formes unimères dans la capacité des copolymères à blocs à interagir avec les membranes biologiques (Batrakova and Kabanov 2008). Il est intéressant de constater que l'effet stimulateur du Lutrol® sur l'internalisation des acides nucléiques observé dans notre modèle d'étude s'est avéré dose dépendant, jusqu'à atteindre une certaine concentration – 3% (w/v) – au-delà de laquelle l'effet observé n'augmente plus. Cette effet de stagnation pour des concentrations supérieures à 3% (w/v) suggère une influence prépondérante d'unimères libres dont la concentration augmente jusqu'à un certain point ou l'équilibre s'inverse, aboutissant à une émergence majoritaire de la forme micellaire.

Ces nouvelles données obtenues *in vitro* en utilisant des lipoplexes suggèrent que le Lutrol® servirait d'intermédiaire en facilitant l'interaction entre les acides nucléiques et les membranes biologiques *in vivo*. Contrairement aux polymères hydrophobes comme le PE6400 qui semblent agir de façon totalement indépendante de l'ADN (Gau-Racine *et al.* 2007), il a déjà été démontré que les polymères très hydrophiles comme le Lutrol® ont la capacité d'interagir avec les acides nucléiques par l'intermédiaire de leurs motifs d'OP (Bello-Roufai *et al.* 2007). Nous avons émis l'hypothèse que le Lutrol® permettait cette interaction ADN/membrane *in vivo* comme *in vitro*, et que les l'incapacité du Lutrol® à provoquer une transfection efficace *in vitro* en l'absence de lipides cationiques provenait d'une différence au niveau de la voie d'internalisation empruntée.

Dualité *in vitro* / *in vivo*

Une des grandes questions restées sans réponses depuis l'utilisation des copolymères à blocs amphiphiles en transfert de gène porte sur leur incapacité à transférer des cellules en culture dans une boîte de plastique. Le PE6400 et le SP1017 permettent en effet de transférer le muscle *in vivo* mais sont inefficaces *in vitro* pour la transfection de cellules en culture (Kabanov *et al.* 2002b; Pitard *et al.* 2002). Au cours de cette thèse, nous avons également rapporté cette dualité *in vitro* / *in vivo*, le Lutrol® étant incapable de transférer

seul des cellules en culture. Cette observation suggère que l'environnement de la cellule ciblée influe directement sur la capacité de transfection de ces vecteurs. Nous avons alors cherché à expliquer cette incapacité des copolymères à blocs transférer des cellules en culture.

Classiquement, on conçoit le degré de complexité des différentes stratégies de vectorisation *in vitro* dans des cellules en culture, *in vivo* au sein d'un organe et *in vivo* par injection systémique selon une échelle croissante, corrélée à l'accumulation des barrières à franchir. Dans le cas des copolymères à blocs, cette échelle s'inverse (au moins pour les deux premières stratégies), suggérant donc que la voie d'internalisation empruntée par les acides nucléiques transférés est différente *in vitro* et *in vivo*.

L'ensemble des expériences décrites jusqu'alors démontre le rôle du Lutrol[®] dans l'interaction des complexes avec les membranes des cellules *in vitro*, ce qui suggère fortement que le Lutrol[®] permet un effet similaire de facilitation de l'interaction membranaire des acides nucléiques *in vivo*.

Le modèle d'étude développé utilisant le Lutrol[®] pour faciliter la transfection de lipoplexes *in vitro* peut être énoncé selon deux points de vue différents. Conceptuellement, on peut en effet considérer que le Lutrol[®] permet de stimuler la transfection de formulations ADN/lipide cationique, mais on peut également considérer que les lipides cationiques permettent la transfection *in vitro* de formulations ADN/Lutrol[®]. Dans ce dernier cas de figure, le Lutrol[®] permettrait aux acides nucléiques d'interagir avec les membranes des cellules et d'être internalisées *in vivo* comme *in vitro* ; cependant les lipides cationiques seraient nécessaires *in vitro* pour assurer une transfection efficace. On peut remarquer que l'efficacité de la transfection d'ADN médiée par les lipides cationiques repose essentiellement sur leur capacité à faire sortir le transgène des endosomes (Xu and Szoka, Jr. 1996). Or, dans notre modèle d'étude *in vitro*, nous avons pu observer que l'effet de potentialisation du Lutrol[®] ne reposait pas sur une facilitation de l'accès des acides nucléiques aux compartiments cytosolique, mais sur une augmentation de la quantité d'acides nucléiques internalisée. Nous avons donc logiquement émis l'hypothèse que la séquestration endosomale des acides nucléiques représentait la principale barrière à leur utilisation *in vitro*, et que leur capacité de transfection *in vivo* passait probablement par une voie indépendante de l'endocytose.

De façon intéressante, la capacité du Lutrol[®] à faciliter l'internalisation des acides nucléiques dans notre modèle n'est pas tributaire du vecteur cationique utilisé. Nous avons en effet démontré que le Lutrol[®] facilitait la transfection de complexes formés à partir de lipides cationiques, mais également à partir de polymères cationiques comme le JetPEI[®]. Il semble donc que le Lutrol[®] joue un rôle général, facilitant l'internalisation des acides

nucléiques formulés au sein de lipoplexes ou de polyplexes au sein desquels les vecteurs utilisés permettent d'assurer l'échappement endosomal du transgène.

Plusieurs études portant sur des polymères plus hydrophobes comme le L64 ou le L61 avaient cependant émis l'hypothèse que les copolymères à blocs amphiphiles permettaient de faciliter l'échappement endosomal d'un transgène, notamment en perméabilisant les membranes. Les polymères très hydrophobes, comme le L61, sont en outre capable de stimuler le flip-flop des lipides des bicouches membranaires (Krylova *et al.* 2003). De plus il avait été rapporté que certains polymères inhibaient la résistance aux drogues des cellules MDR en inhibant leur séquestration vésiculaire (Venne *et al.* 1996). Astafieva *et al.*, avait déjà proposé que le P85 permettait de stimuler la transfection de cellules en culture en facilitant le relargage cytosolique du transgène (Astafieva *et al.* 1996). Bien que les polymères utilisés dans ces différentes études soient de nature plus hydrophobe que le Lutrol[®] et ne présentent pas les mêmes propriétés, ces différentes hypothèses n'expliquent pas pourquoi l'ensemble de ces polymères ne permettent pas de transférer des cellules en culture.

De façon intéressante, si la transfection d'un plasmide seul permet une transfection musculaire relativement efficace (Wolff *et al.* 1990), elle est en revanche inefficace dans des cellules en culture. Cette dualité *in vitro* / *in vivo* observée lors de la transfection d'un ADN plasmidique seul ou formulé avec des copolymères à blocs semble relever de la même problématique.

Nous avons alors observé la capacité de transfection d'ADN non complexé et de formulations ADN/Lutrol[®] similaires à celles utilisées pour le transfert de gène *in vivo*, en utilisant des cellules préchargées en lipides cationiques afin d'empêcher toute séquestration des acides nucléiques par les endosomes. Nous avons pu observer que **la transfection d'ADN nu est efficace *in vitro* à condition d'abolir la séquestration endosomale, et que la formulation d'ADN avec le Lutrol[®] permettait de stimuler cette transfection.**

Le Lutrol[®] semble ainsi capable de faciliter l'interaction entre les acides nucléiques et les membranes des cellules, permettant leur internalisation. La présence de lipides cationiques au sein des cellules ciblées semble permettre ici aux acides nucléiques de rejoindre le cytosol et d'échapper à la dégradation lysosomale. Ces résultats corroborent les résultats obtenus par Bello-Rouffai *et al.* qui démontraient une interaction directe entre les acides nucléiques et les motifs d'OP des polymères comme le Lutrol[®] (Bello-Rouffai *et al.* 2007).

Dans le cadre de cette dernière expérience, on ne peut cependant pas exclure qu'une partie de l'efficacité de transfection soit due à la présence de lipides cationiques encore présents à la surface des cellules ; il faut cependant noter que la transfection d'ADN avec des lipides cationiques repose de façon essentielle sur une complexation optimale des

lipoplexes (Bartreau *et al.* 2008). Or, le niveau de transfection observé à l'aide d'ADN/Lutrol® dans les cellules préchargées en lipides cationiques est incompatible avec une internalisation médiée exclusivement par les lipides cationiques résiduels (la complexation d'ADN avec des lipides cationiques dans des conditions de formulation mal définies – faible temps d'incubation des complexes, variations du rapport de charges... – aboutit à des efficacités de transfection drastiquement plus faible) .

Cette différence de voie d'internalisation dans des cellules *in vitro* et *in vivo* peut être aisément expliquée par le fait que, contrairement aux cellules *in vivo* qui disposent d'un système vasculaire leur assurant un approvisionnement continu en nutriments, les cellules en culture doivent elles même capter les nutriments présents en solution dans le milieu de culture. Elles se spécialisent donc et développent une endocytose exacerbée ; c'est d'ailleurs cette propriété des cellules en culture qui est exploitée par les vecteurs cationiques qui sédimentent dans le milieu, et une fois au contact des cellules, sont endocytés (Xu and Szoka, Jr. 1996; Rejman *et al.* 2006).

Ces observations nous ont amené à proposer un mécanisme d'action du Lutrol® *in vivo* par une voie indépendante de l'endocytose, reposant essentiellement sur une facilitation de la diffusion de l'ADN au sein du tissu (Bello-Roufai *et al.* 2007), et sur une facilitation de leur interaction aux membranes des cellules.

De façon intéressante, ces observations sont compatibles avec les principales hypothèses concernant le mécanisme d'internalisation d'un plasmide nu dans le muscle squelettique. Wolff *et al.* ont rapporté que l'internalisation de l'ADN au sein de la cellule pourrait résulter d'une rupture de la membrane des fibres induite par l'injection IM (intramusculaire), et la présence d'ADN plasmidique au niveau des tubules T du sarcolemme suggère que ces structures jouent un rôle important dans la capture de l'ADN ; de façon intéressante, aucune internalisation par endocytose n'a pu être décelée (Wolff *et al.* 1992). Il a alors été proposé que le plasmide injecté diffusait passivement à travers les pores de la lame basale des myofibres (Karpati and Acsadi 1993). Or, ces pores de cette lame basale sont constitués de protéoglycanes chargés négativement dont la taille avoisine 40 nm ; une réduction de la charge de surface sur les acides nucléiques par ajout de copolymères à blocs amphiphiles et la stimulation de leur interaction aux membranes des cellules pourrait permettre de faciliter leur translocation vers le cytosol.

Avantage des systèmes comportant plusieurs vecteurs

La définition des rôles du Lutrol[®] d'une part et des vecteurs cationiques d'autre part lors de la transfection permet d'envisager l'élaboration de systèmes plus complexes, où chaque partie sera dédiée au passage d'une barrière bien précise en fonction de la voie d'administration choisie. On peut envisager d'utiliser ces différents vecteurs séparément, ou de les assembler au sein de complexes multimodulaires afin de permettre des transfactions optimisées et plus particulièrement adaptées aux cellules ciblées. La facilitation de la transfection engendrée par ces systèmes permettrait de diminuer non seulement les quantités d'acides nucléiques transfectées, mais également les quantités de lipides cationiques utilisées. Les particules résultantes de ces associations seraient donc moins toxiques, tout en conservant une efficacité de transfection tout efficace.

L'utilisation de polymères pour optimiser la transfection de vecteurs cationiques *in vitro* s'est déjà montrée efficace dans différentes études. Astafieva *et al.* avaient déjà observé une facilitation de l'internalisation de polyplexes de PEVP dans des cellules traitées avec du P85 (Astafieva *et al.* 1996), et ces données ont été confirmées au cours d'une étude plus récente utilisant du PEI (Yang *et al.* 2008). De même, lors de cette étude, nous avons pu montrer que le Lutrol[®] facilitait la transfection *in vitro* de lipoplexes mais également de polyplexes.

Kuo *et al.* ont utilisés les copolymères à blocs amphiphiles comme stabilisateurs stériques pour la transfection de complexes cationiques dans des milieux de culture riches en sérum. En effet, les polyplexes ont une charge globale positive qui entraîne leur fixation aux protéines sériques du milieu de culture par interactions électrostatiques, aboutissant à leur agrégation et à une inhibition de leur efficacité de transfection. De façon intéressante, la capacité de ces polymères à stimuler la transfection au cours de cette étude était d'autant plus importante qu'ils présentaient une hydrophobicité faible (F68>F127>P105>P94>L122) (Kuo 2003). Les chaînes hydrophiles d'OE des copolymères à blocs sont capables de provoquer une dispersion des complexes, prévenant ainsi leur agrégation (Pitard *et al.* 2001).

En effet, les copolymères à blocs amphiphiles permettent d'éviter l'agrégation de complexes lipide/ADN formulés à un rapport de charge neutre (Pitard *et al.* 2001; Letrou-Bonneval *et al.* 2008). Dans ce cas de figure, l'ADN est complexé mais en l'absence de répulsion électrostatique, les lipoplexes s'agrègent. L'ajout de copolymères à blocs amphiphiles permet dans ce cas de stabiliser ces objets colloïdalement en assurant une répulsion stérique. De façon intéressante, l'ajout d'un ligand en fonctionnalisant les polymères en surface des particules permet leur internalisation par une voie d'endocytose spécifique. Dans ce cas, les polymères fonctionnalisés permettent d'interagir avec les

membranes des cellules, et la présence de ligands favorise leur endocytose ; les lipides présents au sein de la particule permettent quant à eux de protéger l'ADN des DNAses d'une part, mais également d'assurer l'échappement endosomal du transgène.

In vivo, ces systèmes multimodulaires fonctionnalisés permettraient de remplir l'ensemble des contraintes présentes lors de la transfection, en complexant et en protégeant l'ADN, en ciblant des cellules spécifiques, et en permettant leur internalisation tout en assurant l'échappement endosomal du transgène. Ces systèmes représentent une alternative majeure aux systèmes actuellement dévolus à la transfection *in vivo* après injection systémiques.

Effet sur l'activation de voies de signalisation et implications *in vivo*

Notre laboratoire avait été le premier à montrer que le PE6400 avait la capacité de faciliter la transfection à un niveau intracellulaire (Pitard *et al.* 2002), et nous nous sommes intéressés à l'influence du Lutrol[®] sur les étapes tardives de la transfection. Contrairement aux données obtenues précédemment pour le PE6400 nous avons mis en évidence que la stimulation de la transfection observée avec le Lutrol[®] ne provenait pas de la facilitation des étapes d'import nucléaire ou d'expression du transgène. En effet, le traitement des cellules avec le Lutrol[®] a permis de stimuler leur transfection uniquement dans le cas où il avait lieu avant cette dernière : le traitement au Lutrol[®] de cellules déjà transfectées n'a pas permis de stimuler l'expression du gène rapporteur. De plus, nous avons observé que le traitement avec le Lutrol[®] de cellules d2GFP génétiquement modifiées, exprimant la GFP de façon stable, n'activait pas l'expression du gène rapporteur.

Ces résultats sont en contradiction avec les données obtenues par Sriadibhatla *et al.*, qui avaient observé que le traitement de cellules exprimant la GFP de façon stable avec du P85 permettait de stimuler son expression (Sriadibhatla *et al.* 2006). Dans une étude récente, Yang *et al.* ont traité des cellules en culture avec du P85, et ont observé une stimulation de la transfection médiée par le PEI dépendante du promoteur du plasmide utilisé. Ainsi, seuls les plasmides comprenant des sites de fixation au facteur de transcription NFκB présentaient une transfection stimulée (Yang *et al.* 2008). Yang *et al.* ont démontré que la stimulation de la transfection de polyplexes dans des cellules en culture provenait d'une activation de NFκB qui venait alors stimuler l'expression du gène rapporteur, ainsi que son import nucléaire. L'activation de la voie de signalisation NFκB a déjà été décrite comme facilitatrice de l'import nucléaire d'un plasmide comprenant les séquences de fixation requises (Dean *et al.* 1999; Dean *et al.* 2005), et Mesika *et al.* ont de plus montré que le traitement de cellules avec du TNFα permettait de stimuler son import nucléaire *via* l'activation de protéines karyophiles comme NFκB (Mesika *et al.* 2001; Mesika *et al.* 2005). *In vivo*, les polymères

hydrophobes comme le PE6400 permettent une transfection musculaire d'ADN plasmidique beaucoup plus efficace lorsqu'ils comportent un promoteur CMV que lorsqu'ils comportent un promoteur SV40, confirmant les données obtenues par l'équipe de Kabanov avec du P85.

Nous avons démontré au cours de cette étude que le Lutrol[®] permettait au contraire de stimuler la transfection d'un plasmide indépendamment de son promoteur. En effet, la transfection d'un plasmide comprenant un promoteur SV40 - ne comportant pas d'éléments de réponse à NFκB - était stimulée par le Lutrol[®] dans les mêmes proportions que la transfection d'un plasmide comportant un promoteur CMV. En outre, les cellules traitées avec le Lutrol[®] avant la transfection de lipoplexes ne présentaient pas d'activation de NFκB par rapport aux cellules non traitées. *In vivo*, les polymères plus hydrophiles, comme le Lutrol[®], le F108 ou le F38 permettent de transférer de l'ADN plasmidique dans le muscle indépendamment du promoteur, confirmant les résultats que nous avons obtenus *in vitro*.

Contrairement aux polymères présentant une HLB intermédiaires, les polymères présentant une HLB élevée comme le Lutrol[®] ne semblent pas agir sur les étapes tardives de la transfection d'un plasmide telles que son import nucléaire ou son expression. De par leur mode d'action indépendant de l'activation de voies de signalisations inflammatoires, les copolymères à blocs tels que le Lutrol[®] semblent particulièrement adaptés à la transfection *in vivo* de protéines d'intérêt thérapeutiques.

Dans le cadre du transfert de gène de protéines sécrétées en particulier, la furtivité du vecteur est un des paramètres majeurs permettant de s'affranchir au maximum de réactions immunitaires dirigées contre la protéine transgénique. Le déclenchement de réponse immunitaires dirigées contre la protéine néo-exprimée peut être contrôlé en répartissant la quantité d'ADN transférée en plusieurs injections (Richard-Fiardo *et al.* 2008). En effet, la diminution de la dose d'acides nucléiques transférée permet d'atténuer la stimulation des sensors de l'ADN cytosolique comme DAI, qui sont des éléments majeurs de la défense contre les infections virales en engendrant une réponse inflammatoire massive de la part des cellules activées. Cependant, l'expression de ces sensors est elle-même activée par certains médiateurs de l'inflammation comme l'IFN-α/β ou NFκB (Takaoka and Taniguchi 2008). Or, les polymères hydrophiles tels que le Lutrol[®] n'activent pas ces sensors. De plus, ils n'induisent pas la production d'IL6 et ne stimulent pas le recrutement lymphocytaire au niveau du site d'injection. Les copolymères à blocs amphiphiles présentant une HLB élevée comme le Lutrol[®] sont donc des vecteurs assez efficaces pour considérablement réduire la dose d'ADN injectée, et permettre l'expression d'une quantité suffisante de protéine d'intérêt, mais sont également des vecteurs inertes ne provoquant aucune réaction inflammatoire.

Cette étude a donc permis de mieux appréhender les différentes caractéristiques inhérentes aux différents types de copolymères à blocs utilisés en transfert de gène. Les copolymères à blocs hydrophiles comme le Lutrol® permettent de transférer efficacement un transgène *via* un mécanisme passif et inerte, autorisant leur utilisation pour des approches de transfert de gène d'intérêt thérapeutique difficile à mettre en œuvre car particulièrement sujettes aux réactions immunitaires.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus permet de proposer le mécanisme d'action du Lutrol® *in vivo* et d'expliquer son incapacité à transférer des cellules en culture (Figure 55).

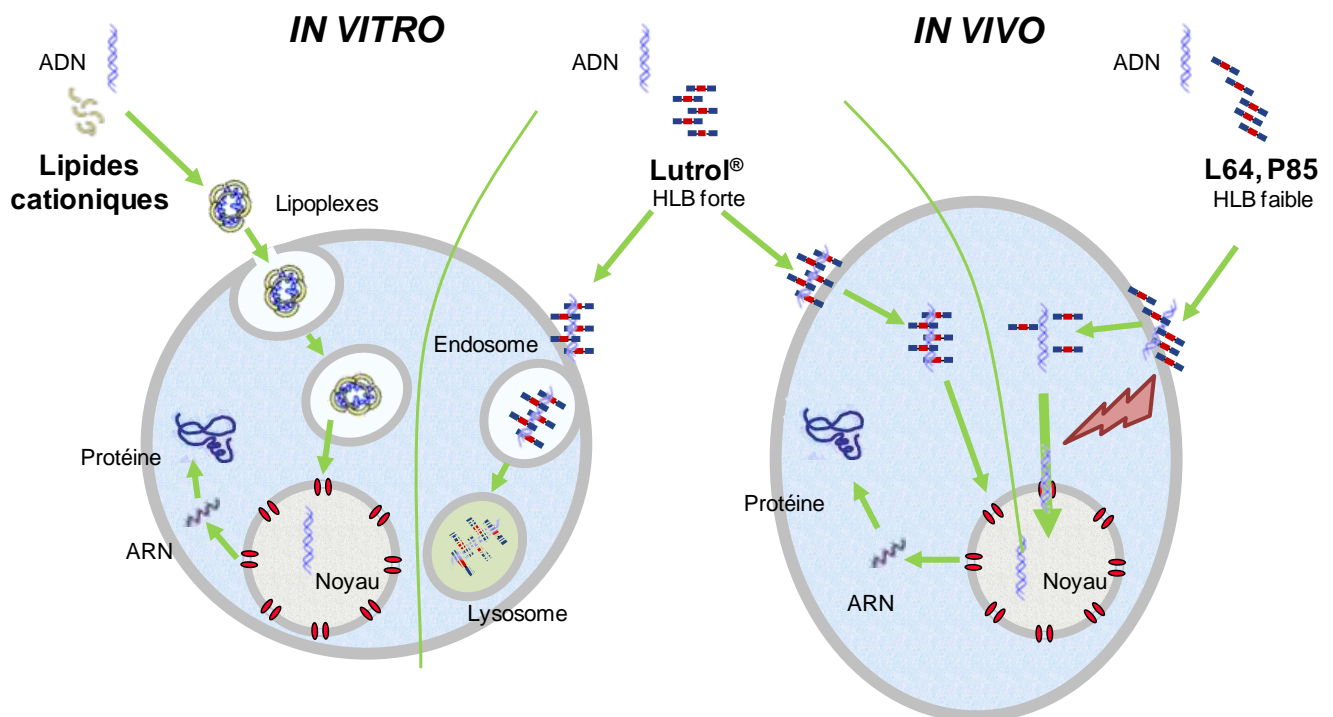


Figure 55 : Schéma récapitulatif.

In vitro, les lipoplexes sont internalisés par endocytose et permettent l'échappement endosomal du transgène, qui peut rejoindre le noyau pour être transcrit. Le Lutrol® permet de faciliter l'interaction des acides nucléiques aux membranes, et donc une internalisation par endocytose, mais contrairement aux vecteurs cationiques, il est inapte à provoquer l'échappement endosomal du transgène, et ce dernier est dégradé.

In vivo, le Lutrol® permet une internalisation directe dans le cytosol des cellules, sans passer par la voie endocytaire. Il potentialise la transfection d'un ADN plasmidique en facilitant son interaction avec les membranes ciblées, ce qui aboutit à une internalisation

plus efficace. L'interaction du lutrol avec les membranes n'engendre pas de perturbations biologiques, et n'active pas de voies de signalisation inflammatoires.

A contrario, les polymères plus hydrophobes comme le L64 ou le P85 activent des voies de signalisations inflammatoires qui aboutissent à la translocation nucléaire d'NFκB ce qui présente l'avantage de faciliter l'import nucléaire et la transcription du transgène ; l'efficacité de ces polymères est cependant tributaire de la présence de promoteurs spécifiques des facteurs de transcription activés, mais favorise surtout la mise en place de réponses immunitaires.

Références bibliographiques

- Akita, H., Ito, R., Khalil, I. A., Futaki, S., and Harashima, H. (2004) Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. *Mol Ther* **9**, 443-451.
- Alakhov, V. Y., Moskaleva, E. Y., Batrakova, E. V., and Kabanov, A. V. (1996) Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconj Chem* **7**, 209-216.
- Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., and Hatton, T. A. (1994) Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* **27**, 2414-2425.
- Almofti, M. R., Harashima, H., Shinohara, Y., Almofti, A., Baba, Y., and Kiwada, H. (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Arch Biochem Biophys* **410**, 246-253.
- 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.
- Banks, G. A., Roselli, R. J., Chen, R., and Giorgio, T. D. (2003) A model for the analysis of nonviral gene therapy. *Gene Ther* **10**, 1766-1775.
- Barry, M. E., Pinto-Gonzalez, D., Orson, F. M., McKenzie, G. J., Petry, G. R., and Barry, M. A. (1999) Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum Gene Ther* **10**, 2461-2480.
- 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.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- Batrakova, E., Lee, S., Li, S., Venne, A., Alakhov, V., and Kabanov, A. (1999) Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. *Pharm Res* **16**, 1373-1379.
- Batrakova, E. V., Dorodnych, T. Y., Klinskii, E. Y., Kliushnenkova, E. N., Shemchukova, O. B., Goncharova, O. N., Arjakov, S. A., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (1996) Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *Br J Cancer* **74**, 1545-1552.
- Batrakova, E. V., Han, H. Y., Miller, D. W., and Kabanov, A. V. (1998) Effects of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm Res* **15**, 1525-1532.
- 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.

- Batrakova, E. V., Li, S., Alakhov, V. Y., Elmquist, W. F., Miller, D. W., and Kabanov, A. V. (2003a) Sensitization of cells overexpressing multidrug-resistant proteins by pluronic P85. *Pharm Res* **20**, 1581-1590.
- Batrakova, E. V., Li, S., Alakhov, V. Y., Miller, D. W., and Kabanov, A. V. (2003b) 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.
- Batrakova, E. V., Li, S., Elmquist, W. F., Miller, D. W., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (2001a) Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Br J Cancer* **85**, 1987-1997.
- Batrakova, E. V., Li, S., Vinogradov, S. V., Alakhov, V. Y., Miller, D. W., and Kabanov, A. V. (2001b) Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 483-493.
- 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.
- 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.
- Blaveri, K., Heslop, L., Yu, D. S., Rosenblatt, J. D., Gross, J. G., Partridge, T. A., and Morgan, J. E. (1999) Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev Dyn* **216**, 244-256.
- 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.
- Breuzard, G., Tertilt, M., Goncalves, C., Cheradame, H., Geguan, P., Pichon, C., and Midoux, P. (2008) Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res* **36**, e71.
- Brissault, B., Kichler, A., Leborgne, C., Danos, O., Cheradame, H., Gau, J., Auvray, L., and Guis, C. (2006) Synthesis, characterization, and gene transfer application of poly(ethylene glycol-b-ethylenimine) with high molar mass polyamine block. *Biomacromolecules* **7**, 2863-2870.
- Brisson, M. and Huang, L. (1999) Liposomes: conquering the nuclear barrier. *Curr Opin Mol Ther* **1**, 140-146.
- Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M., and Wagner, E. (2000) Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* **7**, 401-407.

- Cao, Y., Rodriguez, A., Vacanti, M., Ibarra, C., Arevalo, C., and Vacanti, C. A. (1998) Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* **9**, 475-487.
- Capecchi, M. R. (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22**, 479-488.
- 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.
- Cellesi, F. and Tirelli, N. (2005) A new process for cell microencapsulation and other biomaterial applications: Thermal gelation and chemical cross-linking in "tandem". *J Mater Sci Mater Med* **16**, 559-565.
- Chang, S. F., Chang, H. Y., Tong, Y. C., Chen, S. H., Hsaio, F. C., Lu, S. C., and Liaw, J. (2004) Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther* **15**, 481-493.
- Chen, Y. C., Liang, H. D., Zhang, Q. P., Blomley, M. J., and Lu, Q. L. (2006) Pluronic block copolymers: novel functions in ultrasound-mediated gene transfer and against cell damage. *Ultrasound Med Biol* **32**, 131-137.
- Chen, Z. and Rand, R. P. (1997) The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys J* **73**, 267-276.
- Chen, Z. Y., He, C. Y., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003) Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* **8**, 495-500.
- Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U., and Macino, G. (1996) Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* **15**, 3153-3163.
- Cogoni, C. and Macino, G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 638-643.
- Conner, S. D. and Schmid, S. L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37-44.
- Coonrod, A., Li, F. Q., and Horwitz, M. (1997) On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* **4**, 1313-1321.
- Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H., and Birnstiel, M. L. (1990) Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4033-4037.
- Cullis, P. R., Hope, M. J., and Tilcock, C. P. (1986) Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem Phys Lipids* **40**, 127-144.
- Danko, I., Fritz, J. D., Jiao, S., Hogan, K., Latendresse, J. S., and Wolff, J. A. (1994) Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther* **1**, 114-121.

- Danson, S., Ferry, D., Alakhov, V., Margison, J., Kerr, D., Jowle, D., Brampton, M., Halbert, G., and Ranson, M. (2004) Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer. *Br J Cancer* **90**, 2085-2091.
- Darquet, A. M., Rangara, R., Kreiss, P., Schwartz, B., Naimi, S., Delaere, P., Crouzet, J., and Scherman, D. (1999) Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther* **6**, 209-218.
- Dauty, E. and Verkman, A. S. (2005) Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J Biol Chem* **280**, 7823-7828.
- Davies, J. T. Surface activity. 1[2], 146. 1959. Proc. Int. Congr., Butterworth, London. 1959. Ref Type: Conference Proceeding
- Davis, H. L., Whalen, R. G., and Demeneix, B. A. (1993) Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* **4**, 151-159.
- Davis, M. E. (2002) Non-viral gene delivery systems. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 128-131.
- Dean, D. A. (1997) Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* **230**, 293-302.
- 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.
- Dean, D. A., Strong, D. D., and Zimmer, W. E. (2005) Nuclear entry of nonviral vectors. *Gene Ther* **12**, 881-890.
- 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.
- Dishart, K. L., Denby, L., George, S. J., Nicklin, S. A., Yendluri, S., Tuerk, M. J., Kelley, M. P., Donahue, B. A., Newby, A. C., Harding, T., and Baker, A. H. (2003) Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 739-748.
- Douglas, K. L., Piccirillo, C. A., and Tabrizian, M. (2008) Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur J Pharm Biopharm* **68**, 676-687.
- Dowty, M. E., Williams, P., Zhang, G., Hagstrom, J. E., and Wolff, J. A. (1995) Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4572-4576.

- Dufes, C., Keith, W. N., Bilisland, A., Proutski, I., Uchegbu, I. F., and Schatzlein, A. G. (2005) Synthetic anticancer gene medicine exploits intrinsic antitumor activity of cationic vector to cure established tumors. *Cancer Res* **65**, 8079-8084.
- Dworetzky, S. I., Lanford, R. E., and Feldherr, C. M. (1988) The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *J Cell Biol* **107**, 1279-1287.
- Dykes, G. M., Brierley, L. J., Smith, D. K., McGrail, P. T., and Seeley, G. J. (2001) Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches. *Chemistry* **7**, 4730-4739.
- 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.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Epperson, J. D., Dodge, J., Rill, R. L., and Greenbaum, N. L. (2001) Analysis of oligonucleotides and unincorporated nucleotides from in vitro transcription by capillary electrophoresis in Pluronic F127 gels. *Electrophoresis* **22**, 771-778.
- Erukova, V. Y., Krylova, O. O., Antonenko, Y. N., and Melik-Nubarov, N. S. (2000) Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. *Biochim Biophys Acta* **1468**, 73-86.
- 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.
- 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.
- Farhood, H., Serbina, N., and Huang, L. (1995) The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* **1235**, 289-295.
- Feldman, L. J., Pastore, C. J., Aubailly, N., Kearney, M., Chen, D., Perricaudet, M., Steg, P. G., and Isner, J. M. (1997) Improved efficiency of arterial gene transfer by use of poloxamer 407 as a vehicle for adenoviral vectors. *Gene Ther* **4**, 189-198.
- Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L, Jessee JA, Seymour L, Szoka F, Thierry AR, Wagner E, and Wu G (1997) Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* **8**, 511-2.
- 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. and Ringold, G. M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* **337**, 387-388.

- 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.
- 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.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Friend, D. S., Papahadjopoulos, D., and Debs, R. J. (1996) Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1278**, 41-50.
- Gao, X. and Huang, L. (1991) A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **179**, 280-285.
- Gao, X. and Huang, L. (1995) Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* **2**, 710-722.
- 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.
- Gebhart, C. L. and Kabanov, A. V. (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release* **73**, 401-416.
- Gebhart, C. L., Sriadibhatla, S., Vinogradov, S., Lemieux, P., Alakhov, V., and Kabanov, A. V. (2002) Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer. *Bioconjug Chem* **13**, 937-944.
- Geiger, R. C., Taylor, W., Glucksberg, M. R., and Dean, D. A. (2006) Cyclic stretch-induced reorganization of the cytoskeleton and its role in enhanced gene transfer. *Gene Ther* **13**, 725-731.
- Gilmore, T. D. (1999) The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* **18**, 6842-6844.
- Goncalves, C., Mennesson, E., Fuchs, R., Gorvel, J. P., Midoux, P., and Pichon, C. (2004) Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells. *Mol Ther* **10**, 373-385.
- 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.
- Greenebaum, B., Blossfield, K., Hannig, J., Carrillo, C. S., Beckett, M. A., Weichselbaum, R. R., and Lee, R. C. (2004) Poloxamer 188 prevents acute necrosis of adult skeletal muscle cells following high-dose irradiation. *Burns* **30**, 539-547.

- Haensler, J. and Szoka, F. C., Jr. (1993) Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconj Chem* **4**, 372-379.
- Hagstrom, J. E., Rybakova, I. N., Staeva, T., Wolff, J. A., and Ervasti, J. M. (1996) Nonnuclear DNA binding proteins in striated muscle. *Biochem Mol Med* **58**, 113-121.
- Hartikka, J., Sukhu, L., Buchner, C., Hazard, D., Bozoukova, V., Margalith, M., Nishioka, W. K., Wheeler, C. J., Manthorp, M., and Sawdey, M. (2001) Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther* **4**, 407-415.
- Hebert, E. (2003) Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy? *Biol Cell* **95**, 59-68.
- Herweijer, H., Zhang, G., Subbotin, V. M., Budker, V., Williams, P., and Wolff, J. A. (2001) Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J Gene Med* **3**, 280-291.
- Hirsch-Lerner, D., Zhang, M., Eliyahu, H., Ferrari, M. E., Wheeler, C. J., and Barenholz, Y. (2005) Effect of "helper lipid" on lipoplex electrostatics. *Biochim Biophys Acta* **1714**, 71-84.
- Hunter, R. L. and Bennett, B. (1984) The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. II. Antibody formation and inflammation related to the structure of triblock and octablock copolymers. *J Immunol* **133**, 3167-3175.
- Hunter, R. L. and Bennett, B. (1986) The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. III. Characterization of selected biologically active surfaces. *Scand J Immunol* **23**, 287-300.
- Ingram, D. A., Forman, M. B., and Murray, J. J. (1992) Phagocytic activation of human neutrophils by the detergent component of fluosol. *Am J Pathol* **140**, 1081-1087.
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-48.
- 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.
- Jans, D. A. and Hubner, S. (1996) Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* **76**, 651-685.
- Johnston, T. P. and Miller, S. C. (1985) Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. *J Parenter Sci Technol* **39**, 83-89.
- Johnston, T. P. and Miller, S. C. (1989) Inulin disposition following intramuscular administration of an inulin/poloxamer gel matrix. *J Parenter Sci Technol* **43**, 279-286.
- Kabanov, A., Zhu, J., and Alakhov, V. (2005) Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. *Adv Genet* **53PA**, 231-261.

- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., and Alakhov, V. Y. (2002a) Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 759-779.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., and Miller, D. W. (2003) Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 151-164.
- Kabanov, A. V., Lemieux, P., Vinogradov, S., and Alakhov, V. (2002b) Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 223-233.
- Kakudo, T., Chaki, S., Futaki, S., Nakase, I., Akaji, K., Kawakami, T., Maruyama, K., Kamiya, H., and Harashima, H. (2004) Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* **43**, 5618-5628.
- 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.
- Karpati, G. and Acsadi, G. (1993) The potential for gene therapy in Duchenne muscular dystrophy and other genetic muscle diseases. *Muscle Nerve* **16**, 1141-1153.
- Katsel, P. L. and Greenstein, R. J. (2000) Eukaryotic gene transfer with liposomes: effect of differences in lipid structure. *Biotechnol Annu Rev* **5**, 197-220.
- Ke, Y., McGraw, C. L., Hunter, R. L., and Kapp, J. A. (1997) Nonionic triblock copolymers facilitate delivery of exogenous proteins into the MHC class I and class II processing pathways. *Cell Immunol* **176**, 113-121.
- Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., and Harashima, H. (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev* **58**, 32-45.
- Kichler, A., Leborgne, C., Coeytaux, E., and Danos, O. (2001) Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* **3**, 135-144.
- 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.
- 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.
- Koping-Hoggard, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Varum, K. M., and Artursson, P. (2001) Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther* **8**, 1108-1121.
- Krieg, A. M. (1999) Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *J Gene Med* **1**, 56-63.
- 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.
- Krylova, O. O. and Pohl, P. (2004) Ionophoric activity of pluronic block copolymers. *Biochemistry* **43**, 3696-3703.

- Kukowska-Latallo, J. F., Bielinska, A. U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D. A., and Baker, J. R., Jr. (1996) Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4897-4902.
- Kuo, J. H. (2003) Effect of Pluronic-block copolymers on the reduction of serum-mediated inhibition of gene transfer of polyethyleneimine-DNA complexes. *Biotechnol Appl Biochem* **37**, 267-271.
- Kwon, S. H., Kim, S. Y., Ha, K. W., Kang, M. J., Huh, J. S., Im, T. J., Kim, Y. M., Park, Y. M., Kang, K. H., Lee, S., Chang, J. Y., Lee, J., and Choi, Y. W. (2007) Pharmaceutical evaluation of genistein-loaded pluronic micelles for oral delivery. *Arch Pharm Res* **30**, 1138-1143.
- 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.
- Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B., Monck, M., Graham, R. W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodovich, H., and Lukacs, G. L. (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* **6**, 482-497.
- Lee, R. C., Hannig, J., Matthews, K. L., Myerov, A., and Chen, C. T. (1999) Pharmaceutical therapies for sealing of permeabilized cell membranes in electrical injuries. *Ann N Y Acad Sci* **888**, 266-273.
- Lee, R. C., River, L. P., Pan, F. S., Ji, L., and Wollmann, R. L. (1992) Surfactant-induced sealing of electropermeabilized skeletal muscle membranes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4524-4528.
- 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.
- Levy, M. Y., Barron, L. G., Meyer, K. B., and Szoka, F. C., Jr. (1996) Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther* **3**, 201-211.
- Li, S. and Ma, Z. (2001) Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther* **1**, 201-226.
- 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.
- Linse, P. (1993) Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymers in aqueous solution. *Macromolecules* **26**, 4437-4449.
- Liu D, Ren T, and Gao X (2003) Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* **10**, 1307-15.
- Liu, F., Yang, J., Huang, L., and Liu, D. (1996) Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. *Pharm Res* **13**, 1642-1646.

- 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.
- Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., and Verkman, A. S. (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* **275**, 1625-1629.
- MacDonald, R. I. (1985) Membrane fusion due to dehydration by polyethylene glycol, dextran, or sucrose. *Biochemistry* **24**, 4058-4066.
- Mahato, R. I., Takakura, Y., and Hashida, M. (1997) Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**, 133-172.
- Maillard, L., Van Belle, E., Tio, F. O., Rivard, A., Kearney, M., Branellec, D., Steg, P. G., Isner, J. M., and Walsh, K. (2000) Effect of percutaneous adenovirus-mediated Gax gene delivery to the arterial wall in double-injured atheromatous stented rabbit iliac arteries. *Gene Ther* **7**, 1353-1361.
- Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M., and Dwarki, V. (1993) Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* **4**, 419-431.
- March, K. L., Madison, J. E., and Trapnell, B. C. (1995) Pharmacokinetics of adenoviral vector-mediated gene delivery to vascular smooth muscle cells: modulation by poloxamer 407 and implications for cardiovascular gene therapy. *Hum Gene Ther* **6**, 41-53.
- Maskarinec, S. A., Hannig, J., Lee, R. C., and Lee, K. Y. (2002) Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys J* **82**, 1453-1459.
- Matsui, H., Johnson, L. G., Randell, S. H., and Boucher, R. C. (1997) Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem* **272**, 1117-1126.
- Matsumura, Y. and Maeda, H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46**, 6387-6392.
- 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.
- McLachlan, G., Davidson, D. J., Stevenson, B. J., Dickinson, P., Davidson-Smith, H., Dorin, J. R., and Porteous, D. J. (1995) Evaluation in vitro and in vivo of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. *Gene Ther* **2**, 614-622.
- Melchior, F. and Gerace, L. (1995) Mechanisms of nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 310-318.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700.
- Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J., and Kissel, T. (2002) Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by

- using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments. *Pharm Res* **19**, 140-146.
- Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M., and Reich, Z. (2001) A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol Ther* **3**, 653-657.
- Mesika, A., Kiss, V., Brumfeld, V., Ghosh, G., and Reich, Z. (2005) Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Hum Gene Ther* **16**, 200-208.
- Miller, A. M. and Dean, D. A. (2008) Cell-specific nuclear import of plasmid DNA in smooth muscle requires tissue-specific transcription factors and DNA sequences. *Gene Ther* **15**, 1107-1115.
- Miller, D. W., Batrakova, E. V., Waltner, T. O., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (1997) Interactions of pluronic block copolymers with brain microvessel endothelial cells: evidence of two potential pathways for drug absorption. *Bioconjug Chem* **8**, 649-657.
- Minko, T., Batrakova, E. V., Li, S., Li, Y., Pakunlu, R. I., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (2005) Pluronic block copolymers alter apoptotic signal transduction of doxorubicin in drug-resistant cancer cells. *J Control Release* **105**, 269-278.
- Mislick, K. A. and Baldeschwieler, J. D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12349-12354.
- Moghimi, S. M. and Gray, T. (1997) A single dose of intravenously injected poloxamine-coated long-circulating particles triggers macrophage clearance of subsequent doses in rats. *Clin Sci (Lond)* **93**, 371-379.
- Moghimi, S. M. and Hunter, A. C. (2000) Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol* **18**, 412-420.
- Moradpour, D., Schauer, J. I., Zurawski, V. R., Jr., Wands, J. R., and Boutin, R. H. (1996) Efficient gene transfer into mammalian cells with cholesteryl-spermidine. *Biochem Biophys Res Commun* **221**, 82-88.
- Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., and Benoit, J. P. (2008) Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* **29**, 3477-3496.
- Moss, E. G. and Taylor, J. M. (2003) Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nat Cell Biol* **5**, 771-772.
- Nalbandian, R. M., Henry, R. L., Balko, K. W., Adams, D. V., and Neuman, N. R. (1987) Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. *J Biomed Mater Res* **21**, 1135-1148.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Newman, M. J., Actor, J. K., Balusubramanian, M., and Jagannath, C. (1998) Use of nonionic block copolymers in vaccines and therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **15**, 89-142.

- Nguyen, H. K., Lemieux, P., Vinogradov, S. V., Gebhart, C. L., Guerin, N., Paradis, G., Bronich, T. K., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. V. (2000) Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther* **7**, 126-138.
- Pampinella, F., Lechardeur, D., Zanetti, E., MacLachlan, I., Benharouga, M., Lukacs, G. L., and Vitiello, L. (2002) Analysis of differential lipofection efficiency in primary and established myoblasts. *Mol Ther* **5**, 161-169.
- 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.
- Pollard, H., Toumaniantz, G., Amos, J. L., Avet-Loiseau, H., Guihard, G., Behr, J. P., and Escande, D. (2001) Ca²⁺-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *J Gene Med* **3**, 153-164.
- Pouton, C. W., Lucas, P., Thomas, B. J., Uduehi, A. N., Milroy, D. A., and Moss, S. H. (1998) Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release* **53**, 289-299.
- Prokop, A., Kozlov, E., Moore, W., and Davidson, J. M. (2002) Maximizing the in vivo efficiency of gene transfer by means of nonviral polymeric gene delivery vehicles. *J Pharm Sci* **91**, 67-76.

- Prud'homme, G. J. (2000) Gene therapy of autoimmune diseases with vectors encoding regulatory cytokines or inflammatory cytokine inhibitors. *J Gene Med* **2**, 222-232.
- Qin, L., Ding, Y., Pahud, D. R., Chang, E., Imperiale, M. J., and Bromberg, J. S. (1997) Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gene Ther* **8**, 2019-2029.
- Rejman, J., Bragonzi, A., and Conese, M. (2005) Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther* **12**, 468-474.
- Rejman, J., Conese, M., and Hoekstra, D. (2006) Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *J Liposome Res* **16**, 237-247.
- Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., and Chernomordik, L. V. (2005a) Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* **280**, 15300-15306.
- Richard, P., Bossard, F., Desigaux, L., Lanctin, C., Bello-Roufai, M., and Pitard, B. (2005b) Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum Gene Ther* **16**, 1318-1324.
- 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.
- Rill, R. L., Locke, B. R., Liu, Y., and Van Winkle, D. H. (1998) Electrophoresis in lyotropic polymer liquid crystals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1534-1539.
- Rodeheaver, G. T., Kurtz, L., Kircher, B. J., and Edlich, R. F. (1980) Pluronic F-68: a promising new skin wound cleanser. *Ann Emerg Med* **9**, 572-576.
- Sainlos, M. (2004) Transfert de genes à l'aide de substances bioactives. *Thèse de Doctorat de l'Université de Paris 6*.
- 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.
- Sakurai, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Nakagawa, S., and Mizuguchi, H. (2008) Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int J Pharm* **354**, 9-15.
- Schillen, K., Jansson, J., Lof, D., and Costa, T. (2008) Mixed micelles of a PEO-PPO-PEO triblock copolymer (P123) and a nonionic surfactant (C12EO6) in water. a dynamic and static light scattering study. *J Phys Chem B* **112**, 5551-5562.
- Sebestyen, M. G., Ludtke, J. J., Bassik, M. C., Zhang, G., Budker, V., Lukhtanov, E. A., Hagstrom, J. E., and Wolff, J. A. (1998) DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat Biotechnol* **16**, 80-85.
- Serbest, G., Horwitz, J., Jost, M., and Barbee, K. (2006) Mechanisms of cell death and neuroprotection by poloxamer 188 after mechanical trauma. *FASEB J* **20**, 308-310.

Simoes, S., Slepishkin, V., Pires, P., Gaspar, R., de Lima, M. P., and Duzgunes, N. (1999) Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides. *Gene Ther* **6**, 1798-1807.

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.

Stetson, D. B. and Medzhitov, R. (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**, 93-103.

Szoka, F., Jr. and Papahadjopoulos, D. (1978) Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4194-4198.

Tachibana, R., Harashima, H., Shinohara, Y., and Kiwada, H. (2001) Quantitative studies on the nuclear transport of plasmid DNA and gene expression employing nonviral vectors. *Adv Drug Deliv Rev* **52**, 219-226.

Takaoka, A. and Taniguchi, T. (2008) Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 847-857.

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.

Tang, M. X., Redemann, C. T., and Szoka, F. C., Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem* **7**, 703-714.

Thacker, E. L., Holtkamp, D. J., Khan, A. S., Brown, P. A., and Draghia-Akli, R. (2006) Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Anim Sci* **84**, 733-742.

Tseng, W. C., Haselton, F. R., and Giorgio, T. D. (1997) Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J Biol Chem* **272**, 25641-25647.

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.

Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., and Giacca, M. (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **276**, 3254-3261.

Vacik, J., Dean, B. S., Zimmer, W. E., and Dean, D. A. (1999) Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther* **6**, 1006-1014.

Valle, J. W., Lawrance, J., Brewer, J., Clayton, A., Corrie, P., Alakhov, V., and Ranson, M. A phase II, window study of SP1049C as first-line therapy in inoperable metastatic adenocarcinoma of the oesophagus. ASCO Annual Meeting . 2004.
Ref Type: Conference Proceeding

Van Belle, E., Maillard, L., Rivard, A., Fabre, J. E., Couffinhal, T., Kearney, M., Branellec, D., Feldman, L. J., Walsh, K., and Isner, J. M. (1998) Effects of poloxamer 407 on transfection

time and percutaneous adenovirus-mediated gene transfer in native and stented vessels. *Hum Gene Ther* **9**, 1013-1024.

Venne, A., Li, S., Mandeville, R., Kabanov, A., and Alakhov, V. (1996) Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res* **56**, 3626-3629.

Verbaan, F. J., Oussoren, C., van Dam, I. M., Takakura, Y., Hashida, M., Crommelin, D. J., Hennink, W. E., and Storm, G. (2001) The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. *Int J Pharm* **214**, 99-101.

Vercellotti, G. M., Hammerschmidt, D. E., Craddock, P. R., and Jacob, H. S. (1982) Activation of plasma complement by perfluorocarbon artificial blood: probable mechanism of adverse pulmonary reactions in treated patients and rationale for corticosteroids prophylaxis. *Blood* **59**, 1299-1304.

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.

Vlahos, A., Yu, P., Lucas, C. E., and Ledgerwood, A. M. (2001) Effect of a composite membrane of chitosan and poloxamer gel on postoperative adhesive interactions. *Am Surg* **67**, 15-21.

Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., and Birnstiel, M. L. (1992) Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7934-7938.

Wang, Z., Choi, M. K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K., and Taniguchi, T. (2008) Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5477-5482.

Whittaker, G. R. and Helenius, A. (1998) Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* **246**, 1-23.

Wolfert, M. A., Dash, P. R., Nazarova, O., Oupicky, D., Seymour, L. W., Smart, S., Strohal, 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.

Wolff, J. A., Dowty, M. E., Jiao, S., Repetto, G., Berg, R. K., Ludtke, J. J., Williams, P., and Slautterback, D. B. (1992) Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci* **103 (Pt 4)**, 1249-1259.

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.

Woods, A. and Couchman, J. R. (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* **5**, 183-192.

Wrobel, I. and Collins, D. (1995) Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim Biophys Acta* **1235**, 296-304.

- Wu, G., Majewski, J., Ege, C., Kjaer, K., Weygand, M. J., and Lee, K. Y. (2005) Interaction between lipid monolayers and poloxamer 188: an X-ray reflectivity and diffraction study. *Biophys J* **89**, 3159-3173.
- 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) 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.
- Yasuda, S., Townsend, D., Michele, D. E., Favre, E. G., Day, S. M., and Metzger, J. M. (2005) Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* **436**, 1025-1029.
- Young, J. L., Benoit, J. N., and Dean, D. A. (2003) Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Ther* **10**, 1465-1470.
- Young, J. L., Zimmer, W. E., and Dean, D. A. (2008) Smooth muscle-specific gene delivery in the vasculature based on restriction of DNA nuclear import. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**, 840-848.
- 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.
- Zanta, M. A., Belguise-Valladier, P., and Behr, J. P. (1999) Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 91-96.
- Zhou, X. and Huang, L. (1994) DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* **1189**, 195-203.

Publications

ARTICLE 1

Chevre, R., Le Bihan, O., Beilvert, F., Chatin, B., Barteau, B., Lambert, O., Pitard, B. (2009) Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. *Nucleic Acids Res*, en révision.

ARTICLE 2

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.

ARTICLE 3

Le Bihan, O., **Chevre, R.**, Mornet, S., Garnier, B., Pitard, B., Lambert, O. (2009) Probing the mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. *Nucleic Acids Res*, en révision.

ARTICLE 4

Chisholm, E. J., Vassaux, G., Martin-Duque, P., **Chevre, R.**, Lambert, O., Pitard, B., Merron, A., Weeks, M., Burnet, J., Peerlinck, I., Dai, M. S., Alusi, G., Mather, S. J., Bolton, K., Uchegbu, I. F., Schatzlein, A. G., and Baril, P. (2009) Cancer-specific transgene expression mediated by systemic injection of nanoparticles. *Cancer Res* **69**, 2655-2662.

ARTICLE 5

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.

ARTICLE 6

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.

REVUE 1

Labas, R., Barteau, B., Beilvert, F., David, S., **Chevre, R.**, Pitard, B. (2009) Nature as an inspiration for the development of cationic transfection lipids. *Genetica*, sous presse.

REVUE 2

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.



Amphiphilic Block Copolymers Enhance the Cellular Uptake of DNA Molecules through a Facilitated Plasma Membrane Transport

Journal:	<i>Nucleic Acids Research</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	2 Standard Manuscript - UK Editorial Office
Key Words:	amphiphilic block copolymers, gene transfer, cellular uptake



review

Amphiphilic Block Copolymers Enhance the Cellular Uptake of DNA Molecules through a Facilitated Plasma Membrane Transport

Raphaël Chèvre,^{‡,§} Olivier Le Bihan,[⊥] Fanny Beilvert,^{‡,§} Benoit Chatin^{‡,§}, Benoit Barteau,^{‡,§,#} Olivier Lambert,[⊥] and Bruno Pitard^{*,‡,§,#}

[‡]INSERM, U915, Nantes, F-44000 France. [§]Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France. [⊥] CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux 1-ENITAB, Avenue des Facultés, Talence, F-33405 France. [#]IN-CELL-ART, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, F-44093 France.

*Corresponding author: Bruno PITARD, INSERM U915, IRT-UN, 8 quai Moncoussu, BP70721, 44007 Nantes cedex1, France. Tel: 33228080128; Fax: 33228080130. E-mail: bruno.pitard@nantes.inserm.fr.

ABSTRACT

Amphiphilic block copolymers have been developed recently for their efficient *in vivo* transfection activities in various tissues. Surprisingly, we observed that Lutrol®, an amphiphilic block copolymer family member, does 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 pretreatment of cells with Lutrol®, prior to their incubation with DNA molecules in the presence of cationic lipid, resulted in higher levels of reporter gene expression compared with levels seen in cells which were not Lutrol®-pretreated. 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 internalisation step is the most important barrier affected by Lutrol®. Microscopic examination of transfected cells pretreated with Lutrol® confirmed that more copies of plasmid DNA were internalised. Our results strongly suggest that Lutrol® improves transfection efficiency by a physico-chemical mechanism, leading to the enhancement of cellular uptake through a direct delivery mechanism into the cell cytoplasm, and not *via* an endosomal pathway.

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 triblock structure of PEO-PPO-PEO or PPO-PEO-PPO, whilst tetra-functionalised, 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 deliver reporter and therapeutic genes in various rodent organs including physiological skeletal and cardiac muscle, lung and eyes (2-6). 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) (7;8). 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 the degree of polymerisation of the ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) units, leading to polymers of molecular weight ranging from 200 to 20 000 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 characterised 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 (9). By contrast, linear PEO-PPO-PEO triblock 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 15 000 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 physico-chemical 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 characterisation of block copolymer/DNA complexes was not performed easily with the same techniques that have been used to describe the physico chemical 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

1
2
3 with block copolymers probably occur mainly through hydrogen bonding, hydrophobic and
4 some ionic interactions, but not *via* strong ionic interactions. On the contrary, strong ionic
5 interactions are observed to occur between DNA and cationic lipids or polymers (10). It has
6 also been reported that block copolymers interact with lipidic film, leading to ionic
7 permeabilisation of the reconstituted artificial membrane (11). More recently, it was reported
8 that a linear triblock copolymer with 50 % PEO acted as a biological modifier, activating the
9 NF κ B inflammation cellular pathway leading to the enhancement of transfection efficiency by
10 the recruitment of transcription factors on the cytomegalovirus promoter, which was used to
11 control the transgene expression (12-14). In fact, we showed previously that PE6400,
12 composed of 40 % PEO, promoted DNA trafficking into the nucleus and increases gene
13 expression when microinjected into the cell cytoplasm (4). Nevertheless, this mechanism for
14 linear block copolymer of a low PEO percentage, which is associated with toxicity, does not
15 necessarily apply to other linear triblock copolymers consisting of a higher PEO percentage
16 which have been reported as non-toxic and efficient for gene transfer.

17
18 In this study, we report that a linear triblock copolymer with 80 % PEO, which has been
19 reported to deliver therapeutic genes in mouse models of human diseases with a very good
20 safety profile (7), mediates the increase of cellular internalisation of DNA and siRNA
21 molecules by a different pathway to that used by cationic lipids or polymers. Our results
22 strongly suggest that 80 % PEO linear triblock copolymers do not promote gene transfer by
23 the activation of inflammation cellular pathways, but rather enhance cellular uptake of DNA
24 molecules through a facilitated plasma membrane transport.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, siRNA, amphiphilic block copolymers and cationic vectors

pCMV-Luc (15) 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) and pCMV-LacZ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) are plasmids encoding green fluorescent protein and β -galactosidase reporter genes, respectively, under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. Plasmids were purified from recombinant *E.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: UUCUCCGAACGUGUCACGU) was provided by Qiagen (Chatsworth, CA). F38 (80 % Poly(ethyleneoxide), molecular weight (MW) 4 700), F68 (80 % Poly(ethyleneoxide), MW 8 400) 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, 2 mM L-glutamine, 10 μ g/ml streptomycin, 100 μ g/ml penicillin. For *in vivo* experiments, stock solutions of block copolymers were prepared at the given weight-to-weight (w/w) in sterilised water. Solutions were stored at 4 °C.

DOSP and BGTC were synthesised as previously described (16-19) and provided by IN-CELL-ART (Nantes, France). DOPE was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Jet-PEI® was obtained from Polyplus (Illkirch, France). ICAfectin® 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 (20).

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 (Chatillon-sur-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 anaesthetised 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 4 with 1 μ g 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 siRNA (37.5 ng) with ICAfectin® 442 were prepared as described by the manufacturer. Hybrid DNA/siRNA lipoplexes were formulated at a charge ratio of 4 with 500 ng DNA mixed with 500 ng siRNA. Complexes of DNA-siRNA 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

1
2
3 medium (4.5 g/l) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 µg/ml streptomycin, 100
4 µg/ml/ml penicillin (GIBCO and Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and with 10 %
5 FBS (Eurobio, Courtaboeuf, France). CHO and CHO-2241 heparan sulfate depleted (CHO
6 HS⁻) cells (a generous gift from P. Fender, Grenoble, France) were grown in the same
7 conditions, replacing DMEM medium by Kaighn's F12 medium (GIBCO, Carlsbad, CA).
8 One day before transfection, cells were transferred into 24-well culture plates, at 60 000 cells
9 per well, resulting in 70-80 % confluence 24 h later. Two hours before transfection, cells were
10 incubated with block copolymers at the given weight-to-weight (w/w) concentration in
11 DMEM serum-supplemented medium or Kaighn's F12 serum-supplemented medium for
12 CHO and CHO HS⁻ cells, respectively. Transfection was performed by adding 50 µl DNA
13 complexes or siRNA/DNA complexes in 450 µl serum-free medium or 107 µl siRNA
14 complexes in 500 µl serum-free medium to each well. For CHO and CHO HS⁻ transfection,
15 100 µl lipoplex, complexed or not with Lutrol®, was added in 450 µl serum-free medium.
16 After 2 h, the transfection medium was replaced by 500 µl fresh serum-supplemented
17 medium. Cells were cultured for an additional 20 h before gene expression was determined.
18 Transfection experiments were performed in duplicate.

21 ***Luciferase and GFP assays***

22 One day after transfection, cells were rinsed with 300 µl phosphate-buffered saline (PBS) and
23 lysed with 300 µl reporter lysis buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
24 supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Complete lysis was
25 assured by one freeze-thaw (-80 °C/20 °C) cycle. Samples were then centrifuged at 10 000
26 rpm for 5 min at 4 °C. Luciferase activity was measured using the Promega Luciferase Assay
27 system (Promega, Madison, WI). Luciferase activity was measured from an aliquot of
28 supernatant with a VICTOR² multilabel counter (Perkin Elmer, Les Ulis, France). Luciferase
29 activity was assayed by measuring light emission after addition of 100 µl luciferase substrate
30 to 20 µl supernatant. Luciferase activity was normalised to the total protein concentration of
31 the sample. Protein content was measured with a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford,
32 IL). GFP fluorescence measurements were performed on a 180 µl aliquot of supernatant using
33 a Victor2 apparatus (PerkinElmer, Les Ulis, France). Fluorescence was normalised to the total
34 protein concentration of the sample.

35 ***Flow cytometry experiments***

36 Twenty hours after transfection, samples of cells (10⁵-10⁶) were collected and re-suspended in
37 PBS. The resulting cell suspension was assayed for the expression of GFP by flow cytometer
38 analysis using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The percentage of GFP-
39 positive cells was determined by the flow cytometer programme.

40 ***Real-time, quantitative RT-PCR***

41 Total RNA was extracted from transfected cells by TRIzol® treatment. Reverse transcription
42 was performed with total RNA using oligo(dT)₂₀ primers and SuperScript III reverse
43 transcriptase (Invitrogen). The expression of lamin A/C was quantified by real-time PCR
44 (ABI prism7000, Applied Biosystems, Foster City, CA). Experiments were performed using
45 PCR Master Mix (Applied Biosystems) with 300 nM each primer and 250 nM TaqMan MGB
46 probes. Primers were obtained from Applied Biosystems. The cycling conditions included a
47 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.
48 Results were normalised to the endogenous hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
49 (HPRT1) control gene and expressed according to the 2^{-ΔΔCT} method (21).

50 ***Labelling of lipoplexes***

51 The labelling procedure of lipoplexes with 15 nm aminated γFe₂O₃@SiO₂ nanoparticles (Nps)
52 is described in detail elsewhere (Le Bihan *et al.*, Probing the mechanism of action of cationic
53 lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale, submitted). Briefly, 3.68 x 10¹¹ Nps and 0.5 µg
54 pCMV-Luc were mixed at a ratio Np/pDNA of 5 (mole/mole) in 300 mM NaCl. Then an
55
56
57
58
59
60

1
2
3 equal volume of cationic liposome in pure water was added, to a final lipoplex charge ratio
4 (+/-) of 4. The formulation was prepared in a 150 µl final volume for each well.
5

6 ***Conventional TEM***

7 Cells were processed for ultramicrotomy according to standard procedures. Briefly, after
8 trypsin treatment, cells from 8 wells were pooled, pelleted and fixed for 2 h in a mixture of
9 2.5 % glutaraldehyde and 4 % paraformaldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4). Sample
10 pellets were then post-fixed for 1 h at 4 °C with 1 % osmium tetroxide in the same buffer and
11 were dehydrated with ethanol before embedding in Epon-Araldite. Thin sections (65 nm
12 thick) were stained successively with 5 % uranyl acetate and 1 % lead citrate, unless stated in
13 the text. TEM observation was performed with a FEI tecnai F20 operated at 200 kV under
14 low-dose conditions.
15

16 ***Quantification of labelled lipoplexes within cell sections***

17 The measurement of Np areas was carried out on images of unstained sections using image J
18 software. Np densities were selected after a manual threshold. The area corresponding to these
19 densities was determined with the “analyse particles” function providing a surface of Nps. To
20 determine the area of cell sections, we drew the cell contour manually and measured the area
21 with the “analyse particles” function. The ratio of Np surface to cell section surface allowed
22 the estimation of the amount of Nps per cell, considering that the 65 nm cell section is in the
23 order of magnitude of Np size. This analysis was performed on 158 cell sections from 13 grid
24 squares in total.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

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 complexed either with Lutrol®, 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 hours and 7 days after transfection, respectively. Injection of 10 µg plasmid DNA complexed with 3 % Lutrol® led to high luciferase expression in mouse tibial anterior muscle, compared with the very low luciferase expression achieved with DOSP/DOPE-DNA lipoplexes. By contrast, transfection of cultured C2C12 with 1 µg of pCMV-Luciferase complexed with Lutrol® 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® 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 (12;14). 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 14 700 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 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 optimised *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 4 (+/-). Pretreatment with Lutrol® led to the enhancement of luciferase expression in C2C12 transfected cells compared with untreated cells (Figure 3A). This improvement in transfection efficiency was also observed with a plasmid encoding another reporter gene; i.e. GFP (Figure 3A). Pretreatment 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® (Figure 3C). Transfection of H1299 cells with Jet PEI was also enhanced by pretreatment with Lutrol® (Figure 3D).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Altogether, these data suggest that the enhancement of transgene expression mediated by pretreatment with Lutrol® did not depend on either the reporter gene, the cell line, or the cationic vector used.

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), pretreatment 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 pretreated 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® 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® after the intracellular internalisation of DNA molecules had occurred. Figure 5A shows that enhancement of luciferase expression was observed only when cells were pretreated with Lutrol®, suggesting that Lutrol® did not promote reporter gene expression stimulation at the transcription or translation level, but rather stimulated steps involved in DNA internalisation, endosomal escape or nuclear targeting.

To strengthen this hypothesis, we studied the influence of temperature on luciferase expression obtained after pretreatment of cells with Lutrol®. As expected, in the absence of pretreatment with Lutrol®, we observed that cationic lipid-mediated transfection was partially inhibited at 4 °C. By contrast, transfection enhancement by Lutrol® 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 physico-chemical process (Figure 5B).

Did Lutrol® increase cytoplasmic or nuclear delivery?

To analyse the contributions of endosomal escape and nuclear import in the enhancement of transgene expression after cell pretreatment with Lutrol®, we studied the influence of cell pretreatment with Lutrol® on gene silencing efficiency (Figure 6). Indeed, gene silencing occurs after the delivery of siRNA in the cell cytoplasm and not in the nucleus. H1299 cells were pre-treated with Lutrol® and then transfected with anti-lamin A/C siRNA complexed with ICAfectin® 442 Reagent, in conditions that partially inhibited lamin A/C expression. In the absence of Lutrol® pretreatment, RT-PCR results showed that the percentage of lamin A/C inhibition was 31 %, whereas Lutrol® pretreatment led to a percentage of inhibition of 58 %, supporting the notion that Lutrol® also enhanced the siRNA transfection process. Next, we decided to study the effect of Lutrol® pretreatment on siRNA transfection using particles similar to the one used for plasmid DNA experiments. 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 4 (+/-). H1299 cells were pre-treated with Lutrol® 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® pretreatment increased this inhibition to 41 %.

1
2
3 These data strongly suggest that Lutrol® enhanced the common steps of plasmid DNA and
4 siRNA transfection, i.e. cellular internalisation and endosomal escape, and did not enhance
5 the terminal steps of plasmid transfection, including nuclear import, transcription and
6 translation.
7

8 9 **Did Lutrol® increase the transfected cell number?**

10 To confirm that block copolymers enhance transfection by DNA molecule internalisation
11 and/or endosomal escape, we measured the percentage of transfected cells by FACS analysis
12 using plasmid DNA encoding GFP, and by optical microscopy using plasmid DNA encoding
13 β -galactosidase. FACS analysis showed a similar percentage of GFP-expressing cells in the
14 presence or absence of Lutrol® pretreatment (Figure 7A). As a control, luciferase expression
15 was strongly enhanced after pretreatment with Lutrol® during the same experiment (Figure
16 7A). These results were also in good agreement with the experiment using β -galactosidase as
17 a reporter gene, as shown by the presence of the same number of blue cells (Figure 7B)
18 irrespective of pretreatment with Lutrol®. However, in these two experiments, we noticed
19 that cells pretreated with Lutrol® expressed the reporter gene at a higher level, as shown by
20 the blue intensity of the cells (Figure 7B). The same observation was made in GFP-transfected
21 cells pretreated with Lutrol® (data not shown). These results strongly suggest that, even if the
22 same number of cells were transfected in the presence of Lutrol®, the number of plasmids
23 entering each cell would certainly be increased.
24
25
26
27

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

29 Next, we investigated if the transfection enhancement observed after lutrol® pretreatment was
30 associated with an increase in lipoplex internalisation. In order to detect DNA cellular uptake
31 by TEM, lipoplexes were labelled with Nanoparticles (NPs). Cells were incubated for two
32 hours in the presence of labelled lipoplexes and then submitted to a fixation procedure.
33 Labelled lipoplexes were observed in both untreated and treated cells and possessed similar
34 morphological aspects indicating that Lutrol® treatment did not modify lipoplex structure
35 (Figures 8C, F). To quantify the cellular uptake of lipoplexes in both conditions, we estimated
36 the Np amount per cell by measuring the Np surface per cell surface (see materials and
37 methods). Our quantitative analysis revealed an increase of DOSP-lipoplex uptake by treated
38 cells, as shown in Figures 8E, 8I. This result suggests that Lutrol® promoted an enhanced
39 DNA internalisation through the cell membrane. As a control, cells transfected with labelled
40 and unlabelled lipoplexes showed similar luciferase activities (data not shown). Moreover, a
41 strong transfection enhancement after cell treatment with Lutrol® was also observed with
42 labelled lipoplexes (data not shown), indicating that Nps did not influence transfection
43 efficiency, confirming findings of Le Bihan *et al.* (Probing the mechanism of action of
44 cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale, submitted). In addition, for both
45 untreated and treated cells, we also determined that the surface of cells containing Nps
46 represented 30 % of the total area of cells, which corresponds to the percentage of transfected
47 cells as indicated by Facs analysis and microscopy on GFP and β -galactosidase transfected
48 cells. Altogether, these results indicated clearly that Lutrol® enhanced the cellular uptake of
49 nucleic acids.
50
51
52
53
54

55 **Lutrol® promoted DNA interaction with cell membranes**

56 As efficient, cationic vector-mediated transfection requires the condensation of DNA in
57 positively charged particles, it has been inferred that anionic proteoglycans are potential
58 receptors (22). Direct evidence for the involvement of heparan sulfate proteoglycans (HSPGs)
59 in transfection has been obtained by several groups (23;24). Figure 9 shows clearly that
60 transfection of heparan sulfate-deficient CHO (CHO HS⁻) cells by DOSP/DOPE-DNA

1
2
3 lipoplexes was strongly decreased compared with that obtained in normal CHO cells. By
4 contrast, CHO HS⁻ transfected by lipoplexes in the presence of Lutrol® exhibited an
5 enhanced luciferase expression. These data strongly suggest that Lutrol® enhanced the
6 interaction of DNA particles with the cell membrane, improving their uptake.
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

DISCUSSION

Amphiphilic block copolymers consisting of ethylene oxide and propylene oxide 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 nonionic block copolymers including Lutrol® and PE6400, or tetra functionalized X-shaped block copolymers, leads to a dramatic increase in transgene expression, using either a reporter or therapeutic gene, in skeletal and cardiac muscle and in lung, as well as in the corresponding pathological tissues such as Duchenne muscular dystrophy muscles and cystic fibrosis lungs (4;6;8;25). 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 (12), and F68/DNA formulations were shown to efficiently transfect eyes by drop delivery (3).

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 internalise culture medium nutrients to sustain their rapid growth. This particular behaviour of *in vitro* cell lines leads to the facile, non-specific internalisation 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 electrostatically with negatively charged molecules such as proteoglycans present at the surface of plasma membranes, and are internalised 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 (26). 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 (27). 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 ethylene oxide. 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 (7;9). We showed by electron microscopy studies that cell pretreatment with Lutrol® dramatically increased DNA molecule internalisation into each transfected cell, subsequently leading to an overall increase in transgene expression for a constant percentage of transfected cells. This observation 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® pretreated cells. These results strongly support a role of Lutrol® in the enhancement of the common step of DNA and siRNA transfection, which is cellular internalisation, 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., using P85 (poly(ethyleneoxide)₂₆-poly(propyleneoxide)₄₀-poly(ethyleneoxide)₂₆) containing 50 % PEO, which activated the NFκB signalling pathway and promoted DNA transfection in a promoter-dependant manner

1
2
3 after intramuscular injection. Indeed, it has been proposed that P85 allows transfection of
4 plasmids with viral promoters containing binding sites for specific transcription factors such
5 as NFkB by the improvement of plasmid nuclear targeting due to the NLS sequences present
6 within the transcription factors bound to the plasmid promoter (12). This signalling pathway
7 activation mechanism was also described by Sriadibhatla et al, who demonstrated that P85
8 activates *in vitro* luciferase transcription in engineered cells expressing luciferase (14). More
9 recently, Yang et al. showed that P85 cell pretreatment also promotes transfection
10 enhancement in a promoter-dependant manner, suggesting a signalling pathway activation-
11 dependent mechanism (28). A previous study with PE6400 containing 40 % PEO also showed
12 that microinjected DNA molecules complexed with PE6400 in the cell cytoplasm led to an
13 increase in transfection efficiency (4). This was probably due to the activation of
14 inflammation pathways resulting in the binding of transcription factors to the CMV promoter,
15 as described with P85.
16

17
18 By contrast, the present study shows that block copolymers of 80 % PEO enhance DNA cell
19 internalisation without displaying any promoter dependence, either *in vivo* or *in vitro*.
20 Transcription factor binding elements present on CMV and SV40 promoters did not influence
21 the transfection efficiency, underlying the absence of promoter-specific signalling pathway
22 stimulation, notably inflammatory such as NFkB signaling pathways. Of note, Q-PCR
23 experiments did not reveal any NFkB transcript enhancement in Lutrol® pretreated cells (data
24 not shown), contrary to what has been described with more hydrophobic block copolymers.
25 Therefore, the present study strongly suggests that these 80 % PEO block copolymers
26 promote nucleic acid internalisation without the activation of previously described
27 inflammatory signalling pathways highlighting their use for the expression of protein of
28 therapeutic interest, as we previously described with erythropoietin expression by
29 intramuscular Epo gene transfer which lasted for at least 250 days (7), and with dystrophin
30 expression in mdx mice (8).
31

32
33 Previous results, and those obtained in this study, have allowed us to propose the *in vivo*
34 mechanism of action of these 80 % PEO block copolymers. Block copolymers interacting
35 with DNA molecules would not only enhance the tissue distribution of DNA molecules, but
36 also their cellular internalisation by a passive physico-chemical mechanism that does not
37 involve an endocytotic process, but rather by a direct delivery to the cytoplasm by fusion with
38 the cell membrane. Indeed, if DNA was internalised *via* an endocytic pathway *in vivo*, PEO-
39 PPO-PEO block copolymers would be unable to facilitate endosomal escape, as shown by the
40 absence of efficient transfection in cultured cell lines. Thus, one can imagine that Lutrol®
41 could favour the transmembrane passage of DNA molecules, because it has been shown that,
42 on the one hand, polymers are able to interact with cell membranes by their PPO hydrophobic
43 moiety (29), and on the other hand, polymers are also able to directly interact with DNA by
44 their PPO blocks (10). This explanation is also supported by results described in this paper
45 using heparan sulfate-depleted CHO cells, where transfection of cationic lipid/DNA
46 lipoplexes was only observed in the presence of Lutrol®, whereas as clearly demonstrated by
47 Kopatz et al., cation-mediated transfection requires heparan sulfate proteoglycan (24).
48

49
50 These results show that all block copolymers cannot be considered to have a common
51 mechanism of action regarding gene delivery but, depending on their physico-chemical
52 characteristics, they can promote gene expression either by direct fusion with the plasma
53 membrane or by acting as a biological modifier.
54

55
56 The identification of the mechanism of action of this novel class of vectors for *in vivo* gene
57 delivery should aid in guiding the future design and synthesis of new block copolymers.
58
59
60

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Clothilde Gourden and Emilie Goudeau (IN-CELL-ART, Nantes, France) for excellent technical expertise in cell culture. We thank P. Fender (Grenoble, France) for providing CHO-2241 cells. This work was supported by an ACI “jeunes chercheurs” grant from the “Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies”, Grant # 018 716 from the European Union (strep; SyntheGeneDelivery) and by special grants from the “Association Française contre les myopathies” (Evry, France) and “Vaincre la Mucoviscidose” (Paris, France). O. LeBihan and F. Beilvert are recipients of Ph D fellowships from “Vaincre la Mucoviscidose”.

For Peer Review

REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum.Gene Ther.*, **13**, 1767-1775.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Johnston,T.P. and Miller,S.C. (1985) Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. *J.Parenter.Sci.Technol.*, **39**, 83-89.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

- 1
2
3 13. Kabanov,A.V., Batrakova,E.V., Sriadibhatla,S., Yang,Z., Kelly,D.L. and Alakov,V.Y.
4 (2005) Polymer genomics: shifting the gene and drug delivery paradigms. *J.Control*
5 *Release*, **101**, 259-271.
6
7
- 8 14. Sriadibhatla,S., Yang,Z., Gebhart,C., Alakhov,V.Y. and Kabanov,A. (2006)
9 Transcriptional activation of gene expression by pluronic block copolymers in stably
10 and transiently transfected cells. *Mol.Ther.*, **13**, 804-813.
11
- 12 15. Ferrari,S., Moro,E., Pettenazzo,A., Behr,J.P., Zacchello,F. and Scarpa,M. (1997) ExGen
13 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo.
14 *Gene Ther.*, **4**, 1100-1106.
15
16
- 17 16. Vigneron,J.P., Oudrhiri,N., Fauquet,M., Vergely,L., Bradley,J.C., Basseville,M.,
18 Lehn,P. and Lehn,J.M. (1996) Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors
19 for the transfection of eukaryotic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 9682-9686.
20
- 21 17. Desigaux,L., Sainlos,M., Lambert,O., Chevre,R., Letrou-Bonneval,E., Vigneron,J.P.,
22 Lehn,P., Lehn,J.M. and Pitard,B. (2007) Self-assembled lamellar complexes of siRNA
23 with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and
24 interference. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **104**, 16534-16539.
25
26
- 27 18. Sainlos,M., Hauchecorne,M., Oudrhiri,N., Zertal-Zidani,S., Aissaoui,A., Vigneron,J.P.,
28 Lehn,J.M. and Lehn,P. (2005) Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene
29 transfection. *Chembiochem.*, **6**, 1023-1033.
30
31
- 32 19. Belmont,P., Aissaoui,A., Hauchecorne,M., Oudrhiri,N., Petit,L., Vigneron,J.P.,
33 Lehn,J.M. and Lehn,P. (2002) Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient
34 vectors for gene transfection in vitro and in vivo. *J.Gene Med.*, **4**, 517-526.
35
36
- 37 20. Pitard,B., Oudrhiri,N., Vigneron,J.P., Hauchecorne,M., Aguerre,O., Toury,R.,
38 Airiau,M., Ramasawmy,R., Scherman,D., Crouzet,J. *et al.* (1999) Structural
39 characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol
40 reagents for gene transfection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 2621-2626.
41
- 42 21. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using
43 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
44
45
- 46 22. Labat-Moleur,F., Steffan,A.M., Brisson,C., Perron,H., Feugeas,O., Furstenberger,P.,
47 Oberling,F., Brambilla,E. and Behr,J.P. (1996) An electron microscopy study into the
48 mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.*, **3**, 1010-1017.
49
- 50 23. Mislick,K.A. and Baldeschwieler,J.D. (1996) Evidence for the role of proteoglycans in
51 cation-mediated gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 12349-12354.
52
53
- 54 24. Kopatz,I., Remy,J.S. and Behr,J.P. (2004) A model for non-viral gene delivery: through
55 syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J.Gene Med.*, **6**, 769-776.
56
- 57 25. Piron,J., Quang,K.L., Briec,F., Amirault,J.C., Leoni,A.L., Desigaux,L., Escande,D.,
58 Pitard,B. and Charpentier,F. (2008) Biological pacemaker engineered by nonviral gene
59 transfer in a mouse model of complete atrioventricular block. *Mol.Ther.*, **16**, 1937-1943.
60

- 1
2
3 26. Xu,Y. and Szoka,F.C., Jr. (1996) Mechanism of DNA release from cationic
4 liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, **35**, 5616-5623.
5
6
7 27. Kichler,A., Leborgne,C., Coeytaux,E. and Danos,O. (2001) Polyethylenimine-mediated
8 gene delivery: a mechanistic study. *J.Gene Med.*, **3**, 135-144.
9
10 28. Yang,Z., Sahay,G., Sriadibhatla,S. and Kabanov,A.V. (2008) Amphiphilic block
11 copolymers enhance cellular uptake and nuclear entry of polyplex-delivered DNA.
12 *Bioconjug.Chem.*, **19**, 1987-1994.
13
14 29. Batrakova,E.V., Li,S., Alakhov,V.Y., Miller,D.W. and Kabanov,A.V. (2003) Optimal
15 structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug
16 efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells.
17 *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **304**, 845-854.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURES, TABLES AND LEGENDS

Figure 1: *In vivo* and *in vitro* transfection efficiency of amphiphilic block copolymers and cationic lipids. A luciferase gene expression assay was performed to compare the transfection efficiencies of an amphiphilic block copolymer, Lutrol®, 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 24 hours after transfection (white bars). The luciferase gene-encoding plasmid was complexed with 3 % Lutrol® or with DOSP-DOPE at a charge ratio of 4 (+/-). The amount of plasmid transfected *in vitro* and *in vivo* was, respectively, 1 and 10 µg.

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. The luciferase gene expression assay was performed 3 days after intramuscular injection of 10 µg plasmid encoding luciferase under control of the CMV promoter (black bars) or SV40 promoter (white bars). Plasmid was complexed with 1 % F38, 3 % Lutrol® or 1 % F108.

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. The reporter gene expression assay was performed in transfected cells after Lutrol® treatment (grey bars) or without Lutrol® treatment (white bars). (A) C2C12 cells were transfected with 1 µg luciferase or GFP encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of 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 4 (+/-). (C) HeLa cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP, DOSP/DOPE and BGTC/DOPE at a charge ratio of 4 (+/-). (D) H1299 cells were transfected with 1 µg luciferase encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of 4 (+/-) or Jet PEI according to manufacturer's instructions.

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 4 (+/-). Transfection was performed after block copolymer treatment (grey bars) or without block copolymer treatment (white bars). (A) Cells were incubated with 1 % F38, 3 % Lutrol® or 1 % F108 before transfection. (B) Cells were incubated with 3 % Lutrol® before transfection with two different plasmids with a CMV or SV40 promoter.

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 4 (+/-). Transfection was performed with Lutrol® treatment (grey bars) or without Lutrol® treatment (white bars). (A) Cells were treated with Lutrol® 2 hours before or after addition of DOSP/DOPE-DNA lipoplexes. (B) Cells were incubated for 2 hours at 37 °C or 4 °C, just after the addition of DOSP/DOPE-DNA lipoplexes.

Figure 6: Effect of block copolymers on gene silencing. Transfection was performed on cells after Lutrol® treatment (grey bars) or without Lutrol® treatment (white bars). Real-time quantitative RT-PCR analysis of human lamin A/C mRNA was performed after transfection of H1299 cells either with 37.5 ng siRNA complexed with ICAfectin® 442 or 500 ng siRNA mixed with 500 ng plasmid DNA complexed with DOSP-DOPE at a charge ratio of 4 (+/-).

1
2
3 Values were normalised to hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1). Values
4 are relative to cells transfected under the same experimental conditions with a control siRNA.
5
6

7 Figure 7: Effect of block copolymers on the percentage of transfected cells. (A) C2C12 cells
8 were transfected after Lutrol® treatment (grey bars) or without Lutrol® treatment (white
9 bars). One µg of GFP or luciferase encoding plasmid was complexed with DOSP/DOPE at a
10 charge ratio of 4 (+/-). After 24 hours, GFP expressing cells were counted by flow cytometry
11 and a luciferase gene expression assay was performed. (B) Representative β-galactosidase
12 encoding plasmid transfected C2C12 cells, with or without Lutrol® incubation. One µg of β-
13 galactosidase encoding plasmid was complexed with DOSP-DOPE at a positive charge ratio
14 of 4. β-galactosidase expression was revealed 24 hours after transfection. Scale bar represents
15 200 µm.
16
17

18 Figure 8: TEM visualisation of H1299 cells cellular uptake of DOSP-DOPE/plasmid/Nps (A-
19 C) and after a Lutrol® treatment (D-F) observed 2 hours after transfection. Cells were
20 transfected with luciferase encoding plasmid complexed with Nps (1/5) and with DOSP-
21 DOPE at a (+/-) charge ratio of 4. Ultrathin sections were observed at low (A, D), medium (B,
22 E) and high (C, F) magnification and revealed the presence of labelled lipoplexes containing
23 electron-dense Nps (black arrows). Cell sections were screened for the presence of Nps
24 (asterisks in A and D). Labelled lipoplexes were observed within the cytoplasm and formed
25 multilamellar assemblies (C, F enlargement of marked areas with black squares in B and E).
26 The measurement of Np amount per cell section was performed on unstained sections (G) and
27 analysed after threshold (H). The result is expressed as the ratio of Np surface per cell surface.
28 This ratio increased after Lutrol® treatment (I). Scale bars are 10 µm (A, D) 500 nm (B, E)
29 and 50 nm (C,F). Nu Nucleus, M Mitochondria.
30
31
32
33

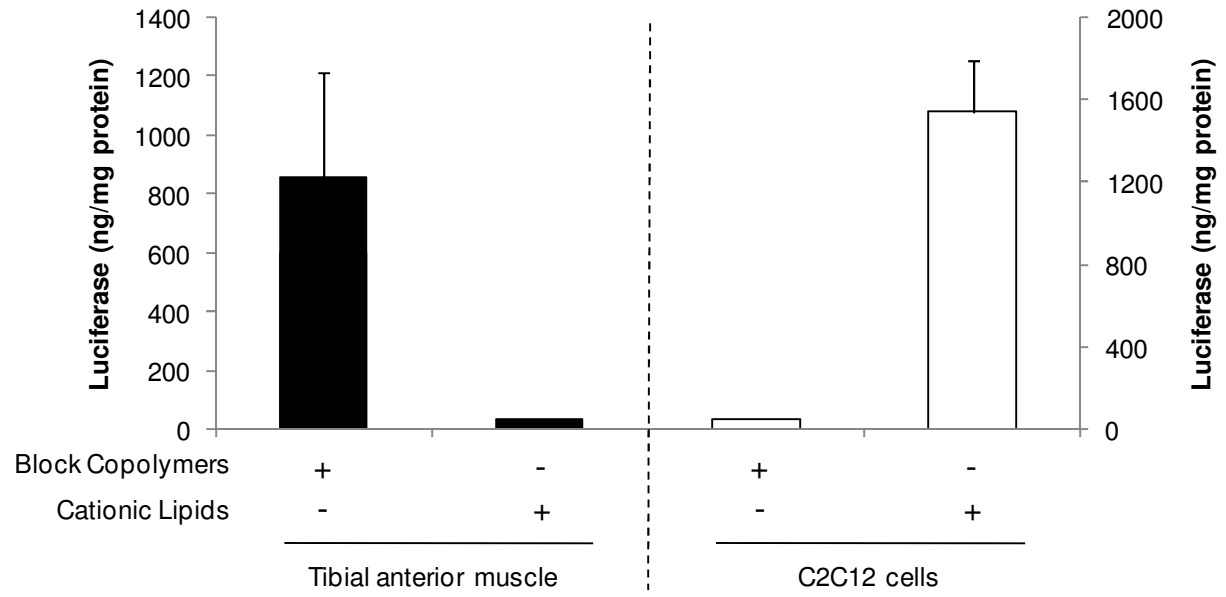
34 Figure 9: Effect of block copolymer complexation on lipoplex transfection efficiency. CHO
35 cells and heparan sulphate-deficient CHO cells (CHO HS-) were transfected with 1 µg
36 luciferase-encoding plasmid complexed with DOSP/DOPE at a charge ratio of 4 (+/-).
37 Lipoplexes were formulated with Lutrol® (grey bars) or without Lutrol® (white bars). After
38 24 hours, the luciferase gene expression assay was performed.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

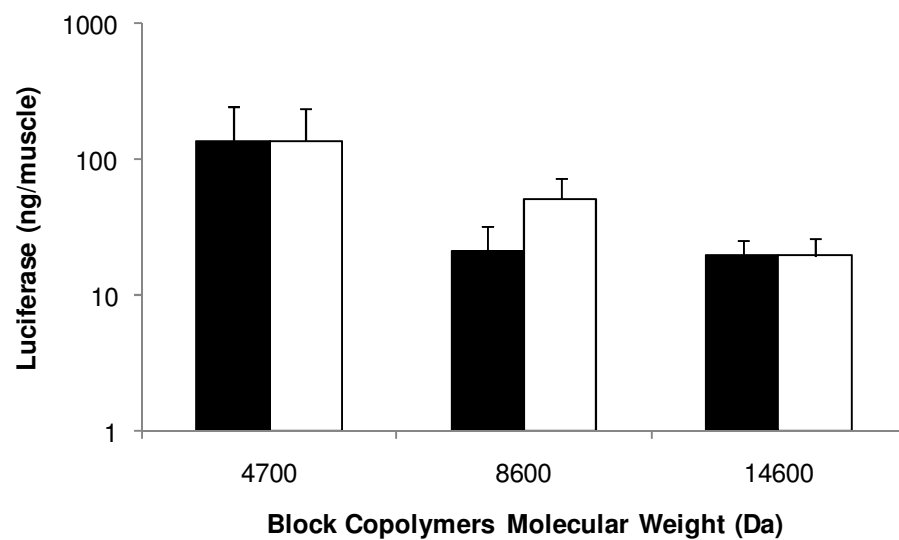
Table 1

<i>Transcription factor binding sites</i>	<i>CMV Promoter</i>	<i>SV40 Promoter</i>
Octamer-binding factor 1	+	+
Activation protein 1 (AP1)	+	+
Zinc finger-containing protein SP1	+	+
NF-E2 p45	-	+
GC box elements	-	+
CRE-binding protein 1/c-jun heterodimer	+	-
cAMP-responsive element binding protein	+	-
NFκB	+	-
c-Rel	+	-
Avian C-type LTR TATA box	+	-
Cellular and viral TATA box elements	+	-
E4BP4, bZIP domain, transcription repressor	+	-
Activating transcription factor	+	-

Table 1: Transcription factor binding sites in the CMV and SV40 promoters (based on Promega data, see ref.12)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

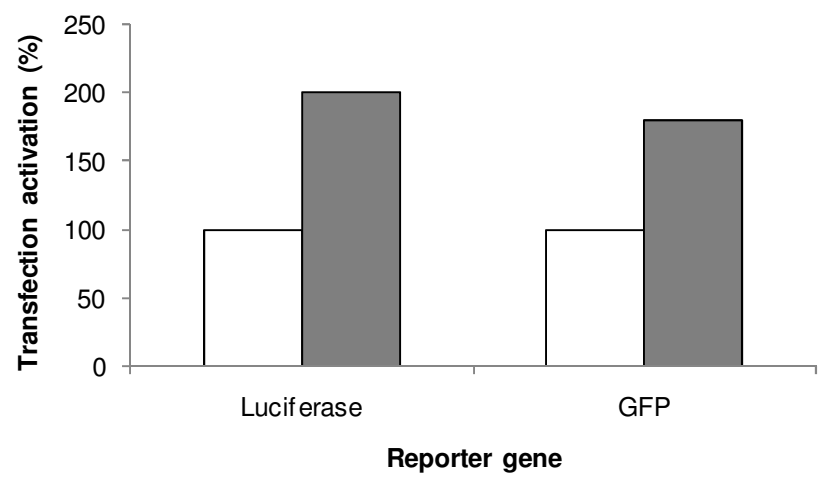




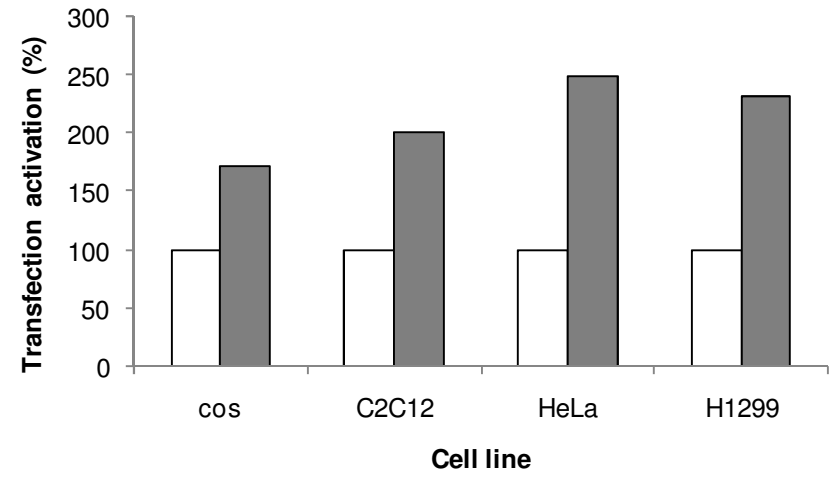
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

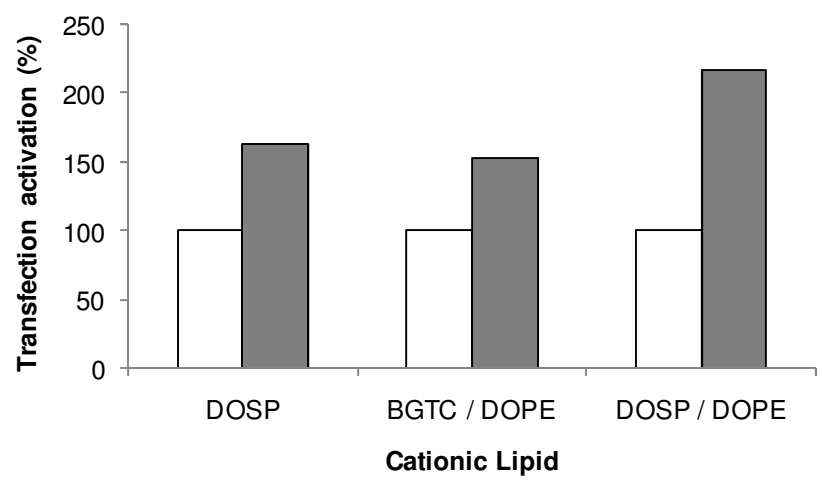
A



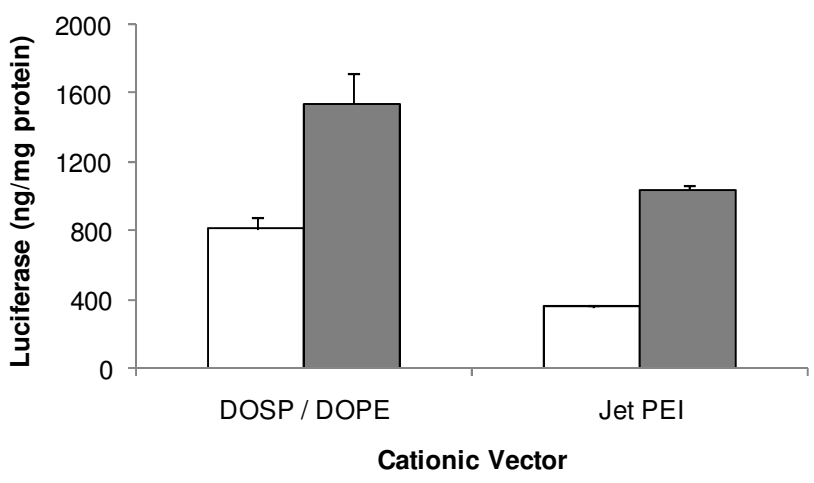
B

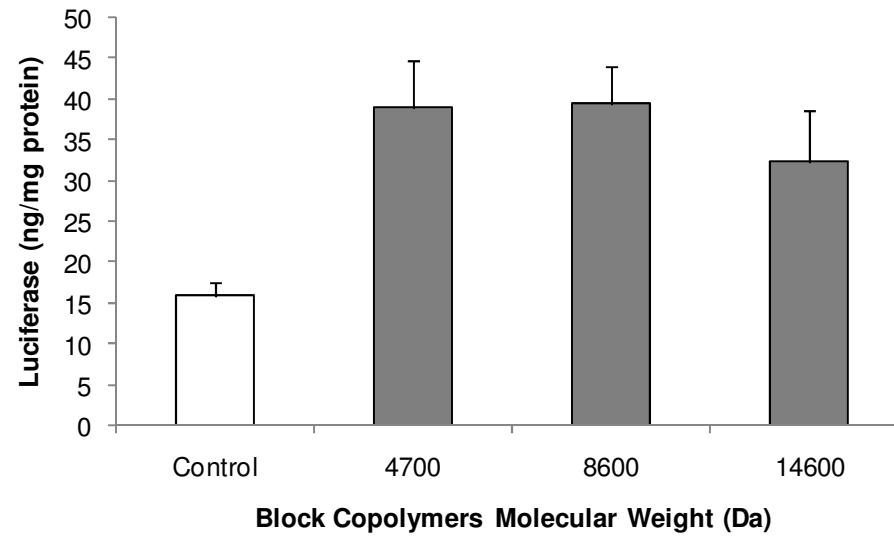
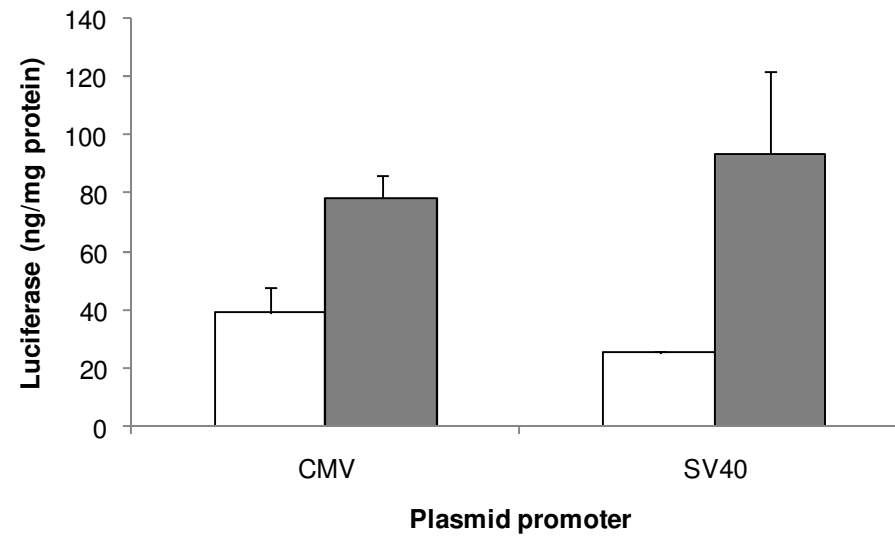


C



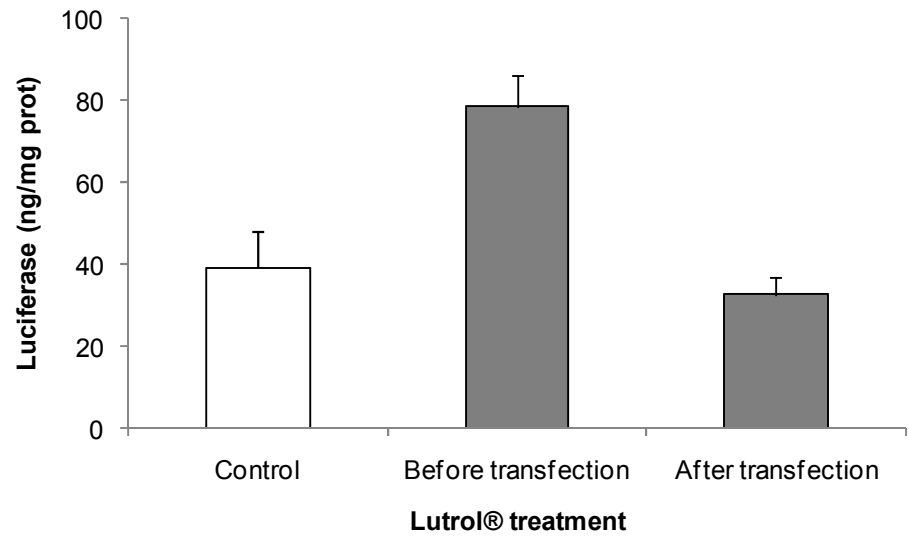
D



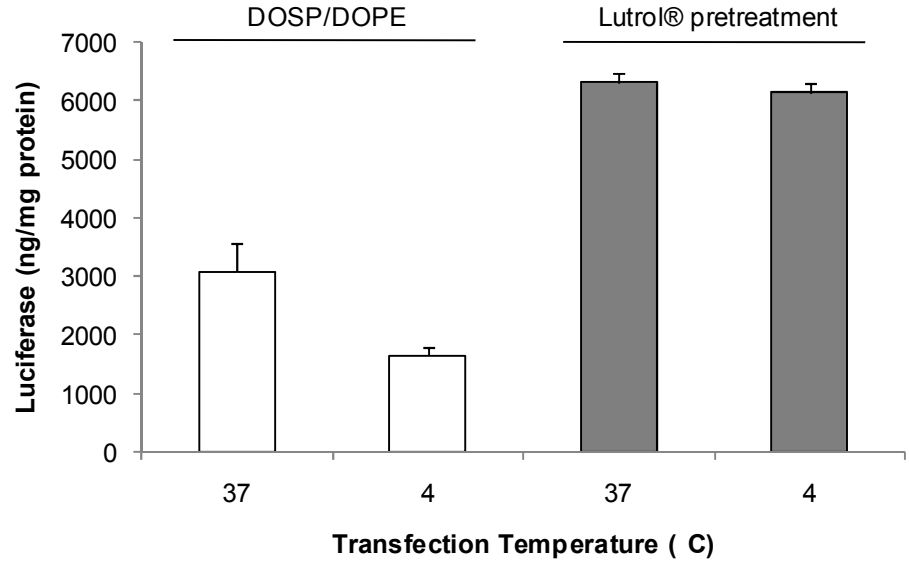
A**B**1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

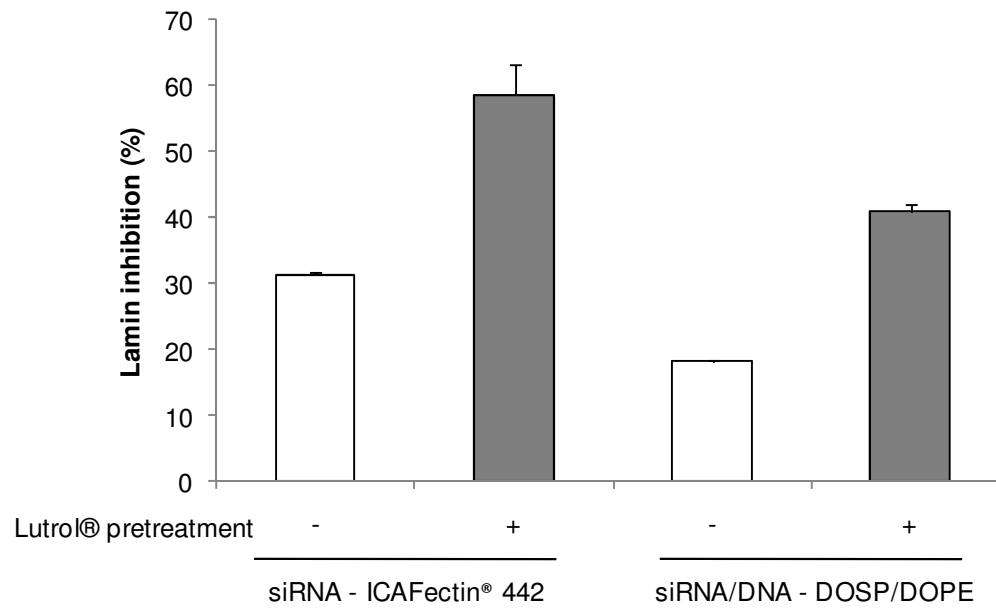
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

A



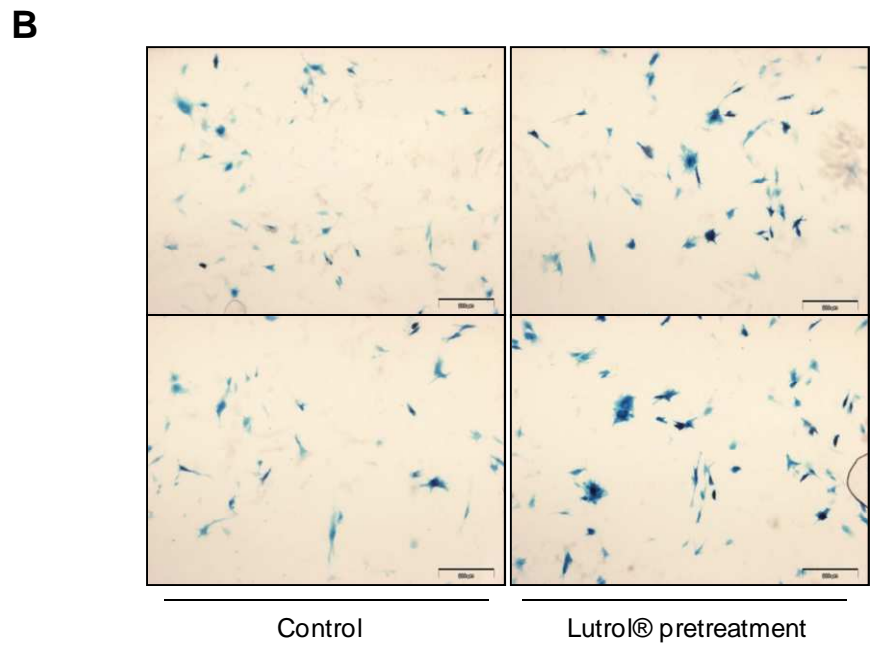
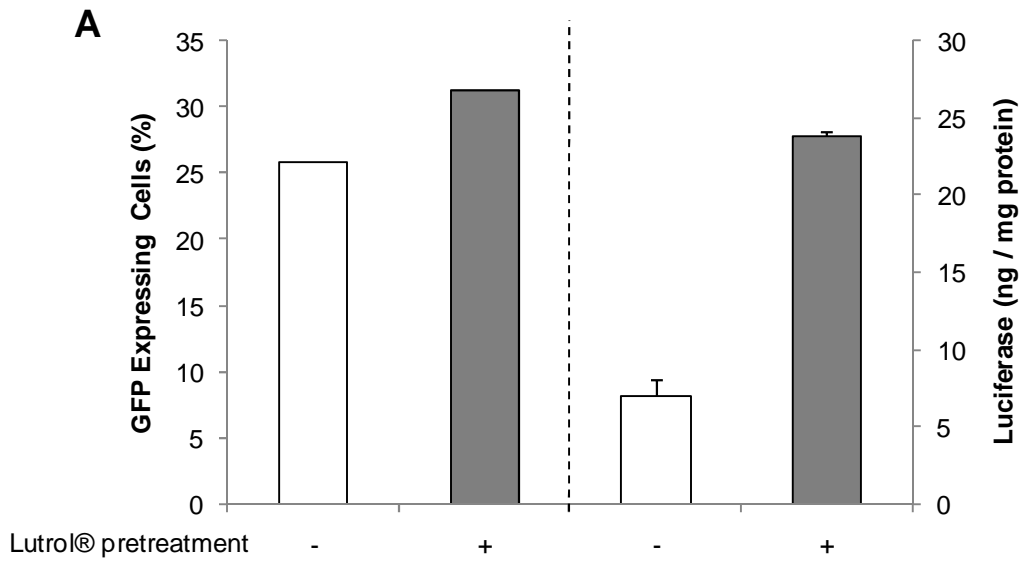
B

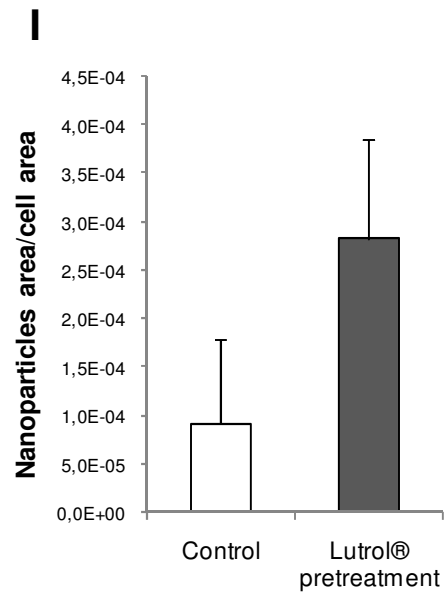
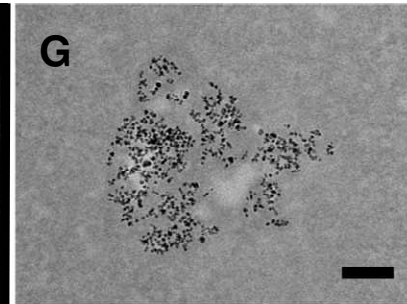
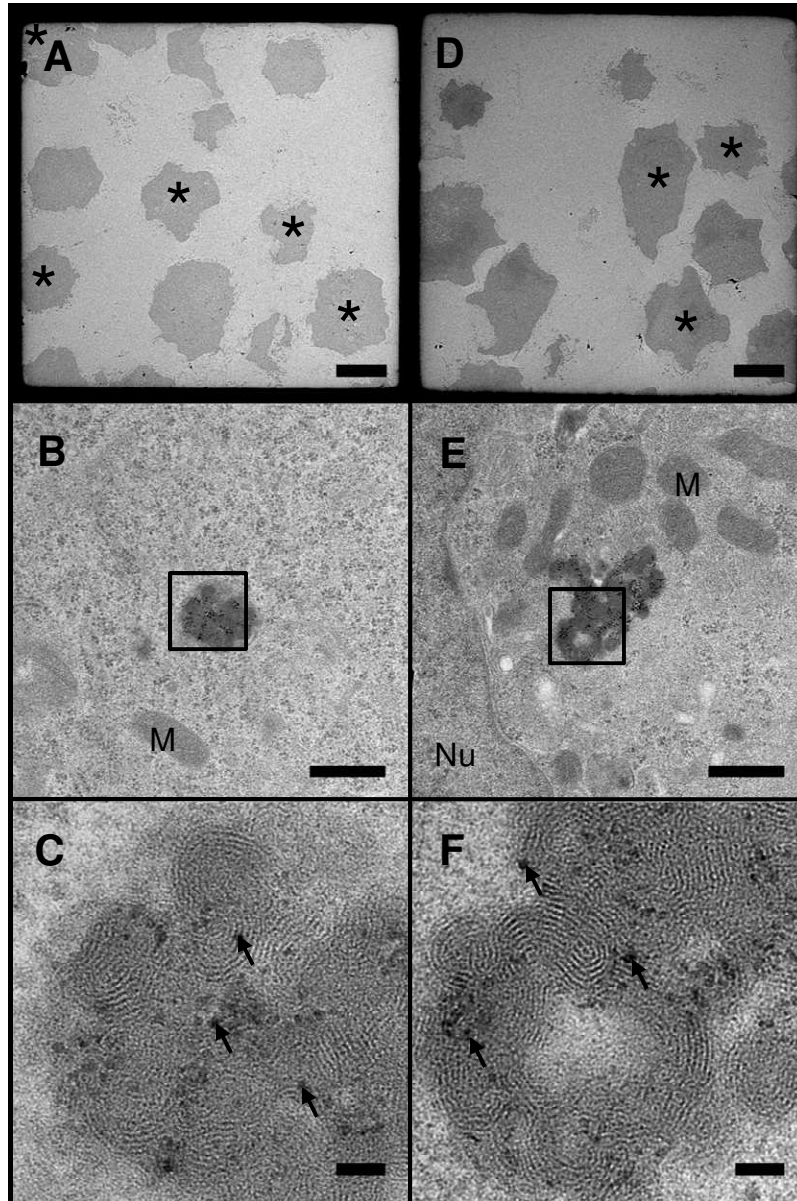




1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

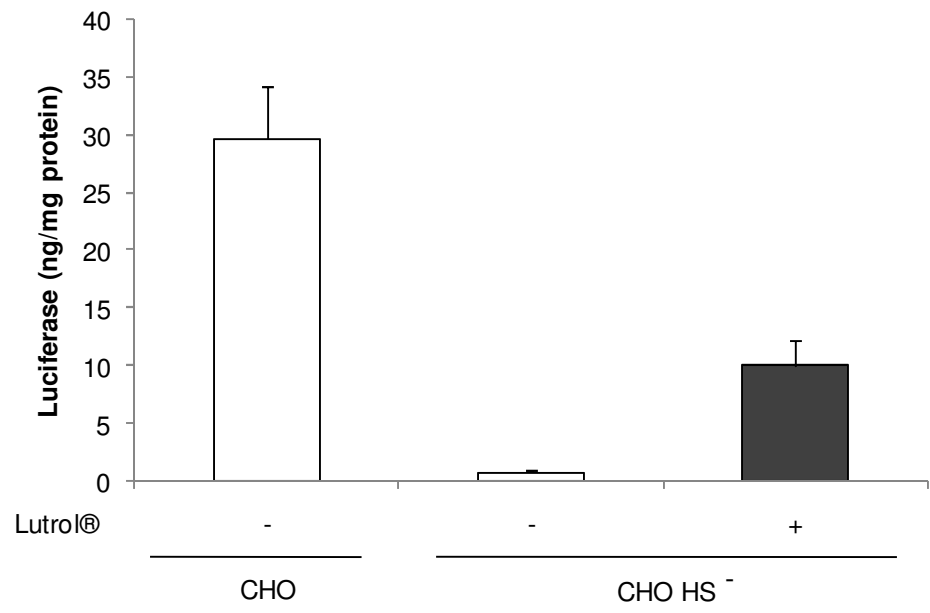
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49





1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49



Therapy of Anemia in Kidney Failure, Using Plasmid Encoding Erythropoietin

PEGGY RICHARD-FIARDO,^{1,2} EMMANUEL PAYEN,³ RAPHAËL CHÈVRE,^{1,2} JULIEN ZUBER,³
EMILIE LETROU-BONNEVAL,^{1,2} YVES BEUZARD,³ and BRUNO PITARD^{1,2,4}

ABSTRACT

Numerous studies using erythropoietin (EPO) gene delivery vectors, either viral or nonviral, have shown uncontrolled EPO expression leading to transient or sustained erythrocytosis and, more recently, severe autoimmune anemia. Therefore, there is a need to develop other EPO gene delivery systems that allow sustained and adjustable expression of EPO. We have examined a new approach of delivering plasmid encoding mouse EPO cDNA into mouse skeletal muscle, using an amphiphilic block copolymer. Repeated injections of low doses of block copolymer–EPOcDNA formulations increased hematocrit in a dose-dependent manner for more than 9 months, without any initial overshoot. Low doses of block copolymer–EPOcDNA formulations prevented autoimmune anemia in immunocompetent Swiss mice and prevented or reversed chronic anemia in an acquired mouse model of renal failure. We conclude that repeated injections of low doses of block copolymer–DNA formulations that do not induce (1) inflammation at the injection site, (2) overexpression of EPO, or (3) the production of anti-EPO neutralizing auto-antibodies hold promise for *in vivo* expression of therapeutic proteins, in particular for systemic delivery.

OVERVIEW SUMMARY

Transfection of skeletal muscle is a promising approach to treat inherited or acquired diseases involving circulating polypeptide deficiencies. Intramuscular delivery of the gene encoding erythropoietin (EPO) by means of either viral or nonviral vectors has resulted in uncontrolled EPO expression, leading to transient or sustained erythrocytosis and severe autoimmune anemia. In the present study, we developed a new protocol consisting of repeated intramuscular injections of block copolymer–DNA formulations, which provide an efficient and simple method for durable and adjustable secretion of erythropoietin in immunocompetent mice. In a mouse model of acquired kidney failure, this novel nonviral system for the delivery of murine erythropoietin gene and the resulting sustained levels of circulating EPO were capable of reversing renal failure-associated anemia.

INTRODUCTION

ERYTHROPOIETIN (EPO) is the major inducer of normal erythropoiesis. The production of recombinant human EPO (rHuEPO) has revolutionized the treatment of anemia associated with renal failure and other chronic disorders (Nielsen and Thaysen, 1989). After treatment with rHuEPO, the development of anti-EPO neutralizing antibodies that cross-react with endogenous EPO has been observed occasionally, resulting in pure red cell aplasia (PRCA) in patients (Casadevall *et al.*, 2002). A viral gene therapy-based system was tested for therapeutic expression of human EPO after *ex vivo* transduction and implantation of dermal cores in patients with chronic renal failure (Lippin *et al.*, 2005). However, a decrease in EPO expression was observed that correlated with the development of an immune response against the viral vector. Other approaches have been used to produce EPO by gene transfer, including administration of vectors derived from recombinant adeno-asso-

¹INSERM, U533, Nantes F-44035, France.

²Institut du Thorax, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F-44035, France.

³INSERM U733, Institut Universitaire d'Hématologie, Laboratoire de Thérapie Génique Hématopoïétique, Hôpital St Louis, Paris F-75010, France.

⁴In-Cell-Art, Nantes F-44093, France.

ciated viruses (rAAV) in skeletal muscle. However, two reports have raised concerns related to the expression of transgenic EPO in macaques (Chenuaud *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004). In both cases, intramuscular injection of rAAV vectors led to autoimmune anemia with the development of antibodies against endogenous EPO. In another report, intramuscular injection of an rAAV vector encoding feline EPO in cats resulted in either PRCA or pathological erythrocytosis (Walker *et al.*, 2005). Moreover, readministration of the vector resulted in a variable biological response that was modulated by a humoral immune response directed against rAAV. Given the toxicity of high EPO levels and the need to control its secretion level, the development of a strategy allowing adjustable expression of EPO through gene transfer is critically needed for clinical use. Several regulation systems allowing for the regulated expression of the EPO transgene have been developed. Rivera and coworkers have described a rapamycin dimerizer-inducible system able to drive expression of the EPO gene in macaque muscles over a 6-year period (Rivera *et al.*, 2005). However, for long-term clinical administration, rapamycin has severe adverse effects. The tetracycline-controlled transcription systems (Tet-on and Tet-off) have been widely used to regulate transgene expression in mammalian cells. In EPO gene therapy applications, immune responses to the chimeric transcription factor proteins have been reported in mice and nonhuman macaques after rAAV-mediated gene transfer (Favre *et al.*, 2002), raising concerns about their possible occurrence in humans. In the context of nonviral gene therapy, we have previously observed that the intramuscular injection of block copolymer–DNA formulations required smaller amounts of transgene compared with naked DNA and thereafter minimized inflammation and immune response against the chimeric *trans*-activator rtTA2s-M2 (Richard *et al.*, 2005a). However, an immune response against rtTA2s-M2 was still observed in immunocompetent animals that completely abrogated EPO synthesis 4 months postinjection. Thus, there is a need for an alternative way of producing EPO by gene transfer. We and other have previously reported that nanostructured materials consisting of plasmid DNA and amphiphilic block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide led to a spectacular increase in gene expression in skeletal muscles (Lemieux *et al.*, 2000; Pitard *et al.*, 2002, 2004; Richard *et al.*, 2005a,b; Bello-Roufai *et al.*, 2007). In this paper, we report a new delivery protocol for block copolymer–DNA formulations that permits the regulated and sustained expression of murine EPO (mEPO) from a plasmid-based system. Serum mEPO levels were adjusted by increasing protein production progressively, using several intramuscular injections of low doses of DNA formulated with block copolymer. Furthermore, we sought to determine whether this protocol could be beneficial to prevent or cure acquired anemia in a chronic kidney failure model in mice.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid DNA

Two plasmids carrying the murine EPO cDNA under the control of the cytomegalovirus (CMV) IE1 promoter/en-

hancer were constructed. One, referred to as pCMV-mEPOreverse, was used as a negative control and was produced by inserting the mEPO cDNA in the antisense orientation. The other, referred to as pCMV-mEPO, enabled the synthesis of murine EPO. mEPO cDNA was recovered by polymerase chain reaction (PCR) from plasmid pTetO-mEPO (Richard *et al.*, 2005a) and introduced into the pcDNA-3 vector (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Plasmids were purified from transformed recombinant *Escherichia coli* by means of Endo-Free plasmid purification columns (Qiagen, Chatsworth, CA).

Animal experiments and plasmid DNA formulations

All 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 Swiss and C57BL/6 mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). At least five mice were injected in each experimental group and each experiment was repeated two or three times. Chronic mouse renal failure was induced chemically with an adenine-excessive diet based on the adenine overload rat model (Yokozawa *et al.*, 1986) but using an adenine content of 0.25% instead of 0.75% in rats. Adenine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was mixed with mouse breeding diets (SAFE, Augy, France). For intramuscular injections, mice were anesthetized with Hypnomidate (40 mg/kg, intraperitoneal injection, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France). Fifty microliters of block copolymer–DNA formulations was injected into shaved tibial anterior muscles at a single site, using a microfine syringe (U100; Becton Dickinson, Rungis, France). Lutrol, a block copolymer, was generously provided by BASF (Mount Olive, NJ). Stock solutions were prepared at 6% (w/v) in water and stored at 4°C. Formulations of DNA with block copolymer were prepared by equivolumetric mixing of block copolymer in water at the desired concentration with plasmid DNA solution at the desired concentration in Tyrode, a physiological medium that mimicks the extracellular ionic composition (Bello-Roufai *et al.*, 2007). Formulations of recombinant human EPO (NeoRecormon; Roche Diagnostics, Meylan, France) were prepared in medium containing water, 3% Lutrol, or 1% magnesium/aluminum layered double hydroxide (Desigaux *et al.*, 2006). Recombinant human EPO formulations were injected into Swiss mice every day for 5 days.

Gene expression analysis

Hematocrit values were measured by microcapillary centrifugation. At various time points after intramuscular injection, mouse blood was collected from the retro-orbital cavity and serum was obtained by centrifugation (3 min at 1000 × g). For plasma samples, blood was collected from the retro-orbital sinus in heparinized tubes and centrifuged for 3 min at 1000 × g. Mouse serum EPO levels were measured by enzyme-linked immunoassay (ELISA) according to the instructions provided by the manufacturer (Medac, Hamburg, Germany).

Total tissue RNA extraction and RT-PCR

Tibial anterior muscles were dissected and frozen in liquid nitrogen. Total RNA from muscle samples was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen). DNase I treatment, using an RNeasy mini kit (Qiagen), was performed. The SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR kit (Invitrogen) was used to synthesize first-strand cDNA from mRNA. PCRs were performed, using the following specific oligonucleotide primers: mEPO, 5'-TCACCTCACTGCTTCGGGTA-3' (forward), 5'-CCTCTCCCGTGTACAGCTTC-3' (reverse); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), 5'-CTGTGCCGTTGAATTTGCC-3' (forward), 5'-GTCGGTGTGAA-CGGATTTGG-3' (reverse). The primer sets for detection of mRNA were designed to encompass intronic sequences, allowing us to distinguish any possible PCR products from contaminating genomic DNA. The RT-PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. The lengths of the expected products were 165 bp for mEPO mRNA and 234 bp for G3PDH mRNA.

Determination of reticulocyte percentages

Whole blood samples were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min at 4°C. Red blood cells were resuspended in PBS containing thiazole orange at 0.1 ng/ml (Sigma-Aldrich), incubated for 45 min at 4°C, and washed twice with cold PBS. Reticulocyte percentages were assessed by flow cytometric analysis. Flow cytometric analysis was performed on a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose CA) with CellQuestPro software.

Anti-EPO antibody assays

The presence of anti-Epo antibodies in the serum of anemic Swiss mice was evaluated using a functional assay. This assay was designed to examine the ability of mouse serum to neutralize the effect of recombinant human EPO (NeoRecorcom; Roche Diagnostics) on the growth of an EPO-dependent mouse cell line, DaE-7 (Sakaguchi *et al.*, 1987). Briefly, cells were cultured in growth medium containing EPO, harvested, and washed twice with medium deprived of EPO. Cells were then seeded in 96-well plates (10^5 cells per well) in growth medium containing EPO at 10 mIU/ml, which was the minimal quantity that enables the proliferation of DaE-7 cells. Mouse serum was serially diluted in 2-fold dilution steps in the growth medium and added to the corresponding wells, and the cells were cultured for 48 hr at 37°C. CellTiter 96 AQueous one solution (Promega, Madison, WI) was added and incubated for 3 hr. Absorbance was read at wavelengths of 490 and 630 nm.

Interleukin-6 assay

Muscles of Swiss mice injected with control solution, Lutrol alone, naked DNA, or Lutrol–DNA formulations containing either 2.5 or 10 μg of pCMV-mEPO and 3% Lutrol were dissected, frozen in liquid nitrogen, and homogenized in 1 ml of reporter lysis buffer (Promega) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Interleukin-6 (IL-6) levels were measured in the supernatants by ELISA according to the instructions of the manufacturer (R&D

Systems, Minneapolis, MN). A standard curve was included for each microplate, using the IL-6 standard kit.

Histochemical analysis

At sacrifice, tibial anterior muscles were dissected, embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek USA, Torrance, CA), frozen in isopentane, and cut into 8- μm -thick sections. Sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and then stained with haematoxylin–eosin solution. For EPO immunodetection, sections were permeabilized with PBS–Triton X-100 (0.1%) for 30 min, incubated with goat anti-human EPO primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology; Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France), followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-goat IgG secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology; Tebu-bio). After washing, bound antibodies were revealed with the DakoCytomation liquid DAB substrate chromogen system (Dako, Trappes, France). Sections were examined with a Zeiss AxioVision microscope. Kidneys were fixed in AFA (alcohol, formalin, acetic acid) fixative and embedded in paraffin. Sections (2 μm) were stained with hematoxylin and eosin. The sections were examined with an AX70 Olympus microscope equipped with ColorView (Soft Imaging System, Münster, Germany).

Determination of creatinine and urea

Urea and creatinine were measured in 2-fold diluted plasma with CREA and UREA/BUN kits (Roche Diagnostics) on a Roche/Hitachi Modular P instrument.

Statistical analysis

Data were analyzed by Student *t* test and the Mann–Whitney test.

RESULTS

Secretion of murine erythropoietin

Swiss mice were injected intramuscularly with various amounts of plasmid DNA encoding murine EPO, ranging from 2.5 to 10 μg , either naked or formulated with 3% Lutrol (Fig. 1A). Mice injected with 10 μg of naked DNA had a slight increase in hematocrit level and a serum EPO value of 4.0 ± 1.4 mU/ml on day 14. Serum EPO values of untreated control mice were below the sensitivity threshold of the kit. The injection of increasing doses of pCMV-mEPO formulated with Lutrol led to a dose-dependent increase in hematocrit. At the highest injected dose of DNA (10 μg), the hematocrit first increased from 50 to 80% on day 14 postinjection before decreasing slowly to reach values below the physiological level on day 50, with severe anemia in four of six animals. In this group of mice, the serum EPO level was 116.9 ± 44.3 mU/ml on day 14 and 57.0 ± 25.1 mU/ml on day 50. The RT-PCR analysis of EPO mRNA in muscles and immunostaining of EPO protein in muscle tissue sections indicated that muscle fibers still produced EPO on day 50 (Fig. 1B and C). In mice injected with 2.5 and 5 μg of formulated plasmid DNA, the hematocrit levels increased and remained stable, averaging 60% on day 50 postin-

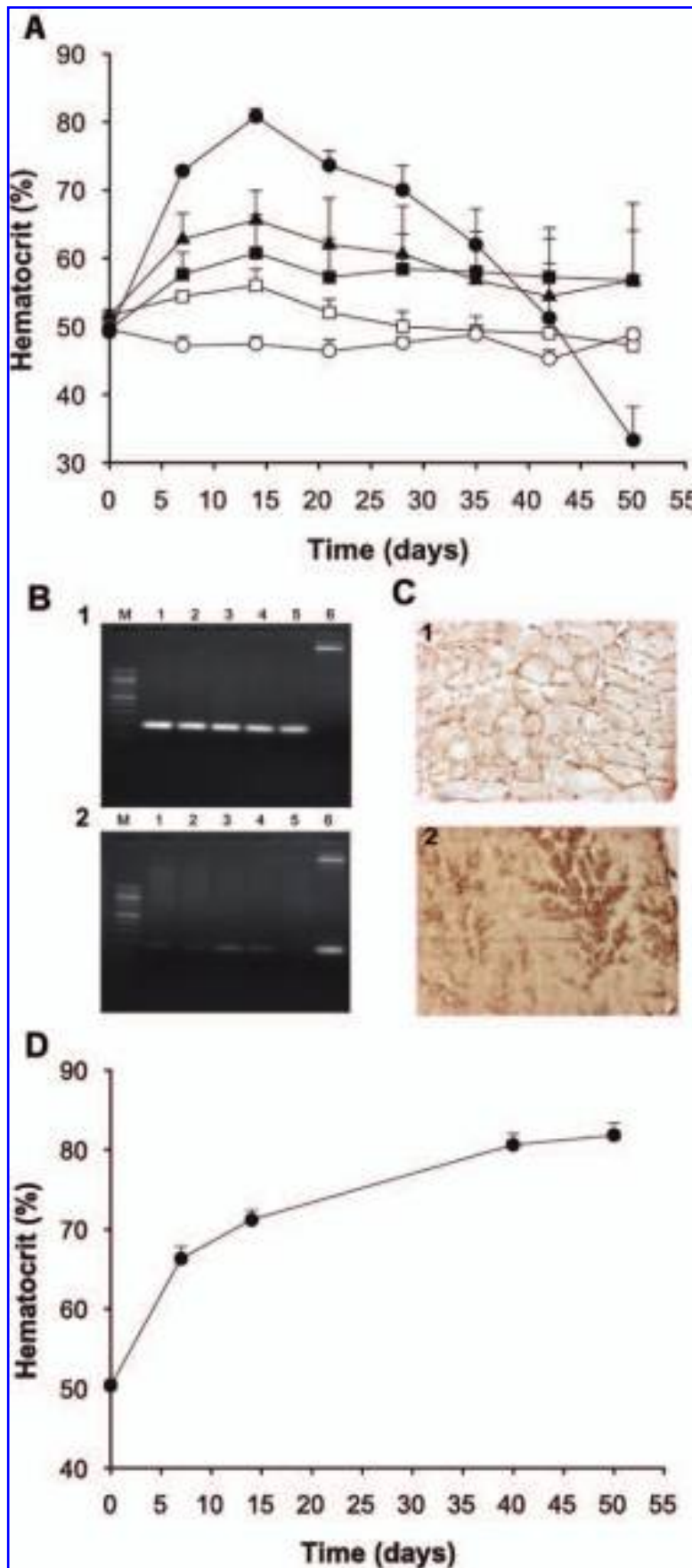


FIG. 1. Mouse hematocrit as a function of time and murine EPO expression after injection of block copolymer/DNA formulations. (A) Swiss mouse hematocrit as a function of time after intramuscular injection of Lutrol-DNA formulations containing 3% Lutrol and 2.5 (solid squares), 5 (solid triangles), or 10 μg of pCMV-mEPO (solid circles). As control, Swiss mice were also intramuscularly injected with 10 μg of naked pCMV-mEPO (open squares) or with Lutrol-DNA formulations containing 3% Lutrol and 10 μg of pCMV-mEPOreverse (open circles). (B) RT-PCR detection of G3PDH mRNA (panel 1) and mEPO mRNA (panel 2) of Swiss mouse tibial anterior muscle, 50 days after injection of Lutrol-DNA formulations containing 10 μg of pCMV-mEPO and 3% Lutrol. The lengths of the expected products were 234 bp for G3PDH mRNA and 165 bp for mEPO mRNA. Lanes M, DNA marker; lanes 1-4, RT-PCR products from mice with hematocrit levels of 28, 40, 42, and 29%, respectively; lanes 5, RT-PCR products from uninjected mice as negative control; lanes 6, PCR products of pCMV-mEPO as positive control. (C) Immunodetection of EPO in Swiss mouse tibial anterior muscle, 50 days after intramuscular injection of 3% Lutrol alone (panel 1) or 10 μg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol (panel 2). Original magnification, $\times 10$. (D) Influence of mouse strain on hematocrit. C57BL/6 mice were intramuscularly injected with 10 μg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol. Each data point represents the mean and SEM of a group of 10 mice.

jection. Anemia was not diagnosed in any of the mice. In mice injected with 2.5 and 5 μg of formulated plasmid DNA, serum EPO values were, respectively, 6.0 ± 4.5 and 3.8 ± 2.9 mU/ml on day 14, and 8.5 ± 9.2 and 3.9 ± 4.3 mU/ml on day 50. No significant difference ($p > 0.05$) was found between the mean EPO values of the two groups. Injections of 10 μg of pCMV-mEPO reverse formulated with 3% Lutrol had no significant effect on the hematocrit of mice or on EPO levels. In another mouse strain (C57BL/6), injection of 10 μg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol (Fig. 1D) led to the progressive increase in hematocrit level from 50 to 85% on day 50 postinjection. Identical kinetics of the hematocrit level were also observed in this particular mouse strain using the electrotransfer as the method of gene delivery (Kreiss *et al.*, 1999; Rizzuto *et al.*, 1999; Payen *et al.*, 2001).

Inflammatory response and histopathological analysis

We next investigated the correlation between the amount of injected plasmid and inflammation at the injection site. To quantify the inflammatory response, IL-6 levels were measured in muscles of Swiss mice 6 hr after intramuscular injection of control solution, Lutrol alone, or plasmid pCMV-mEPO (2.5 or 10 μg) formulated with or without 3% Lutrol (Fig. 2A). The level of IL-6 in muscles was higher after injection of 10 μg of DNA compared with that obtained with 2.5 μg of DNA ($p < 0.05$) formulated with or without 3% Lutrol. Muscle IL-6 levels detected in control mice injected with 3% Lutrol were not significantly different compared with that observed in mice injected with control solution. As shown in Fig. 2B, muscles of mice injected with 10 μg of pCMV-mEPO formulated without

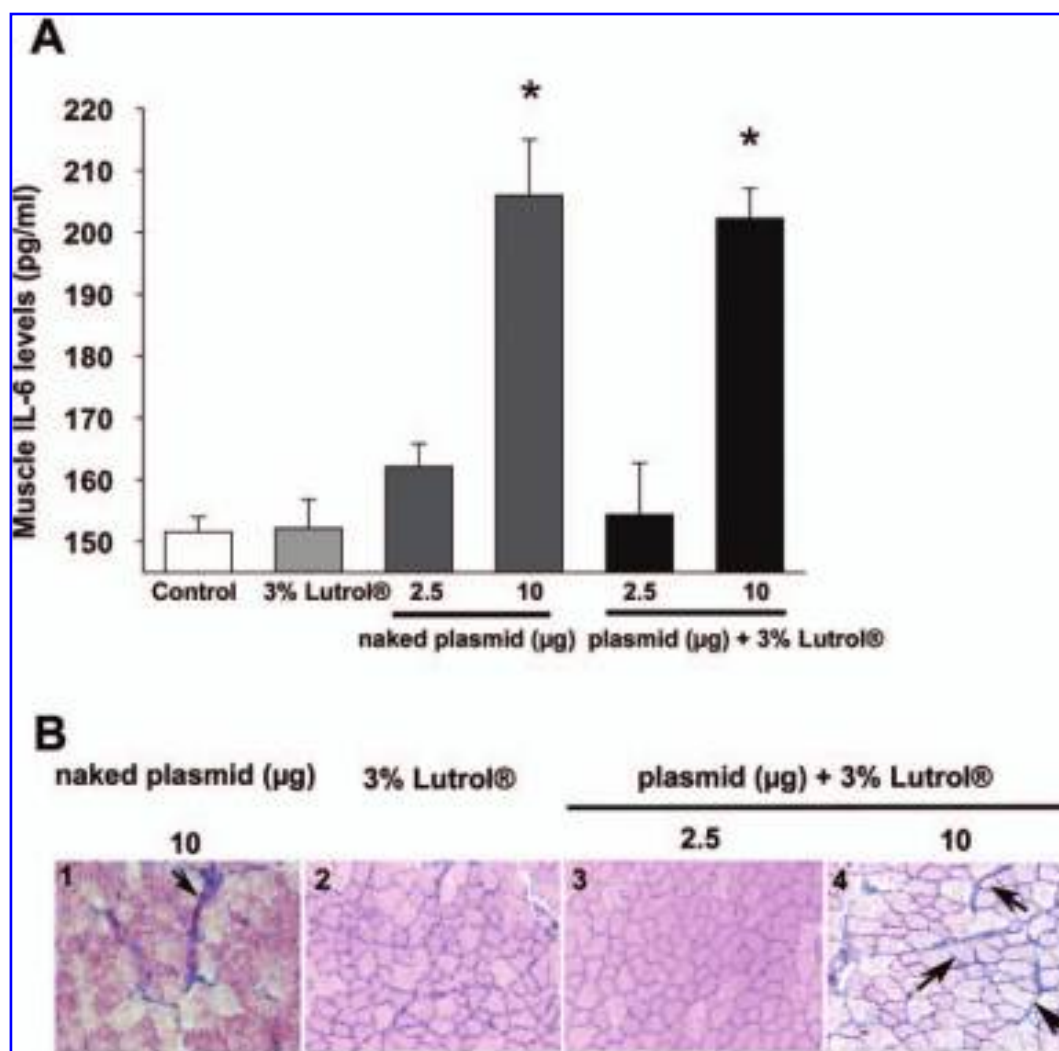


FIG. 2. Inflammatory response and histopathological analysis of Swiss mouse muscle after injection of Lutrol alone or with DNA either naked or formulated with Lutrol. (A) IL-6 levels were measured 6 hr after intramuscular injection of control solution, 3% Lutrol, or 2.5 or 10 μg of pCMV-mEPO formulated with (solid columns) or without (gray columns) 3% Lutrol. Each data point represents the mean and SEM of a group of five mice. Asterisks indicate a significant difference between mice injected with 2.5 or 10 μg of pCMV-mEPO, either naked or formulated with 3% Lutrol ($p < 0.05$). (B) Representative tissue sections of muscle, 7 days after intramuscular injection of 10 μg of naked plasmid DNA (panel 1), 3% Lutrol alone (panel 2), 3% Lutrol with 2.5 μg of pCMV-mEPO (panel 3), or 3% Lutrol with 10 μg of pCMV-mEPO (panel 4). Arrows indicate mononuclear infiltration. Original magnification, $\times 10$.

(panel 1) or with 3% Lutrol (panel 4) exhibited infiltration of mononuclear inflammatory cells 7 days postinjection (arrows). By contrast, muscles of mice injected with 3% Lutrol alone (Fig. 2B, panel 2) or with 2.5 μg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol (Fig. 2B, panel 3) did not show an inflammatory response on day 7 postinjection.

Role of Lutrol in the development of anemia

To investigate a possible role for Lutrol in the development of autoanemia, Swiss mice were injected either with 10 μg of DNA formulated with 3% Lutrol or with a high amount of naked DNA required to increase the hematocrit to a similar level. Figure 3A shows that in both groups of mice, the hematocrit decreased with the same kinetics and reached values below the physiological level 50 days postinjection, indicating anemia.

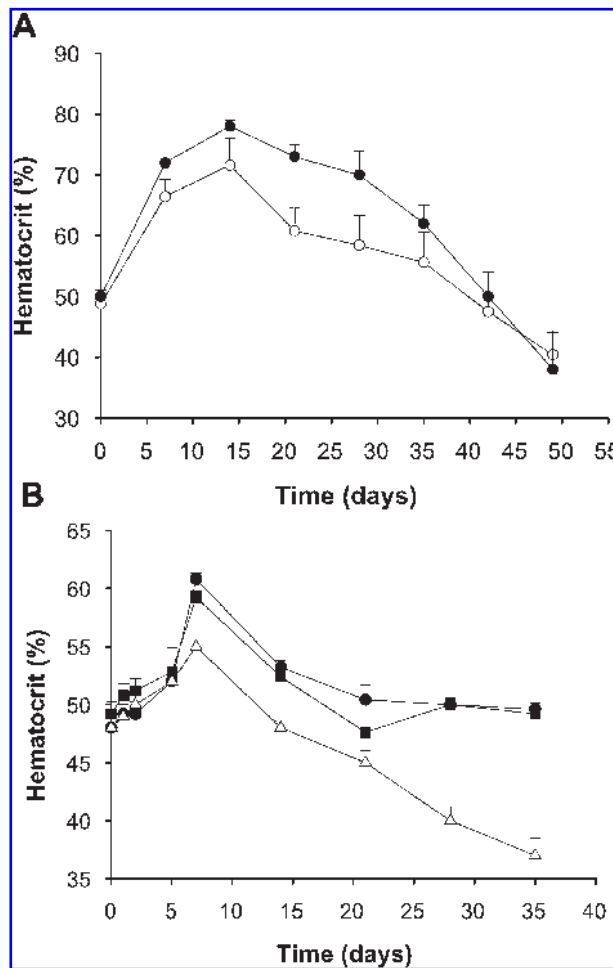


FIG. 3. Mouse hematocrit as a function of time after injection of naked DNA, Lutrol-DNA formulations, or recombinant human EPO. **(A)** Swiss mouse hematocrit as a function of time after intramuscular injection of 50 μg of naked pCMV-mEPO (open circles) or 10 μg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol (solid circles). **(B)** Swiss mouse hematocrit as a function of time after injection of 5 IU of NeoRecormon alone (solid squares), formulated with 3% Lutrol (solid circles), or with 1% Mg/Al layered double hydroxide (open triangles). Each data point represents the mean and SEM of a group of five mice.

Another experiment was carried out to exclude a possible immunoadjuvant effect of Lutrol on *de novo*-synthesized EPO by the muscle fibers. Mice were injected with recombinant human EPO alone or formulated with 3% Lutrol or with an adjuvant, that is, magnesium/aluminum layered double hydroxide (Fig. 3B). In mice injected with recombinant human EPO formulated without or with 3% Lutrol, the hematocrit increased from 50 to 60% on day 14 and decreased slowly to reach physiological values on day 35. By contrast, in mice injected with recombinant EPO formulated with magnesium/aluminum layered double hydroxide, the hematocrit level increased on day 14 and then decreased slowly to reach values below the physiological level on day 35, indicating the development of anemia.

Reticulocyte percentages and anti-mEPO antibodies

In control mice, the mean reticulocyte percentage level was $3.45 \pm 0.15\%$. In general, in anemic mice with normal erythropoiesis capacity, the reticulocyte percentage is expected to increase because of EPO stimulation and new red blood cell production. However, injection of high doses of DNA (10 μg) formulated with block copolymer led not only to a decrease in hematocrit below physiological levels 50 days postinjection, but also to a dramatic reduction of the reticulocyte percentage to $0.35 \pm 0.15\%$ (Fig. 4A). A possible mechanism underlying the observation could be the development of neutralizing antibodies against transgenic EPO cross-reacting with endogenous murine EPO and interfering with EPO function and turnover. To test this hypothesis, we evaluated the ability of mouse sera to neutralize recombinant EPO and then to impair the growth of the EPO-dependent mouse cell line DaE-7. Sera of mice injected either with 2.5 or 10 μg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol were obtained 50 days postinjection, serially diluted, and added to DaE-7 cells in the presence of EPO at 10 mU/ml. After 48 hr, DaE-7 cell viability was assessed (Fig. 4B). No significant difference in DaE-7 proliferation was observed in sera of mice injected with formulations containing 2.5 μg of DNA and 3% Lutrol compared with control mice. By contrast, marked growth inhibition of DaE-7 cells was observed with sera of mice injected with Lutrol-DNA formulations containing 10 μg of DNA. The combined observations of interference with EPO activity in the *in vitro* proliferation assay, low hematocrit level, and absence of compensatory reticulocyte production *in vivo* suggest the development of antibodies against mEPO. These antibodies are unlikely to be directed against the EPO protein backbone because endogenous EPO exons of anemic mice exhibiting low hematocrit level on day 50 were sequenced and found to be identical to the mEPO cDNA cloned into the plasmid (data not shown).

Long-term secretion of murine erythropoietin

We next investigated whether the increase in hematocrit level could be permanently elevated by limiting muscle inflammation after intramuscular injection of Lutrol-DNA formulations. Swiss mice were intramuscularly injected four times at 1-week intervals with the lowest amount of DNA (2.5 μg) that led to a detectable increase in the hematocrit level. Sequential injections led to a high hematocrit level for almost 9 months (Fig. 5). On day 288 postinjection, the serum EPO level was 67.2 ± 20.8 mU/ml. By contrast, a single injection of the cumulative

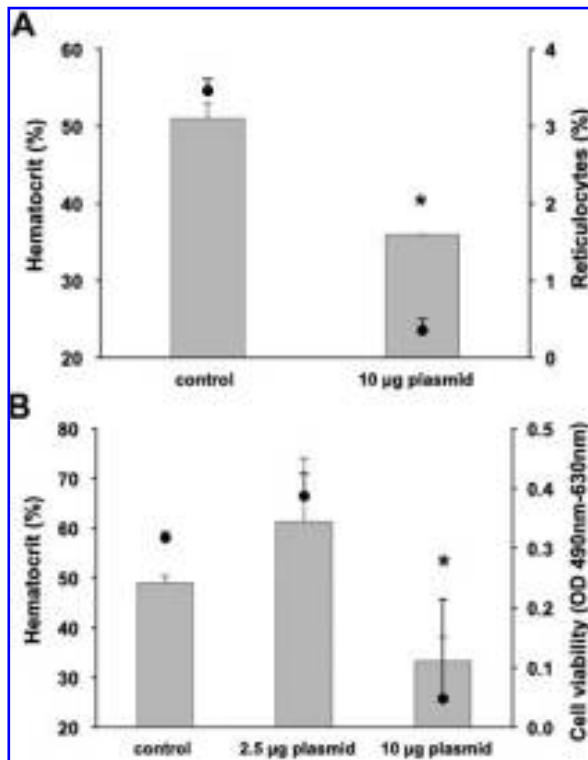


FIG. 4. Reticulocyte percentages in anemic mice and inhibition of EPO-dependent cell growth by the sera of anemic mice. **(A)** Hematocrit level and flow cytometric analysis of reticulocyte percentage in mouse peripheral blood. Blood samples were collected 50 days after intramuscular injection of 10 µg of pCMV-mEPO formulated with block copolymer. Columns represent mean hematocrit levels and circles represent mean reticulocyte percentages. A significant difference in hematocrit level was observed between control mice and mice injected with 10 µg of formulated plasmid ($p < 0.05$) and a significant difference in reticulocyte percentages was observed between the same groups ($p < 0.001$). **(B)** Sera of mice injected with either 2.5 or 10 µg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol were obtained 50 days after intramuscular injection (same mice as represented in Fig. 1A). Eight-fold diluted sera were cultured with DaE-7 cells in growth medium containing EPO at 10 mU/ml. Cell viability was measured by a cell proliferation assay. Columns represent mean hematocrit levels, and circles represent mean cell viability (OD_{490 nm} vs. OD_{630 nm}). Each measure represents the mean and SEM. Significant differences in hematocrit level and cell viability were observed between control mice and mice injected with 10 µg of formulated plasmid: * $p < 0.01$.

dose of plasmid DNA (10 µg) led to a transient increase in the hematocrit level and to autoimmune anemia as shown in Fig. 1A.

Correction of acquired anemia in a mouse model of chronic renal failure

We next investigated whether intramuscular injection of Lutrol-DNA formulations could correct severe anemia in mice. *In vivo*, adenine phosphoribosyltransferase converts adenine into adenine monophosphate. When present in excess, adenine

monophosphate becomes a substrate for xanthine dehydrogenase and is oxidized to 2,8-dihydroxyadenine (DHA) (Wyn-gaarden and Dunn, 1957), which precipitates in the renal interstitium as DHA stones and can induce kidney disease (Greenwood *et al.*, 1982). In rats, a 0.75% adenine diet has been shown to induce chronic renal failure with lesions of kidney tubules and glomeruli (Yokozawa *et al.*, 1986). Because mice had not been used previously in the adenine-induced kidney failure model, we first determined the optimal adenine diet. Above 0.5% adenine, cachectic mice died in 1 or 2 weeks. Below 0.1%, no increase in plasma creatinine and urea was observed. With 0.25% adenine, a progressive decrease in the hematocrit level and body weight, as well as an increase in plasma creatinine and urea levels (Fig. 6A–D) and histological abnormalities in the kidney (Fig. 6E–H), were noticed. At low magnification of sagittal kidney sections, adenine-treated mice (Fig. 6F) had harmonious kidney reduction when compared with the kidneys of untreated mice (Fig. 6E). In treated mice, the renal cortex had an irregular external shape, with focal areas of dilated tubules (arrows). At higher magnification the areas of dilated tubules appeared clearly (Fig. 6H) when compared with the kidney of a normal Swiss mouse (Fig. 6G). The dilated tubules were surrounded by inflammatory infiltrates (Fig. 6H, arrowheads). No morphological difference could be found for glomeruli or vessels at this higher magnification.

Two different Lutrol/pCMV-mEPO treatments of anemic mice were used to study the impact of murine EPO expression on these mice. In the first setting, Swiss mice were fed the 0.25% adenine diet for 65 days. On day 45, they were injected with either 2.5 or 10 µg of pCMV-mEPO or with 10 µg of pCMV-mEPOreverse, all plasmids being formulated with 3% Lutrol (Fig. 7A). In control mice injected with 10 µg of pCMV-mEPOreverse there was no correction of anemia and hematocrit levels averaged 35% from day 45 to day 65. By contrast,

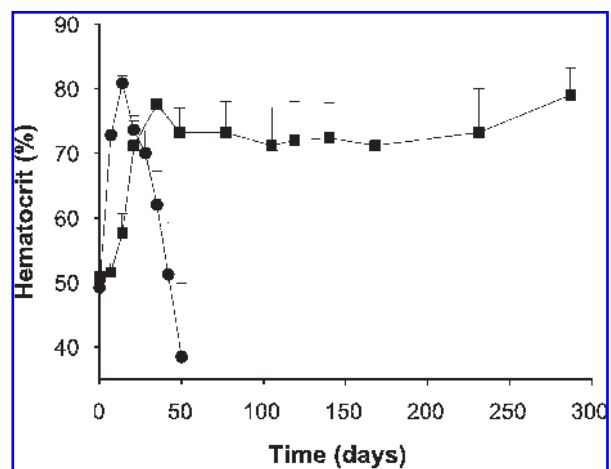


FIG. 5. Mouse hematocrit as a function of time after multiple injections of Lutrol-DNA formulations. Swiss mouse tibial anterior muscles were injected with 2.5 µg of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol on days 0, 7, 14, and 21 (squares). For comparison, the hematocrits of mice injected with 10 µg of formulated plasmid (presented in Fig. 1A) are shown here (circles). Each data point represents the mean and SEM of a group of five mice.

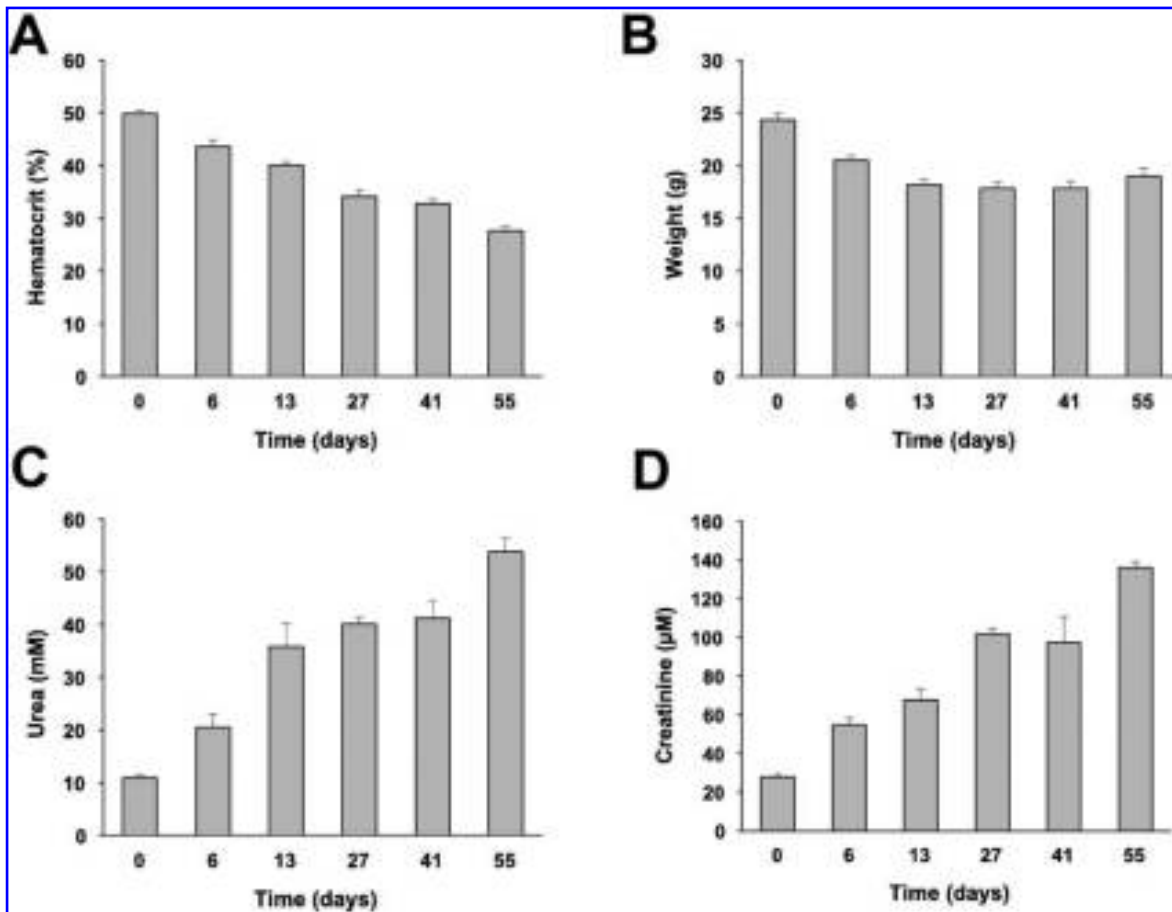


FIG. 6. Characterization of the adenine diet mouse model. Shown are (A) hematocrit, (B) body weight, (C) urea, and (D) creatinine levels as a function of time in mice fed 0.25% adenine. (E–H) Microscopic aspect of kidneys in adenine-treated Swiss mice (F and H) compared with kidneys of age-matched normal Swiss mice (E and G) on day 40 after the beginning of adenine treatment. Arrows, dilated tubules; arrowheads, dilated tubules surrounded by inflammatory infiltrates.

the hematocrit level of mice injected with Lutrol–DNA formulations containing 10 μ g of pCMV-mEPO increased and returned to normal on day 65. Injection of 2.5 μ g of DNA also led to an increase in the hematocrit level, although lower than in the other group. In the second setting (Fig. 7B), mice were intramuscularly injected with Lutrol–DNA formulations containing 2.5 μ g of pCMV-mEPO and 3% Lutrol at the onset of the adenine diet. Two injections were performed, on day 0 and on day 14. In this condition, mice maintained a hematocrit level around normal values (45 to 55%) for at least 40 days. By contrast, in mice receiving no DNA, the hematocrit level decreased sharply and reached 32% on day 40.

We also investigated the effect of mEPO gene transfer in adenine-treated mice on plasma creatinine and urea level (Table 1). Forty days after the beginning of the 0.25% adenine diet, mice intramuscularly injected twice with 2.5 μ g of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol showed significantly elevated plasma creatinine and urea, as in uninjected control mice. These results indicated that intramuscular injection of Lutrol–DNA formulations in adenine-treated mice permitted a correction of anemia but no improvement of kidney disease. Forty days after the beginning of adenine treatment, the retic-

ulocyte percentage and hematocrit level were $1.62 \pm 0.34\%$ and $27.0 \pm 4\%$ in adenine-treated mice, $3.59 \pm 0.04\%$ and $52.0 \pm 2.4\%$ in control mice, and $2.09 \pm 0.3\%$ and $59.3 \pm 6.3\%$ in adenine-treated mice receiving two administrations of 2.5 μ g of pCMV-mEPO. These results strongly suggested that in adenine-treated mice injected twice with 2.5 μ g of pCMV-mEPO formulated with 3% Lutrol, the absolute reticulocyte number was largely increased compared with that of uninjected mice.

DISCUSSION

The present study was designed to determine whether a non-viral gene delivery system containing the murine EPO gene could produce durable, adjustable expression of EPO after intramuscular administration in mice and whether the biological effect of transgenic EPO could have a therapeutic effect in an acquired anemic mouse model related to chronic renal failure. This study shows that repeated injections of low doses of DNA adjusted and sustained the long-term duration of hematocrit changes. By contrast, a single high dose of DNA (10 μ g) formulated with block copolymer or even a high dose of naked

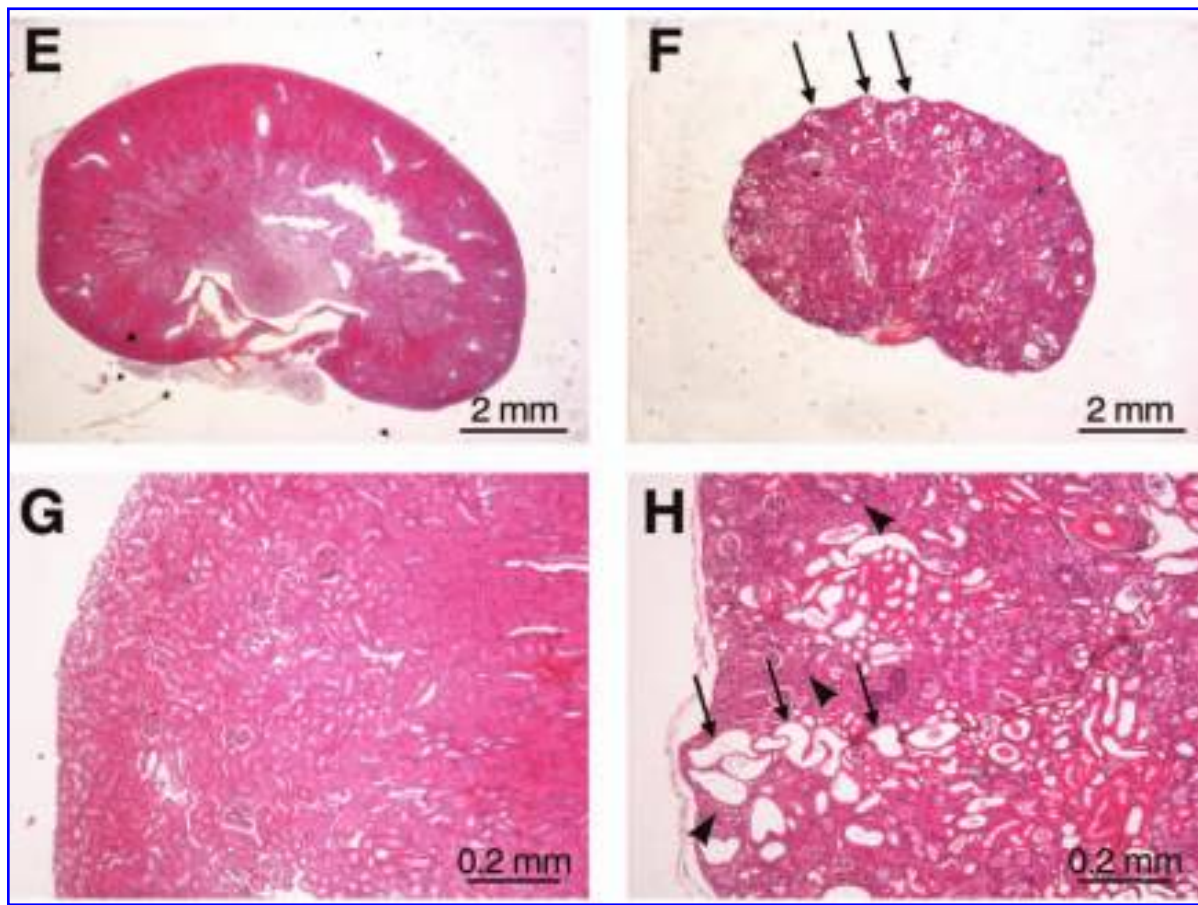


FIG. 6. (Continued).

DNA ($50 \mu\text{g}$) led not only to a transient and excessive increase in the hematocrit but also to anemia. To investigate whether this transient expression was due to the clearance of plasmid DNA from injected muscles, RT-PCR and EPO immunostaining were performed and revealed that muscles of anemic mice were still expressing transgenic mouse EPO. This observation, together with the low reticulocyte numbers in anemic mice and the failure of recombinant EPO to support the growth of an EPO-dependent cell line when incubated with the serum of anemic mice, suggested the existence of antibodies against mouse EPO in mice injected with a high dose of pCMV-mEPO. Our data are in favor of the presence of antibodies against specific posttranslational modifications or aggregated mouse EPO proteins because sequencing of the EPO gene of anemic mice displayed the same sequence as that cloned in the plasmid. This is in good agreement with the results observed after rAAV EPO gene transfer into the skeletal muscle of macaques (Lasne *et al.*, 2004). Most likely, in the present study, neutralizing anti-EPO antibodies cross-reacted with endogenous EPO, leading to anemia. This result was unexpected in mice given that previous studies had shown that *in vivo* recombinant EPO expression could be long-lasting when the mouse EPO gene was under the control of the CMV promoter and delivered intramuscularly by electrotransfer (Kreiss *et al.*, 1999; Rizzuto *et al.*, 1999; Payen *et al.*, 2001). However, those studies were performed in C57BL/6 mice and we found that a stable increase

in the hematocrit value could also be achieved 50 days after injection of C57BL/6 mice with $10 \mu\text{g}$ of pCMV-mEPO formulated with block copolymer. This suggests that there is strain variation regarding the response to $10 \mu\text{g}$ formulated plasmid (even if inbred C57BL/6 mice, unlike humans, represent few genetic variants compared with outbred Swiss mice). Repeated injections of low amounts of DNA ($2.5 \mu\text{g}$) with block copolymer that did not induce, in Swiss mice, histopathological abnormalities and inflammation enabled us to prevent autoimmune reaction and to obtain a prolonged increased hematocrit up to 288 days, at the same level as that obtained 14 days postinjection of $10 \mu\text{g}$ of DNA formulated with block copolymer. While this manuscript was being reviewed, Sebestyen and coworkers described the same proof of principle that repeated delivery of small amounts of DNA led to long-term expression of EPO at a level that promoted erythropoiesis without leading to polycythemia (Sebestyen *et al.*, 2007).

Unmethylated CpG dinucleotides present in the bacterial DNA plasmid sequences have been shown to activate innate and adaptive immune responses (Krieg, 2003). Injections of low DNA amounts reduced the local inflammation and decreased the amounts of delivered CpG dinucleotides and may avoid this unwanted immune induction.

The block copolymer used in the present study cannot be considered an immunoadjuvant in Swiss mice because (1) histopathological analysis of tissue sections of muscles injected

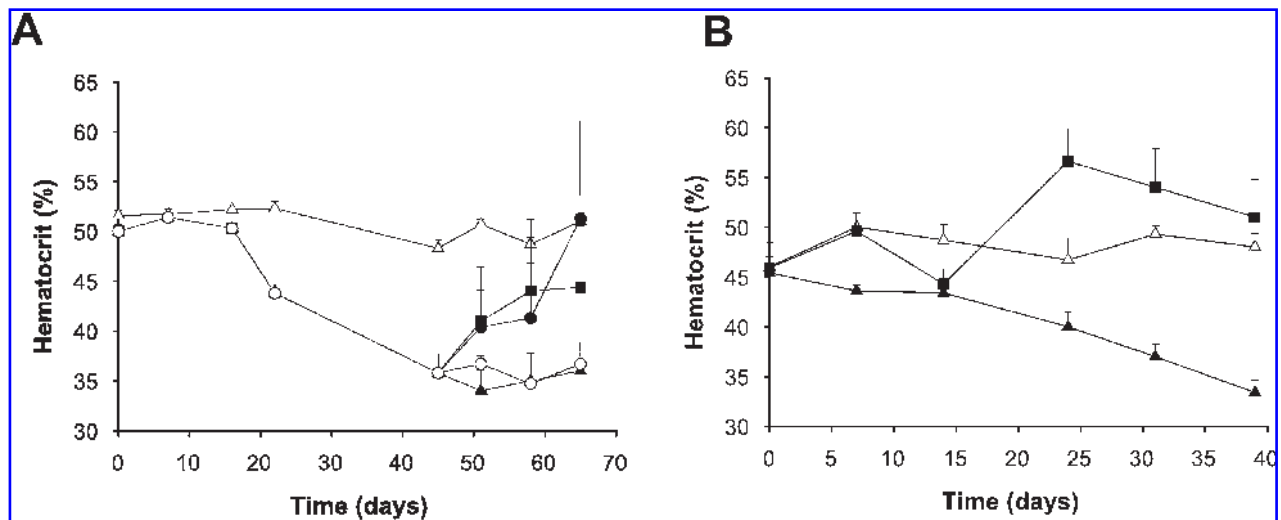


FIG. 7. Biological effects of transgenic mEPO expression in a mouse chronic renal failure model. Swiss mice were fed 0.25% adenine to induce kidney failure-associated anemia. These mice were injected with DNA either when the hematocrit reached 35% (A) or concomitant with the beginning of the adenine treatment (B). (A) After 45 days, five mice were intramuscularly injected with 10 μg of pCMV-mEPO reverse (open circles), with 2.5 μg of pCMV-mEPO (solid squares), or with 10 μg of pCMV-mEPO (solid circles), all formulated with 3% Lutrol, and continued to be fed 0.25% adenine. Five mice were still fed 0.25% adenine (solid triangles) and control mice were fed without adenine (open triangles). Each data point represents the mean and SEM of a group of five mice. (B) Ten mice were fed a 0.25% adenine diet for 40 days (solid triangles). Ten mice were fed 0.25% adenine for 40 days and they were injected twice with 2.5 μg of pCMV-mEPO (days 0 and 14) formulated with 3% Lutrol (solid squares). Control mice were fed without adenine (open triangles). Each data point represents the mean and SEM of a group of 10 mice. A significant difference ($p < 0.001$) was observed between the mean hematocrit level of adenine-treated mice and that of control mice on day 40. No significant difference was observed between the mean hematocrit level of adenine-treated mice receiving 2.5 μg of formulated plasmid twice and that of control mice on day 40.

with Lutrol alone revealed neither myofiber cytopathology nor interstitial inflammation 1 week postinjection; (2) muscle IL-6 levels detected in mice injected with 3% Lutrol were not significantly different compared with that observed in mice injected with control solution; (3) no anemia was observed in Swiss mice intramuscularly injected with pCMV-mEPO amounts ranging from 1 to 5 μg formulated with 3% Lutrol; (4) the intramuscular injection of formulation containing 10 μg of pCMV-mEPO and 3% Lutrol induced severe autoimmune anemia whereas repeated injections of the same cumulative dose of DNA (2.5 $\mu\text{g} \times 4$), also formulated with 3% Lutrol, did not

induce anemia; (5) the injection of recombinant human EPO formulated with 3% Lutrol did not lead to anemia; and (6) the injection of high doses of naked DNA that led to a similar increase in the hematocrit level as that observed with Lutrol-DNA complexes on day 14 postinjection also led to anemia on day 50. These results strongly suggest that autoimmune anemia in Swiss mice is caused by the presence of large amounts of EPO, either aggregated or without proper posttranscriptional modification, in a tissue that is inflamed due to the injection of immunostimulating plasmid DNA of bacterial origin, rather than to an adjuvant effect of the block copolymer itself.

The present study illustrates the high potential of a synthetic vector consisting of the formulation of DNA with block copolymer as an alternative to rAAV vectors for an adjustable and durable transgene expression. The repeated injection scheme indeed is not appropriate for recombinant viral vectors, such as rAAV, because of the immune response induced by the vector itself after the first injection, preventing possible viral vector readministration (Walker *et al.*, 2005). The use of a nonviral gene delivery system in a repeated injection scheme is suitable for the stable secretion of a therapeutic protein. Further work is needed to explore whether this approach can be applied to other relevant larger animal models including rhesus macaque and cat.

Furthermore, repeated injection of a plasmid DNA encoding this protein formulated with block copolymer was able to compensate for the deficiency in genuine EPO secretion and to prevent or correct the anemia induced by acquired renal failure in adenine-treated mice.

We also show the development of an autoimmune anemia in mice as a result of intramuscular gene transfer of a plasmid en-

TABLE 1. PLASMA CREATININE AND UREA LEVELS IN ADENINE-TREATED MICE^a

	Creatinine (μM)	Urea (mM)
Control	16.2 \pm 1.6	6.2 \pm 0.3
0.25% adenine	87.2 \pm 13.3	54.5 \pm 8.8
0.25% adenine + injected plasmid (2 \times 2.5 μg) + 3% Lutrol	76.4 \pm 21.6	68.6 \pm 10.5

^aOn day 40, mice (described in Fig. 6B) were evaluated for plasma levels of creatinine and urea. Values represent means \pm SEM of a group of five mice. Significant differences ($p < 0.005$) in mean plasma creatinine and urea levels were observed between adenine-treated mice receiving two administrations of 2.5 μg of formulated pCMV-mEPO and control mice.

coding self-antigen. This phenomenon had been observed previously only in macaques and in cats when the EPO gene was delivered with rAAV vector (Chenuaud *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2005). In the present study, anemic mice 50 days postinjection had a hematocrit level of 17.5% whereas their serum EPO level was 85.5 mU/ml. The same observation was reported by Gao and coworkers in cynomolgus macaque 17111, which had 95 days postinjection a hematocrit level below 10% and an EPO value of 100 mU/ml (Gao *et al.*, 2004). In both studies, the discrepancy between low hematocrit and high serum EPO value could be explained by the fact that EPO-driven autoanemia is probably a transient phenomenon. Indeed, Gao and coworkers reported that at the time of necropsy, the interfering antibodies had begun to disappear in some of the animals. Therefore, the Swiss mouse model could be used to generate simple tools to study autoimmune responses to specific transgenic proteins (or glycoproteins such as EPO) in order to understand factors that predispose to transgene-driven autoimmunity.

Our results provide a proof of principle that step-wise injections of small amounts of plasmid DNA lead to a gradually increasing additive physiological effect in EPO-based gene therapy. This approach could solve the issue of regulating EPO expression levels to prevent polycythemia and the development of neutralizing antibodies against viral vectors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Anne Janin and Stephanie Belhadj (Saint-Louis Hospital, Paris, France) for expertise in kidney histology, to Clothilde Gourden (In-Cell-Art, Nantes, France) and Elodie Ribert for technical expertise in *in vitro* studies, to Virginie Forest for flow cytometric analysis (Institut du Thorax, INSERM U533, Nantes, France), and to Dr. Robert Barthel for careful reading of the manuscript. This work was supported by the APEX program financed by INSERM, by the ACI program from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies, and by special grants from the Association Française contre les Myopathies and Vaincre la Mucoviscidose.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exists.

REFERENCES

- 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.
- CASADEVALL, N., NATAF, J., VIRON, B., KOLTA, A., KILADJIAN, J.J., MARTIN-DUPONT, P., MICHAUD, P., PAPO, T., UGO, V., TEYSSANDIER, I., VARET, B., and MAYEUX, P. (2002). Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* **346**, 469–475.
- CHENUAUD, P., LARCHER, T., RABINOWITZ, J.E., PROVOST, N., CHEREL, Y., CASADEVALL, N.J., SAMULSKI, R., and MOULLIER, P. (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* **103**, 3303–3304.
- DESIGAUX, L., BELKACEM, M.B., RICHARD, P., CELLIER, J., LÉONE, P., CARIO, L., LEROUX, F., TAVIOT-GUÉHO, C., and PITARD, B. (2006). Self-assembly and characterization of layered double hydroxide/DNA hybrids. *Nano Lett.* **6**, 199–204.
- FAVRE, D., BLOUIN, V., PROVOST, N., SPISEK, R., PORROT, F., BOHL, D., MARME, F., CHEREL, Y., SALVETTI, A., HURTREL, B., HEARD, J.M., RIVIERE, Y., and MOULLIER, P. (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J. Virol.* **76**, 11605–11611.
- GAO, G., LEBHERZ, C., WEINER, D.J., GRANT, R., CALCEDO, R., McCULLOUGH, B., BAGG, A., ZHANG, Y., and WILSON, J.M. (2004). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* **103**, 3300–3302.
- GREENWOOD, M.C., DILLON, M.J., SIMMONDS, H.A., BARRATT, T.M., PINCOTT, J.R., and METREWELI, C. (1982). Renal failure due to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. *Eur. J. Pediatr.* **138**, 346–349.
- KREISS, P., BETTAN, M., CROUZET, J., and SCHERMAN, D. (1999). Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *J. Gene Med.* **1**, 245–250.
- KRIEG, A.M. (2003). CpG motifs: The active ingredient in bacterial extracts? *Nat. Med.* **9**, 831–835.
- LASNE, F., MARTIN, L., DE CEARRIZ, J., LARCHER, T., MOULLIER, P., and CHENUAUD, P. (2004). “Genetic doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol. Ther.* **10**, 409–410.
- 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**, 986–999.
- LIPPIN, Y., DRANITZKI-ELHALEL, M., BRILL-ALMON, E., MEIZAHAV, C., MIZRACHI, S., LIBERMAN, Y., IAINA, A., KAPLAN, E., PODJARNY, E., ZEIRA, E., HARATI, M., CASADEVALL, N., SHANI, N., and GALUN, E. (2005). Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. *Blood* **106**, 2280–2286.
- NIELSEN, O.J., and THAYSEN, J.H. (1989). Response to erythropoietin in anaemic haemodialysis patients. *J. Intern. Med.* **226**, 89–94.
- PAYEN, E., BETTAN, M., ROUYER-FESSARD, P., BEUZARD, Y., and SCHERMAN, D. (2001). Improvement of mouse β -thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA. *Exp. Hematol.* **29**, 295–300.
- PITARD, B., POLLARD, H., AGBULU, 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.
- 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.
- RICHARD, P., POLLARD, H., LANCTIN, C., BELLO-ROUFAI, M., DESIGAUX, L., ESCANDE, D., and PITARD, B. (2005a). Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation. *J. Gene Med.* **7**, 80–86.
- RICHARD, P., BOSSARD, F., DESIGAUX, L., LANCTIN, C., BELLO-ROUFAI, M., and PITARD, B. (2005b). Amphiphilic block copolymers promote gene delivery *in vivo* to pathological skeletal muscles. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1318–1324.
- RIVERA, V.M., GAO, G.P., GRANT, R.L., SCHNELL, M.A., ZOLTICK, P.W., ROZAMUS, L.W., CLACKSON, T., and WILSON, J.M. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105**, 1424–1430.

- RIZZUTO, G., CAPPELLETTI, M., MAIONE, D., SAVINO, R., LAZZARO, D., COSTA, P., MATHIESEN, I., CORTESE, R., CILIBERTO, G., LAUFER, R., LA MONICA, N., and FATTORI, E. (1999). Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6417–6422.
- SAKAGUCHI, M., KOISHIHARA, Y., TSUDA, H., FUJIMOTO, K., SHIBUYA, K., KAWAKITA, M., and TAKATSUKI, K. (1987). The expression of functional erythropoietin receptors on an interleukin-3 dependent cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 7–12.
- SEBESTYEN, M.G., HEGGE, J.O., NOBLE, M.A., LEWIS, D.L., HERWEIJER, H., and WOLFF, J.A. (2007) Progress toward a non-viral gene therapy protocol for the treatment of anemia. *Hum. Gene Ther.* **18**, 269–285.
- WALKER, M.C., MANDELL, T.C., CRAWFORD, P.C., SIMON, G.G., CAHILL, K.S., FERNANDES, P.J., MACLEOD, J.N., BYRNE, B.J., and LEVY, J.K. (2005). Expression of erythropoietin in cats treated with a recombinant adeno-associated viral vector. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 450–456.
- WYNGAARDEN, J.B., and DUNN, J.T. (1957). 8-Hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2, 8-dihydroxy-adenine by xanthine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, 150–156.
- YOKOZAWA, T., ZHENG, P.D., OURA, H., and KOIZUMI, F. (1986). Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* **44**, 230–234.

Address reprint requests to:

Dr. Bruno Pitard

INSERM U533

Faculté de Médecine

1 rue Gaston Veil

Nantes F-44035, France

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

Received for publication July 7, 2006; accepted after revision January 14, 2008.

Published online: March 14, 2008.



Probing the mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale

Journal:	<i>Nucleic Acids Research</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	2 Standard Manuscript - UK Editorial Office
Key Words:	DNA transfer, endosomal escape, electron microscopy, lipoplexes, nanoparticle probes



Review

1
2
3
4 Probing the mechanism of action of cationic lipid/DNA
5
6
7
8 lipoplexes at a nanometric scale
9
10
11
12
13
14
15

16 Olivier Le Bihan[†], Raphaël Chèvre^{‡,†}, Stéphane Mornet[#], Boris Garnier[†], Bruno Pitard^{‡,§}, and Olivier
17
18 Lambert^{†*}
19
20
21
22
23
24
25

26 †CBMN UMR-CNRS 5248, Université Bordeaux, ENITAB, IECB, Avenue des Facultés, F-33405
27 Talence, France. ‡ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U915, F-44035 Nantes,
28 France. † Université de Nantes, Faculté de Médecine, Institut du Thorax, F-44035 Nantes, France. § IN-
29 CELL-ART, 1 place Alexis Ricordeau, F-44093 Nantes, France. # ICMCB, CNRS, Université Bordeaux,
30
31
32
33
34
35
36 87 avenue du Dr. A. Schweitzer, F-33608 Pessac, France.
37
38
39
40
41
42

43 * Corresponding author: Olivier Lambert; CBMN UMR-CNRS 5248, Université Bordeaux, Avenue des
44 Facultés, F-33405 Talence, France, Tel: +33 5 40003490; Fax +33 5 40003484, Email:
45 o.lambert@cbmn.u-bordeaux.fr
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

1
2
3
4 Cationic lipids are used for delivering nucleic acids (lipoplexes) into cells for both therapeutic and
5
6 biological applications. A better understanding of the identified key-steps, including endocytosis,
7
8 endosomal escape and nuclear delivery is required for further developments to improve their efficacy.
9
10 Here, we developed a labelling protocol using aminated nanoparticles as markers for plasmid DNA to
11
12 examine the intracellular route of lipoplexes using transmission electron microscopy. Cellular uptake
13
14 and the mechanism of endosomal escape of DNA molecules were monitored by providing snapshots of
15
16 morphological changes of lipoplexes, membrane reorganisations and endosomal membrane ruptures.
17
18 The study carried out on two cationic lipids, bis(guanidinium)-tris(2-aminoethyl)amine-cholesterol
19
20 (BGTC) and dioleyl succinyl paramomycin (DOSP), showed two pathways of endosomal escape that
21
22 could explain their different transfection efficiencies. For BGTC, a partial or complete dissociation of
23
24 DNA from cationic lipids occurred before endosomal escape while for DOSP, lipoplexes remained
25
26 visible within ruptured vesicles suggesting a more direct pathway for DNA release and endosome
27
28 escape. In addition, the formation of new multilamellar lipid assemblies was noted, which could have
29
30 resulted from the interaction between cationic lipids and cellular compounds. These results provide new
31
32 insights into DNA transfer pathways and possible implications of cationic lipids in lipid metabolism.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

1
2
3 The delivery of nucleic acids into cells is increasingly of interest for therapeutic purposes, with a
4 global relevance to any disease amenable to manipulation at the gene expression level. The development
5 of non-viral vectors composed of plasmid DNA complexed to a number of molecules such as cationic
6 lipids or polymers, so-called lipoplexes and polyplexes, respectively, is of particular importance for both
7 *in-vitro* and *in-vivo* gene transfer strategies. Although their transfection efficiencies are less than those
8 of viral systems, the potential risks associated with their use are lower than those associated with viral
9 systems, encouraging efforts to improve non-viral transfection efficiencies (see 1-6 for recent reviews).
10 *In-vitro* gene delivery using cationic lipids or cationic polymers has been studied extensively using
11 various biochemical and photonic visualisation techniques for delineating uptake, intracellular
12 trafficking and transgene expression. More than one pathway of non-viral vector uptake has been
13 identified, involving clathrin-dependent, clathrin-independent and cholesterol-dependent pathways.
14 However, the details of processes related to DNA release, endosomal vesicle escape and transport to the
15 nucleus remain less well established due to the lack of resolution of available techniques.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 To explore further the mechanisms of gene transfer regarding these crucial barriers, strategies
35 providing a visualisation of this process at a molecular scale are very much required. Transmission
36 electron microscopy (TEM) is a very suitable imaging technique for observing cellular and subcellular
37 structure at nanometer resolution. While the TEM technique is currently used for structural
38 characterisation of synthetic vectors, only a few attempts have been made to observe lipoplexes
39 internalised into the cell. Although images of lipoplexes internalised into the cell showing their
40 multilamellar organisation have been obtained (7-9), unambiguous identification of the lipoplexes
41 through the entirety of their intracellular routes is of crucial importance for a more in-depth investigation
42 to guide the synthesis of future vectors. Investigations have been carried out using labelled DNA or
43 lipid, based on immunostaining or streptavidin-gold complexes, allowing their detection within the cell,
44 but the maturation of lipoplexes and/or endosomal escape process were not described (8, 10-12). The
45 main drawback to the study of non-viral vector trafficking at the nanometric scale is the absence of
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 appropriate imaging probes that combine detection suitable for TEM observations and visualisation of
2 artefact-free lipoplex structures.
3

4
5 Nanoparticles may help to overcome these limitations. Indeed, nanoparticles possess physical and
6
7 chemical properties that make them powerful tools in medicine including therapy, diagnosis and
8
9 imaging (13). Among these current applications, nanoparticles have proved to be successful in their
10
11 potential for *in-vivo* imaging. As an excellent example of their suitability, magnetic nanoparticles have
12
13 been used frequently as contrast agents for magnetic resonance imaging and quantum dots for optical
14
15 imaging techniques, providing real-time nanoparticle biodistributions (14). Following these examples,
16
17 we propose to extend the imaging applications of nanoparticles to TEM. Our imaging approach relies on
18
19 the labelling of plasmid DNA (pDNA) with nanoparticle probes that are easily recognisable by TEM.
20
21 This method will allow both tracking of labelled lipoplexes within the cell and also description at the
22
23 nanometre scale of the morphology of these lipoplexes and eventually the structural changes undergone
24
25 during their intracellular traffic.
26
27
28
29

30
31 In the present study we used a 10-15 nm core-shell, silica-based nanoparticle (Np) containing a
32
33 maghemite nanocrystal (for TEM) that possesses an aminated-modified surface (for its pDNA binding)
34
35 satisfying the requisites mentioned above. We characterised the interactions between Nps and pDNA
36
37 using a co-sedimentation assay. As cationic lipids have been among the most efficient synthetic gene
38
39 delivery reagents *in vitro*, we used guanidinium-cholesterol cationic lipid (BGTC) and dioleoyl succinyl
40
41 parmomycin (DOSP), respectively, to form lipoplexes (15-17). Lipoplexes labelled with Nps were
42
43 visualized by cryo-TEM. These labelled lipoplexes were then incubated with adherent cells and the
44
45 cellular traffic was studied on ultrafine plastic cell sections. The results showed morphological changes
46
47 of the lipoplexes after cellular uptake, ruptured endosomal vesicles and newly-formed membrane
48
49 assemblies, providing new insights into DNA transfer mediated by cationic lipids.
50
51
52
53
54
55

56 MATERIAL AND METHODS

57 *Chemicals, plasmid and cationic liposomes*

1 All chemicals were purchased from Sigma. Absolute ethanol (J.T. Baker) and ammonia (Carlo Erba)
2 were used as received. Water was deionised (resistivity higher than 18 M Ω).
3

4
5 pCMV-Luc (6.3 kb) is a plasmid encoding the luciferase reporter gene under the control of the human
6
7 cytomegalovirus immediate-early gene promoter (18). Plasmid DNA was purified from recombinant *E.*
8
9 *coli* using Endofree plasmid purification columns (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). BGTC/DOPE and
10
11 DOSP/DOPE liposomes were obtained as previously described (8,17,19).
12
13

14 15 16 17 ***Preparation and surface modification of core-shell, silica-based nanoparticles***

18
19 Silica-based nanoparticles contained 7 nm diameter maghemite nanocrystals in a core-shell
20
21 morphology, providing a high-contrast image. Maghemite nanoparticles prepared by a coprecipitation
22
23 method (20) were used as seeds in the reaction media for the growth of the controlled-size silica shell,
24
25 according to the method derived from the Stöber process (21) and previously reported (22). For this
26
27 study, 10-15 nm diameter $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ nanoparticles were generated. The particle surface was aminated
28
29 with N-(trimethoxysilylpropyl)ethylenediamine using the procedure previously described (23). Surface-
30
31 modified silica nanoparticles (Nps) were stored in 20 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4 with a final
32
33 concentration of 1 g/L.
34
35
36
37
38
39

40 41 ***Characterisation of Np/pDNA interactions***

42
43 A 30 μL aqueous solution containing 2.25 μg pCMV-Luc (pDNA) was gently mixed with an equal
44
45 volume of Nps at the desired concentration. After a 30 min incubation time, the mix was centrifuged at
46
47 22 000 g, for 30 min, at 20 $^\circ\text{C}$ to pellet the total Nps content. To quantify pDNA that did not pellet with
48
49 Nps, 15 μl aliquots of each supernatant were electrophoresed through a 1.2 % agarose gel at 50 V/cm for
50
51 1 h. Gels stained using SYBR-green were scanned under UV illumination and pDNA was quantified
52
53 using Image J software. As a control, pDNA alone was submitted to the same procedure and used as a
54
55 reference for quantification measurement. The stability of Np/pDNA complexes regarding ionic strength
56
57 was measured in a final volume of 100 μl at the desired NaCl concentration. The effect of pH on
58
59
60

1 Np/pDNA complexes was measured using 15 mM sodium citrate (pH 4 and pH 5), 10 mM MES (pH 6),
2
3 5 mM Hepes (pH 7), 20 mM Tris-HCl (pH 8) and 5 mM sodium borohydruce (pH 9) buffers,
4
5 respectively. According to the procedure described above, DNA recovered in the supernatant was
6
7 submitted to gel electrophoresis and then quantified. All experiments were reproduced three times.
8
9

10 11 *Labelling of lipoplexes*

12
13
14 2.17×10^{12} Nps and 3 μg pDNA were mixed at a ratio Np/pDNA = 5 (mole/mole) in 300 mM NaCl.
15
16 Following this, an equal volume of cationic liposome was added in pure water. The final lipid cationic
17
18 charge ratio was equal to 4. For transfection assays, the formulation prepared in a 150 μl final volume
19
20 was deposited in each well.
21
22

23 24 25 *Cell culture transfection*

26
27
28 H1299 human lung cancer cells were cultured at 37 °C in 5 % CO₂/humidified atmosphere, in DMEM
29
30 with glucose, L-glutamine, and pyruvate, supplemented with 1 % streptomycin/penicillin (GIBCO and
31
32 Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and 10 % FCS (Eurobio, Courtaboeuf, France). At day-1
33
34 before transfection, the cells were transferred onto 24-well culture plates, at 65 000 cells per well,
35
36 resulting in ~ 70-80 % confluence 24 h later, prior to transfection.
37
38

39
40 Cells were transfected with labelled and unlabelled BGTC/DOPE-DNA and with DOSP/DOPE-DNA
41
42 lipoplexes formulated at a cationic lipid/DOPE-DNA charge ratio of 4. Lipoplexes containing 3 μg
43
44 luciferase plasmid were added to each well, i.e. 150 μl complex and 450 μl serum-free DMEM. After 3
45
46 h, the transfection medium was replaced by 1 ml fresh medium. Cells were cultured for an additional 21
47
48 h before gene expression was determined. Luciferase activity was measured using the Promega
49
50 luciferase assay system (Madison, WI, USA), according to the procedure previously described (19).
51
52 Transfection experiments were performed in triplicate.
53
54
55
56
57
58

59 *Conventional TEM and cryo-TEM*

1 For cryo-TEM, a 5 μ l sample was deposited onto a holey carbon coated copper grid. The excess was
2 blotted with a filter paper. Unstained samples were frozen into liquid ethane and the grids were mounted
3 onto a Gatan 626 cryoholder, transferred into the microscope, and maintained at a temperature of
4 approximately -175 °C. Sample observations were performed with a FEI Tecnai F20 transmission
5 electron microscope, operating at 200 kV. Low-dose images were recorded at a nominal magnification
6 of x 50 000 with a 2k x 2k USC1000 slow-scan CCD camera (Gatan, CA, USA).
7
8
9
10
11
12

13
14 For TEM, cells were processed for ultramicrotomy according to standard procedures. Briefly, after
15 trypsin treatment, cells from 8 wells were pooled, pelleted and fixed for 2 h in a mixture of 2.5 %
16 glutaraldehyde and 4 % paraformaldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.4). Sample pellets were then
17 post-fixed for 1 h at 4 °C with 1 % osmium tetroxide in the same buffer and were dehydrated with
18 ethanol before embedding in Epon-Araldite. Thin sections (65 nm thickness) were stained successively
19 with 5 % uranyl acetate and 1 % lead citrate. TEM observation was performed with a FEI tecnai F20
20 operated at 200 kV.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 RESULTS

34
35 The present work aims to understand at a nanometre scale the gene transfer mechanism, from its
36 cellular uptake to its delivery into the nucleus, using nanoparticle (Np) as the imaging probe. For this
37 purpose, we labelled lipoplexes with Nps producing a high electron-scattering density easily observable
38 by TEM (Figure 1). The Np was a 10-15 nm core-shell, silica-based nanoparticle containing 7 nm
39 diameter maghemite nanocrystal, unambiguously recognisable by TEM. Zeta potential measurements on
40 these aminated-modified Nps previously showed that the Np surfaces exhibited a high density of
41 positive charges brought by ammonium groups of the polysiloxane films in neutral and acidic media
42 (23). Its aminated-modified surface allowed the formation of pDNA-Np complexes mediated by
43 electrostatic interactions (Fig. 1A). To analyse the mechanism of action of lipoplexes, we focused our
44 study on two cationic lipids, both known to be efficient DNA carriers. BGTC was made of a cholesterol
45 hydrophobic moiety attached to guanidinium group and DOSP was composed of two aliphatic chains
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 linked to an aminoglycoside head group. Thus, pDNA-Np complexes were mixed with either BGTC-
2 DOPE or DOSP-DOPE liposomes to formulate labelled lipoplexes. Cryo-TEM image of labelled
3 BGTC-lipoplexes revealed the presence of randomly-distributed Nps within lipid/pDNA assemblies
4 (Fig. 1B). This indicated that labelled lipoplexes kept their typical multilamellar organisation and that
5 their edges remained accessible to cell interaction. Thus, we expected that this labelling process should
6 not modify the physicochemical properties of the lipoplexes, nor the transfection efficiency.
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

17 **Physico-chemical characterisation of the interaction between pDNA and Np**

18 To adjust the Np/pDNA ratio (r) for lipoplex labelling, we first investigated the effect of increasing
19 Nps on fixed DNA concentration (Fig. 2). Fig. 2A shows the results of agarose gel electrophoresis of
20 pDNA, free and complexed with Nps. The mobility of pDNA was progressively restricted with
21 increasing Np amount. DNA immobilisation within the gel was due to Np/pDNA interactions. DNA
22 removal from the solution was analysed by centrifugation (Figs. 2B, 2C). At $r = 1$, 100 % of DNA was
23 present in the supernatant. For r ranging from 3 to 7, the amount of DNA increased gradually in the
24 pellet. The formation of Np/DNA complexes was visualised by TEM (Figs. 2F-G), showing few
25 particles associated with DNA. At $r = 10$ and beyond, the total amount of pDNA was in the pellet. Large
26 Np/pDNA complexes were formed as observed by TEM (Fig. 2H). Our results were in good agreement
27 with previous results on interactions between DNA and 26 nm aminated particles showing a similar
28 cosedimentation profile (24). At a (w/w) ratio of 10, they showed that > 90 % of DNA was associated
29 with particles. Note that in our conditions a (w/w) ratio of 10 corresponded to $r = 17.8$. It is interesting
30 to note that, at high Np/pDNA ratios (> 10), it has been reported that aminated silica particles enhanced
31 transfection efficiency (24,25). To avoid this effect, we chose a lower Np/pDNA ratio. In subsequent
32 experiments, we selected $r = 5$, for which no enhancing effect has been measured. We, then, studied the
33 influence of pH on Np/pDNA complexes at $r = 5$. For a pH range between 4 and 9, the fraction of DNA
34 present in the pellet varied between 42 % and 32 % (Fig. 2D). At neutral and acidic pH no significant
35 variation was observed suggesting that the complexes were stable under cellular pH conditions. In
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 addition, the amount of pDNA in the supernatant remained similar from 0 to 2 M NaCl, indicating that
2 Np/pDNA complexes were stable for these ionic strengths (Fig. 2E).
3
4
5
6

7 **Transfection efficiency measurements of labelled and unlabelled lipoplexes**

8
9
10 Labelled lipoplexes containing the gene reporter were incubated with a monolayer of H1299
11 pulmonary epithelial cells. Using formulations containing BGTC, the measurements of luciferase
12 activity of both labelled and unlabelled lipoplexes were 26.72 ± 0.19 and 37.92 ± 5.12 ng luciferase per
13 mg protein, respectively, indicating that at $r = 5$ the presence of Nps did not influence notably the
14 transfection efficiency according to previous data (24,25).
15
16
17
18
19

20
21 This result suggested that the use of such small Nps should not interfere with the intracellular traffic
22 of the lipoplexes. Interestingly, the particle size might be of importance regarding the DNA transfer, as it
23 has been reported that the use of 230 nm silica nanoparticles was able to enhance transfection efficiency
24 (26). In our present work, the size of Nps is small with respect to the lipoplexes, such that it should not
25 markedly change their morphologies or surface properties (Fig. 1C). It is noteworthy that both labelled
26 and unlabelled formulations with DOSP showed similar transfection efficiencies (data not shown).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
These results validated the use of Nps as an imaging probe, independent of their DNA carrier capacity
(27).

42 **EM observations of the intracellular fate of labelled BGTC lipoplexes**

43
44
45 Plastic sections of cells observed by TEM allow the morphological characterisation of BGTC
46 lipoplexes interacting with cells and also after cellular uptake. As Np/pDNA complexes were stable
47 under a broad range of saline and pH conditions and do not modify the transfection efficiency of parent
48 BGTC-DOPE/DNA lipoplexes, lipoplex tracking was unambiguously provided by Np probes.
49
50
51
52
53

54
55 This analysis revealed morphological changes undergone by lipoplexes during their intracellular
56 trafficking process. For the sake of clarity, we have classified these structural arrangements into three
57 main parts, which may be related to typical steps of a gene delivery pathway. The first part relates to
58
59
60

1 lipoplexes which kept their original morphology (Fig. 3). Labelled lipoplexes were observed interacting
2 with the plasma membrane (Figs. 3A, 3B). They formed micron-sized clusters of roundish multilamellar
3 structures containing Nps. The formation of these micron-sized clusters was due to the aggregation of
4 structures containing Nps. The formation of these micron-sized clusters was due to the aggregation of
5 lipoplexes induced by the culture medium use to grow the cells, as has already been described (28). The
6 6.5 nm repeat distance of lamellae (inset in Fig. 3B) was similar to that visible on cryo-TEM image (Fig.
7 1C), meaning that the repetitive motif corresponded to DNA strands complexed with cationic lipid
8 bilayers. Lipoplexes whose morphologies resembled those present outside the cell, were also visible in
9 the cytoplasm (Figs. 3C,3D). In addition to a similar morphology, the repeat distance between lipid
10 membrane layers remained unchanged, i.e. 6.4-6.5 nm (inset in Fig. 3D). Lipoplexes were contained in
11 an endosomal vesicle (arrows in Fig. 3D) indicating that their cellular entry had been achieved according
12 to an endocytic process. Although the exact mechanism was not elucidated, evidence based on the
13 lipoplex size suggested that a clathrin-mediated internalisation was not likely. Instead, a mechanism
14 capable of large object entry could be preferred.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31 The second part concerns lipoplexes that underwent significant morphological changes. Typical views
32 are presented in Fig. 4. Lipoplexes looked different from genuine structures, as shown in Fig. 3.
33 Considerable lipid membrane reorganisations took place within the endocytic vesicles (Figs. 4A-D).
34 Roundish structures that were a landmark of genuine lipoplexes disappeared, suggesting that lipoplexes
35 were destabilised. New, large, multilamellar structures with a 5.5 nm membrane to membrane repeat
36 distance were visible at the endosomal vesicle edges (inset Fig. 4B). Moreover, Nps were not associated
37 with these multilayer structures, but rather remained mainly in the middle of the vesicle. These results
38 showed that pDNA was not sandwiched within these new lipid structures and suggested that this
39 important morphological rearrangement probably triggered the partial or complete dissociation of pDNA
40 from cationic lipids. In addition, another aspect of morphological changes was encountered. The
41 membrane of some endocytic vesicles containing lipoplexes had disappeared over a long distance
42 revealing the loss of membrane integrity and a potential mixing of the endosomal compartment with the
43 cytosol (Fig. 4C). The endocytic compartment exhibited a brighter contrast than the cytosol, which
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 delineated the ghost contour of the vesicle. At the periphery, multilamellar lipid structures were present
2 (asterisks in Fig. 4C). Inside the vesicle, Nps were visible, alone or associated with the few remaining
3 lipoplexes. This membrane disruption provides a pertinent insight into endosomal membrane
4 destabilisation and pDNA endosomal escape. The presence of neo-formed multilamellar structures
5 suggested that lipoplex reorganisation occurred before the endosome rupture. However, we cannot
6 exclude the possibility that it was concomitant with the release of pDNA from the lipoplexes.
7 Unravelling this intriguing question would require further investigation. It is noteworthy that endocytic
8 vesicles exhibiting morphological changes were observed close to the nucleus (Figs. 4B, 4C, 4F), as was
9 isolated Nps (Fig. 4E). The transfer of pDNA from the endocytic vesicles to the nucleus may, then, be
10 somewhat facilitated by this close vicinity. Despite close scrutiny, no Np was seen in the nucleus, hence
11 a description of the ultimate step of nucleus entry was not achievable. It is possible that, during its
12 transfer, pDNA dissociated from Nps.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 Of interest, at the edge of the vesicle ghost (Fig. 4C), multilamellar vesicles exhibited two lipid
29 arrangements, with 5.5 nm and 3.6 nm spacing, respectively. The 5.5 nm lipid layers, similar to those in
30 Fig. 3B, were present in the outer part of the stack, facing the cytosol, while the 3.6 nm lipid layers were
31 facing the luminal part of the vesicle. This peculiar lipid arrangement indicated that lipid – lipid
32 interactions were modified during lipoplex trafficking. Indeed, this phenomenon was also observed, to a
33 lesser extent, for other endocytic vesicles containing modified lipoplexes (Fig. 4D). Although there is
34 not yet a clear explanation of the driving forces underlying this mechanism, it could correspond to a
35 peculiar rearrangement of the cationic lipid with cellular compounds, leading to a 3.6 nm packing. In
36 accordance with this hypothesis, large and complex multilamellar vesicles exhibiting a 3.6 nm repeat
37 distance were also observed in compartments containing Nps (Fig. 4F).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 The third part reports on 3.6 nm spaced, large, multilamellar lipid structures devoid of Nps (Figs. 5A,
53 5B). It is very tempting to propose that such lipid assemblies derived from those presented in Figs. 4C
54 and 4F, which would have gone through a further maturation process. It is interesting to note that these
55 typical lipid structures, with the same regular lipid packing, were also observed outside the cell,
56
57
58
59
60

1 suggesting that these lipid assemblies were rejected by the cell (Figs. 5C, 5D). These data provided
2 evidence that cells eliminated assemblies containing cationic lipids, and highlighted a mechanism
3 involving the formation of pure multilamellar lipid assemblies with a typical membrane packing.
4
5
6
7
8

9 **EM observations of the intracellular fate of labelled DOSP lipoplexes**

10 Like BGTC lipoplexes, lipoplexes formulated with DOSP formed multilayered structures with DNA
11 sandwiched in-between (17). Labelling DOSP lipoplexes with Nps did not modify their overall features,
12 as observed in Fig. 6 showing the early step of DOSP lipoplex entry. Several labelled lipoplexes (the
13 enlarged view shows Nps marked with black arrows in Fig. 6B) were observed in interaction with the
14 plasma membrane (Fig. 6A). As mentioned previously, typical features of lipoplexes exhibiting regular
15 lamellar structures with a 6.5 nm repeat distance were also visible (Fig. 6B and inset). Lipoplexes were
16 observed intact internalised into the cell and were surrounded by an endosomal membrane (asterisk in
17 Fig. 6D) revealing an early intracellular pathway similar to that of BGTC lipoplexes.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 Fig. 7 shows typical morphological changes of labelled DOSP lipoplexes at the level of the endocytic
32 vesicle. Interestingly, vesicles appeared less dense than those in Fig. 6C, and the endocytic membrane
33 was missing over a long distance suggesting a release of material as observed for BGTC in Fig.4C. We
34 did not, however, observe vesicles containing extensive membrane reorganisation similar to that
35 described in Figs. 4A, 4B. These data suggested a more direct endosomal escape for DOSP than for
36 BGTC. The endocytic vesicles contained Nps and lamellar structures located preferentially at their
37 boundaries (Figs. 7A, 7D, 7G). Two types of lamellar structures were observed, i.e. 6.5 nm repeat
38 compact assemblies ascribed to lipoplexes (Fig. 7B) and 5.5 nm multilamellar structures devoid of Nps,
39 likely corresponding to newly-formed lipid stacks (Figs. 7C-7I). The 5.5 nm repeat assemblies had
40 various shapes, i.e. long planar structures (Figs. 7D-7E), curved structures (Fig. 7C) and elongated
41 vesicles present at the vicinity of the endocytic vesicles (Figs. 7E-7H). The formation of the latter
42 vesicles could arise from the budding of the planar structures as suggested by the curved shape (Fig. 7C)
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 and the protruding structure (Fig. 7F). It is also important to note that these modifications occurred near
2 the nuclear membranes (dotted lines in Figs. 7D, 7G), as noted with BGTC lipoplexes.
3
4
5
6

7 DISCUSSION

8
9 Cationic lipid-DNA complexes have emerged as one of the major non-viral DNA delivery strategies
10 over the last decade. Despite their wide use, a better understanding of the cellular and molecular
11 mechanisms involved in lipoplex-mediated gene transfer is required to define the limiting barriers in
12 DNA transfer and to optimise the vectors. As a general process, the cellular mechanisms can be divided
13 into five main steps: (1) binding of the lipoplexes to the cell surface; (2) entry of the lipoplexes into the
14 cells *via* endocytosis; (3) DNA release into the cytosol; (4) transport through the cytosol; (5) entry of
15 DNA into the nucleus and nuclear transcription.
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25
26 To obtain more-detailed information on molecular mechanisms, we have studied, by TEM, the cellular
27 uptake and intracellular fate of lipoplexes at the nanometre resolution scale. Lipoplexes were labelled
28 with electron-dense Nps, allowing their clear identification all along their intracellular traffic. This
29 pDNA labelling method relies on the stochastic mixture of Nps and pDNA, allowing the labelling of
30 part or whole pDNA molecules. At $r = 5$, the labelled fraction of pDNA represents 40 % of the total
31 pDNA according to sedimentation assays, meaning that 60 % remains label-free. As the condition of
32 lipoplex formation corresponds to a lipid charge ratio equal to 4, it allows the complexation of all pDNA
33 molecules with cationic lipids. In these conditions, our cryoTEM and TEM observations revealed that
34 all (> 90 %) lipoplexes contained Nps, meaning they were composed of both labelled and unlabelled
35 pDNA and that the labelling rate of pDNA into lipoplexes was sufficient to follow their intracellular
36 route.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51
52 This study was performed with two cationic lipids, BGTC and DOSP. Both of these lipids have high
53 transfection efficiencies; of the two the DOSP vector shows a better efficiency (17), which can be
54 explained by the intracellular trafficking mechanism. Our results lie in the general framework of
55 lipoplex-mediated gene transfer. Both of the cationic lipids used display common features of cellular
56
57
58
59
60

uptake. These lipoplexes interact with the cell surface and are internalised through an endocytic process. As, in our conditions, the lipoplexes are a few hundred nm in size, it seems likely that they are endocytosed by macropinocytosis rather than a clathrin-dependent mechanism.

Endosome escape, referring to DNA release from the endosome, is a crucial step in the DNA delivery process and remains one of the steps for which very little structural information is available. It has been proposed that endosome escape would be triggered by the formation of a pore through the endosomal membrane, permitting DNA release (29). Our current study not only provides support for membrane rupture, but also gives a more complete view of endosome escape mechanisms. Our TEM snapshots indicate that membrane ruptures are larger than pores and also reveal lipoplex remodelling. For BGTC, two phases were observed; a deep reorganisation of lipoplexes within the endosome with loss of the 6.5 nm characteristic repeat DNA-membrane distance (Figs. 4A, 4B), and a more-advanced endosome change (Fig. 4C) with large endosome rupture and the release of a large amount of material. For DOSP, lipoplex remodelling seems to occur in a more direct way, which would lead to a better transfection efficiency. Indeed, endosomes contained highly-concentrated 'native' lipoplexes while showing a ruptured membrane, suggesting that DNA released from lipoplexes may concomitantly escape the endosome (Figs. 7A, 7B). These data indicate different pathways of endosome escape that could also explain the difference in transfection efficiencies. Although we do not have a clear explanation, it is tempting to speculate that it is related to the nature of the cationic lipid. For a more complete understanding, further investigations on the respective role of the hydrophilic head group and the hydrophobic tail would be required.

Beyond endosome escape, the next step corresponds to DNA transport through the cytosol towards the nucleus. Our observations indicate that endosomal vesicles are located close to the nucleus. This accumulation near the nucleus, which was also reported for polymer-DNA complexes (30), suggests that DNA may reach the nucleus through either a passive diffusion or a short active transport. Concerning the passage of the nuclear barrier, our data show Nps close to, but not within, the nucleus. This absence deserves a few comments. One explanation could be the size of Nps. They are too large to pass through

1 nuclear pore complexes. Thus, they will physically remain outside the nucleus. Another explanation
2 could be related to the number of plasmid copies that enter nucleus. Although an estimation remains
3 difficult, it is well accepted that this number is very low in comparison to the initial amount incubated
4 with cells. In our labelling conditions, as about half of the pDNA is labelled, it is clear that we can
5 expect few Nps per nucleus. In addition, EM observations using ultrafine cell sections provide a very
6 limited view of the nucleus and, thus, reduce the chance of visualising intranuclear Nps. As the
7 probability of observing the phenomenon is very low, we cannot exclude the possibility that a few Nps
8 could have passed the nuclear barrier.
9

10 It was interesting to note that lipoplex remodelling was accompanied by the formation of new,
11 multilamellar lipid structures. Indeed, multilamellar assemblies with a 5.5 nm repeat distance were
12 present in destabilised endosomes of DOSP lipoplex-treated cells. Although the mechanisms underlying
13 endosomal escape remain ill-defined, evidence exists that specific compounds are required. The use of
14 DOPE as a lipid helper is important for endosome release (31). In the same vein, it has been proposed
15 that anionic lipids could be involved in the fusion process (29,32,33). Thus, it is possible that cellular
16 compounds could interact with cationic lipid dissociated from DNA and then induce the formation of
17 these new, multilamellar lipid structures. This lipid reorganisation provides original insights into the fate
18 of exogenous lipid (cationic and neutral lipid) introduced extensively into the cytoplasm. In the case of
19 BGTC, the formation of multilayer vesicles with a 3.6 nm spacing was observed. These structures were
20 present in large quantities in BGTC lipoplex-treated cells. They have been scarcely encountered in
21 H1299 control cells, nor with DOSP lipoplex-treated cells (data not shown). This raises the question of
22 why these structures are overexpressed by BGTC lipoplex-loaded H1299 cells. The H1299 cell line used
23 in this study is derived from pulmonary type II epithelial cells which synthesise and secrete lamellar
24 structures called lamellar bodies (LBs), specialised for the storage of pulmonary surfactant (34,35). LBs
25 enriched in phospholipids and cholesterol are arranged in tightly-packed, concentric membrane sheets or
26 lamellae with little or no inter-lamellar space. It has been shown that cholesterol enrichment of rat
27 pulmonary type II epithelial cells increases LB production and that LBs accumulate extra cholesterol
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 molecules, leading to an enhancement of cholesterol storage in LBs (36). In our conditions, a large
2 amount of BGTC made of a cholesterol moiety as been introduced into the cytoplasm. It is likely that the
3 intracellular BGTC has induced a similar process leading to the production of LB-like structures, unlike
4 DOSP which is made of two aliphatic chains. The activation of such a process may well explain the
5 secretion of LB-like structures, as observed in Fig. 5, *via* a mechanism driven by the cellular machinery.
6
7

8
9
10
11
12 These data suggest that the nature of a cationic lipid can have an impact on lipid metabolism. This
13 raises the question of whether the lipid if could be involved in the process of DNA transfer. From our
14 study, there is no evidence of a direct implication in this process. However, it has been shown that
15 vector components can activate the cellular machinery to enhance gene expression. Indeed, the use of
16 Pluronic polymer or incorporation of vinblastine into lipoplexes induces transcriptional activation of
17 gene expression by activating the p53 and NF κ B signalling pathways (37,38). Thus, the role of the
18 hydrophobic moiety of cationic lipids would deserve a more complete and systematic study. In the gene
19 delivery process, cationic lipids could, then, be considered not only as simple vehicles but also as
20 “active” molecules in gene expression.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 CONCLUSION

37
38 DNA transfer using non viral vectors is a non-cellular process, meaning that this process is, to a lesser
39 extent, not completely controlled by the cellular machinery but is, instead, more stochastically-mediated.
40 This implies that the evolution of lipoplexes may be not synchronised and/or identical. Thus, it is not
41 surprising that various aspects of lipoplex morphology were noted. The observation of labelled
42 lipoplexes provided snapshots of morphological and structural modifications undergone by lipoplexes.
43 For the first time, using nanoparticle probes, we were able to depict, at a nanometre resolution scale, the
44 morphologies of lipoplexes, from their cellular uptake to pDNA release and endosome escape. We have
45 identified evident landmarks of this intricate process, including lipid membrane reorganisation and a
46 potential mechanism for cationic lipid release, which clearly contribute to the understanding of the
47 mechanism of action of lipoplexes. The development of this powerful approach for the investigation of
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 specific intercellular pathways, and to identify parameters governing gene delivery, will guide the future
2 synthesis of cationic vectors with optimised functions fulfilling the requirements of all steps involved in
3 gene delivery.
4
5
6
7
8

9 **Funding**

10 This work has been supported in part by special grants from the “Association Française contre les
11 myopathies” (AFM), “Vaincre la Mucoviscidose” (VLM) and the Conseil Régional d’Aquitaine
12 (20071302007). O. Le Bihan is the recipient of PhD fellowships from VLM.
13
14
15
16
17

18 **Acknowledgments**

19 The authors are very grateful to J. Lai Kee Him, S. Tan, A. Carpentier and Clothilde Gourden (IN-
20 CELL-ART, Nantes, France) for their technical assistance.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. 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.
2. Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H. and Harashima, H. (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32-45.
3. Hoekstra, D., Rejman, J., Wasungu, L., Shi, F. and Zuhorn, I. (2007) Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 68-71.
4. Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J.-P. and Pichon, C. (2008) Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr. Gene Ther.*, **8**, 335-352.
5. Van der Aa, M.A., Mastrobattista, E., Oosting, R.S., Hennink, W.E., Koning, G.A. and Crommelin, D.J. (2006) The nuclear pore complex: the gateway to successful nonviral gene delivery. *Pharm. Res.*, **23**, 447-459.
6. Braun, S. (2008) Muscular gene transfer using nonviral vectors. *Curr. Gene Ther.*, **8**, 391-405.
7. Pitard, B., Aguerre, O., Airiau, M., Lachagès, 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.
8. 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

- 1 characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for
2 gene transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 2621-2626.
- 3
4
5
6 9. Koynova, R., Tarahovsky, Y.S., Wang, L. and Mac Donald, R.C. (2007) Lipoplex formulation of
7 superior efficacy exhibits high surface activity and fusogenicity, and readily releases DNA.
8
9 *Biochim. Biophys. Acta.*, **1768**, 375-386.
- 10
11
12
13
14 10. Friend, D.S., Papahadjopoulos, D. and Debs, R.J. (1996) Endocytosis and intracellular
15 processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.*,
16
17 **1278**, 41-50.
- 18
19
20
21
22 11. Lappalainen, K., Miettinen, R., Kellokoski, J., Jääskeläinen, I. and Syrjänen, S. (1997)
23 Intracellular distribution of oligonucleotides delivered by cationic liposomes: light and electron
24 microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.*, **45**, 265-274.
- 25
26
27
28
29
30 12. Akhtar, S., Hughes, M.D., Khan, A., Bibby, M., Hussain, M., Nawaz, Q., Double, J. and Sayyed,
31 P. (2000) The delivery of antisense therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **44**, 3-21.
- 32
33
34
35 13. Nel, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel.
36
37 *Science*, **311**, 622-627.
- 38
39
40
41 14. Sanvicens, N. and Marco, M.P. (2008) Multifunctional nanoparticles-properties and prospects
42 for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.*, **26**, 425-433.
- 43
44
45
46 15. Vigneron, J.-P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.-C., Basseville, M., Lehn, P.
47 and Lehn, J.-M. (1996) Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the
48 transfection of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **3**, 9682-9686.
- 49
50
51
52
53
54 16. Pitard, B., Oudrhiri, N., Lambert, O., Vivien, E., Masson, C., Wetzler, B., Hauchecorne, M.,
55 Scherman, D., Rigaud, J.-L., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M. and Lehn, P. (2001) Sterically
56
57
58
59
60

- 1 stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse
2 airways in vivo. *J. Gene Med.*, **3**, 478-487.
- 3
4
5
6 17. Desigaux, L., Sainlos, M., Lambert, O., Chevre, R., Letrou-Bonneval, E., Vigneron, J.-P., Lehn,
7 P., Lehn, J.-M. and Pitard, B. (2007) Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic
8 aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc. Natl. Acad.*
9 *Sci. U. S. A.*, **104**, 16534-16539.
- 10
11
12
13
14
15
16 18. Pitard, B., Pollard, H., Agbulut, O., Lambert, O., Vilquin, J.T., Cherel, Y., Abadie, J., Samuel,
17 J.L., Rigaud, J.L., Menoret, S., Anegon, I. and Escande, D. (2002) A non-ionic agent promotes
18 gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1767-1775.
- 19
20
21
22
23
24 19. Letrou-Bonneval, E., Chèvre, R., Lambert, O., Costet, P., André, C., Tellier, C. and Pitard, B.
25 (2008) Galactosylated multimodular lipoplexes for specific gene transfer into primary
26 hepatocytes. *J. Gene Med.*, **10**, 1198-1209.
- 27
28
29
30
31
32 20. Massart, R. (1981) Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE*
33 *Trans. Magn.*, **17**, 1247-1248.
- 34
35
36
37 21. Stöber, W., Fink, A. and Bohn, E. (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in
38 the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.*, **26**, 62-69.
- 39
40
41
42
43 22. Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E. and Brisson, A. (2005) The formation of supported lipid
44 bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett.*, **5**, 281-285.
- 45
46
47
48 23. Trépout, S., Mornet, S., Benabdelhak, H., Ducruix, A., Brisson, A.R. and Lambert, O. (2007)
49 Membrane protein selectively oriented on solid support and reconstituted into a lipid membrane.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
24. Kneuer, C., Sameti, M., Bakowsky, U., Schiestel, T., Schirra, H., Schmidt, H. and Lehr, C.M. (2000) A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 926-932.
25. Ravi Kumar, M.N.V., Sameti, M., Mohapatra, S.S., Kong, X., Lockey, R.F., Bakowsky, U., Lindenblatt, G., Schmidt, H. and Lehr, C.M. (2004) Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **4**, 876-881.
26. Gemeinhart, R.A., Luo, D. and Saltzman, W.M. (2005) Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Biotechnol. Prog.*, **21**, 532-537.
27. Roy, I., Ohulchanskyy, T.Y., Bharali, D.J., Pudavar, H.E., Mistretta, R.A., Kaur, N. and Prasad, P.N. (2005) Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 279-284.
28. 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.
29. Xu, Y. and Szoka, F.C. (1996) Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **35**, 5616-5623.
30. Varga, C.M., Tedford, N.C., Thomas, M., Klibanov, A.M., Griffith, L.G. and Lauffenburger, D.A. (2005) Quantitative comparison of polyethylenimine formulations and adenoviral vectors in terms of intracellular gene delivery processes. *Gene Ther.*, **12**, 1023-1032.
31. Wrobel, I. and Collins, D. (1995) Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochim; Biophys. Acta* **1235**, 296-304.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
32. Düzgüneş N., Goldstein, J.A., Friend, D.S. and Felgner, P.L. (1989) Fusion of liposomes containing a novel cationic lipid, N-[2,3-(dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium: induction by multivalent anions and asymmetric fusion with acidic phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **28**, 9179-9184.
33. Hafez, I.M., Maurer, N. and Cullis, P.R. (2001) On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.*, **8**, 1188-1196.
34. Stratton, C.J. (1978) The ultrastructure of multilamellar bodies and surfactant in the human lung. *Cell Tissue Res.*, **193**, 219-229.
35. Weaver, T.E., Na, C.L., Stahlman, M. (2002) Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol.*, **13**, 263-270.
36. Kollbeck, I., Guthmann, F., Ladhoff, A.M., Tandon, N.N., Schlame, M. and Rüstow, B. (2002) Cellular cholesterol stimulates acute uptake of palmitate by redistribution of fatty acid translocase in type II pneumocytes. *Biochemistry*, **41**, 6369-6375.
37. 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.
38. Wang, L., Dean, D.A. and Macdonald, R.C. (2005) Effect of vinblastine on transfection: influence of cell types, cationic lipids and promoters. *Curr. Drug Deliv.* **2**, 93-96.

FIGURE LEGENDS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1: Labelled lipoplexes with Nps.

A) Cryo images of pDNA interacting with Nps. B) Labelled lipoplexes. Nps are incorporated into the lamellar assembly of pDNA/BGTC complexes. Note that the black dots within Nps correspond to small maghemite cores. Scale bar 50 nm.

Figure 2: Physicochemical characterisation of Np/pDNA interactions.

A) Agarose gel electrophoresis of Np/pDNA complexes prepared at the ratio (r) given on top. B,C) After centrifugation, gel electrophoresis of the supernatant (B), and pDNA cosedimented with Np plotted in (C). D) Influence of pH on Np/pDNA complexes at r = 5. E) Influence of NaCl on Nps/pDNA complexes at r = 5. F-H) TEM images of Np/pDNA complexes at r = 1, r = 5 and r = 10, respectively. Scale bar 200 nm.

Figure 3: TEM images of labelled BGTC lipoplexes at early stages of the DNA transfer route.

A,B) Labelled lipoplexes interacting with the plasma membrane. Large view (A) and an enlarged area (B) marked with black square in A. Multilamellar structures (shown in inset in B) are typical of lipoplex assemblies with a 6.5 nm spacing provided by the distance between peaks (white arrows) on Fourier transform image.

C,D) Labelled lipoplexes with their genuine morphologies internalised into the cell *via* an endocytic process. D) Enlarged view of marked area with black square in C. Black arrows indicate the endosomal membrane. Inset: Enlargement of a 6.5 nm multilamellar assembly. Note that Nps (black densities) are clearly identified as well as the lipid layer structures (inset). Scale bars 1 μm (A,C), 100 nm (B,D) and 50 nm (inset). Nu: Nucleus.

Figure 4: Gallery of labelled BGTC lipoplexes exhibiting various morphological modifications within endosomal vesicles that correspond to steps closely related to endosomal escape.

A) Typical morphological changes of lipoplexes show membrane reorganisation and a loss of 6.5 nm multilamellar assemblies, suggesting DNA dissociation from cationic lipids. Scale bar 500 nm. B) Reorganised lipoplexes close to the nucleus and an enlarged view corresponding to dashed black square (aside panel). New multilamellar structures are present at the vesicle boundaries. Insets: Enlarged image and its Fourier transform revealing a 5.5 nm membrane spacing. White arrows indicate peaks on Fourier transform image. Scale bars 1 μm , 100 nm, 20 nm. C) Morphologies of modified lipoplexes after endosomal membrane disruption (black arrows). The dashed black square delineates the enlarged lipid assembly (aside panel) composed of two repeat distances. Inset: Fourier transform image showing two sets of bright peaks corresponding to a distance of 5.5 and 3.6 nm, respectively. Scale bars 500 nm, 20 nm. D) Another example of lipid assembly with two membrane motifs clearly visible in enlarged area (inset). Scale bars 100 nm, 20 nm. E) Nps in the vicinity of the nucleus. Scale bar 1 μm . F) Low and high magnification view of vesicles containing Nps and composed of multilayered membranes with a 3.6 nm spacing motif (inset). Scale bars 1 μm , 100 nm, 20 nm. Nu: Nucleus.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 5: Novel multilamellar lipid assemblies encountered inside (A,B) and outside (C,D) the cell, observed with BGTC cationic lipid. The enlarged views (B,D) correspond, respectively, to the marked areas (black squares). A 3.6 nm repeat motif is calculated from the peak distance on the enlarged image and its Fourier transform (inset). Scale bars 1 μm (A,C), 100 nm (B,D) and 20 nm (inset).

Figure 6: Labelled DOSP lipoplexes during cellular uptake and early steps of intracellular trafficking. A,B) Labelled lipoplexes bound to the plasma membrane. Large view (A) and an enlarged area (B) marked with a black square in A. Typical lipoplexes with a 6.5 nm lamellar spacing. Back dots (white arrows) correspond to Nps. C,D) Labelled lipoplexes surrounded by endosomal membrane after their internalisation into the cell. D) Enlarged view (corresponding to a black square drawn in C) shows typical 6.5 nm multilamellar arrangements (clearly visible in inset in D). Black arrows indicate Nps. Scale bars 1 μm (A,C), 100 nm (B,D) and 20 nm (inset).

Figure 7: Gallery of endosomes that contain labelled DOSP lipoplexes with deep morphological modifications providing snapshots on the endosomal escape process. A-C) Partially disrupted endosome containing native labelled lipoplexes (B and inset) with a 6.5 nm repeat distance and new 5.5 nm repeat lipid structures devoid of Nps (C and inset). DNA dissociation from DOSP and its release from the endosome seem concomitant and probably occur in a more direct way than with BGTC, for which an intermediate step was observed. D-F) Totally disrupted endosome containing only Nps in luminal volume. At its boundary, 5.5 nm multilamellar planar structures (arrow heads in E) and budding structures (white arrows in F) are present. G-I) "Ghost" endosome without visible membrane. The presence of Nps (black arrows) and multilamellar vesicles (H) allows its identification. Note its location close to the nucleus (I). Asterisks indicate nuclear pores. Scale bars: 1 μm (A, D, G), 100 nm (B, C, E, F, H, I) and 20 nm (insets).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

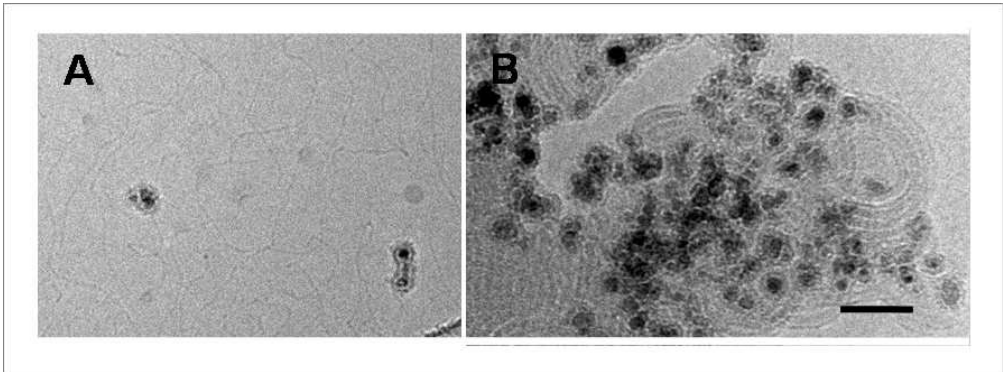


Figure 1 Le Bihan et al.

Peer Review

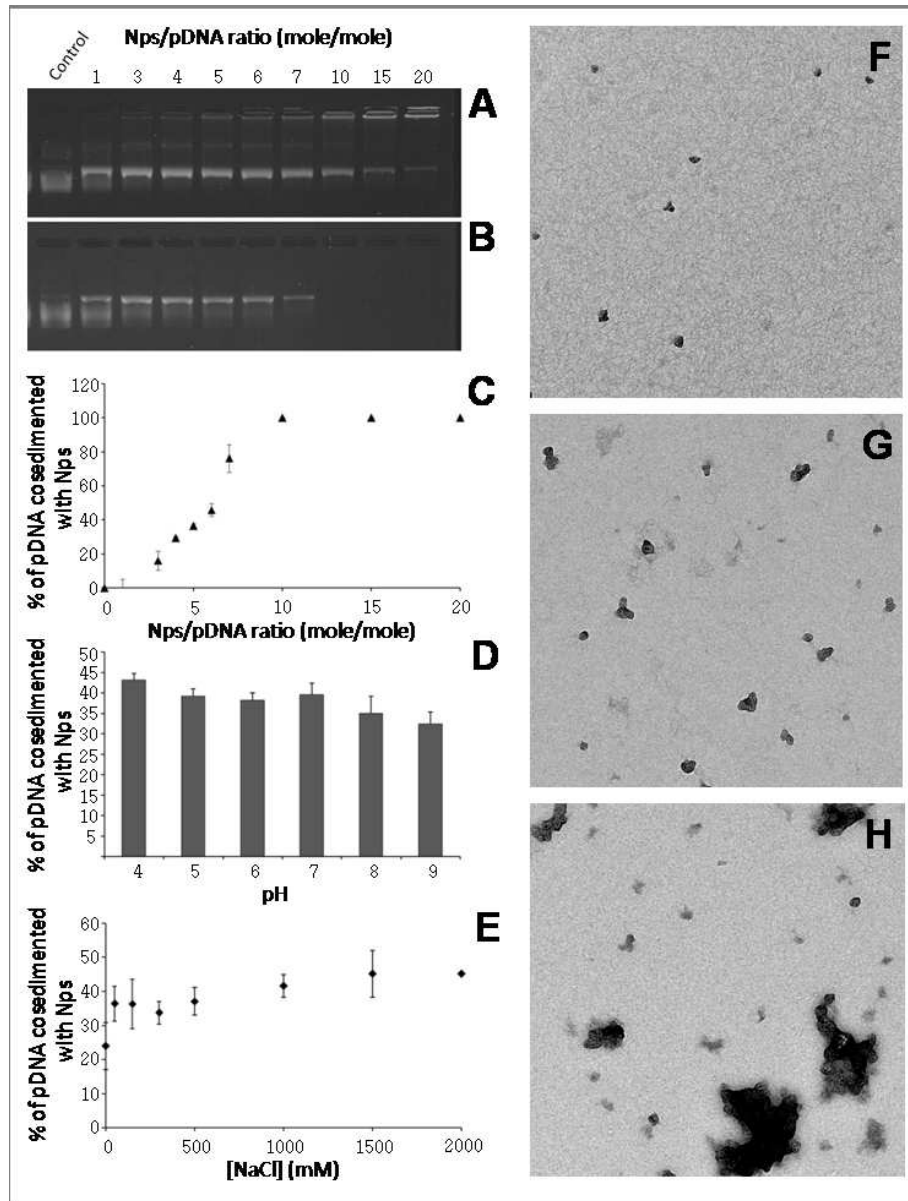


Figure 2 Le Bihan et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

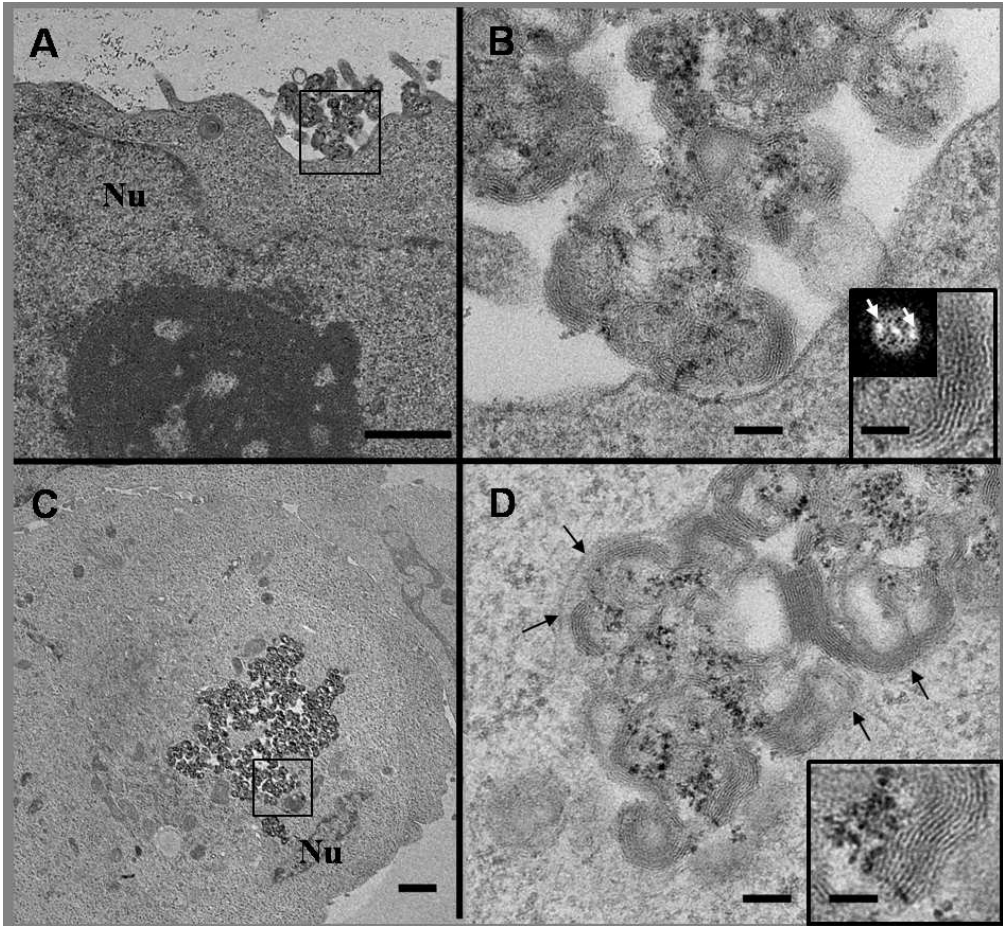


Figure 3 Le Bihan et al.



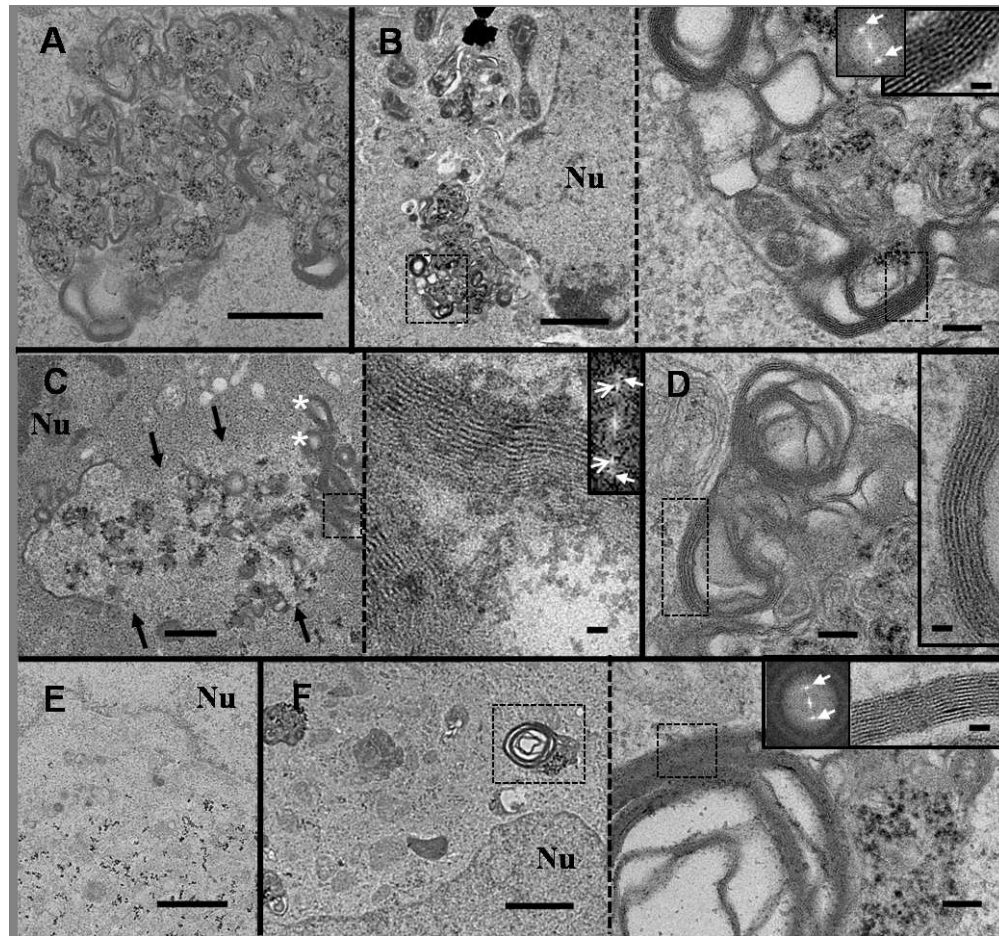


Figure 4 Le Bihan et al.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

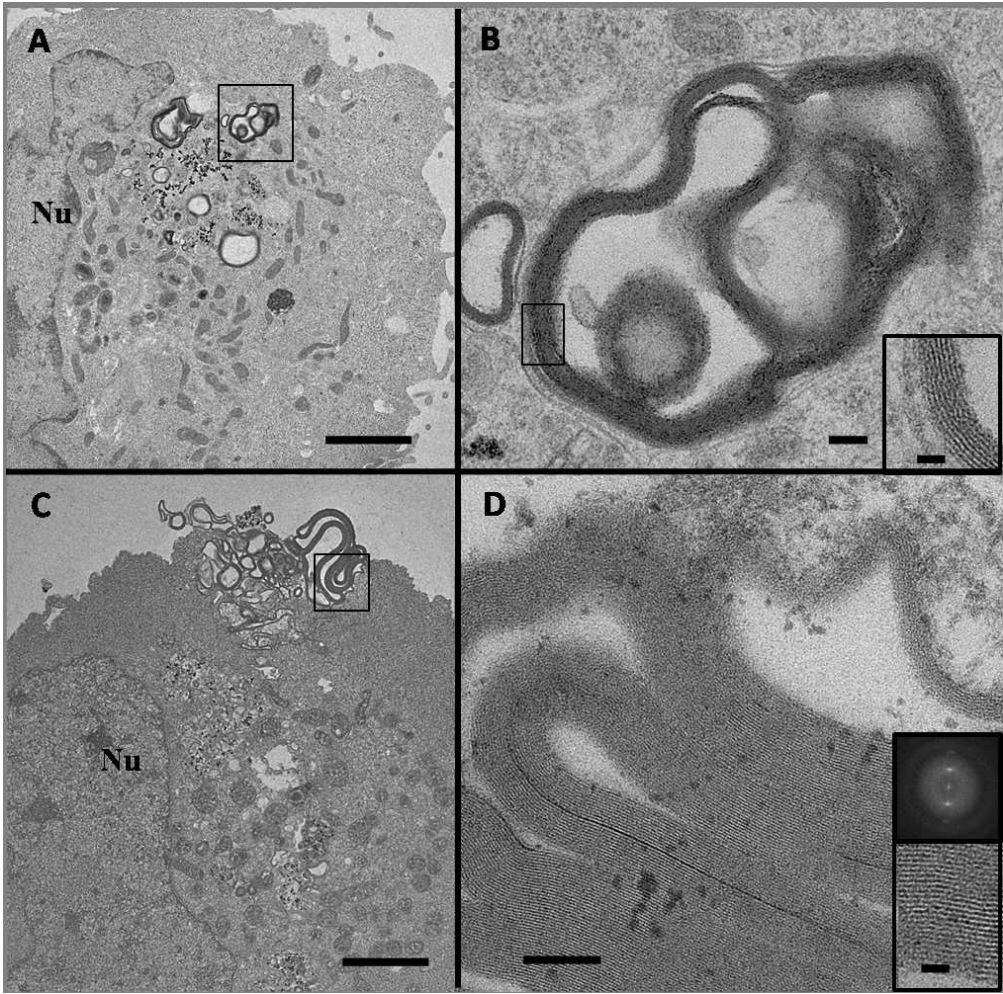


Figure 5 Le Bihan et al.



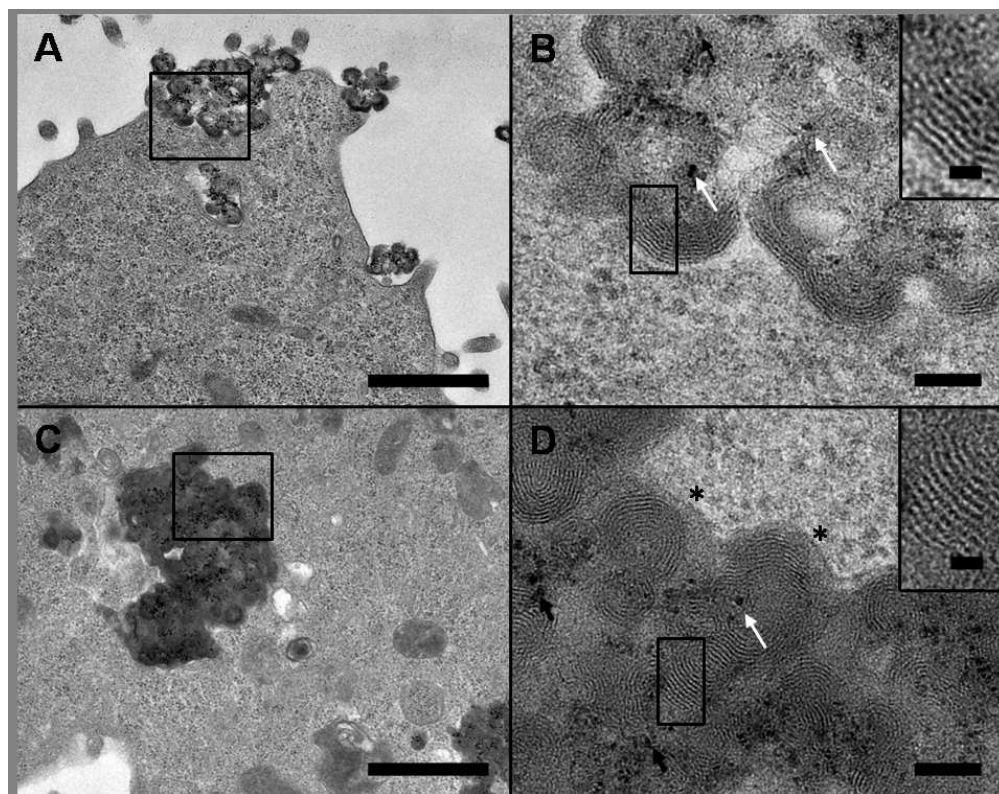


Figure 6 Le Bihan et al.

review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

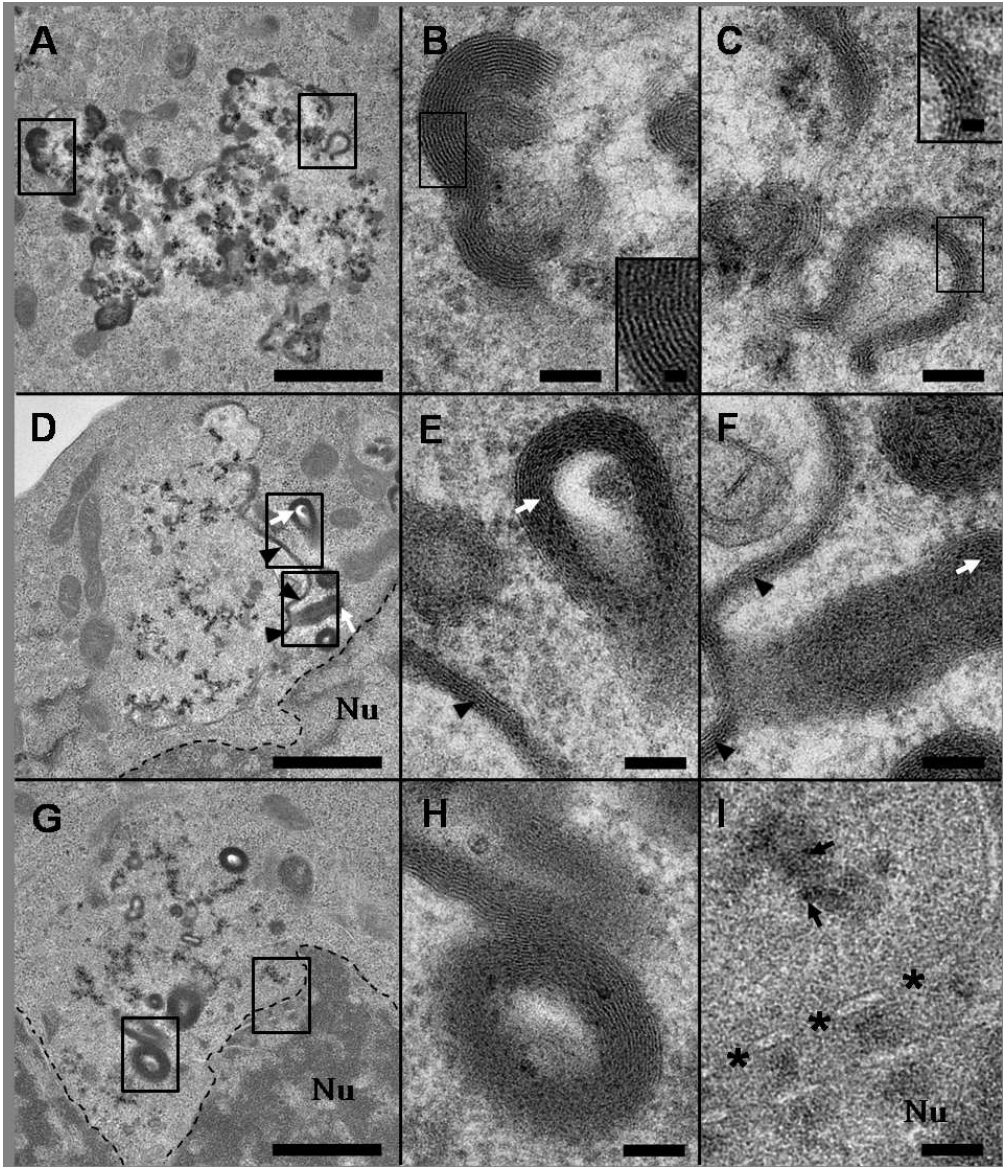


Figure 7 Le Bihan et al.

Cancer-Specific Transgene Expression Mediated by Systemic Injection of Nanoparticles

Edward J. Chisholm,^{1,2} Georges Vassaux,^{9,10} Pilar Martin-Duque,⁶ Raphael Chevre,^{7,8} Olivier Lambert,¹¹ Bruno Pitard,^{7,8} Andrew Merron,¹ Mark Weeks,³ Jerome Burnet,¹ Inge Peerlinck,¹ Ming-Shen Dai,^{9,10} Ghassan Alusi,² Stephen J. Mather,⁴ Katherine Bolton,⁵ Ijeoma F. Uchegbu,⁵ Andreas G. Schatzlein,⁵ and Patrick Baril^{9,10}

¹Centre for Molecular Oncology, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry; ²Department ENT, Barts and The London NHS Trust; ³Cancer Proteomics Laboratory, EGA Institute for Women's Health, University College London; ⁴Cancer Research United Kingdom, Nuclear Medicine Group, St. Bartholomew's Hospital; ⁵The School of Pharmacy, University of London, London, United Kingdom; ⁶Centro de Investigación Biomédica de Aragón/Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain; ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U915; ⁸Institut du Thorax, Université de Nantes; ⁹INSERM U948, Université de Nantes, CHU Hôtel Dieu; ¹⁰Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France; and ¹¹CBMN, UMR-CNRS 5248, Université Bordeaux, ENITAB, IECEB, Talence, France

Abstract

The lack of safe and efficient systemic gene delivery vectors has largely reduced the potential of gene therapy in the clinic. Previously, we have reported that polypropylenimine dendrimer PPIG3/DNA nanoparticles are capable of tumor transfection upon systemic administration in tumor-bearing mice. To be safely applicable in the clinic, it is crucial to investigate the colloidal stability of nanoparticles and to monitor the exact biodistribution of gene transfer in the whole body of the live subject. Our biophysical characterization shows that dendrimers, when complexed with DNA, are capable of forming spontaneously in solution a supramolecular assembly that possesses all the features required to diffuse in experimental tumors through the enhanced permeability and retention effect. We show that these nanoparticles are of sizes ranging from 33 to 286 nm depending on the DNA concentration, with a colloidal stable and well-organized fingerprint-like structure in which DNA molecules are condensed with an even periodicity of 2.8 nm. Whole-body nuclear imaging using small-animal nano-single-photon emission computed tomography/computer tomography scanner and the human Na/I symporter (NIS) as reporter gene shows unique and highly specific tumor targeting with no detection of gene transfer in any of the other tissues of tumor-bearing mice. Tumor-selective transgene expression was confirmed by quantitative reverse transcription-PCR at autopsy of scanned animals, whereas genomic PCR showed that the tumor sites are the predominant sites of nanoparticle accumulation. Considering that NIS imaging of transgene expression has been recently validated in humans, our data highlight the potential of these nanoparticles as a new formulation for cancer gene therapy. [Cancer Res 2009;69(6):2655–62]

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

E.J. Chisholm, G. Vassaux, and P. Martin-Duque contributed equally to this work.

Requests for reprints: Georges Vassaux, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U948, Laboratoire de Biothérapie, 4ème étage HNB Nord, CHU Hôtel Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes Cedex 1, France. Phone: 33-240-08-74-88; Fax: 33-240-08-75-06; E-mail: georges.vassaux@nantes.inserm.fr.

©2009 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2657

Introduction

To be efficient against cancer, the ideal antitumoral agent would have to target malignant cells throughout the body while sparing normal tissues. Cancer gene therapy has thus far been limited by the lack of systemically active, cancer-specific delivery vectors (1), especially in the field of nonviral, synthetic gene delivery vectors (2–4). In this context, we have recently described that nanoparticles composed of the polypropylenimine dendrimers of third generation (PPIG3), when complexed with DNA, are capable of efficient gene transfer to tumor deposits, upon systemic injection. Importantly, when a therapeutic transgene was used, marked antitumor activity was observed, leading, in some experiments, to the “cure” of all animals treated (5, 6).

Key to the furthering clinical development of this technology and its safe application in patients is the ability to monitor gene transfer in the live subject, using a minimally invasive method. This is of particular importance considering the toxic nature of the therapeutic transgenes required for cancer gene therapy. Whole-body nuclear imaging of gene transfer in the live subject has been described (7) and requires a reporter gene and a radiolabeled tracer. One possible strategy exploits the Na/I symporter (NIS) as a reporter gene and radio-halogen as tracer. NIS is endogenously expressed in the thyroid and stomach and, to a lower extent, in the salivary glands, breast, and thymus (8). In the thyroid, NIS promotes iodide concentration, and radio-iodide uptake is used in the detection and, in some specific cases, in the treatment of disseminated thyroid carcinomas (9). In gene therapy experiments, ectopic expression of NIS has been shown to allow accumulation of radioactive iodide in tissues for noninvasive imaging (10–12). Moreover, ectopic NIS expression is unlikely to interfere with the cell biochemistry. Different modalities have been reported to image NIS-expressing tissues, including positron emission tomography (PET), scintigraphic imaging, and single photon emission computed tomography (SPECT; refs. 13–16). The imaging of NIS-expressing tissues is particularly versatile because NIS can promote cellular uptake of different radioisotopes: ¹²³I⁻ (SPECT), ¹²⁴I⁻ (PET), ^{99m}TcO₄⁻ (SPECT), and ¹³¹I⁻ (scintigraphic imaging; refs. 8, 11). This imaging method has very recently been validated in humans (17).

Another consideration that is key to the translation of PPIG3/DNA complexes to the clinic is the biophysical characterization of the nanoparticles. Delivery of polymer-drug conjugates containing doxorubicin (18), paclitaxel (19), or camptothecin (20) to tumors has been described and some of these compounds

are in phase III clinical trials (21). These complexes have been shown to remain for long periods in the blood stream and accumulate passively in tumor tissues through a phenomenon referred to as the enhanced permeability and retention effect (EPR). The EPR effect first described by Matsumura and Maeda (22, 23) constitutes an important mechanism by which "objects" with adapted size and surface characteristics can extravasate through the endothelial fenestration of tumor blood tissues, usually larger and more disorganized than normal blood tissues. As a result, these "objects" are preferentially retained in the tumors and, thus, the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the associated-drugs are enhanced compared with administration of the drug alone (24, 25). Nanoparticles exploiting the EPR effect for cancer-selective delivery of nucleic acids would be highly desirable.

In this context, the aim of the present study is (a) to determine whether the biophysical characteristics of PPIG3/DNA complexes are compatible with the EPR effect, (b) to assess whether NIS-imaging can be used to visualize nanoparticle-mediated gene transfer, and (c) to determine the pattern of gene expression allowed by these nanoparticles in tumor-bearing mice.

Materials and Methods

Nanoparticles and plasmid DNA. The nanoparticles used in this study are constituted of PPIG3 and prepared in 5% dextrose solution as previously described (5). The NIS cDNA was amplified by PCR from pTGW10 plasmid (13) using the primers 5'-CTCTAGAGATGGAGGCCGTGGAGACCGG-GAACGG-3' (forward) and 5'-CTCTAGAGCTGCGCCTTTGGCCTAATAC-3' (reverse) and subcloned into the pcDNA3.1/V5-His-TOPO expression plasmid DNA (Invitrogen).

Dynamic light scattering, fluorescence, and cryo-transmission electron microscopy studies. Dynamic light scattering, fluorescence, and cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) studies were done as previously described (26, 27). PPIG3/DNA nanoparticles were prepared by combining increased concentration of PPIG3 dendrimer (0-3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) with a fixed-standardized concentration of DNA plasmid (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 1 mL of 5% dextrose. After 10-min incubation at room temperature, the hydrodynamic mean diameter of nanoparticles formed was determined by dynamic light scattering using the intensity mean size (Z average) with a sample refractive index of 1.59 and a viscosity of 0.89 cP. The system was routinely calibrated using a 220-nm standard dts 5050 from Malvern Instrument. Data presented are the mean diameters \pm SE of nanoparticles measured from three independent experiments. To evaluate the level of DNA condensation, 5 nmol/L final concentration of ethidium bromide was added to the tubes, and fluorescence measurement assessed 5 min later at 600 nm on a Kontron SFM25 spectrofluorimeter (Kontron). Structural information and size of PPIG3/DNA nanoparticles were determined by cryo-TEM assay. PPIG3 dendrimer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was combined with DNA plasmid at the indicated concentration and let to assemble for 10 min. A 5- μL aliquot was deposited onto a holey carbon-coated copper grid and plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen. The grids containing the frozen samples were thereafter mounted onto a Gatan 626 cryoholder, and samples observed with a Tecnai F20 FEI transmission electron microscope, operating at 200 kV. Low-dose images were recorded at a nominal magnification of $\times 50,000$ with a $2\text{k} \times 2\text{k}$ USC1000 slow-scan charge-coupled device camera (Gatan). To determine formation of highly ordered phases between the PPIG3 dendrimer and DNA molecules, periodic information within the PPIG3/DNA nanoparticle structures was investigated using the Image J analysis program applied to the pictures from the cryo-TEM analysis. The procedure consists of computing the Fourier transform and in displaying the power spectrum image. DNA spacing is calculated from measurements of distance of the first-order peaks based on the fact that in Fourier space this distance is proportional to the inverse length of DNA spacing.

Cell lines. All cell lines used were obtained from Cancer Research UK Cell Services. The cell lines A431, HeLa, and HeP-2 were grown in DMEM, supplemented with 10% of fetal bovine serum and antibiotics. The SCC25 cell line was cultured in a 1:1 mixture of DMEM and Ham's F-12 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 400 ng/mL hydrocortisone.

Animals. All experiments were conducted with appropriate ethical approval and in accordance with the Guidance on the operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (House of Commons 1990) of the U.K Home Office regulations. Six- to eight-week-old female BALB/c nu/nu or C3H mice (Harlan) were allowed to acclimatize for 1 wk and kept in individualized ventilated cages with free access to food and water. Tumor cells (10^6) were implanted subcutaneously in the right flanks of mice and kept until tumors reached $\sim 200\text{ mm}^3$. PPIG3 dendrimer and plasmid DNA encoding NIS were then complexed in 250 μL of a 5% dextrose solution at a ratio of 5:1 (w/w) with 50 μg of plasmid DNA and 250 μg of dendrimer (5). The final concentration of nanoparticle components was therefore 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the plasmid DNA and 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for the PPIG3 dendrimers. After incubation for 10 min at room temperature, the resulting PPIG3/DNA nanoparticles were injected intratumorally or i.v. into the tail vein of mice bearing tumors ($n = 3$). Control mice were treated with PBS ($n = 3$), PPIG3 nanoparticles ($n = 3$), or plasmid DNA alone ($n = 3$). Animals were weighed every 5 d; aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) serum transaminase activity levels were determined from blood samples collected at the indicated times in the text. Histologic examinations of liver, lungs, spleen, and kidney were done 5 d after the systemic administration of the PPIG3/DNA nanoparticles.

Nano-SPECT/computer tomography imaging. Small-animal SPECT/computer tomography (CT) scanning was done as previously described (28). Twenty-four hours after administration of the PPIG3/DNA nanoparticles, animals were anesthetized and then given an i.v. injection of 18.5MBq of $^{99\text{-m}}\text{Tc}$. Alternatively, different scans were done on the same cohort of animals 10, 24, 48, and 72 h after administration of the PPIG3/DNA nanoparticles. Mice were then positioned inside the SPECT/CT scanner (Bioscan, Inc.). The SPECT image was obtained, and acquisition time depended on specific radioactivity levels in each mouse over the limits of the scan to obtain 100,000 cps. A CT scan was taken at the same limits as the SPECT scan and all images were reconstructed with MEDISO software (Medical Imaging Systems). Fusion of SPECT and CT images was carried out using PMOD software (Medical Imaging Systems).

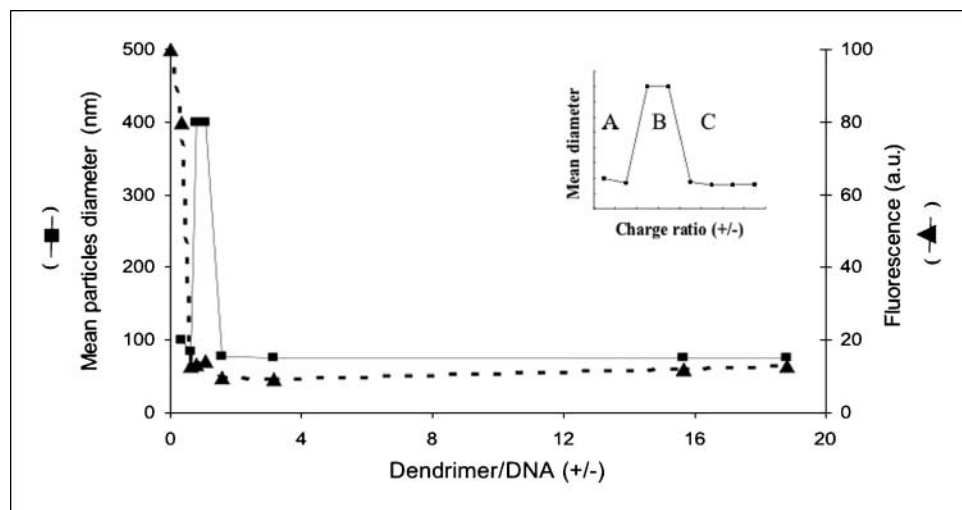
Quantitative reverse transcriptase-PCR and genomic PCR. To detect NIS mRNA expression in tissues, scanned animals were sacrificed and the tumor, liver, spleen, lung, kidney, and bone marrow tissues were harvested. Tissues were homogenized and total RNA was prepared using the RNeasy Mini kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Reverse transcription followed by quantitative PCR was done from 2 μg of tRNA extracted as previously described (28). To detect plasmid DNA in tissues, quantitative genomic PCR was done. Tissues were harvested and genomic DNA was extracted using DNeasy kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). DNA concentration and purity were determined using NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Five nanograms of DNA sample were used in each quantitative PCR reaction in triplicate. The PCR conditions and primers were the same as those used for the reverse transcription-PCR (RT-PCR) described above. Negative controls included PCR reaction without the cDNA or the genomic DNA.

Statistical analysis. The experiments were done at least thrice in triplicate. Errors bars represent SE. One-way ANOVA followed by the Bonferroni posttest (GraphPad Prism software) was used to determine statistical significance for the following experiments: quantitative RT-PCR; genomic PCR; body weight and serum transaminase activity measurements; and nanoparticle uptake, luciferase activity, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays.

Results

Colloidal stability of the PPIG3/DNA nanoparticles by the dynamic light scattering method. We investigated the physicochemical properties of the supramolecular assemblies of the

Figure 1. Colloidal stability of the PPIG3/DNA nanoparticles as a function of their charge ratio. Complexes were obtained by mixing the PPIG3 dendrimer at the required concentrations with plasmid DNA at the fixed standardized concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dynamic light scattering analysis (solid lines) was done to assess colloidal stability of the complexes. Ethidium bromide fluorescence measurements (dashed lines) were also done for each tube to evaluate the level of nucleic acid entrapment within the PPIG3/DNA nanoparticle structure. Size determination and fluorescence measurements were done after 10 min of complexation. An arbitrary value of 400 nm was attributed to complexes that were colloidally unstable. *Inset*, a schematic representation of zones A, B, and C. Complexes from zones A and C were stable, whereas those from zone B were colloidally unstable, with their diameter increasing to up to 400 nm. Representative of three independent experiments.



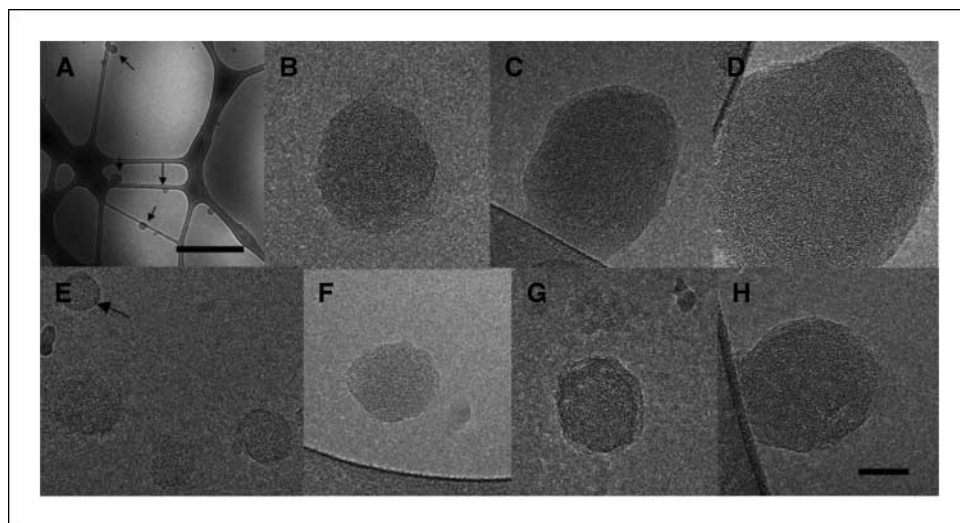
nanoparticles obtained by mixing the PPIG3 dendrimer with a plasmid DNA encoding NIS. Dynamic light scattering was first used to assess the colloidal stability of the formed nanoparticles as a function of the charge ratio. To calculate the mean theoretical charge ratio, we assumed that 1 μg of plasmid DNA is 3 nmol of negatively charged phosphate and that 16 positive charges are displayed by the PPIG3 dendrimer according to its chemical formulation and molecular weight (PPIG3, 1.67 kDa). Increasing concentrations of PPIG3 dendrimer (0-3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were left to assemble to a constant concentration of DNA plasmid (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 minutes before determining the size of the formed nanoparticles using a Zetasizer instrument. Results in Fig. 1 show that the PPIG3/DNA nanoparticles exhibit a three-zone model of colloidal stability depending on the cationic vector/DNA charge ratio used. In zone A (i.e., for a charge ratio <1), we found colloidal stable, negatively charged complexes with a mean diameter of 107 ± 17 nm ($n = 3$). In zone B, characterized by dendrimer/DNA charge ratios ranging from 1 to 1.5, the complexes were neutral, large, and colloidally unstable as evidenced by the observation that their diameter increased up to 402 ± 56 nm ($n = 3$). Finally, in zone C (i.e., for a charge ratio above 1.5), we observed colloidal stable, positively charged complexes with a mean diameter of 86 ± 9 nm ($n = 3$). These results show that

PPIG3/DNA nanoparticles followed the well-known three-stage model of colloidal stability described elsewhere (3, 26, 27, 29).

Next, we investigated the level of DNA condensation using fluorescence measurement after addition of ethidium bromide in all samples. The percentage of free DNA or DNA bound loosely to PPIG3 dendrimer was then estimated at 600 nm. As expected (Fig. 1), the fluorescence intensity decreased as the dendrimer/DNA charge ratio increased from 100% in zone A to a low minimal value in zones B and C. The very low level of fluorescence intensity in zones B and C indicates that DNA molecules in these zones are firmly packed within the nanoparticle structure, preventing their interaction with ethidium bromide molecules and, consequently, with any other components of the extracellular media.

Structural features of the PPIG3/DNA nanoparticles by cryo-TEM imaging and the Fourier transform method. The structure of the PPIG3/DNA nanoparticles was finally examined using cryo-electron microscopy (Fig. 2). Cryo-TEM allows visualizing nanoparticles with their native contrast without the need of dehydration or staining procedures. Therefore, when combined to Image J software and the Fourier method, cryo-TEM images provide accurate information about the structure and the size of nanoparticles. Plasmid DNAs were mixed with the PPIG3 dendrimers (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), and the size of nanoparticles was determined

Figure 2. Cryo-TEM visualization of dendrimer/DNA complexes. A, field of view of PPIG3/DNA nanoparticles at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showing round-shaped structures (black arrows). Gallery of cryo-TEM images of PPIG3/DNA nanoparticles at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B-D) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E-H) revealing a fingerprint pattern of DNA organization within dendrimer/DNA complexes whose sizes vary from 38 nm (E, arrow) up to 255 nm (D). Bar, 1 μm (A); 50 nm (B-H).



individually. At a DNA concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, corresponding to a PPIG3 dendrimer/DNA charge ratio of 16, globular structures ranging in size from 103 to 255 nm were observed (Fig. 2A–D). When the DNA concentration was halved (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with the same dendrimer/DNA charge ratio, the same globular structure was observed but the size of particles was smaller, ranging from 38 to 152 nm (Fig. 2E–H). The average size of the PPIG3/DNA nanoparticles was 78 ± 14 nm (7 particles analyzed) for a DNA concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 150 ± 26 nm (7 particles analyzed) for a DNA concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 286 ± 41 nm (7 particles analyzed) for a DNA concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At higher DNA concentrations, the complex precipitated. These results show that the size of PPIG3/DNA nanoparticles was directly dependent on the DNA loaded and led, as shown in the gallery of Fig. 2, to the formation of compact, concentric, and homogeneous structures with a fingerprint-like aspect. Image analysis based on the use of Fourier transform showed that despite the lack of a highly ordered organization, a repeat distance of ~ 2.8 nm corresponding to DNA strand packing was detected. Taken together, these data show that the PPIG3 dendrimer when complexed with plasmid DNA displays a set of biophysical characteristics that are suitable for a tumor-specific gene transfer mediated by the EPR effect (22, 23).

Visualization of nanoparticle-mediated gene transfer upon intratumoral injection. To monitor the exact localization and amplitude of gene transfer in the whole body of tumor-bearing mice, we first examined gene transfer on intratumoral injection of the nanoparticles. Mice with subcutaneous A431 tumors were injected with PPIG3 dendrimers (250 μg) complexed with a plasmid DNA encoding NIS (50 μg), forming, as shown above, nanoparticles averaging 286 nm (± 41) in size. Twenty-four hours later, mice were scanned. Fusion of the SPECT and CT images revealed that the $^{99\text{-m}}\text{TcO}_4^-$ tracer accumulated in the thyroid gland and the stomach (Fig. 3A) as a result of endogenous expression of the NIS gene (10–13) and in the tumor (Fig. 3A) as a result of gene transfer. Control, intratumoral injections of PBS, DNA, or PPIG3 alone failed to result in radiotracer accumulation in the tumor whereas signals not related to gene transfer (thyroid and stomach) were detected (data not shown). Quantitative RT-PCR done on tumor biopsies harvested at autopsy of the scanned animals revealed the presence of NIS-specific mRNA (48.2 ± 8.2 pg/ μg tRNA), confirming *in vivo* gene transfer upon intratumoral injection of the PPIG3/DNA nanoparticles. By contrast, a very low presence of NIS-specific mRNA was found in control mice treated with PBS (0.28 ± 0.06 pg/ μg tRNA), DNA (1.25 ± 0.32 pg/ μg tRNA), or PPIG3 alone (0.62 ± 0.16 pg/ μg tRNA).

Visualization of nanoparticle-mediated gene transfer upon systemic injection in immunodeficient tumor-bearing mice. To examine the pattern of gene transfer obtained upon systemic injection, mice with subcutaneous Hep-2, A431, and HeLa xenograft tumors (Fig. 4A) were injected in the tail vein with nanoparticles (250 μg) complexed with the plasmid encoding NIS (50 μg). Twenty-four hours later, mice were scanned. Fusion of the SPECT and CT images revealed that the $^{99\text{-m}}\text{TcO}_4^-$ tracer accumulated in the thyroid and stomach as a result of endogenous NIS expression (data not shown) and in the tumors (Fig. 4A). Careful examination of all projections of the tomographic sections failed to detect any other gene-transfer-related signal (data not shown), suggesting that systemic nanoparticle delivery resulted in tumor-specific gene transfer. To confirm this hypothesis, quantitative RT-PCR was done on tumor biopsies taken from the scanned animals. Results showed that NIS-specific mRNA was below the threshold of detection in

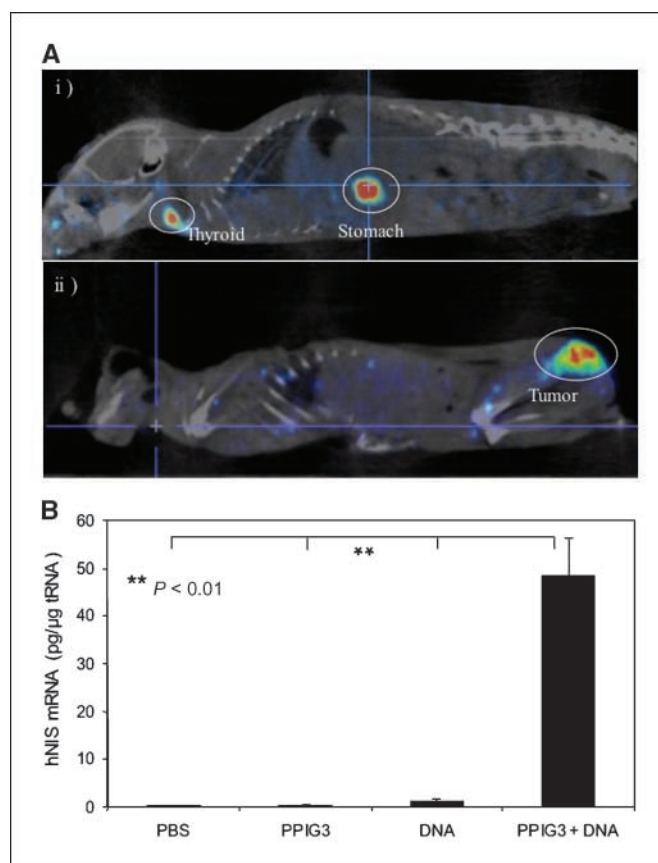


Figure 3. Visualization of nanoparticle-mediated gene transfer upon intratumoral injection. *A*, nude mice bearing A431 subcutaneous tumors were injected intratumorally with PPIG3/DNA nanoparticles obtained by mixing 250 μg of PPIG3 dendrimer to 50 μg of plasmid DNA encoding for NIS. Twenty-four hours later, mice ($n = 3$) were anesthetized, injected i.p. with sodium [$^{99\text{-m}}\text{Tc}$]pertechnetate (18.5 MBq), and scanned for 30 min. Mice were sacrificed at the end of the scan. Images were reconstructed and the figure presented shows sagittal views in the planes of the thyroid and stomach (*i*) or tumor (*ii*) of one representative mouse. *B*, quantitative RT-PCR analysis of NIS transcript in tumor tissues harvested at autopsy of the scanned animals. A431 subcutaneous tumors from the three mice treated as described in *A* were carefully removed. Total RNA was extracted, reverse transcribed, and amplified using NIS-specific primers. The absolute value of NIS mRNA in samples was standardized to the absolute value of 18S mRNA and then expressed as picograms of NIS mRNA by micrograms of total RNA using a standard curve with different concentrations of NIS cDNA. *Columns*, mean of experiments done in triplicate; *bars*, SE. **, $P < 0.01$, significant difference between the mean values of NIS mRNA in tumors from mice treated with the PPIG3/DNA nanoparticles and from control mice treated with PBS ($n = 3$), PPIG3 ($n = 3$), or DNA alone ($n = 3$).

the liver, spleen, kidney, heart, and lung in all tumor-bearing mice scanned (data not shown). By contrast, NIS-specific mRNA could be quantified in tumor samples from Hep-2 (Fig. 4B; 31.66 ± 5.8 ng/ μg tRNA), A431 (27.2 ± 4.2 ng/ μg tRNA), and HeLa cells (29.6 ± 6.4 ng/ μg tRNA). Taken together, these experiments show that systemic injection of the nanoparticles results in tumor-selective transgene expression.

We then assessed whether systemic gene delivery mediated by the nanoparticles could result in gene transfer in more than one tumor deposit. Mice with subcutaneous Hep-2, A431, and HeLa xenograft tumors implanted in both flanks were injected systemically with the PPIG3 dendrimers (250 μg) complexed with the DNA plasmid encoding NIS (50 μg). Twenty-four hours later, mice were scanned and fusion of the SPECT and CT images was done. Result in Fig. 4A shows a coronal image in which the two Hep-2 tumors

are in the same tomographic section. The signals observed in the two tumors show that both have been transfected by the PPIG3/DNA nanoparticles. Similar scans were obtained with subcutaneous A431 and HeLa tumors (data not shown). The only additional signals detected were in the thyroid and the stomach as a result of endogenous NIS expression (data not shown). Quantitative RT-PCR (Fig. 4C) analysis on tumor biopsies taken from the scanned animals showed that gene transfer in bilateral tumors was in the same order of magnitude: Hep-2 (right: 26.5 ± 4.7 ng/ μ g tRNA; left: 31.5 ± 6.1 ng/ μ g tRNA), HeLa (right: 25.5 ± 5.2 ng/ μ g tRNA; left: 32.5 ± 8.1 ng/ μ g tRNA), and A431 (right: 41 ± 8.1 ng/ μ g tRNA; left: 31.0 ± 8.0 ng/ μ g tRNA). In control mice injected with PBS, DNA, or PPIG3 alone, NIS-specific signal was below the threshold of detection of the PCR assay (data not shown). Altogether, these data show that gene transfer mediated by the nanoparticles is tumor specific and can reach at least two independent tumor deposits.

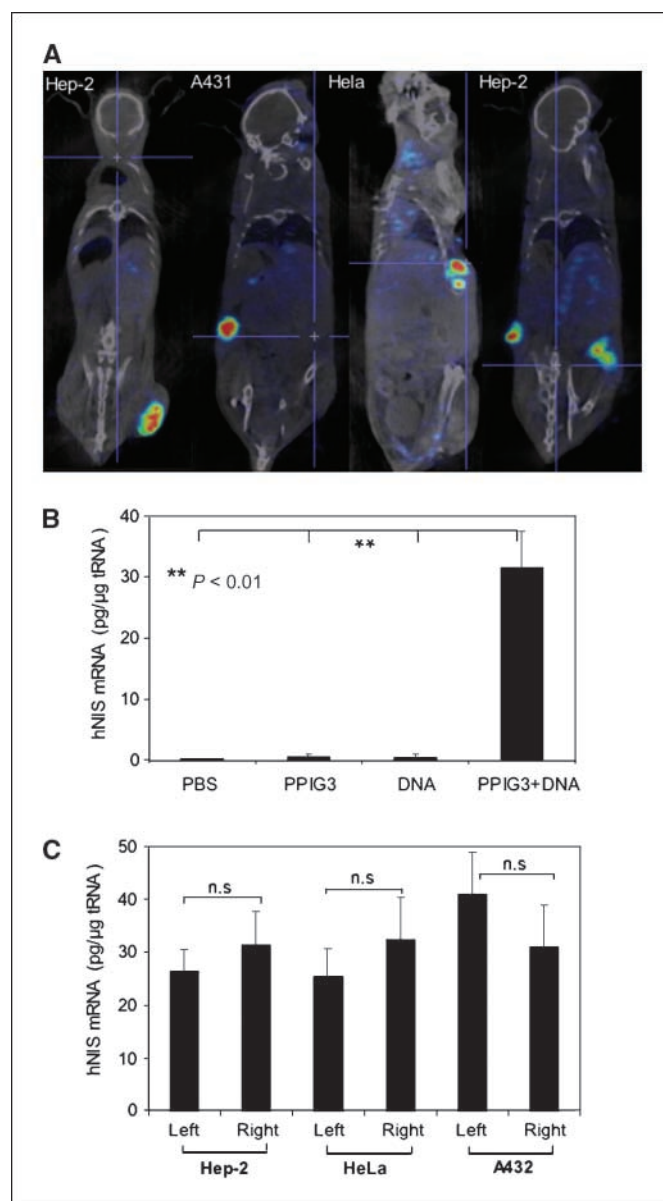
Visualization of nanoparticle-mediated gene transfer upon systemic injection in immunocompetent tumor-bearing mice.

To assess whether the nanoparticle-mediated gene transfer remains cancer selective in an immunocompetent mouse model, C3H mice bearing subcutaneous SCC25 tumors were i.v. injected with the PPIG3 nanoparticles (250 μ g) complexed with the plasmid encoding NIS (50 μ g). Mice were scanned 24 hours later. Fusion of the SPECT and CT images revealed that, as in the case of an immunodeficient mouse model, injection of the PPIG3/DNA nanoparticles results in radiotracer uptake in the tumor (Fig. 5A). In addition, different scans were done on the same cohort 10, 24, 48, and 72 hours after the PPIG3/DNA nanoparticle injection. In these experiments and at each time point, the animals were anesthetized and scanned to verify that no residual $^{99m}\text{TcO}_4^-$ from the previous scan remained in the tumor. The animals were then injected with the radiotracer, and the data acquired. Tumors were then outlined and the radioactivity was calculated in the volume of interest. Result in Fig. 5B shows that the mean peak of radiotracer accumulation (0.24 ± 0.021 MBq) is obtained 24 hours after PPIG3/DNA

nanoparticle injection, showing the transient nature of this gene transfer technology. In control mice injected with PBS, DNA, or PPIG3 alone, the radioactivity value was <0.001 (data not shown).

To assess the homing of nanoparticles in mice, quantitative PCR specific for the plasmid DNA was done on total DNA extracted from various tissues of C3H mice bearing SCC25 tumors injected systemically with the PPIG3/DNA nanoparticles (250 μ g/50 μ g, w/w). Result in Fig. 5C shows a low but detectable PCR signal in the stomach (0.0012 ± 0.0002 pg equivalent plasmid), thyroid (0.002 ± 0.0001 pg equivalent plasmid), kidneys (0.0002 ± 0.0001 pg equivalent plasmid), and bone marrow (0.0009 ± 0.0002 pg equivalent plasmid). A higher signal was detected in the liver (0.0091 ± 0.0006 pg equivalent plasmid), spleen (0.0033 ± 0.0004 pg equivalent plasmid), and lungs (0.0042 ± 0.0018 pg equivalent plasmid). In tumors, this signal was increased more than 20-fold (0.192 ± 0.0017 pg equivalent plasmid) compared with the liver. These data show that the plasmid predominantly deposits in the tumors upon injection of the nanoparticles.

Figure 4. Visualization of nanoparticle-mediated gene transfer upon systemic injection. **A**, nude mice bearing Hep-2, A431, HeLa, or two Hep-2 subcutaneous tumors were injected in the tail vein with PPIG3/DNA nanoparticles obtained by mixing 250 μ g of PPIG3 dendrimer with 50 μ g of plasmid DNA encoding for NIS. Twenty-four hours later, mice ($n = 3$ for each tumor models) were anesthetized, injected i.p. with sodium ^{99m}Tc pertechnetate (18.5 MBq), and scanned for 30 min. Mice were sacrificed at the end of the scan. Images were reconstructed and the figure presented shows coronal views in the planes of the tumors of four representative mice. **B**, quantitative RT-PCR analysis of NIS transcript in Hep-2 tumor tissues harvested at autopsy of the scanned animals. Subcutaneous Hep-2 tumors from the three mice treated as described in **A** were carefully removed. Total RNA was extracted, reverse transcribed, and amplified using NIS-specific primers. The absolute value of NIS mRNA in samples was standardized to the absolute value of 18S mRNA and then expressed as picograms of NIS mRNA by micrograms of total RNA using a standard curve with different concentrations of NIS cDNA. Columns, mean of experiments done in triplicate; bars, SE. **, $P < 0.01$, significant difference between the mean values of NIS mRNA in Hep-2 tumors from mice treated with the PPIG3/DNA nanoparticles and from control mice treated with PBS ($n = 3$), PPIG3 ($n = 3$), or DNA alone ($n = 3$). **C**, quantitative RT-PCR analysis of NIS transcript in tumors grafted subcutaneously into both flanks of animals. Hep-2 tumor cells were implanted in both flanks of nude mice ($n = 3$) and treated with the PPIG3/DNA nanoparticles as described in **A**. At the end of the scan, tumor tissues on both flanks of the three mice were carefully removed. Total RNA was extracted, reverse transcribed, and amplified using NIS-specific primers. The absolute value of NIS mRNA in samples was standardized to the absolute value of 18S mRNA and then expressed as picograms of NIS mRNA by micrograms of total RNA using a standard curve with different concentration of NIS cDNA. Columns, mean of experiments done in triplicate; bars, SE. In this experiment, no statistically significant difference ($n.s.$, $P > 0.05$) was found between the mean values of NIS mRNA detected in the tumor tissues from the left and right flanks of the animals.



Evaluation of acute toxicity in mice and macrophage uptake *in vitro*. To evaluate acute toxicity, body weight measurement, serum AST and ALT transaminase activity levels, and tissues histology were determined in immunocompetent mice upon systemic injection of the PPIG3/DNA nanoparticles (250 μg /50 μg , w/w). Results in Supplementary Fig. S1B show a mild but significant ($P < 0.01$) increase in serum AST and ALT transaminase activity levels 24 hours after the administration. These values went back to normal level 2 days later. This does not seem to affect the overall health of the animals because no variation in body weight (Supplementary Fig. S1A) and no loss of tissue integrity were detected in animals (Supplementary Fig. S1C).

Finally, to assess a possible capture of the PPIG3/DNA nanoparticles by macrophages of the mononuclear phagocyte system of mice, murine J774 A1 macrophage cell line was cultured for 24 hours in the presence of the PPIG3/DNA nanoparticles

prepared by mixing the PPIG3 nanoparticles (250 μg) with an expression plasmid coding for the F-Luciferase gene (50 μg), which was previously labeled with the fluorescent DNA intercalating agent YOYO-1. Data from Supplementary Fig. S2A show that $29.4 \pm 9.37\%$ of J774 A1 cells were capable of taking up nanoparticles as shown by the presence of the fluorescent dye within the cytoplasm of these cells (Supplementary Fig. S2A). However, no transgene expression (Supplementary Fig. S2B) or cellular toxicity (Supplementary Fig. S2C) was observed following the uptake of the PPIG3/DNA nanoparticles by the macrophages. These *in vitro* results tend to suggest that the PPIG3/DNA nanoparticles might be internalized by macrophages *in vivo*. However, this uptake is low and does not result in transgene expression.

Discussion

In this report, we show for the first time tumor-specific gene transfer on systemic injection of nanoparticles of dendrimers in tumor-bearing animal. Using nuclear whole-body imaging and NIS as reporter gene, we have been able to detect a specific and unique radiotracer uptake in tumors of both immunodeficient and immunocompetent mice, whereas no signal was detected in normal tissues of the animals. Importantly, quantitative RT-PCR on different organs harvested at autopsy of the scanned animals provided the same conclusions. A NIS-specific RT-PCR signal was detected in tumor sites, whereas no signal above the detection threshold was detected in kidney, liver, spleen, heart, and lungs, known to retain nonspecifically synthetic or viral particles (30–32). Nanoparticle biodistribution was indirectly measured by quantitative PCR on DNA extracted from various tissues 24 hours after the systemic injection. No trace of NIS plasmid DNA was detected in the stomach, thyroid, kidney, and bone marrow, whereas a weak but detectable signal was measured in the liver, spleen, and lungs. In the tumor, this signal reached 20-fold that of the liver, suggesting an accumulation of the nanoparticle in the malignant lesion. This property seems to be unique to the PPIG3/DNA nanoparticles because synthetic vectors are usually accumulated in abundance in the lungs, kidney, and liver 1 hour following administration and can be detectable for up to 3 days (30–32). This extratumoral accumulation can in turn induce severe toxicity, which limits its

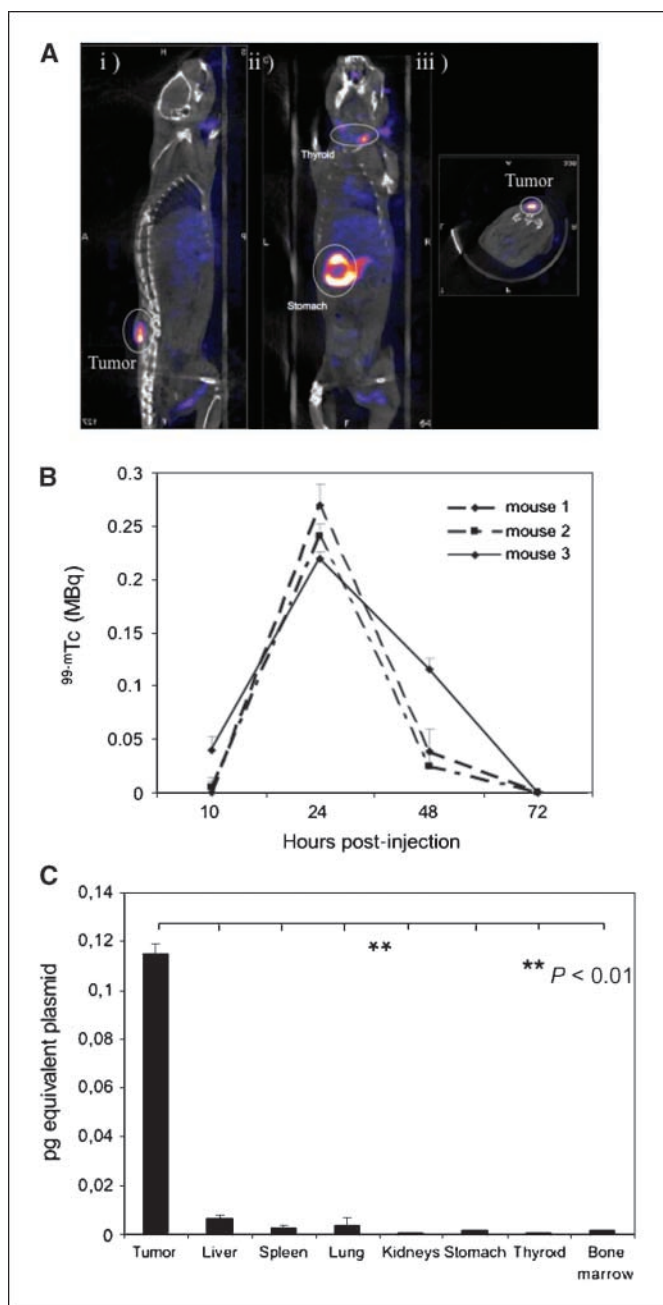


Figure 5. Visualization of nanoparticle-mediated gene transfer upon systemic injection in immunocompetent mice. **A**, C3H mice bearing SCC25 tumors were injected into the tail vein with the PPIG3/DNA nanoparticles obtained by mixing 250 μg of PPIG3 dendrimer with 50 μg of plasmid DNA encoding for NIS. Twenty-four hours later, mice ($n = 3$) were anesthetized, injected i.p. with sodium [$^{99\text{-m}}\text{Tc}$]pertechnetate (18.5 MBq), and scanned for 30 min. Mice were sacrificed at the end of the scan. Images were reconstructed, and the figure presented shows coronal views in the planes of the tumors (*i*) or the thyroid and stomach (*ii*) of one representative mouse. *iii*, an axial view in the planes of the tumors. **B**, kinetics of transgene expression via nanoparticle-mediated gene transfer on systemic injection in immunocompetent mice. Quantification of radioactivity (MBq) in each tumor site of mice treated as described in **A** was done in live animals using the Mediso MIP tool software over a period of 72 h starting at 10 h after the PPIG3/DNA nanoparticle injection and repeated every 24 h. **C**, quantitative genomic PCR of NIS plasmid in different tissues of immunocompetent mice bearing SCC25 tumors. Tissues from several organs including the tumors of the three mice treated as described in **A** were carefully removed. Genomic DNA was extracted and amplified by PCR using NIS-specific primers. The absolute value of NIS DNA copy in samples was determined using a standard curve with different concentrations of NIS DNA plasmid. **Columns**, mean of experiments done in triplicate; **bars**, SE. **, $P < 0.01$, significant difference between the mean values of NIS DNA copy detected in SCC25 tumor tissues and in liver, spleen, lungs, kidneys, stomach, thyroid, and bone marrow tissues of mice treated with the PPIG3/DNA nanoparticles.

applications in humans. By contrast, no loss of animal body weight or signs of long-lasting or serious toxicity were observed upon systemic injection of the PPIG3/DNA nanoparticles.

A possible explanation for this remarkable selectivity would be the EPR effect. Conceptually, EPR exploits the aberrant biology of solid tumors and, in particular, the architecture of their vasculature, which is irregular in shape, dilated, and contains endothelial cells with unusually large fenestrations (22, 23). These characteristics, combined with a poor lymphatic drainage, result in the fact that macromolecules with high blood circulation time and specific features such as charge and size will be preferentially accumulated in tumors. This accumulation has been shown to be restricted to high molecular weight macromolecules with a slow clearance, and this concept has given rise to at least 11 clinical trials testing the efficacy of polymer-drug conjugates (4, 18–20).

Results from biophysical characterization show that the PPIG3/DNA nanoparticles exhibit a set of physicochemical features that are suitable with a passive diffusion of particles in tumors through the EPR effect. First, the colloidal stability of supramolecular assemblies formed between the dendrimers and plasmid DNA follows the well-known three-stage model of colloidal stability described with other synthetic vectors (3, 4, 26, 27). This colloidal stability and the high positive charge of the particle are classic features of a nonviral gene delivery vector and might lead to the formation of monodispersed, nonaggregated particles, which could better diffuse and interact with cellular membranes and subsequently promote internalization via endocytosis or pinocytosis pathways (3, 26, 27, 29, 33). Second, at high charge ratio (e.g., ref. 16), corresponding to DNA of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ complexed to the PPIG3 dendrimer at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, the nanoparticles were found to have a mean size of 286 ± 41 nm. It is now well established that the size of particles is probably the most important criterion for high circulation time in blood as well as high accumulation rate in tumor sites. Experimental studies (4, 30–32) have shown that the size of the particles must be large enough to prevent the passage through the small pores of glomerular filtration barrier, which is known to be ~ 50 nm in size with a cutoff value of 50 kDa, to impede their elimination by renal clearance. In addition, the nanoparticle must be >200 nm to avoid diffusion through the endothelial fenestration of normal endothelium, which is known to be ~ 100 to 200 nm (34), as well as through the sinusoid in the spleen and in the liver, which varies from 150 to 200 nm in size (35). Our *in vitro* data on the macrophage uptake of PPIG3/DNA nanoparticles indicate that the PPIG3/DNA nanoparticles may be captured by the macrophages of the mononuclear phagocyte system organs *in vivo*. However, the level of uptake was low and inferior to that found when macrophages were cultured in the presence of an other cationic synthetic vector (e.g., Lipofectamine) complexed with the same plasmid DNA. Consequently, particles of 286 nm in size, as found in our study, may be eliminated or degraded more slowly and then might preferentially accumulate through the leaky tumor vasculature characterized by gap junctions

>100 to 600 nm in size between endothelial cells (22, 23, 36). Third, the nucleic acid must be properly wrapped up within the nanoparticle to impede its degradation by serum nuclease. Our cryo-TEM analysis in conjunction with a detailed analysis using the Fournier method showed that DNA plasmids are firmly enclosed within dendrimer complexes exhibiting a regular spacing ~ 2.8 nm, leading to the formation of a closed and concentric structure with a fingerprint-like aspect. Observation that ethidium bromide fluorescence decreases rapidly as the supramolecular assembly takes place indeed supports that nanoparticles of dendrimer are capable of strongly complexing with DNA plasmid. By analogy, it is reasonable to speculate that DNA plasmids must be well protected from physical fluctuations encountered when nanoparticles diffuse *in vivo* (e.g., degradation by seric nucleases). Consequently, taken together, our data show that polypropylenimine dendrimer PPIG3/DNA nanoparticles may be compatible with an EPR effect.

In conclusion, we provide evidence that polypropylenimine dendrimer PPIG3, when complexed with plasmid DNA, formed colloidal stable self-assembly nanoparticles that possess the biophysical properties compatible with features required for passive accumulation of particles in tumor through the EPR effect. In the context of systemic delivery, molecular imaging provides a whole-body, minimally invasive method of transgene expression. This unique information obtained by *in vivo* molecular imaging revealed that PPIG3/DNA nanoparticle-mediated gene transfer in tumors is transient and reaches its peak 24 hours after administration. Considering that NIS imaging of transgene expression has been recently validated in humans (17), our data highlight the potential of these nanoparticles as a new formulation for cancer gene therapy. In this context, the utilization of plasmids with a therapeutic expression cassette (a cancer-cytotoxic cytokine that would diffuse through the tumor, e.g., tumor necrosis factor α ; ref. 5) combined with an imaging expression cassette (in which NIS expression is driven by a strong, ubiquitous promoter) may provide therapeutic benefits for patients with metastatic tumors.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 7/10/2008; revised 12/1/2008; accepted 12/27/2008; published OnlineFirst 3/3/09.

Grant support: Cancer Research UK, the Medical Research Council, INSERM, La Ligue Contre le Cancer, Association pour la Recherche sur le Cancer, and INSERM grant 0607-3D1615-66/AO from the French National Cancer Institute (INCa). The publication of this article was made possible by the financial support from Association Française pour l'Etude du Foie and BMS laboratories. P. Martin-Duque is funded by FIDES Fund and ISCIII grant PI/052626.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Dr. Jhiang (Integrated Biomedical Sciences Graduate Program, The Ohio State University, Columbus, OH) for providing the hNIS cDNA and Dr. S. Lesieur (Equipe Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés, Châtenay-Malabry, France) for providing the J774 A1 murine macrophage cell line.

References

1. Szabo E. Selecting targets for cancer prevention: where do we go from here? *Nat Rev Cancer* 2006;6:867–74.
2. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 2002;9:1647–52.
3. Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:581–93.
4. Wang X, Yang L, Chen ZG, Shin DM. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin* 2008;58:97–110.
5. Dufes C, Keith WN, Bilsland A, Proutski I, Uchegbu IF, Schatzlein AG. Synthetic anticancer gene medicine exploits intrinsic antitumor activity of cationic vector to cure established tumors. *Cancer Res* 2005;65:8079–84.
6. Bell HS, Dufes C, O'Prey J, et al. A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression *in vivo*. *J Clin Invest* 2007;117:1008–18.
7. Penuelas I, Mazzolini G, Boan JF, et al. Positron emission tomography imaging of adenoviral-mediated

- transgene expression in liver cancer patients. *Gastroenterology* 2005;128:1787–95.
8. Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188–200.
 9. Robbins RJ, Schlumberger MJ. The evolving role of ¹³¹I for the treatment of differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 2005;46 Suppl 1:28–37S.
 10. Dadachova E, Carrasco N. The Na/I symporter (NIS): imaging and therapeutic applications. *Semin Nucl Med* 2004;34:23–31.
 11. Briat A, Vassaux G. Preclinical applications of imaging for cancer gene therapy. *Expert Rev Mol Med* 2006;8:1–19.
 12. Vassaux G, Groot-Wassink T. *In Vivo* Noninvasive Imaging for Gene Therapy. *J Biomed Biotechnol* 2003;21: 92–101.
 13. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Glaser M, Lemoine NR, Vassaux G. Adenovirus biodistribution and noninvasive imaging of gene expression *in vivo* by positron emission tomography using human sodium/iodide symporter as reporter gene. *Hum Gene Ther* 2002;13: 1723–35.
 14. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Wang Y, Lemoine NR, Keith WN, Vassaux G. Noninvasive imaging of the transcriptional activities of human telomerase promoter fragments in mice. *Cancer Res* 2004;64:4906–11.
 15. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Wang Y, Lemoine NR, Reader AJ, Vassaux G. Quantitative imaging of Na/I symporter transgene expression using positron emission tomography in the living animal. *Mol Ther* 2004;9: 436–42.
 16. Marsee DK, Shen DH, MacDonald LR, et al. Imaging of metastatic pulmonary tumors following NIS gene transfer using single photon emission computed tomography. *Cancer Gene Ther* 2004;11:121–7.
 17. Barton KN, Stricker H, Brown SL, et al. Phase I study of noninvasive imaging of adenovirus-mediated gene expression in the human prostate. *Mol Ther* 2008;16: 1761–9.
 18. Seymour LW, Ferry DR, Anderson D, et al. Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J Clin Oncol* 2002;20:1668–76.
 19. Guo W, Johnson JL, Khan S, Ahmad A, Ahmad I. Paclitaxel quantification in mouse plasma and tissues containing liposome-entrapped paclitaxel by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetics study. *Anal Biochem* 2005; 336:213–20.
 20. Bissett D, Cassidy J, de Bono JS, et al. Phase I and pharmacokinetic (PK) study of MAG-CPT (PNU 166148): a polymeric derivative of camptothecin (CPT). *Br J Cancer* 2004;91:50–5.
 21. Albain KS, Belani CP, Bonomi P, O'Byrne KJ, Schiller JH, Socinski M. PIONEER: a phase III randomized trial of paclitaxel poliglumex versus paclitaxel in chemotherapy-naïve women with advanced-stage non-small-cell lung cancer and performance status of 2. *Clin Lung Cancer* 2006;7:417–9.
 22. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986;46: 6387–92.
 23. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* 2006;11:812–8.
 24. Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, et al. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res* 2003;63:8977–83.
 25. Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K. Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J Control Release* 2007;121: 146–55.
 26. Pitard B, Oudrhiri N, Vigneron JP, et al. Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2621–6.
 27. Desigaux L, Sainlos M, Lambert O, et al. Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16534–9.
 28. Merron A, Peerlinck I, Martin-Duque P, et al. SPECT/CT imaging of oncolytic adenovirus propagation in tumours *in vivo* using the Na/I symporter as a reporter gene. *Gene Ther* 2007;14:1731–8.
 29. Barteau B, Chevre R, Letrou-Bonneval E, Labas R, Lambert O, Pitard B. Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. *Curr Gene Ther* 2008;8:313–23.
 30. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 1994;83:601–6.
 31. Cho YW, Park SA, Han TH, et al. *In vivo* tumor targeting and radionuclide imaging with self-assembled nanoparticles: mechanisms, key factors, and their implications. *Biomaterials* 2007;28:1236–47.
 32. Kaul G, Amiji M. Biodistribution and targeting potential of poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model. *J Drug Target* 2004;12:585–91.
 33. Pitard B, Aguerre O, Airiau M, et al. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14412–7.
 34. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 2002;1:1–5.
 35. Wisse E, Braet F, Luo D, et al. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol* 1996; 24:100–11.
 36. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 1995;55: 3752–6.

Galactosylated multimodular lipoplexes for specific gene transfer into primary hepatocytes

Emilie Letrou-Bonneval^{1,2,3}
Raphaël Chèvre^{1,2}
Olivier Lambert⁴
Philippe Costet^{1,2}
Corinne André³
Charles Tellier³
Bruno Pitard^{1,2,5*}

¹INSERM, U533, F-44000 Nantes, France

²Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

³UMR CNRS 6204 Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, Université de Nantes, Faculté des Sciences et des Techniques, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, F-44322 Nantes, France

⁴CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux 1-ENITAB, Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France

⁵InCellArt, 1 place Alexis Ricordeau, F-44093 Nantes, France

*Correspondence to: Bruno Pitard, INSERM, U533, 1 Rue Gaston Veil, F-44035 Nantes, France.
E-mail: bruno.pitard@univ-nantes.fr

Received: 9 November 2007

Revised: 14 March 2008

Accepted: 18 April 2008

Abstract

Background Numerous synthetic cationic vectors have been synthesized and are successfully used for *in vitro* gene transfer but an excess of positive charges can lead to cytotoxicity and does not enable specific transfection.

Methods We decided to develop alternative molecular systems consisting of neutral, colloiddally stable bioassemblies equipped with ligands for specific cell targeting. Consequently, we directed our efforts toward the development of a multimodular non-viral gene delivery system consisting of a condensed core of DNA with cationic liposomes of bis(guanidinium)-tren-cholesterol and an external corona of poly(ethylene oxide) stretches harbored by the steric stabilizers used to stabilize lipoplexes colloiddally. A ligand capable of cell targeting by receptor-mediated endocytosis was covalently linked at the poly(ethylene oxide) extremity of steric stabilizers. Steric stabilizers were functionalized by a one-step enzymatic galactosylation to develop new supramolecular assemblies of lipoplexes able to target asialoglycoprotein receptors located on primary hepatocytes.

Results Cryo-TEM and fluorescence experiments showed that DNA was condensed within lamellar complexes whose size ranged between 100 to 300 nm in diameter. Bis(guanidinium)-tren-cholesterol-DNA lipoplexes, colloiddally stabilized by galactosylated steric stabilizers at a galactosylated steric stabilizer/DNA ratio of 300, led to specific transfection of primary hepatocytes whereas ungalactosylated steric stabilizer did not transfect.

Conclusions Our findings confirm the receptor-mediated endocytosis pathway of galactosylated multimodular lipoplexes. Thus, we conclude that the fabrication of a multimodular assembly harboring a ligand without non-specific interaction with cell membranes is possible and a highly promising system to transfect other primary or cultured cells specifically through a receptor-dependent mechanism. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords asialoglycoprotein receptor; block copolymer; endocytosis; galactose; gene transfer; hepatocytes

Introduction

Since 1987, numerous cationic vectors have been synthesized and are currently used for delivery of nucleic acids into cultured cells [1,2]. The principle of non-viral gene delivery relies on the interaction of nucleic acids with cationic residues present on the vector through electrostatic forces [1,3]. The resulting cationic vector/DNA complexes display a three-stage model of colloiddal stability depending on the theoretical charge ratio, corresponding

to the moles of positive charges per mole of negative phosphates [4,5]. In zone A, for charge ratios below 1, negatively charged stable complexes are formed. In zone B, complexes precipitate as the charge ratio is close to neutral (ranging from 1 to 3, in the present study) due to the absence of electrostatic repulsion forces. In zone C (for charge ratios above 4, in the present study), complexes are colloidally stable through electrostatic repulsion due to positively charged complexes. The morphology depends on the theoretical charge ratio but multilamellar structures are usually observed in cationic lipid/DNA lipoplexes irrespective of the charge ratio [2]. The most active complexes are those from zone C because their electrostatic interactions with negative molecules present at the cell surface lead to non-specific internalization through endocytosis, phagocytosis or macropinocytosis processes [3,6]. Whereas many cells types are transfected with cationic lipid/DNA lipoplexes using this principle, the excess of cationic lipid used to generate positively charged lipoplexes can lead to high cytotoxicity, compromising cell viability [7,8] and preventing specific transfection. In this context, numerous strategies have been described to limit the cytotoxicity of positively charged complexes such as decreasing their charge ratio [9–11]. However, the transfection activity of cationic vectors/DNA complexes was less efficient because they did not spontaneously internalize into cells by electrostatic interactions. Thus, various studies [9–12] have tried to substitute non-specific binding of positively charged particles to cells with a more specific interaction by a receptor-mediated process. The asialoglycoprotein receptor (ASPGR), present at the surface of hepatocytes, has been one of the most used glycosylated receptors for the targeting of cationic vector-based gene delivery systems [13]. ASPGR naturally binds and internalizes terminal galactose-bearing asialoglycoproteins [14]. Thus, galactose molecules were grafted onto different cationic vectors, including cationic lipids, polyethyleneimines (PEI) [15–18], polylysine (PLL) [19–22] and peptides [23], to target ASPGR specifically. Some studies have reported the synthesis of lipid molecules with headgroups containing both cationic polyamines and galactose residues [9,10,12]. In order to form colloidally stable DNA complexes with this type of molecule, positively charged lipoplexes were used to transfect a human hepatoma cell line (HepG2). In this context, the presence of galactose in the cationic lipid led to a modest increase in transfection compared to that obtained with cationic lipids without galactose. This was due to the still positive zeta potential of lipoplexes even with galactosylated cationic lipid, which led to non-specific transfection. Remy *et al.* [11] described the formation of particles resulting from the association of DNA with two independent molecules, i.e. cationic lipopolyamine and galactosylated neutral lipid. Transfection of the HepG2 cell line showed that these particles led to a 1000-fold increase in transgene expression compared to lipopolyamine/DNA lipoplexes without galactosylated neutral lipid. However, addition of asialofetuin, the natural ligand of ASPGR, did not lead to

a decrease in transgene expression, questioning the mechanism of transfection of the particles. Other approaches to transfect the HepG2 cell line specifically were explored with cationic polymers including PLL [19–22] and PEI [15–18]. Galactosylated PLL (PLL-gal) was shown to increase transfection efficiency compared to parent PLL but the presence of residual positive amines in the PLL backbone prevented non-specific transfection activity from being completely abolished [19–22]. Moreover, addition of chloroquine was necessary to observe transfection, with PLL either galactosylated or not [21]. Therefore, the same strategy was employed with PEI, which does not require chloroquine to transfect cultured cells. The galactose-bearing PEI (PEI-gal) was prepared by reductive amination between PEI and the galactosyl residue with an optimal percentage of galactosylation reported to be 5% of the total amine functions in PEI [15,16,18]. Nonetheless, around neutrality, particles became much larger and unstable, so physicochemical properties like particle size and electric charge were investigated [15]. In spite of efforts at downsizing, the galactosylated complexes still presented a slightly positively charged surface. Therefore, a modest increase in gene transfection in HepG2 cells was observed with galactosylated particles compared to ungalactosylated ones [15–17,20]. Indeed, again the presence of residual positive charges at the surface of galactosylated particles tends to show that complexes are internalized not only by receptor-mediated endocytosis, but also non-specific endocytosis by electrostatic interactions. These observations prompted us to design and evaluate new supramolecular assemblies capable of only specific nucleic acid delivery. More precisely, our goal here was to explore the efficiency of multimodular assemblies containing a condensed core of DNA surrounded by a corona of poly(ethylene oxide) stretches linked to hydrophobic moieties functionalized with ligand at the distal ends for cell recognition and internalization by a receptor-mediated process. Thus, we first designed a simple and fast synthetic procedure to produce poly(ethylene oxide) hydrophobic derivatives containing galactose residues to target the ASPGR on primary hepatocytes. As complexes have to be close to neutrality to avoid non-specific interaction with cell membranes, we decided to form small complexes resulting from the association of bis(guanidinium)-tren-cholesterol (BGTC)/dioleylphosphatidylethanolamine (DOPE) liposomes and DNA at a theoretical charge ratio close to neutrality in the presence of functionalized poly(ethylene oxide) hydrophobic derivatives, which serves here both as a steric colloidal stabilizer and to target receptors. In the present study, we demonstrate that it is possible to fabricate galactosylated multimodular lipoplexes by self-assembly of BGTC/DOPE liposomes, DNA and steric colloidal stabilizer with chemical tunability. We also report the results of cryo-transmission electron microscopy experiments showing that the morphology of the multimodular supramolecular assemblies consisted of ordered lamellar domains. Finally, we report data from *in vitro* gene expression studies demonstrating that

galactosylated multimodular lipoplexes are efficient for transfection in primary hepatocytes in a specific manner and that non-equipped particles were totally inefficient.

Materials and methods

Plasmids, steric stabilizers and cationic liposomes

pCMV-Luc [24] is a plasmid encoding the luciferase reporter gene under the control of the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. Plasmid was purified from recombinant *E. coli* by means of Endo-free plasmid purification columns (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). Steric stabilizers (Scheme 1), F68 (80% poly(ethylene oxide); molecular weight (MW) 8400) and F108 (80% poly(ethylene oxide), MW 14600), were generously provided by BASF. Stock solutions of steric stabilizers were prepared at given weight-to-weight (w/w) concentration in sterilized water and were kept at 4 °C. BGTC/DOPE liposomes were obtained as previously described [5].

Enzymatic galactosylation of steric stabilizers

The synthesis of F68-gal and F108-gal was performed by first dissolving F68 and F108 (1 mM) in acetate buffer (100 mM, pH 4.5) and in *N,N*-dimethylformamide (10%). Then *p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (pNP- β -gal) (Sigma-Aldrich; 2 mmol) was added at room temperature under vigorous stirring. Finally, the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich; 8.9 units) was added to the remaining solution, and the mixture was stirred for 15 h at 30 °C. The reaction was stopped by heating at 100 °C for 5 min, and the mixture was immediately dialyzed for 4 days under distilled water using a Pierce SnakeSkin® membrane (molecular weight cutoff (MWCO) 3500 Da). Then, the products were centrifuged, filtered with Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (Millipore; MWCO 30.000 Da) and freeze-dried. F68-gal: ^1H NMR (D_2O): δ 4.30 (H1 gal, d, $J = 7.8$ Hz), 3.78–3.73 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-H}$, m), 3.67–3.40 (bs, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n$, $(\text{-O-CH}_2\text{-CH-(CH}_3\text{)-O})_n$), 1.06–1.03 (m, $(\text{-O-CH}_2\text{-CH-(CH}_3\text{)-O})_n$). F108-gal: ^1H NMR (D_2O): δ 4.30 (H1 gal, d, $J = 7.8$ Hz), 3.80–3.75 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-H}$, m), 3.67–3.29 (bs, $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n$,

$(\text{-O-CH}_2\text{-CH-(CH}_3\text{)-O})_n$), 1.09–1.06 (m, $(\text{-O-CH}_2\text{-CH-(CH}_3\text{)-O})_n$).

Preparation of lipoplexes

Formulations of DNA with BGTC were prepared by mixing equal volumes of various concentrations of BGTC/DOPE liposomes with plasmid DNA at the desired concentration. Formulations of DNA complexes with F108, F108-gal or F68, F68-gal were prepared as described above by mixing solutions of cationic liposomes containing various concentrations of steric stabilizers with plasmid DNA solution.

Dynamic light scattering, fluorescence and cryo-TEM studies

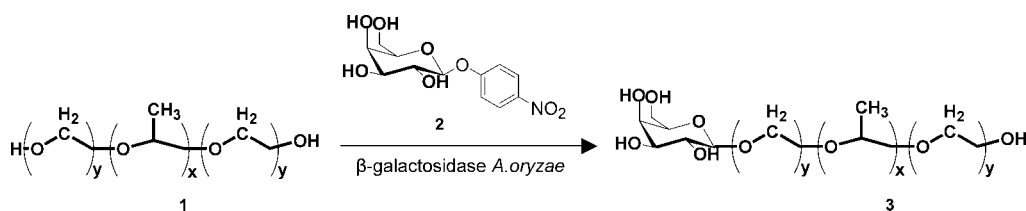
Dynamic light scattering measurements were made on a Zetasizer 3000 HSA (Malvern) at 20 °C as previously described [4,5]. Samples were prepared by complexing DNA with BGTC/DOPE liposomes at a charge ratio of 2 and with F108-gal or F108 at various w/w ratios. Formation of complexes was confirmed by electrophoresis on 1.0% agarose gel with Tris-acetate running buffer at 100 V for 20 min. Fluorescence and cryo-TEM experiments were performed as previously described [4,5,25].

Size determination of complexes in transfection media

BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes prepared at a charge ratio of 2 and at an F108-gal/DNA ratio (w/w) of 300 and BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 4 were formed in 150 mM NaCl by mixing 50 μl of F108-gal or BGTC/DOPE solutions with 50 μl (200 $\mu\text{g/ml}$) plasmid DNA. Samples were analyzed after 20 min of complexation at room temperature. Just prior to dynamic light scattering analysis, 1000 μl of either 150 mM NaCl or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (plus additives used for culturing primary hepatocytes) was added to lipoplexes. Size determination was obtained every hour for lipoplexes diluted with NaCl or DMEM.

Primary culture of hepatocytes

Hepatocytes were isolated from the liver of fed male rats or mice by the collagenase method [26], modified as



Scheme 1. Enzymatic synthesis of galactosylated steric stabilizers 3 by means of the transgalactosylation activity of a galactoside hydrolase

described elsewhere [27,28]. Briefly, livers were perfused with Hank's balanced salt solution, and washed at a rate of 5 ml/min using the inferior vena cava before collagenase (0.025%) was added. Dead cells were eliminated through a density gradient using percoll, and viable cells were plated at a density of 75 000/cm² on collagen-coated plates. Cells were given a time span of 2 h to attach in William's medium E with Glutamax (Invitrogen), 10% fetal bovine serum (FBS), 10 µg/ml streptomycin, 100 u/ml penicillin, 100 nM dexamethasone and 100 nM insulin (Actrapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark).

Cell line culture

Cos7 green monkey kidney fibroblast cells were grown in high glucose DMEM (Invitrogen) (4.5 g/l). Cell culture media were supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 10 µg/ml streptomycin, 100 u/ml penicillin at 37 °C under humidified 5% CO₂. Cells were plated at a density of 35 000/cm² 24 h prior to transfection.

Culture cell transfection

Cells were transfected with BGTC/DOPE-DNA lipoplexes formulated at BGTC/DOPE-DNA charge ratios of 4 or 2 in the presence of F108-gal, F108 or F68-gal, F68 at various steric stabilizer/DNA ratios. BGTC/DOPE-DNA/steric stabilizer lipoplexes containing 2 µg of luciferase plasmid were added to each well. Lipoplexes were incubated at room temperature for 15–20 min before transfection. After transfection (4 h), the serum-free medium (300 µl) was then replaced with 1 ml of growth medium containing 10% FBS for Cos7 and without FBS for primary hepatocytes. Cells were cultured for an additional 20 h before gene expression was determined.

Luciferase assay

Luciferase activity was measured using the Promega luciferase assay system (Madison, WI, USA). Cells were rinsed twice with 500 µl of phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with 200 µl of reporter lysis buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Then, strictly hepatocyte cells were subjected to four freeze/thaw cycles. After 5 min of centrifugation at 10 000 rpm and 4 °C, luciferase activities were measured from an aliquot of supernatant with a VICTOR² multilabel counter (Perkin Elmer, Les Ulis, France). Luciferase activity was assayed by measuring light emission after addition of 100 µl of luciferase substrate to 20 µl of the supernatant. Protein content was measured with a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit.

Formation and transfection with YOYO-1-labeled plasmid

YOYO-1 was from Molecular Probes (Eugene, USA). The luciferase plasmid was added to a solution of YOYO-1 (0.1 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO)) at the desired mixing ratio (dye/base pairs). A dye/base pair ratio 1 : 150 is equivalent to the addition of one molecule of dye for every 150 base pairs of plasmid DNA. The mixture was incubated at room temperature for 10 min before self-assembly of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes formulated at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2 in the presence of F108-gal at an F108-gal/DNA ratio of 300 or in the presence of F108 at an F108/DNA ratio of 300; or with a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 4. Primary hepatocytes were incubated with lipoplexes for 4 h. After transfection, the serum-free medium (300 µl) was replaced with fresh medium. Then, 20 h post-transfection, cells were washed twice with 500 µl of PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C. Finally, cells were rinsed again with PBS and mounted with fluorescent mounting medium (DAKO, Carpenterina, CA, USA) for observation. Cells were observed under FITC filter to determine the YOYO internalization.

Results

Galactosylation of steric stabilizers

The grafting of galactosyl residues onto two steric stabilizers, F68 and F108, was performed by a chemo-enzymatic glycosylation (Scheme 1) through the transglycosylation activity of the galactoside hydrolase from *Aspergillus oryzae* using pNP-β-gal as donor and steric stabilizers as acceptors. As this method was based on using the transfer activity of galactoside hydrolase, we used a large excess of donor to favor transglycosylation products [29]. Galactosylated F108 (F108-gal) and galactosylated F68 (F68-gal) were characterized by different methods. First, an aqueous size-exclusion chromatography method was performed on ungalactosylated and galactosylated steric stabilizers to evaluate the polydispersity of the steric stabilizers. Both chromatograms were similar, indicating that the size distribution of steric stabilizers was not modified by the enzymatic reaction (data not shown). F108-gal and F68-gal were also analyzed by H¹ NMR at 400 MHz using D₂O as the lock solvent. The anomeric proton of the galactose unit (H1 gal, 4.30ppm, d) presents a *J* coupling constant near 7–8 Hz, which is characteristic of a β grafting. Therefore, enzymatic synthesis led strictly to β-F108-gal and β-F68-gal and did not modify the polydispersity of steric stabilizers. As the galactosylation was not complete, the average number of galactose units grafted onto steric stabilizers was determined by the ratio of the anomeric signal of galactose (1H, H1 gal, 4.30 ppm, d, *J* = 7.8 Hz) and the chemical shifts of non-modified terminal methylenes (4H, CH₂-CH₂-O-H, 3.75–3.80 ppm,

m) of steric stabilizers. This calculation indicated that around 25% of the terminal OH groups of the F108 and F68 steric stabilizers were linked to β -galactose.

Galactosylated multimodular lipoplexes

Next, galactosylated multimodular lipoplexes were assembled by condensing DNA molecules with BGTC/DOPE liposomes at a charge ratio close to neutrality in the presence of F108-gal or F108. A thorough understanding of

the physicochemical properties of lipoplexes as a function of the steric stabilizer/DNA ratio is crucial for the self-assembly of the gene delivery system. Therefore, we examined the influence of this factor on the colloidal stability of the BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes and the BGTC/DOPE-DNA/F108 lipoplexes. To this end, we measured the mean particle diameter by dynamic light scattering. Figure 1A illustrates the mean diameter of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 2 as a function of F108-gal/DNA ratio and F108/DNA ratio. As previously shown [30], in the absence of steric stabilizer and at this low ratio, we obtained colloiddally

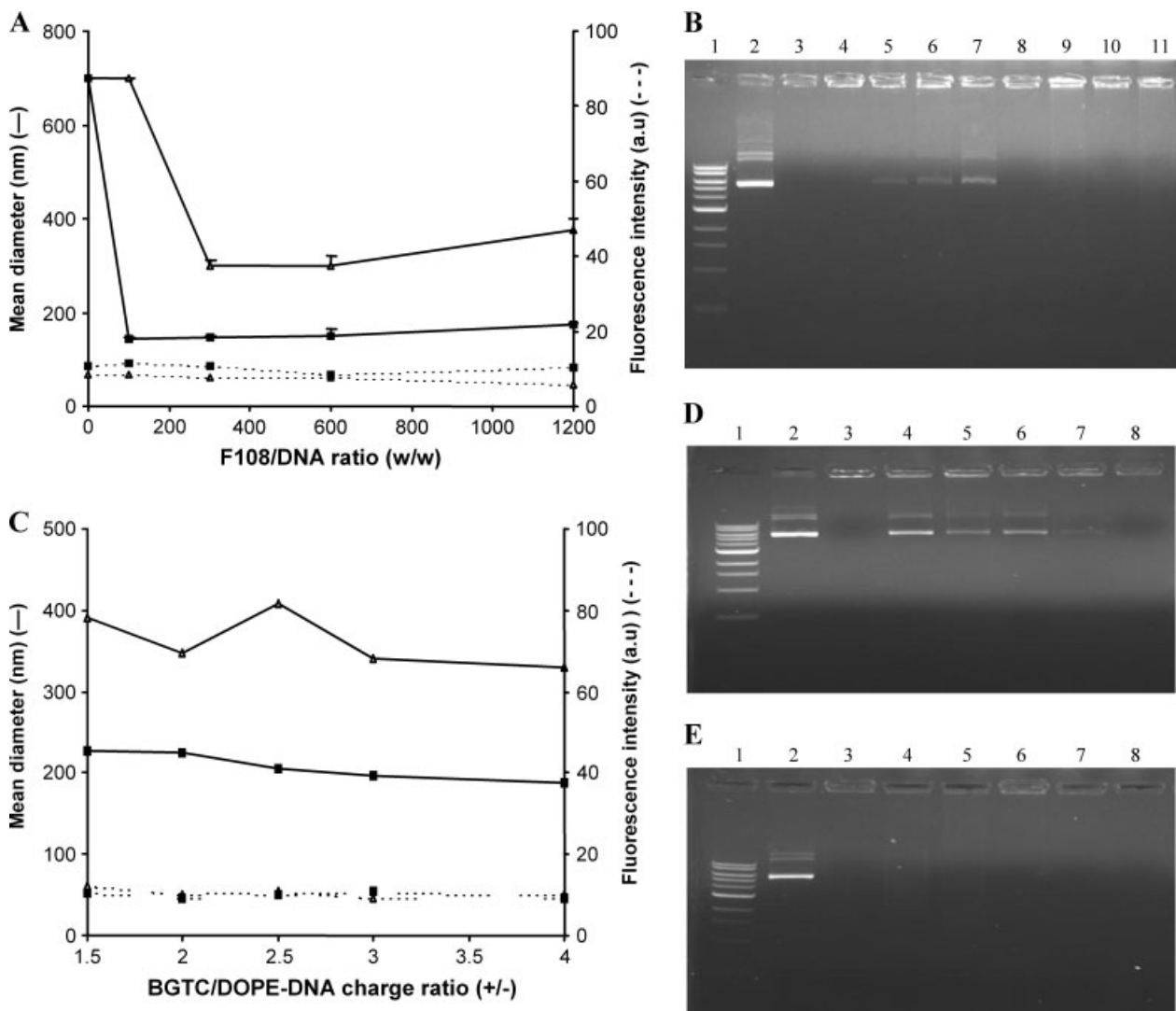


Figure 1. DNA complexation and colloidal stabilization of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes in the presence of F108-gal or F108. To assess the colloidal stability of lipoplexes and nucleic acid complexation, dynamic light scattering (solid lines) and BET fluorescence measurements (dashed lines) were performed after 20 min of complexation, respectively. (A) Mean diameter and BET fluorescence of lipoplexes as a function of F108-gal/DNA (w/w) ratio (Δ) and F108/DNA (w/w) ratio (\blacksquare). (B) Agarose gel electrophoresis of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes as a function of F108-gal/DNA (w/w) ratio and BGTC/DOPE-DNA/F108 lipoplexes as a function of F108/DNA (w/w) ratio. Lanes 1, 2 and 3 correspond to a 1 kb DNA ladder, naked plasmid, and aggregated BGTC/DOPE-DNA lipoplexes, respectively. Lanes 4–7 and 8–11 correspond to BGTC/DOPE-DNA lipoplexes formed in the presence of F108-gal and F108, respectively. (C) Colloidal stability and DNA complexation of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes with F108-gal (Δ) and F108 (\blacksquare) as a function of the BGTC/DOPE-DNA charge ratio. (D) Agarose gel electrophoresis of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes at an F108-gal/DNA ratio of 300 as a function of various BGTC/DOPE-DNA charge ratios and (E) BGTC/DOPE-DNA/F108 lipoplexes at an F108/DNA ratio of 300 as a function of various BGTC/DOPE-DNA ratios. Lanes 1, 2 and 3 correspond to a 1 kb DNA ladder, naked plasmid, and BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 2, respectively. Lanes 4–8 correspond to BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 1.5, 2, 2.5, 3 and 4, respectively

unstable lipoplexes, as evidenced by visible precipitates which cannot be measured by dynamic light scattering. Under this condition an arbitrary value of 700 nm was attributed for those non-colloidally stable lipoplexes. By contrast, addition of F108 allowed the formation of stable DNA complexes with a mean diameter of 150 nm at an F108/DNA ratio starting from 100. F108-gal led also to the formation of colloidally stable BGTC/DOPE-DNA lipoplexes with a mean diameter of 300 nm starting from an F108-gal/DNA ratio of 300. Fluorescence experiments, performed by exposing BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes and BGTC/DOPE-DNA/F108 lipoplexes to ethidium bromide, showed that the fluorescence level was very low. This indicates that all DNA molecules were totally incorporated into BGTC/DOPE-DNA particles even stabilized by F108-gal or F108. To confirm these results, DNA entrapment into lipoplexes of various F108-gal/DNA and F108/DNA ratios was assayed by agarose gel electrophoresis experiments. The results presented in Figure 1B demonstrate that DNA molecules associated with BGTC/DOPE liposomes in the presence of F108 did not migrate into the gel, although, in the presence of F108-gal, lipoplexes were partially destabilized during gel electrophoresis experiment as evidenced by some DNA

molecules which were able to migrate into the gel for the highest F108-gal/DNA ratio. Next, we studied the influence of the BGTC/DOPE-DNA charge ratio on the mean diameter of complexes and the DNA complexation in the presence of F108-gal or F108. Figure 1C shows that DNA complexed by BGTC/DOPE liposomes in the presence of F108-gal and F108 led to the formation of particles of a mean diameter of about 350 and 220 nm, respectively, irrespective of the BGTC/DOPE-DNA charge ratio. BET intercalating experiments indicated that the fluorescence signal was at its minimal value for both galactosylated and ungalactosylated particles, although the agarose gel electrophoresis analysis indicated (Figures 1D and 1E) that BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes for BGTC/DOPE-DNA ratios ranging from 1.5 to 3 (Figure 1D) were partially destabilized during the experiment.

Cryo-TEM of galactosylated multimodular lipoplexes

The supramolecular assemblies of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes in the presence of F108 and F108-gal were observed by cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) (Figure 2). In the presence of F108 at an

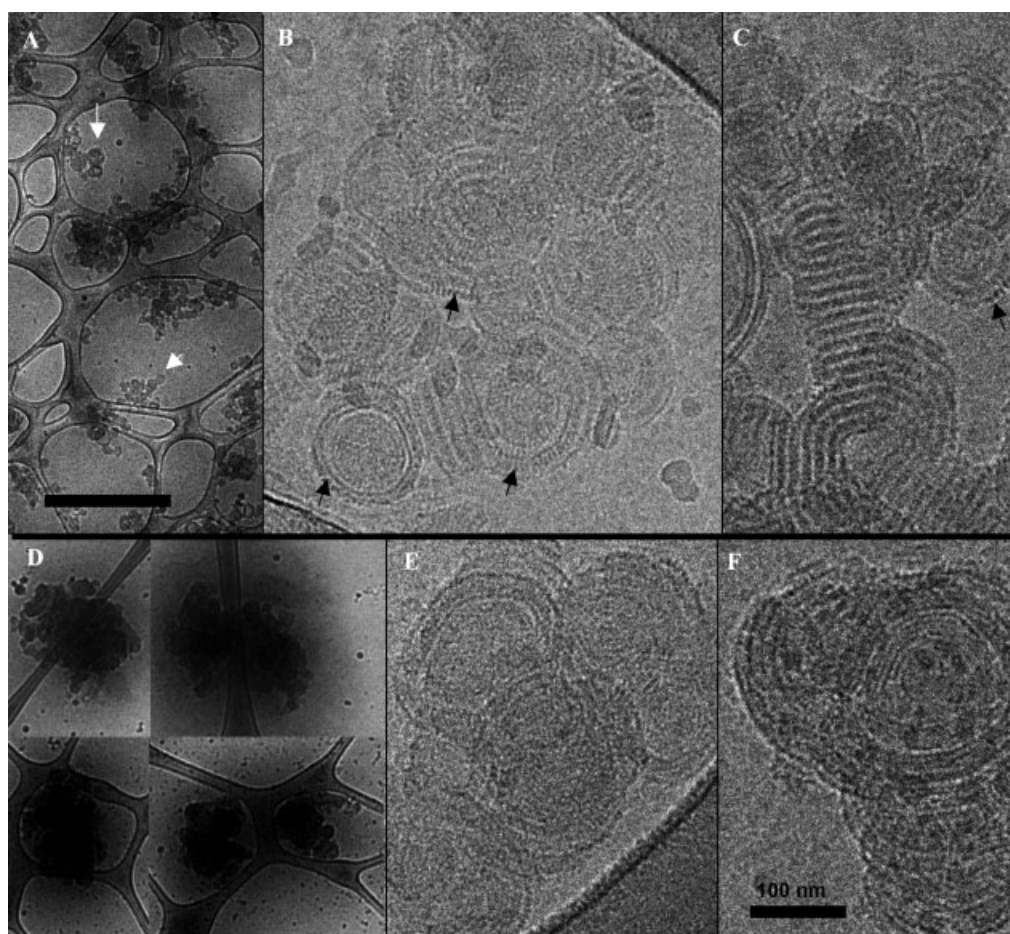


Figure 2. Cryo-TEM visualization of multimodular lipoplexes. (A) Field of view of BGTC/DOPE-DNA/F108 lipoplexes. (B, C) Images at high magnification of lipoplexes showing complex assemblies of DNA sandwiched between lipid membranes (black arrows). (D) Gallery of images of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes revealing dense and large assemblies. (E, F) Images at high magnification of a small part of the DNA condensate. Scale bars 1 μ m (A, D) and 100 nm (B, C, E, F)

F108/DNA ratio of 300, lipoplexes ranged in size from 50 to 300 nm and were mainly composed of grapes of liposome-sized structures (white arrows). Indeed, spherical structures made of liposomes surrounded by DNA strands were involved in the formation of larger aggregates (Figure 2B). The 2.5 nm regular striation visible at the liposome surface corresponded to the assembly of DNA strands (black arrows). Lipoplexes containing the typical repeat structure of DNA/lipid bilayers involving a large restructuring of liposome were also visible (Figure 2C). The lipoplexes formed in the presence of F108-gal at an F108-gal/DNA ratio of 300 led to larger lipoplexes, which were encountered on the grid in small quantities (a few lipoplexes per square grid). These lipoplexes (shown in a gallery of images) appeared larger and denser than those obtained with F108, their sizes ranging from 200 to 500 nm (Figure 2D). Due to their larger size, only the periphery of the lipoplexes can be correctly imaged at higher magnification (Figures 2E and 2F). The structures exhibited a regular repeat corresponding to DNA strands sandwiched between lipid bilayers and revealed a significant lipid membrane rearrangement. Although their overall size was different, the lipoplexes exhibited comparable organization in the presence of both F108 and F108-gal; thus it is very likely that these steric stabilizers have no noticeable influence on intimate BGTC/DOPE–DNA interactions.

Colloidal behavior of lipoplexes in transfection medium

Dynamic light scattering analysis of lipoplexes provides a means of checking for the colloidal stability of particles destined for *in vitro* transfection. However, measurement of particle size alone does not take into account possible transfection medium-induced effects on the size of the complexes. In fact, it is possible that charged species in the medium could alter the size of preformed lipoplexes before effective transfection takes place [31]. To address this issue, preformed lipoplexes representing both BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes prepared at a charge ratio of 2 and at an F108-gal/DNA ratio of 300, and BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 4, were evaluated either in the transfection medium of primary hepatocytes or in 150 mM NaCl solution. Results from dynamic light scattering analysis performed every hour on the lipoplexes are shown in Figure 3. It can be seen that, within 1 h of adding transfection medium, the size of lipoplexes at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 4 began to increase until aggregates were formed. By contrast, BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes were able to maintain their small size in saline solution as well as in transfection medium.

Biological activity of galactosylated multimodular lipoplexes

We next investigated the ability of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes or BGTC/DOPE-DNA/F68-gal

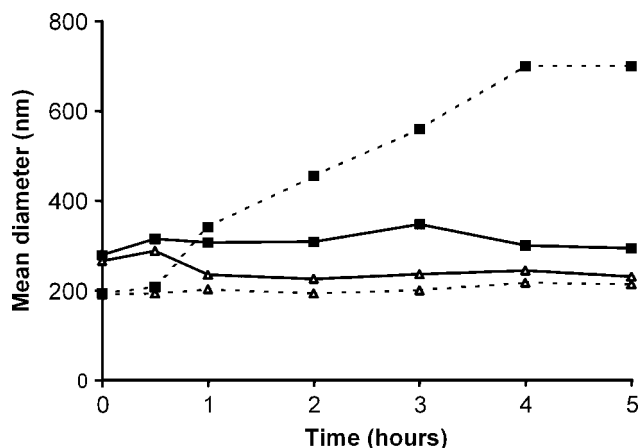


Figure 3. Colloidal stability of lipoplexes in transfection medium. Dynamic light scattering analysis of positively charged BGTC/DOPE-DNA lipoplexes (dashed lines) at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 4 was performed either in primary hepatocyte transfection medium (■) or in 150 mM NaCl (△). Similar experiments with BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes (solid lines) at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2 and at an F108-gal/DNA ratio of 300 (w/w) were conducted; i.e. primary hepatocytes transfection medium (■) and NaCl (△)

lipoplexes to transfect primary hepatocyte cells. Primary hepatocyte cells were transfected with BGTC/DOPE-DNA lipoplexes formulated at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2 in the presence of F108-gal and F108 or F68-gal and F68 at various steric stabilizer/DNA ratios. Figure 4A shows that DNA complexes formulated with F108-gal led to a dramatic increase in luciferase expression as the F108-gal/DNA ratio increased. The same trend was also observed with F68-gal but led to a lower luciferase expression. By contrast, BGTC/DOPE-DNA lipoplexes formed in the absence or presence of ungalactosylated F108 or F68 did not lead to significant primary hepatocyte transfection. Therefore, these results strongly suggest that particles equipped with galactose lead to specific hepatocyte transfection and that the length of the steric stabilizer plays a role both in the formation of supramolecular assemblies and in the accessibility of the ligand for the receptor-mediated endocytosis pathway. Further experiments were performed with particles characterized by an F108/DNA ratio of 300. Next, experiments were undertaken to determine the optimal BGTC/DOPE-DNA charge ratio that allowed the highest luciferase activity with BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes. Figure 4B illustrates that BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes formulated at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2 gave the highest transfection efficiency. We next evaluated the influence of the amount of DNA entrapped within sterically stabilized lipoplexes on the luciferase expression of transfected hepatocytes. Figure 4C indicates that luciferase activity was maximal for a DNA amount of 2 µg/well. In these two experiments (Figures 4B and 4C) ungalactosylated lipoplexes did not transfect primary hepatocytes. To demonstrate the cell-specific transfection with galactosylated multimodular lipoplexes, we carried out experiments on primary hepatocytes in the absence

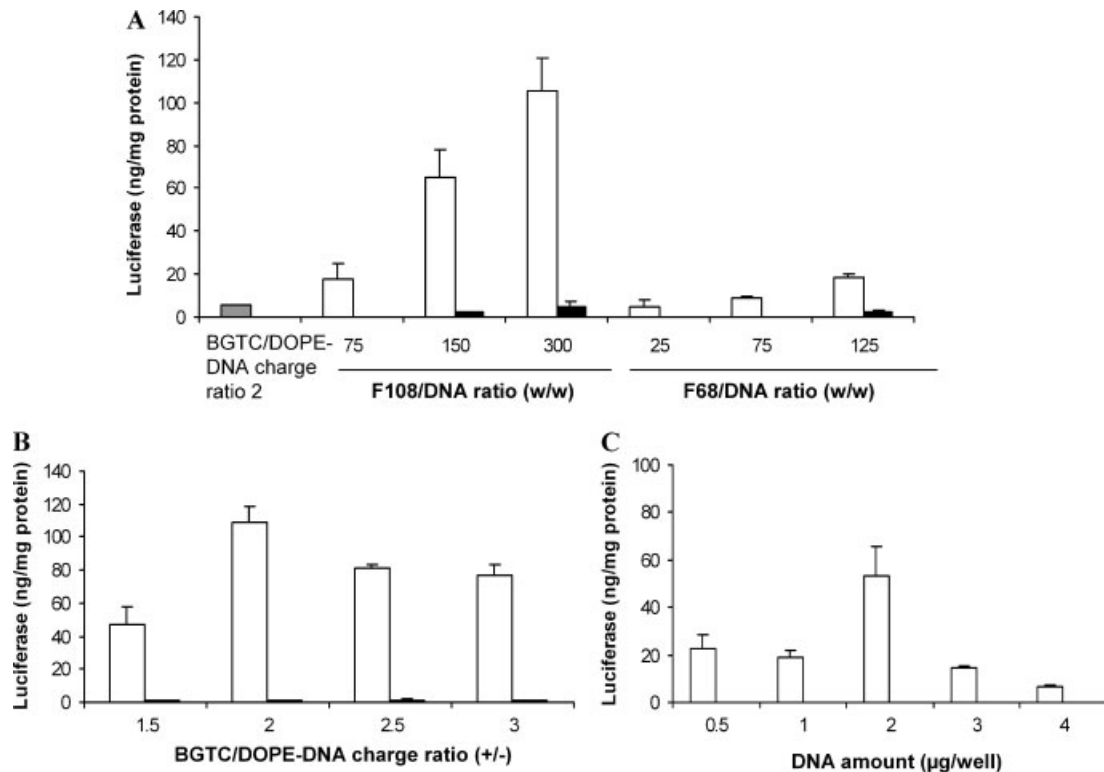


Figure 4. Transfection efficiency in primary hepatocytes of BGTC/DOPE-DNA/steric stabilizer lipoplexes as a function of (A) the chemical structure of the steric stabilizer, (B) the BGTC/DOPE-DNA charge ratio, and (C) the DNA amount. *In vitro*, luciferase activity in transfected primary hepatocytes was performed with galactosylated steric stabilizer (white bars) or ungalactosylated steric stabilizer (black bars). (A) Two different steric stabilizers with different chemical structures were galactosylated and used for the formation of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 2 and containing 40 µg DNA/ml. (B) BGTC/DOPE-DNA lipoplexes were prepared at various BGTC/DOPE-DNA charge ratios with F108-gal at an F108-gal/DNA (w/w) ratio of 300 or with F108 at an F108/DNA (w/w) ratio of 300 and 40 µg DNA/ml. (C) BGTC/DOPE-DNA lipoplexes were characterized by an F108-gal/DNA (w/w) ratio of 300, a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2 and a DNA concentration ranging from 10 to 80 µg/ml

and presence of various concentrations of free galactose, which can bind to the ASGPR (Figure 5A). This experiment was also performed with BGTC/DOPE-DNA lipoplexes formed at a charge ratio of 4 as control because these positively charged lipoplexes should not be internalized through ASGPR but rather through electrostatic interactions. In the absence of free galactose, BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes at an F108-gal/DNA ratio of 300 formulated with BGTC/DOPE-DNA at a charge ratio of 2 gave a similar activity to BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 4 (Figure 5A). We also observed that increasing the concentration of free galactose led to a progressive decrease in luciferase expression. By contrast, as expected the presence of free galactose did not affect the luciferase activity of highly positively charged lipoplexes (Figure 5A). Consequently, these results show that competition takes place between galactosylated multimodular lipoplexes and free galactose to interact with ASGPR, suggesting that BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes are internalized in primary hepatocytes by a receptor-mediated process. To confirm the specific effects of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes on receptor-mediated transfection, we carried out control experiments on Cos7 cells, which do not express ASGPR. The transfection efficiency of lipoplexes colloiddally stabilized with F108-gal or F108 was similar and lower than

that observed with positively charged BGTC/DOPE-DNA lipoplexes (Figure 5B). To confirm the receptor-mediated endocytosis pathway for transfection of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes, primary hepatocyte cells were transfected after pre-incubation with nocodazole, which induces depolymerization of microtubules. Nocodazole inhibits transport of endosomal vesicles from early to late endosomes. This chemical substance prevents lysosomal degradation so nocodazole improves one step of the endocytosis process. Nocodazole pre-treatment increased the transfection efficiency of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes (Figure 5C). By contrast, in the presence or absence of nocodazole, BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 4 gave similar levels of luciferase expression (data not shown). Therefore, BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a charge ratio of 4 are mainly internalized by non-specific electrostatic interactions with the cellular membrane, although BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes transfected through an endocytosis process.

Cellular uptake of galactosylated multimodular lipoplexes

We finally examined the cellular uptake of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes into primary hepatocytes. The

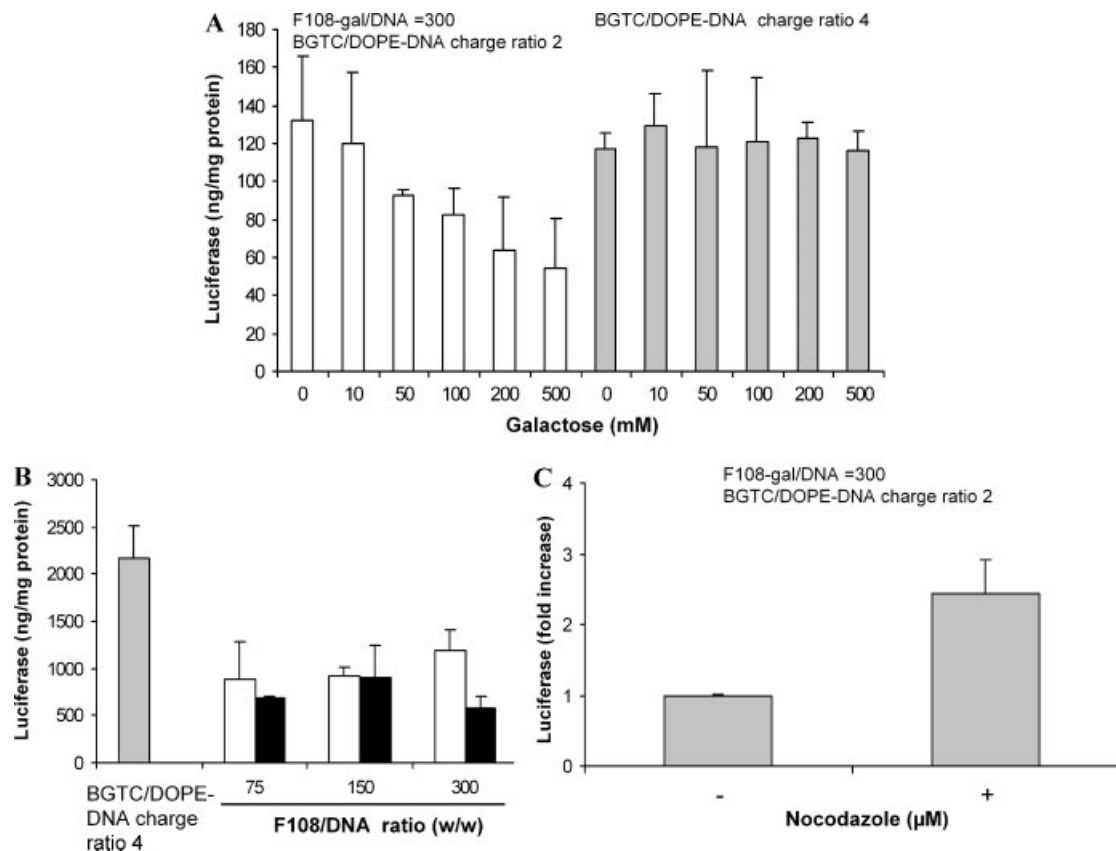


Figure 5. BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes enabled specific *in vitro* transfection. (A) Luciferase expression in primary hepatocyte cells of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes either colloiddally stabilized with F108-gal (F108-gal/DNA (w/w) ratio of 300) or with positively charged particles (BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 4) as a function of the concentration of free galactose added to the cell culture medium 2 h before the transfection. (B) Luciferase expression in Cos7 cells of positively charged BGTC/DOPE-DNA lipoplexes and BGTC/DOPE-DNA lipoplexes at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2 formed in the presence of F108-gal (white bars) or F108 (black bars). (C) Luciferase expression in primary hepatocyte cells of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes characterized by a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2, an F108-gal/DNA (w/w) ratio of 300 and 40 µg DNA/ml as a function of the pre-incubation during 45 min with 33 µM nocodazole

BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes, BGTC/DOPE-DNA/F108 lipoplexes and positively charged BGTC/DOPE-DNA lipoplexes were labeled with the fluorescent DNA-intercalating dye YOYO-1. Fluorescent complexes were incubated for 4 h with cells. The cells were then observed by microscopy. As shown in Figure 6A, BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes were detected inside almost all of the cells. In contrast, for cells incubated with BGTC/DOPE-DNA/F108 lipoplexes, no fluorescence signal was observed inside cells (Figure 6B). As a positive control, positively charged BGTC/DOPE-DNA lipoplexes were also shown in cells (Figure 6C).

Discussion

Over the past decade, numerous non-viral cationic vectors have been synthesized. They share a high efficiency for gene transfer *in vitro* [1,2]. Their use relies on the presence of a large excess of positive charges at the surface of cationic vectors/DNA complexes which is necessary to display a very high transfection activity [1,3]. Nonetheless, positive charges of complexes can lead

to toxicity and to non-specific interactions with the cell surface [7,8]. However, efforts to further mask residual positive charges present at the surface of complexes and to improve specific gene delivery via covalently linked residues aimed at receptor binding have so far failed. Thus, in the present study, we have investigated the relationships between the physicochemical properties and transfection efficiency in primary hepatocytes of DNA complexes formed by novel multimodular supramolecular assemblies. These are characterized by a condensed core of DNA surrounded by a corona of neutral steric stabilizers harboring galactose residues. We used a cationic lipid, BGTC, constituted of guanidinium residues as polar headgroup and cholesterol for the hydrophobic moiety to create the condensed core of particles close to neutrality (at a BGTC/DOPE-DNA charge ratio of 2). However, at this low charge ratio, we obtained BGTC/DOPE-DNA lipoplexes that were not colloiddally stable due to the absence of electrostatic repulsion forces. To colloiddally stabilize neutral lipoplexes, we used steric stabilizers (i.e. F68 and F108) which are poly(ethylene oxide) hydrophobic derivatives. Galactose residue was covalently linked at the distal end of the F108 and F68 for specific

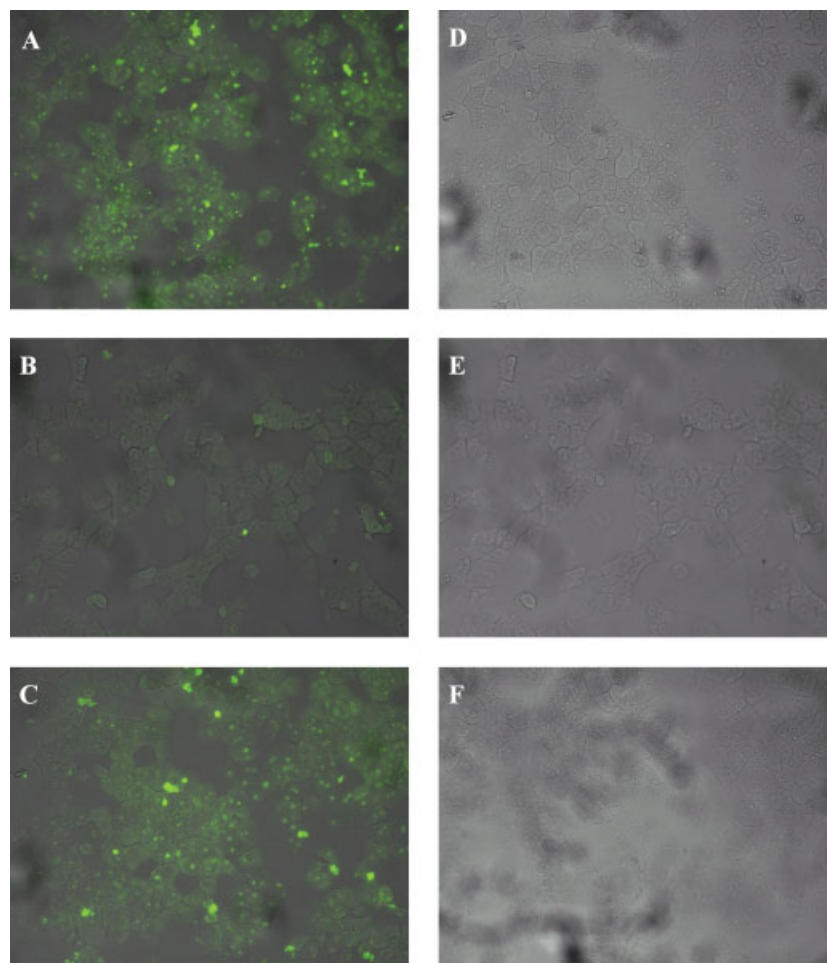


Figure 6. Primary hepatocyte cellular uptake of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes (A, D), BGTC/DOPE-DNA/F108 (B, E) and positively charged BGTC/DOPE-DNA lipoplexes (C, F). DNA molecules were labeled with YOYO (1 molecule every 150 base pairs) before self-assembly with BGTC/DOPE liposomes at a charge ratio of 2 (A, B, D, E) or at a charge ratio of 4 (C, F). Primary hepatocytes were observed under FITC filter to see the YOYO fluorescence (A–C) and by phase contrast (D–E)

cell recognition. Most of the systems based on galactose-bearing cationic polymers (i.e. PEI-gal, PLL-gal) have been synthesized by chemical synthesis, which required at least three steps and led to a low percentage of grafted galactose molecules [15,16,18,19,21]. Indeed, direct functionalization of PEI by reductive amination between PEI and galactosyl residues led to an optimal percentage of galactosylation reported to be still only 5% of the total amine functions in PEI [15,16,18]. Therefore, to improve the limiting step of grafting of galactose units onto polymers, we have developed an enzymatic strategy for galactosylation using β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, which leads to the glycosylation of 25% of the accessible OH groups of F108 and F68. F108-gal led to colloidal stabilization of the condensed core of BGTC/DOPE-DNA lipoplexes. However, while F108 formed particles about 150 nm in diameter, F108-gal led to particles of about 300 nm in diameter. The same observation was noticed with PEI-gal, which led to bigger particles than unmodified PEI [16]. Therefore, it seemed that the presence of galactose modified the natural physicochemical properties of the vectors. Nevertheless, in our case, F108-gal did not perturb the

interaction between DNA and BGTC/DOPE liposomes leading to the formation of lamellar organization as observed with F108. The most active BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes for transfection of primary hepatocytes were characterized by a neutral charge ratio and an F108-gal/DNA ratio of 300 (w/w), and a certain lability as evidenced by the release of DNA molecules during gel agarose electrophoresis of complexes. This DNA release would be due to the destabilization of galactosylated lipoplexes by non-covalent interactions including Van der Waals, hydrogen or dipolar binding between galactosyl residues present in the agarose gel and galactosyl residues linked to the terminal OH group of F108, enhanced by the electric field. This lability characteristic of the multimodular lipoplexes may contribute to the intracellular disassembly of vector/DNA complexes and escape from vesicles before the DNA is degraded in late endosomes or lysosomes. The biological activity of the self-assembly galactosylated multimodular lipoplexes described in this study was investigated in rat primary hepatocytes rather than in the human hepatoma HepG2 cell line commonly used for specific targeting of the ASPGR. Results showed that only galactosylated

particles led to transfection. The absence of transfection observed with particles containing the condensed core of DNA surrounded by ungalactosylated F108 contrasts radically to that obtained with the control usually described in the literature, which led to residual non-specific transfection due to positive charges remaining on particles [9,10,12,15–17,21,22]. Remy *et al.* [11] also reported a multimodular gene delivery system combining two lipids; one positively charged and the other one containing galactose residues that led to transfection of a highly dividing human hepatoma cell line. In the present study, we have shown that the galactosylated multimodular lipoplexes specifically transfect primary hepatocytes expressing ASPGR as shown by galactose inhibition of the transfection. Total inhibition was not achieved even at high galactose concentration (0.5 M), since multimodular lipoplexes presented several galactose units at their surface, which induced avidity effects. The galactose density at the surface of BGTC/DOPE-DNA/F108-gal lipoplexes was estimated by assuming that the amount of steric stabilizer present per surface unit of lipoplex was 338 nmol/cm², according to the formula (n/N)/S, where n is the amount of steric stabilizer in solution (40.6 nmol), N is the number of lipoplexes in solution (1.25 × 10⁸), and S is the surface of one lipoplex (9.6 × 10⁻¹⁰ cm²). Therefore, these lipoplexes contained 135 nmol galactose/cm². This value was in good agreement with a previously described system characterized by a similar galactose density which enabled the binding of ASPGR of primary hepatocytes with a high affinity [32]. On the other hand, Remy *et al.* [11] did not succeed in decreasing the transfection efficiency of HepG2 in the presence of the natural ligand of ASPGR, i.e. asialofetuin. However, the absence of physicochemical characterization of their particles could suggest that novel supramolecular assemblies could be obtained involving a mechanism independent of the recognition by ASPGR. Therefore, the present work suggests that this versatile multimodular system appears to be a promising artificial method for specific gene delivery to ASPGR on primary hepatocyte cells and could be adapted to transfect other primary cells through specific recognition of receptors and to deliver other classes of nucleic acids including siRNA.

Acknowledgements

We are grateful to Clothilde Gourden (In-Cell-Art Nantes, France) for excellent technical expertise in cell culture and to Pierre and Jean-Marie Lehn for providing BGTC. This work was supported by an ACI 'jeunes chercheurs' grant from the 'Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies', Grant # 018 716 from the European Union (strep; SyntheGeneDelivery) and by special grants from the 'Association Française contre les myopathies' (Evry, France) and 'Vaincre la Mucoviscidose' (Paris, France). E. L.-B. is supported by 'Vaincre la Mucoviscidose'.

References

- Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 12349–12354.
- Pitard B. Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat Cell Mol Genet* 2002; **27**: 5–15.
- Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, *et al.* An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 1996; **3**: 1010–1017.
- Pitard B, Aguerre O, Airiau M, *et al.* Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 14412–14417.
- Pitard B, Oudrhiri N, Vigneron JP, *et al.* Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 2621–2626.
- Grosse S, Aron Y, Thévenot G, François D, Monsigny M, Fajac I. Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *J Gene Med* 2005; **7**: 1275–1286.
- Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 6982–6986.
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2550–2561.
- Frisch B, Carrière M, Largeau C, *et al.* A new triantennary galactose-targeted PEGylated gene carrier, characterization of its complex with DNA, and transfection of hepatoma cells. *Bioconjug Chem* 2004; **15**: 754–764.
- Gaucheron J, Santaella C, Vierling P. In vitro gene transfer with a novel galactosylated spermine bolaamphiphile. *Bioconjugate Chem* 2001; **12**: 569–575.
- Remy JS, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F, Behr JP. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 1744–178.
- Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **252**: 78–83.
- Schwartz AL. The hepatic asialoglycoprotein receptor. *CRC Crit Rev Biochem* 1984; **16**: 207–233.
- Pricer WE, Ashwell G. The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem* 1971; **246**: 4825–4833.
- Zanta MA, Boussif O, Adib A, Behr JP. In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjugate Chem* 1997; **8**: 839–844.
- Bettinger T, Remy JS, Erbacher P. Size reduction of galactosylated PEI/DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes. *Bioconjugate Chem* 1999; **10**: 558–561.
- Morimoto K, Nishikawa M, Kawakami S, *et al.* Molecular weight-dependent gene transfection activity of unmodified and galactosylated polyethyleneimine on hepatoma cells and mouse liver. *Mol Ther* 2003; **7**: 254–261.
- Sagara K, Kim SW. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes. *J Control Release* 2002; **79**: 271–281.
- Nishikawa M, Takemura S, Takakura Y, Hashida M. Targeted delivery of plasmid DNA to hepatocytes in vivo: optimization of the pharmacokinetics of plasmid DNA/galactosylated poly(L-lysine) complexes by controlling their physicochemical properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **287**: 408–415.
- Choi YH, Liu F, Park JS, Kim SW. Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjugate Chem* 1998; **9**: 708–718.
- Midoux P, Mendes C, Legrand A, *et al.* Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 871–878.
- Han J, Yeom YI. Specific gene transfer mediated by galactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Int J Pharm* 2000; **202**: 151–160.

23. Niidome T, Urakawa M, Sato H, *et al.* Gene transfer into hepatoma cells mediated by galactose-modified alpha-helical peptides. *Biomaterials* 2000; **21**: 1811–1819.
24. Ferrari S, Moro E, Pettenazzo A, Behr JP, Zacchello F, Scarpa M. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther* 1997; **4**: 1100–1106.
25. Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, *et al.* Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: e159.
26. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969; **43**: 506–520.
27. Balavoine S, Feldmann G, Lardeux B. Regulation of RNA degradation in cultured rat hepatocytes: effects of specific amino acids and insulin. *J Cell Physiol* 1993; **156**: 56–62.
28. Dentin R, Pégrier JP, Benhamed F, *et al.* Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 2004; **279**: 20314–20326.
29. André C, Niamke S, Faure A, *et al.* New methods for chemo-enzymatic galactosidation of 2S rapeseed protein. *Protein J* 2004; **23**: 247–254.
30. Pitard B, Oudrhiri N, Lambert O, *et al.* Sterically stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways in vivo. *J Gene Med* 2001; **3**: 478–487.
31. Turek J, Dubertret C, Jaslin G, Antonakis K, Scherman D, Pitard B. Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection. *J Gene Med* 2000; **2**: 32–40.
32. Yin C, Ying L, Zhang PC, *et al.* High density of immobilized galactose ligand enhances hepatocyte attachment and function. *J Biomed Mater Res A* 2003; **67**: 1093–1104.

Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference

Léa Desigaux^{*†}, Matthieu Sainlos[‡], Olivier Lambert[§], Raphael Chevre^{*†}, Emilie Letrou-Bonneval^{*†}, Jean-Pierre Vigneron[‡], Pierre Lehn[¶], Jean-Marie Lehn^{*¶}, and Bruno Pitard^{*†¶**}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U533, F-44035 Nantes, France; [†]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Institut du Thorax, F-44035 Nantes, France; [‡]Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, Collège de France, F-75005 Paris, France; [§]Unité Mixte de Recherche-Centre National de la Recherche Scientifique, 5248 Université Bordeaux 1, F-33405 Talence, France; [¶]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U613, Centre Hospitalier Universitaire de Brest, Université de Bretagne Occidentale, F-29200 Brest, France; and ^{**}In-Cell-Art, 1 Place Alexis Ricordeau, F-44093 Nantes, France

Contributed by Jean-Marie Lehn, August 8, 2007 (sent for review February 10, 2007)

RNA interference requires efficient delivery of small double-stranded RNA molecules into the target cells and their subsequent incorporation into RNA-induced silencing complexes. Although current cationic lipids commonly used for DNA transfection have also been used for siRNA transfection, a clear need still exists for better siRNA delivery to improve the gene silencing efficiency. We synthesized a series of cationic lipids characterized by head groups bearing various aminoglycosides for specific interaction with RNA. siRNA complexation with such lipidic aminoglycoside derivatives exhibited three lipid/siRNA ratio-dependent domains of colloidal stability. Fluorescence and dynamic light-scattering experiments showed that cationic lipid/siRNA complexes were formed at lower charge ratios, exhibited a reduced zone of colloidal instability, and had smaller mean diameters compared with our previously described guanidinium-based cationic lipids. Cryo-transmission electron microscopy and x-ray-scattering experiments showed that, although the final *in toto* morphology of the lipid/siRNA complexes depended on the aminoglycoside type, there was a general supramolecular arrangement consisting of ordered lamellar domains with an even spacing of 67 Å. The most active cationic lipid/siRNA complexes for gene silencing were obtained with 4,5-disubstituted 2-deoxystreptamine aminoglycoside derivatives and were characterized by the siRNA being entrapped in small particles exhibiting lamellar microdomains corresponding to siRNA molecules sandwiched between the lipid bilayers. These results clearly show that lipidic aminoglycoside derivatives constitute a versatile class of siRNA nanocarriers allowing efficient gene silencing.

gene silencing | gene transfer vectors | transfection

RNAi has become widely used for knocking down the expression of a specific target gene by a posttranscriptional silencing mechanism and thereby it allows phenotypic analysis of gene function in cells (1, 2). Therapeutic approaches involving RNAi are also actively investigated (3, 4). To achieve gene silencing, sequence-specific double-stranded small interfering RNA (siRNA) molecules have to be delivered efficiently into the cytoplasm of cells (5, 6). Various methods have already been used for siRNA delivery, in particular, cationic lipids developed for plasmid DNA transfection (see ref. 7). These cationic lipids are composed of a hydrophobic moiety linked (by a spacer) to a cationic head group bearing either a quaternary ammonium [such as the lipids DOTMA {N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride} and DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane)}, a polycation [such as the lipid DOGS (dioctadecylamidoglycylspermine) (8) and lipopolyamine RPR120535 (9)], or guanidinium groups [such as the lipid BGTC, bis(guanidinium)-tris(2-aminoethyl)amine-cholesterol (10, 11)]. A colipid such as dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) is usually combined with the cationic lipids to form liposomes. The electrostatic interactions

between the plasmid DNA and the cationic head groups lead to the formation of supramolecular assemblies whose structure has been shown to be lamellar or hexagonal, depending on the type and proportion of the colipid in the cationic liposomes (12). Nevertheless, the structural characteristics of complexes formed with siRNA are still unknown, and the relevance of the structures observed with plasmid DNA remains to be assessed in the case of siRNA. It should also be stressed that the current cationic vectors commonly used for plasmid transfection have not been optimized for the delivery of nucleic acids of low molecular weight and particular entities such as siRNA. Indeed, siRNA molecules display a highly specific structure, very different from that of plasmid DNA. A siRNA is a short (usually 21–25 nucleotides) dsRNA with a few (generally 2) nucleotides forming overhangs at the 3' ends (13). These naturally occurring siRNAs result from the processing by Dicer, an enzyme converting long dsRNAs and hairpin RNAs into siRNAs. To bypass the dicing step, this particular structure has to be conserved in synthetic siRNAs. In contrast, plasmid DNA used for gene transfer generally contains, in addition to the prokaryotic sequences required for amplification in bacteria, a eukaryotic expression cassette with a promoter, the cDNA of interest, and a polyadenylation signal. Plasmid DNA thus forms generally large molecules, contrary to the small 21- to 25-nucleotide siRNAs. Such an important structural difference may result in a significant change in the efficiency of a particular transfection vector with one nucleic acid category or another one.

These observations prompted us to design and evaluate new classes of reagents capable of interacting with siRNA molecules in a more specific manner. Our goal was to explore the efficiency of lipidic aminoglycoside derivatives to deliver siRNA molecules and knock down gene expression in mammalian cells. Thus, we chose to synthesize a series of cationic lipids characterized by an aminoglycoside-based cationic head group linked to two hydrophobic dioleoyl chains by a succinyl spacer. Indeed, we reasoned that aminoglycosides are natural compounds already widely used as antibiotics that

Author contributions: P.L., J.-M.L., and B.P. designed research; L.D., M.S., O.L., R.C., E.L.-B., and J.-P.V. performed research; and B.P. wrote the paper.

Conflict of interest statement: P.L., J.-M.L., and B.P. own stock in In-Cell-Art Co., which commercializes lipidic aminoglycoside derivatives.

Abbreviations: BGTC, bis(guanidinium)-tris(2-aminoethyl)amine-cholesterol; cryo-TEM, cryo-transmission electron microscope; DC-Chol, 3-β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol; DOPE, dioleoyl phosphatidylethanolamine; 4,5-DDS, 4,5-disubstituted 2-deoxystreptamine; 4,6-DDS, 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine; DOSK, dioleoyl succinyl kanamycin A; DOSN, dioleoyl succinyl ethylthionemycin B; DOSP, dioleoyl succinyl paromomycin; DOST, dioleoyl succinyl tobramycin; SAXS, small-angle x-ray scattering.

†To whom correspondence may be addressed. E-mail: lehn@isis.u-strasbg.fr, bruno.pitard@univ-nantes.fr, or bruno.pitard@incellart.com.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0707431104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

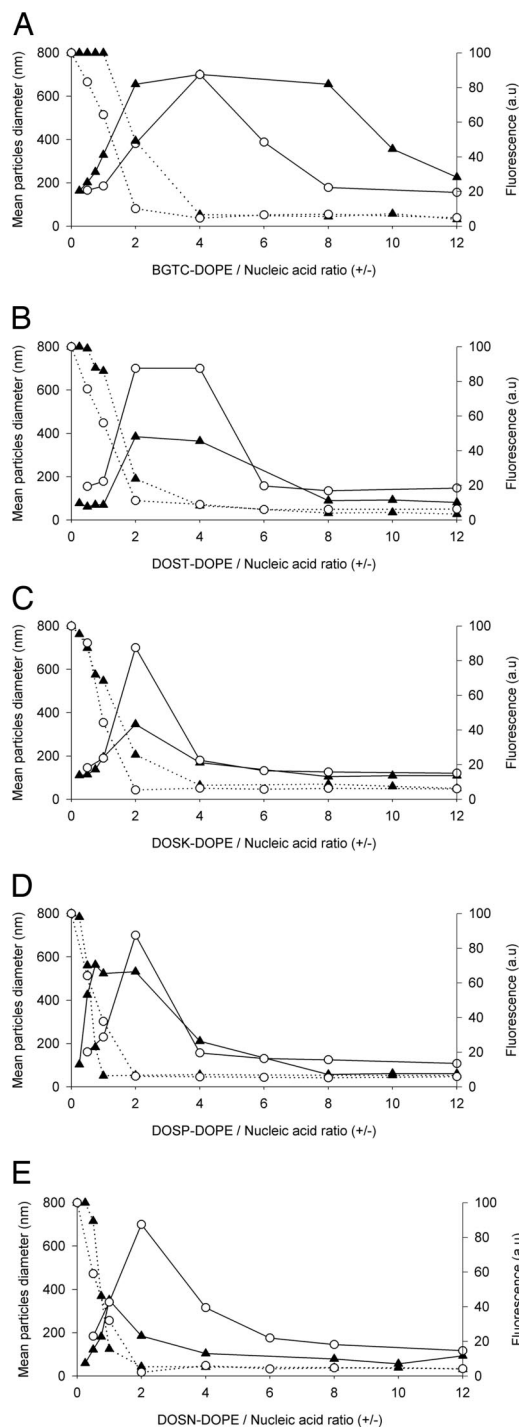


Fig. 2. Colloidal stability of cationic lipid/nucleic acid complexes as a function of their charge ratio. Complexes were obtained by mixing BGTC (A), DOST (B), DOSK (C), DOSP (D), and DOSN (E) cationic liposomes at the required concentrations with plasmid DNA (○) or siRNA (▲) at 10 $\mu\text{g/ml}$. Dynamic light-scattering analysis (solid lines) was performed to assess colloidal stability of the complexes. Ethidium bromide fluorescence measurements (dashed lines) allowed the evaluation of nucleic acid entrapment within complexes. a.u., arbitrary units. Size determination and fluorescence measurements were performed after 1 h of complexation. An arbitrary value of 700 nm was attributed to complexes that were colloidally unstable.

complexation of DNA with either BGTC or aminoglycoside derivative liposomes led to a similar decrease in fluorescence intensity, differences were observed in the siRNA case. Here, only with

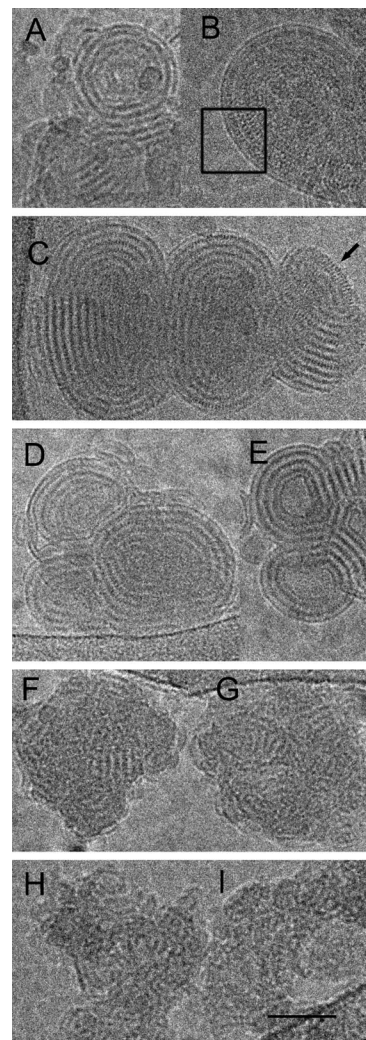


Fig. 3. Cryo-TEM micrographs of cationic lipid/siRNA complexes. (A and B) Concentric "onion-like" structure of representative BGTC/siRNA complexes at high magnification. Box in B outlines the regular arrangement of the siRNA molecules between two lipid bilayers. (C) Structure of DOST/siRNA complexes at high magnification. Note the regular arrangement of the RNA molecules at the edge (black arrow). (D and E) Structure of two DOSK/siRNA complexes at high magnification. (F and G) Structure of two DOSP/siRNA complexes at high magnification. (H and I) Structure of two DOSN/siRNA complexes at high magnification. (Scale bar: 50 nm.)

BGTC/siRNA complexes was there an obvious lag before the fluorescence intensity decreased. On the other hand, the slope of the decrease of the fluorescence intensity was steeper with DOSN and DOSP than with that observed with DOSK and DOST siRNA complexes. Thus, DOSN and DOSP liposomes appear to strongly complex siRNA molecules, thereby leading to rapid and total exclusion of ethidium bromide for charge ratios < 2 .

Structural Features of siRNA Complexes: Cryo-TEM Imaging and SAXS Experiments.

Mixing unilamellar BGTC liposomes 30–70 nm in diameter with siRNA led to the formation of discrete compact and concentric structures with a size in the 200- to 500-nm range (Fig. 3 A and B). These structures were probably made of stacks of alternating lipid bilayers and electron-dense densities corresponding to siRNA molecules. Indeed, the complexes exhibited a periodicity of $\approx 70 \text{ \AA}$, a value consistent with the sum of the thickness of a lipid bilayer and the diameter of the double-stranded siRNA molecules. In addition, for well oriented structures, the micrographs

also visualized fine striations with a 30-Å spacing, which might correspond to a regular arrangement of the siRNA molecules between the two lipid bilayers (box in Fig. 3*B*).

When mixed with siRNA, DOST and DOSK liposomes formed concentric multilamellar (“onion-like”) structures, possibly consisting of a regular packing of lipid bilayers and siRNA molecules, which were strongly similar to those obtained with BGTC liposomes (Fig. 3*C–E*). Indeed, a typical complex (Fig. 3*C*) again exhibited a regular spacing of ≈ 70 Å between two consecutive repeats, the electron-dense layer corresponding probably to the siRNA monolayer. Here again, the siRNA molecules appeared well ordered on the lipid membrane as observed on the edge of the lipoplex (black arrow in the upper-right corner of Fig. 3*C*) with a spacing similar to that observed with BGTC/siRNA complexes (see above).

With DOSP and DOSN liposomes, small complexes with a size of ≈ 60 nm were formed when adding siRNA molecules (Fig. 3*F–I*), and these complexes actually exhibited a peculiar tendency to form clusters by aggregation. Most importantly, unlike the complexes formed by the three previous cationic lipid formulations (BGTC-, DOST-, and DOSK-based liposomes), the complexes obtained with DOSP and DOSN liposomes possessed a much more irregular structure. Indeed, although they were also composed of stacks of alternating lipid bilayers and siRNA molecules with a spacing of ≈ 70 Å, such an arrangement did not extend over a distance long enough to form fully concentric onion-like structures. Consequently, only ordered microdomains characterized by a flat fingerprint-like repetition were observed. This finding may be linked to the size of the DOSP and DOSN liposomes (diameter range, 30–50 nm). Indeed, they generally had a smaller size than those prepared with the three other cationic lipids (data not shown) and thus might not be able to induce the formation of complete onion-like structures. It is also noteworthy here that, when the liposomes prepared from the five different lipid mixtures were exposed to 300 mM NaCl, the small liposomes remained unilamellar, whereas the large ones became bilamellar (data not shown), probably because of an osmotic effect, as described in ref. 19.

SAXS scans of siRNA complexes formed by BGTC or DOSP liposomes revealed a first-order reflection peak at 67.7 and 67.5 Å, respectively (data not shown). Thus, the spacing of ≈ 70 Å observed by cryo-TEM imaging of DOSP and BGTC/siRNA complexes (see above) was similar to that determined by x-ray scattering. Moreover, BGTC/siRNA complexes (but not DOSP/siRNA complexes) exhibited a second-order reflection peak at 33.8 Å, which clearly indicates the presence of a lamellar structure organized over a long distance and is in good agreement with the cryo-TEM micrographs (data not shown and see above). Finally, in control experiments, BGTC/plasmid DNA lipoplexes were also studied by SAXS. A first-order reflection peak at 69.1 Å and a second-order reflection at 34.5 Å were easily detected, a finding consistent with SAXS results reported for BGTC/DNA complexes in ref. 11.

GFP Silencing Activity of the siRNA Complexes Formed by the Various Aminoglycoside Derivatives. As shown in Fig. 4*A*, a general trend indicated that GFP fluorescence levels of d2GFP cells transfected with the various GFP-targeting siRNA complexes decreased progressively as the cationic lipid/siRNA charge ratio increased. However, cationic lipids with aminoglycoside head groups belonging to the 4,6-DDS family, i.e., DOST and DOSK, exhibited divergent behaviors because they led to either a slow (DOSK) or a fast (DOST) decrease in GFP fluorescence when the cationic lipid/siRNA charge ratio increased. In contrast, both lipidic derivatives of the 4,5-DDS class of aminoglycosides, i.e., DOSP and DOSN, led to a similar progressive decrease of GFP expression, a minimal residual GFP fluorescence level of $\approx 10\%$ finally being reached. Importantly, transfections of RNA-induced silencing complex-loaded control (not GFP-targeting) siRNA by using the various cationic lipids under the same conditions allowed normalization of the residual GFP expression for each data point. Identical results

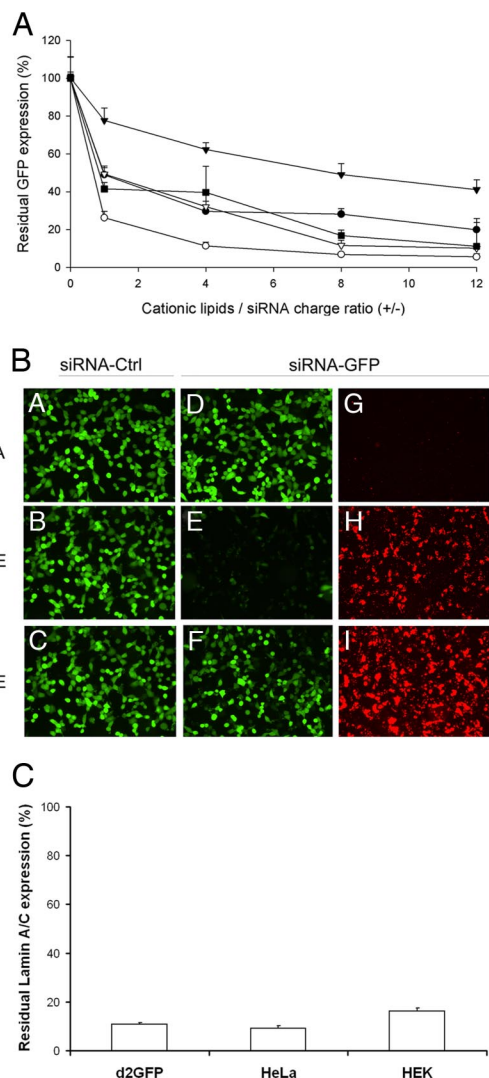


Fig. 4. GFP silencing activity of the siRNA complexes formed by various aminoglycoside derivatives. (A) Residual GFP fluorescence after *in vitro* transfection of d2GFP cells with lipid/siRNA complexes characterized by various $+/-$ charge ratios. GFP-expressing d2GFP cells were transfected with 400 ng of anti-GFP siRNA complexed with liposomes composed of BGTC (●), DOSK (▼), DOSP (○), DOSN (◻). Residual GFP expression was expressed as the ratio (%) of GFP fluorescence in cells transfected with anti-GFP siRNA to GFP fluorescence in cells transfected with control (non-GFP targeting) siRNA. (B) Fluorescence microscopy visualization of GFP silencing and siRNA internalization. The GFP-expressing d2GFP cells were transfected with control siRNA (A–C in panel B) or 3'-rhodamine-labeled anti-GFP siRNA (D–I in panel B). The siRNA molecules (500 ng per well) were formulated in the absence (“naked” siRNA in A, D, and G in panel B) or in the presence of the cationic lipids DOSP (B, E, and H in panel B), or DOSK (C, F, and I in panel B). The transfected d2GFP cells were observed by using a FITC filter to visualize GFP fluorescence (A–F in panel B) or a rhodamine filter to visualize siRNA internalization (G–I in panel B). (C) Real-time quantitative RT-PCR analysis of human lamin A/C mRNA after transfection of various human cell lines (HEK293, HeLa, and d2GFP cells) with DOSP/siRNA lipoplexes [normalization to hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1)]. Values are relative to cells transfected under the same experimental condition with a control siRNA.

were obtained with control siRNA-transfected cells and with untransfected cells that were thus used as reference for normalization. This indicates that transfection of control siRNA did not affect the endogenous GFP fluorescence level compared with nontransfected cells (data not shown), and strongly suggests that the complexes were not cytotoxic for d2GFP cells.

GFP silencing efficiency of DOSP/siRNA complexes was also quantified by flow cytometry (FACS) analysis and by measuring the GFP mRNA level by real-time quantitative RT-PCR in transfected d2GFP cells. FACS results showed that 91.2% of the cells transfected with anti-GFP siRNA complexed with DOSP were undergoing the expected RNAi response (data not shown). This result was in good agreement with that obtained under the same experimental conditions by the lysis method (see above and Fig. 4A). Real-time quantitative RT-PCR analysis indicated that transfected cells had only 4.1% of GFP-mRNA compared with cells transfected with control siRNA or untransfected cells (data not shown).

Accordingly, Fig. 4B shows that delivery of anti-GFP siRNA molecules into d2GFP cells by DOSP/siRNA complexes led to a strong reduction of the number of GFP-positive cells (*E*), which correlated with a high cellular uptake of the siRNA molecules (as visualized in *H* by the red fluorescence due to the rhodamine-labeled anti-GFP siRNA). In contrast, DOSK liposomes also clearly led to efficient siRNA uptake by the cells (*I*), but the GFP fluorescence was only slightly reduced (*F*) compared with cells transfected with control siRNA (*C*). Naked “unreacted” siRNA was used as control of the efficiency of the cationic lipids for siRNA delivery; *A*, *D*, and *G* show that there was suppression of neither GFP expression nor siRNA uptake, a finding confirming the role of the vectors for siRNA delivery.

Next, we performed RNAi experiments with siRNA targeting the endogenous lamin A/C expression. Here, RT-PCR results indicated that d2GFP cells transfected with DOSP/siRNA complexes had very little residual lamin A/C mRNA compared with cells transfected with control siRNA (Fig. 4C), a finding demonstrating that DOSP/siRNA complexes can also allow the efficient knockdown of the expression of an endogenous gene in d2GFP cells. To broaden our conclusions, we also found that DOSP/anti-lamin A/C siRNA complexes were highly efficient for silencing of lamin A/C expression in other human cells lines such as HEK293 cells (human embryonic kidney cells) and HeLa cells (derived from a human epithelioid cervical cancer), a very low level of residual lamin A/C mRNA again being observed (Fig. 4C).

In additional experiments, we studied the kinetics of GFP silencing and compared the silencing efficacy of DOSP liposomes with the effectiveness of commercial reagents (see *SI Text* and *SI Figs. 6 and 7*). These studies basically showed that GFP silencing was maximal for ≈ 5 days and that DOSP liposomes were the most efficient among the reagents tested under our conditions. Finally, direct evaluation of the cytotoxicity of DOSP/siRNA complexes evaluated in the three different cells lines used in the present study by flow cytometry and by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay clearly showed that the viability of the transfected cells was not affected (data not shown).

Discussion

Gene silencing requires a highly efficient method for delivery of the siRNA duplexes into the cytoplasm of cells. Thus, in the present study, we have investigated the relationships between the physicochemical properties and the gene silencing efficiency of siRNA complexes formed by cationic lipids characterized by aminoglycosidic head groups. First, the colloidal stability properties of lipidic aminoglycoside derivatives/siRNA complexes were found to strongly depend on their $+/-$ mean charge ratio, a feature allowing the identification of three different zones (termed A, B, and C) corresponding, respectively, to negative, neutral, and positive complexes. Such a colloidal stability behavior had already been observed with DNA lipoplexes formed when mixing DNA with lipopolyamine micelles (9, 16–18), BGTC (refs. 11 and 19 and this study), and quaternary ammonium cationic liposomes (21, 22). The width of the neutral zone B observed with lipidic aminoglycoside derivative/DNA complexes was in fact similar to the width of lipidic amidinium derivative/DNA complexes. However, the zone B width was clearly smaller for the siRNA complexes formed by our lipidic

aminoglycoside derivatives than for those formed by lipidic amidinium derivatives. In particular, the boundary between the zones A and B was shifted toward a lower charge ratio when siRNA was complexed with 4,5-DDS aminoglycoside derivatives in comparison with 4,6-DDS derivatives and BGTC. It is also noteworthy that, in all three zones, the mean diameter of the aminoglycoside derivative/siRNA complexes was smaller than the mean diameters of lipidic amidinium derivative/siRNA complexes. In zone C, the mean diameters of the siRNA complexes obtained with DOST and DOSK were, respectively, 81 and 105 nm, and they were even smaller for the DOSP- and DOSN-based complexes (58 and 57 nm, respectively).

Cryo-TEM analysis of the siRNA complexes revealed two different types of morphologies: large, concentric lamellar structures and grape-like structures with small lamellar microdomains. Thus, most importantly, complexation with siRNA transformed the initial unilamellar liposomes into lamellar supramolecular bioassemblies consisting of either concentric multilamellar structures or ordered microdomains. A regular spacing of ≈ 67.7 Å, which probably corresponds to alternating lipid bilayers with intercalated siRNA molecules, was measured by SAXS and cryo-TEM in both morphological types of bioassemblies. Moreover, as shown by cryo-TEM, siRNA molecules adopted a regular arrangement with a periodicity of ≈ 30 Å within the monolayer they formed in the concentric multilamellar structures. It is likely that the siRNA molecules are arranged in a similar manner within the grape-like structures, although this was not observed probably because of their very small sizes. The fact that siRNA complexes with different morphologies were formed by the two classes of aminoglycoside derivatives might be explained by specific geometry features, the 4,6-DDS and 4,5-DDS derivatives adopting cylindrical and conical shapes, respectively. These features could impact the formation and size of the initial liposomes and the complexes. It has indeed been shown that a concentric multilamellar organization over a long distance was favored when using large liposomes able to disrupt and reassemble, thereby sandwiching the nucleic acid molecules. On the other hand, small liposomes may behave like spherical micelles and lead to ordered lamellar microdomains, as shown with lipopolyamine micelles in ref. 19.

As stated above, RNAi-mediated gene silencing requires the efficient delivery of siRNA molecules into the cytoplasm of the target cells. Thus, we also investigated the efficiency of our well characterized lipidic aminoglycoside derivative/siRNA complexes for gene down-regulation. Clearly, highly effective complexes for gene silencing were obtained with 4,5-DDS derivative-based zone C siRNA complexes, characterized by their small diameter and high colloidal stability. In general, it is agreed that cationic lipid/nucleic acid complexes are internalized into cells through an endocytosis process mediated by electrostatic interactions between the positively charged lipoplexes and negative residues on the cell membrane (23). Thus, regarding trafficking of the siRNA molecules into and within the cells, aminoglycoside-derived cationic lipid/siRNA complexes may actually improve both siRNA internalization and endosomal escape into the cellular cytosol because of their particular physicochemical properties and structural features. For instance, an increased endosomal escape of the siRNA may be observed as a flip-flop mechanism (24), which could be favored by the flexibility of the aminoglycoside moiety of the cationic lipid. This phenomenon may be enhanced by the existence of lamellar fingerprint-like microdomains in the siRNA complexes formed by 4,5-DDS derivatives (DOSP and DOSN) because such microdomains may have a more destabilizing effect on the endosomal membrane than the complete well ordered onion-like structures obtained with BGTC and the 4,6-DDS derivatives DOSK and DOST. Such a destabilizing process is probably critical for the release of a large amount of siRNA into the cell cytoplasm and its subsequent incorporation into functional RNA-induced silencing complexes.

In conclusion, the present study enabled us to identify a class of cationic lipids composed of synthetic derivatives of natural compounds that are highly efficient for *in vitro* delivery of siRNA. These cationic lipids may thus become a critical constituent of future multimodular siRNA delivery systems for *in vivo* cell targeting after systemic administration, such as sterically stabilized neutral siRNA complexes equipped with targeting ligands at the distal end of polyethyleneglycol (PEG) stretches.

Materials and Methods

siRNA and Preparation of Complexes. Anti-GFP siRNA (sense sequence: GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU) was obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). 3'-Rhodamine-labeled anti-GFP siRNA and negative control siRNA (AllStars Negative Control, sense sequence: UUCUCCGAACGUGUCACGU) were provided by Qiagen (Chatsworth, CA). Human anti-Lamin A/C siRNA was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Lipidic aminoglycoside derivatives and BGTC were synthesized as described in refs. 10, 20, 25, and 26. DC-Chol and DOPE were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Polyethyleneimine (25 kDa) was from Sigma (St. Louis, MO). RNAiFect, X-treme-GENE, and Lipofectamine 2000 were from Qiagen, Roche Diagnostics (Mannheim, Germany), and Invitrogen (Carlsbad, CA), respectively. Lipidic aminoglycoside derivatives/DOPE (1/1, mol/mol) and BGTC/DOPE (2/3, mol/mol) cationic liposomes were prepared as described in ref. 11, with minor changes; for instance, the dispersion was sonicated for 10 min and stored at 4°C. Complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives or BGTC-DOPE were prepared by mixing equal volumes of cationic liposomes in water with siRNA at the desired concentration in 300 mM NaCl.

Dynamic Light Scattering, Ethidium Bromide Exclusion, and Cryo-TEM. Dynamic light scattering, ethidium bromide fluorescence measurements, and cryo-TEM experiments were performed as described in ref. 27.

GFP-Expressing Cells and siRNA Transfection. The H1299-derived GFP-expressing human lung cancer d2GFP cells (a generous gift from A. Chauchereau, Villejuif, France), and the HEK293 and HeLa cells were cultured at 37°C in 5% CO₂/humidified atmosphere, in DMEM with glucose, L-glutamine, and pyruvate, supplemented with 1% streptomycin/penicillin (GIBCO and Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) and 10% FCS (Eurobio, Courtaboeuf, France). At day -1 before transfection, the cells were transferred onto 24-well culture plates, at 65,000 cells per well, resulting in ≈70–80% confluence 24 h later. Transfection was

performed by adding 50 μl of complexes in 500 μl of serum-free DMEM to each well. After 2 h, the transfection medium was replaced by 1 ml of fresh medium. Transfection experiments were performed in triplicate.

GFP Fluorescence Measurements. At 24 h after transfection, the cells were washed twice with 500 μl of PBS and then lysed with Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) supplemented with a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics), complete lysis being ensured by one freezing–thawing (–80°C/20°C) cycle. Samples were then centrifuged at 10,000 × g for 5 min. GFP fluorescence measurements were performed on a 180-μl aliquot of supernatant by using a Victor² apparatus (PerkinElmer, Les Ulis, France). Fluorescence was normalized to the total protein concentration of the sample, determined by using a BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL). Residual GFP expression was expressed as percentage of the fluorescence of the control sample (treated with control siRNA).

Fluorescence Microscopy of Transfected d2GFP Cells. Fluorescence microscopy examination was carried out by using an inverted fluorescence microscope Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Real-Time Quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from transfected cells by TRIzol treatment. Reverse transcription was performed with total RNA by using oligo(dT)₂₀ primers and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The expression of lamin A/C or GFP was quantified by real-time PCR (ABI prism 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA). Experiments were performed by 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^{–ΔΔCt} method (28).

We thank A. Chauchereau (Villejuif, France) for providing d2GFP cells, Solenne Goubain and Clothilde Gourden (In-Cell-Art, Nantes, France) for providing excellent technical expertise in cell culture and analysis of GFP silencing, and P. Méléard (Rennes, France) for helping with the SAXS experiments. This work was supported by an Action Concertée Incitative “Jeunes Chercheurs” grant from the “Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies,” by Grant 018716 from the European Union (Strep; SyntheGeneDelivery), and by special grants from the “Association Française contre les Myopathies” (Evry, France) and “Vaincre La Mucoviscidose” (Paris, France).

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) *Nature* 391:806–811.
2. Mello CC, Conte D (2004) *Nature* 431:338–342.
3. Hannon GJ, Rossi JJ (2004) *Nature* 431:371–378.
4. Dykxhoorn DM, Palliser D, Lieberman J (2006) *Gene Ther* 13:541–552.
5. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) *Nature* 409:645–648.
6. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH (2006) *Cell Cycle* 5:2103–2109.
7. Brazas RM, Hagstrom JE (2005) *Methods Enzymol* 392:112–124.
8. Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6982–6986.
9. Pitard B, Aguerre O, Airiau M, Lachagès AM, Boukhnikachvili T, Byk G, Dubertret C, Herviou C, Scherman D, Mayaux J-F, Crouzet J (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14412–14417.
10. Vigneron J-P, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergely L, Bradley J-C, Basseville M, Lehn P, Lehn J-M (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9682–9686.
11. Pitard B, Oudrhiri N, Vigneron JP, Hauchecorne M, Aguerre O, Toury R, Airiau M, Ramasawmy R, Scherman D, Crouzet J, et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2621–2626.
12. Pitard B (2002) *Somat Cell Mol Genet* 27:5–15.
13. Grünweller A, Hartmann RK (2005) *Curr Med Chem* 12:3143–3161.
14. Moazed D, Noller HF (1987) *Nature* 327:389–394.
15. Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM, Tarry MJ, Carter AP, Ramakrishnan V (2001) *Science* 292:897–902.
16. Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M, Scherman D, Crouzet J, Pitard B (1999) *Nucleic Acids Res* 27:3792–3798.
17. Turek J, Dubertret C, Jaslin G, Antonakis K, Scherman D, Pitard B (2000) *J Gene Med* 2:32–40.
18. Wetzter B, Byk G, Frederic M, Airiau M, Blanche F, Pitard B, Scherman D (2001) *Biochem J* 15:747–756.
19. Pitard B, Oudrhiri N, Lambert O, Vivien E, Masson C, Wetzter B, Hauchecorne M, Scherman D, Rigaud JL, Vigneron JP, et al. (2001) *J Gene Med* 3:478–487.
20. Sainlos M (2004) PhD thesis (Univ Pierre et Marie Curie, Paris).
21. Lasic D, Strey H, Stuart M, Podgornik R, Frederik PM (1997) *J Am Chem Soc* 119:832–833.
22. Radler JO, Koltover I, Salditt T, Safinya CR (1997) *Science* 275:810–814.
23. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) *Physiol Rev* 77:759–803.
24. Xu Y, Szoka FC, Jr (1996) *Biochemistry* 35:5616–5623.
25. Sainlos M, Hauchecorne M, Oudrhiri N, Zertal-Zidani S, Aissaoui A, Vigneron J-P, Lehn J-M, Lehn P (2005) *ChemBioChem* 6:1023–1033.
26. Belmont P, Aissaoui A, Hauchecorne M, Oudrhiri N, Petit L, Vigneron JP, Lehn J-M, Lehn P (2002) *J Gene Med* 4:517–526.
27. Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, Richard R, Desigaux L, Fernandes S, Lanctin C, Pollard H, Zeghal M, Rescan PY, Escande D (2004) *Nucleic Acids Res* 32:e159.
28. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) *Methods* 25:402–408.

1

2 Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis

3 Romain Labas · Fanny Beilvert · Benoit Barteau ·
4 Stéphanie David · Raphaël Chèvre · Bruno Pitard

5 Received: 20 February 2009 / Accepted: 25 August 2009
6 © Springer Science+Business Media B.V. 2009

7 **Abstract** Synthetic gene delivery systems represent an
8 attractive alternative to viral vectors for DNA transfection.
9 Cationic lipids are one of the most widely used non-viral
10 vectors for the delivery of DNA into cultured cells and are
11 easily synthesized, leading to a large variety of well-
12 characterized molecules. This review discusses strategies
13 for the design of efficient cationic lipids that overcome the
14 critical barriers of in vitro transfection. A particular focus
15 is placed on natural hydrophilic headgroups and lipophilic
16 tails that have been used to synthesize biocompatible and
17 non-toxic cationic lipids. We also present chemical fea-
18 tures that have been investigated to enhance the transfec-
19 tion efficiency of cationic lipids by promoting the escape of
20 lipoplexes from the endosomal compartment and DNA
21 release from DNA-liposome complexes. Transfection effi-
22 ciency studies using these strategies are likely to improve
23 the understanding of the mechanism of cationic lipid-
24 mediated gene delivery and to help the rational design of
25 novel cationic lipids.

26
27 **Keywords** Cationic lipid · Design · Gene delivery ·
28 Liposome · Natural compound · Nonviral vector ·
29 Transfection

A1 R. Labas · F. Beilvert · S. David · R. Chèvre · B. Pitard (✉)
A2 INSERM, U915, 1 Rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France
A3 e-mail: bruno.pitard@univ-nantes.fr

A4 R. Labas · F. Beilvert · S. David · R. Chèvre · B. Pitard
A5 Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax,
A6 44000 Nantes, France

A7 B. Barteau · B. Pitard
A8 IN-CELL-ART, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France

Abbreviations		30
BCAT	<i>O</i> -(2 <i>R</i> -1,2-di- <i>O</i> -(1' <i>Z</i> ,9' <i>Z</i> -octadecadienyl)-glycerol)-3- <i>N</i> -(bis-2-aminoethyl)-carbamate	31
BGSC	Bis-guanidinium-spermidine-cholesterol	32
BGTC	Bis-guanidinium-tren-cholesterol	33
CDAN	<i>N</i> '-cholesteryloxycarbonyl-3,7-diazanonane-1,9-diamine	34
CHDTAEA	Cholesteryl hemidithiodiglycolyl tris(aminoethyl)amine	35
DCAT	<i>O</i> -(1,2-di- <i>O</i> -(9' <i>Z</i> -octadecenyl)-glycerol)-3- <i>N</i> -(bis-2-aminoethyl)-carbamate	36
DC-Chol	3β-[<i>N</i> -(<i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethylaminoethyl) carbamoyl]cholesterol	37
DLKD	<i>O</i> , <i>O</i> '-Dilauryl <i>N</i> -lysylaspartate	38
DMKD	<i>O</i> , <i>O</i> '-Dimyristyl <i>N</i> -lysylaspartate	39
DOG	Dioleylglycerol	40
DOGS	Diocetadecylamidoglycylspermine (Transfectam®)	41
DOGSDSO	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-succinyl-2-hydroxyethyl disulfide ornithine	42
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	43
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	44
DOSN	Dioleyl succinyl ethylthioneomycin	45
DOSP	Dioleyl succinyl paromomycin	46
DOST	Dioleyl succinyl tobramycin	47
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonio propane	48
DOTMA	<i>N</i> '-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium chloride	49
DPPES	Di-palmitoyl phosphatidylethanolamidosperrmine	50

51	DS(9-yne)PE	Di(octadec-9-ynoyl)phosphatidyl ethanolamine
52	EDOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -3-ethylphosphocholine
53	FRET	Fluorescence resonance energy transfer
54	KanaCapChol	Cholesteryl caproyl kanamycin
55	KanaChol	3 β -[6'-kanamycin-carbamoyl] cholesterol
56	KanaSucDODA	Diocetadecyl succinyl kanamycin
57	KanaSucDOLA	Dioleoyl succinyl kanamycin
58	TGKC	3 β -[6'-(1,3,3''-Triguanidino) kanamycin-carbamoyl] cholesterol
59	TGKSucDODA	Triguanidinium dioctadecyl succinyl kanamycin

60
61

62 Introduction

63 Gene transfer involves the delivery of nucleic acids to
64 targeted cells and their subsequent expression. The intro-
65 duction of DNA sequences that correspond to a functional
66 gene, or interfere with the functioning of a cellular gene, is
67 being actively investigated for the treatment of both
68 inherited and acquired diseases (Mulligan 1993; Anderson
69 1998). As naked DNA alone does not promote high levels
70 of gene expression, the success of such a strategy requires
71 the use of efficient gene delivery vectors. Ideally, DNA
72 delivery systems should (1) be safe, nontoxic, nonimmu-
73 nogenic and well tolerated, (2) contain and protect nucleic
74 acids in small particles, (3) interact with the cellular
75 membrane and penetrate the target cell, (4) enable the
76 intracellular trafficking of DNA to reach the nucleus and
77 (5) permit biological activity by transgene expression.

78 Viral vectors, although very efficient, have several
79 limitations including immunogenicity, toxicity and safety
80 issues, in addition to large-scale production and quality-
81 control costs. Thus, the development of non-viral alterna-
82 tives has focused extensive research that has led to the
83 emergence of two main synthetic vector categories: cationic
84 polymers and cationic lipids. The self-assembled,
85 nanometric complexes resulting from the electrostatic
86 interactions between the negative phosphate groups of
87 DNA and the positive charges of cationic lipids and cationic
88 polymers are called lipoplexes and polyplexes,
89 respectively (Felgner et al. 1997). Cationic lipids are
90 amphiphilic molecules composed of a hydrophobic moiety
91 (i.e. cholesterol, saturated or unsaturated alkyl chains)
92 covalently linked via a spacer to a cationic headgroup.
93 Polar hydrophilic headgroups include quaternary ammo-
94 nium salts, primary, secondary and tertiary amine groups,
95 amidinium salts and miscellaneous cationic headgroups.
96 The linkers that connect hydrophobic and hydrophilic
97 moieties are commonly composed of ether, ester, amide,

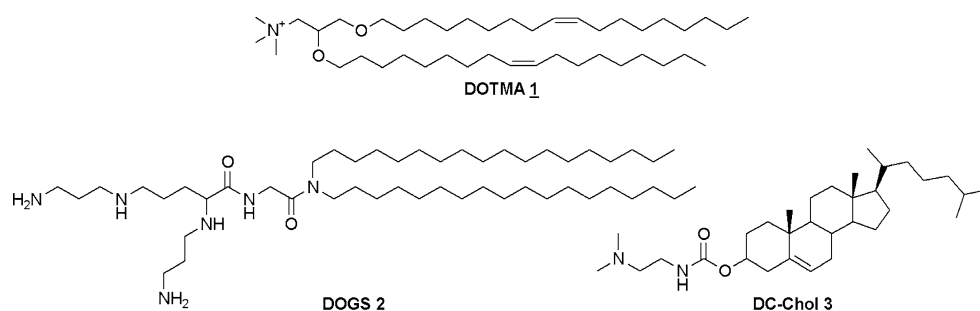
carbamate and other labile bonds. Cationic lipids can be
synthesized easily, using versatile chemical strategies that
allow the modification of each constituent moiety, to pro-
duce a large variety of extensively characterized mole-
cules. Thus, the structure–activity relationships of
numerous series of cationic lipids have been investigated to
elucidate the chemical requirements for efficient gene
transfer (Wiethoff and Middaugh 2003; Niculescu-Duvaz
et al. 2003). The polar hydrophilic headgroups enable the
condensation of nucleic acids by electrostatic interactions
with the negatively charged phosphate groups of the DNA,
whereas the hydrophobic moieties help to maintain the
self-aggregating lipid organization, such as the bilayer
membrane, by co-operative intermolecular binding. The
resulting lipoplexes present a heterogeneous size and
supramolecular structure, depending on their composition.
The physicochemical properties, on the macroscopic and
the microscopic length scale, of supramolecular assemblies
formed by lipoplexes are important parameters that govern
transfection efficiency (Pitard 2002; Barteau et al. 2008).
On the macroscopic length scale, DNA complexation and
the size of lipoplexes are two essential physicochemical
properties for efficient gene transfection. On the micro-
scopic length scale, electron microscopy techniques allow
the precise elucidation of the structural characteristics of
the condensed structures of lipoplexes formed with various
cationic lipids. Imaging of lipoplex structures by cryo-
transmission electron microscopy (TEM) and small-angle
X-ray scattering (SAXS) revealed that most of these cationic
lipid/DNA complexes were organized as lamellar
structures with DNA entrapped between the lamellae of
aggregated multilamellar structures of cationic lipids.

Although the mechanism underlying cationic lipid-
mediated transfection is not yet clearly established,
understanding of the lipoplex characteristics involved in
in vitro gene delivery has increased. In this review, we will
focus on cationic lipids that have been used for in vitro
gene transfection, with the particular aim to give a general
overview of natural compounds that have been used as
polar headgroups or hydrophobic domains for the design of
cationic lipids. We will also discuss chemical features that
have been evaluated to enhance the transfection efficiency
of cationic lipids.

Natural lipid from plasma membrane

Since the breakthrough in lipid-mediated transfection that
occurred with the development of the monocationic lipid
N'-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium
chloride (DOTMA) **1** (Felgner et al. 1987), the multivalent
cationic lipid dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS) **2**
(Behr et al. 1989) and the cationic cholesterol derivative

Fig. 1 Structure of cationic lipids DOTMA, DOGS and DC-Chol



148 3 β -[N,N',N'-dimethylaminoethyl carbamoyl] cholesterol
 149 (DC-Chol) **3** (Gao and Huang 1991), which were reported
 150 to deliver DNA efficiently into cells (Fig. 1), a large
 151 number of new synthetic cationic lipids have been char-
 152 acterized for their transfection efficiencies in a wide range
 153 of cell lines. Because toxicity and biocompatibility are
 154 considered to be critical factors that govern transfection
 155 efficiency, the use of natural compounds known for their
 156 safety has been actively investigated for the design of new
 157 biocompatible and non-toxic cationic lipids for DNA
 158 delivery. Table 1 summarizes the various approaches
 159 which have been followed to overcome some of the gene
 160 transfer barriers by using natural compounds. For the
 161 hydrophobic moieties of cationic lipids several natural
 162 lipids have been used including phospholipids, cholesterol
 163 and bipolar lipids from archeobacteria.

164 Cationic lipids derived from natural phospholipids

165 Phospholipids constitute major components of biological
 166 membranes and are widely used in lipoplex formulations.
 167 These natural lipids have also been converted into cationic
 168 derivatives, either by chemical modification or the syn-
 169 thesis of phospholipid analogues. For instance, the poly-
 170 cationic di-palmitoyl phosphatidylethanolamidospemine
 171 (DPPEs) **4** (Behr et al. 1989) with a spermine polar
 172 headgroup and the quaternary ammonium 1,2-dioleoyl-*sn*-
 173 3-ethylphosphocholine (EDOPC) **5** (Rosenzweig et al.
 174 2000) are two representative cationic lipids that were
 175 inspired by natural phospholipids (Fig. 2). The synthesis of
 176 analogues with chemical similarity to cell membrane
 177 phospholipids, namely phosphonate and phosphoramidate
 178 derivatives characterized by the absence of the glycerol
 179 moiety and alkyl chains directly bonded to the phosphorus
 180 atom, has also been described (representative examples
 181 **6** and **7**, Fig. 2). Several structural modifications were
 182 performed including variations of the hydrophobic chain
 183 length (Le Bolc'h et al. 1995; Floch et al. 1998),
 184 the structure of the linker and of the polar head group
 185 (Lamarche et al. 2007; Mevel et al. 2007). An interest-
 186 ing structural modification was the substitution of the
 187 trimethylammonium polar head group by either a

188 trimethylphosphonium or a trimethylarsonium, to decrease
 189 the toxicity of the cationic lipids (Floch et al. 2000; Guenin
 190 et al. 2000; Picquet et al. 2005). The rationale for this was
 191 based on a previous study that had used a similar strategy
 192 (Stekar et al. 1995) and on the fact that trimethylarsonium
 193 groups have been found in natural phospholipids (arse-
 194 nocholine) from marine organisms (Junk et al. 1990). Thus,
 195 the replacement of a trimethylammonium polar head group
 196 by either a trimethylphosphonium or a trimethylarsonium
 197 effectively led to the development of cationic phospholipid
 198 analogues that were less toxic and showed higher trans-
 199 fection efficiencies up to 20-fold higher than their trime-
 200 thylammonium counterparts (Montier et al. 2003).

Cationic lipids derived from cholesterol

201
 202 Cholesterol is a natural compound that provides rigidity of
 203 cellular membranes and better stability of lipoplexes.
 204 Several cationic cholesterol derivatives have been synthe-
 205 sized, mainly using the hydroxyl group in position 3 to
 206 anchor the linker and the polar headgroup. Most of these
 207 cationic lipids are amine-containing compounds, with
 208 DNA interactions dependent on the protonation of ammo-
 209 nium groups. For instance, DC-Chol **3** (Fig. 1) is one of the
 210 members of the monovalent cholesterol derivatives family
 211 (Gao and Huang 1991) and cholesteryl spermidine **8**
 212 (Moradpour et al. 1996) and the polyamine lipid GL67 **9**
 213 (Lee et al. 1996) are multivalent cholesterol vectors for
 214 gene transfer (Fig. 2). In this category of lipids GL67 have
 215 been used to express Cystic fibrosis transmembrane con-
 216 ductance regulator in human clinical trials.

Cationic lipids derived from archaeal lipids

217
 218 Archaea are a group of prokaryote microorganisms that
 219 were first detected in harsh environments like volcanic hot
 220 springs, but are now known to be widely distributed in
 221 nature (DeLong 1998). Their biochemistry is notably dif-
 222 ferent from that of other life-forms (De Rosa et al. 1986)
 223 and archaeal membrane lipids have unique structure char-
 224 acteristics such as ether linkages and saturated isopranyl
 225 units (Koga and Morii 2007). The ether linkages provide a

Table 1 Summary of the various approaches which have been followed to overcome some of the gene transfer barriers by using natural compounds

Gene transfer barriers	Strategy	References	
Particle formation and cellular internalization	Phospholipids	Behr et al. (1989)	
		Rosenzweig et al. (2000)	
		Mevel et al. (2007)	
	Cholesterol derivatives	Gao and Huang (1991)	
		Moradpour et al. (1996)	
		Lee et al. (1996)	
	Archaeal lipids	Benvegna et al. (2005)	
DNA complexation	Polyamines	Behr et al. (1989)	
		Pitard et al. (1997)	
		Turek et al. (2000)	
	Amino acids derivatives	Byk et al. (1998)	
		Heyes et al. (2002)	
		Kumar et al. (2003)	
		Kim et al. (2004)	
			Obata et al. (2008)
	Guanidinium functions	Vigneron et al. (1996)	
		Pitard et al. (2001)	
Aminoglycoside derivatives	Belmont et al. (2002)		
	Sainlos et al. (2003)		
	Desigaux et al. (2007)		
Endosomal escape	Fusogenic lipids	Boussif et al. (2001)	
		Gaucheron et al. (2001)	
		Fletcher et al. (2006)	
Cytoplasm delivery	Disulfide reduction	Tang and Hughes (1998, 1999)	
		Byk et al. (2000)	
		Wetzer et al. (2001)	
		Kumar and Chaudhuri (2004)	
		Bajaj et al. (2008)	
		Zhu et al. (2000)	
Endosomal escape and cytoplasm delivery	Ortho ester functions	By and Nantz (2004)	
		Chen et al. (2007)	
		Boomer and Thompson (1999)	
	Vinyl ether functions	Boomer et al. (2002)	
		Aissaoui et al. (2004)	
	Acylhydrazone functions		

226 high chemical and enzymatic stability and the branching
 227 methyl groups improve membrane fluidity. Moreover,
 228 bipolar archaeal lipids span the membrane from one side to
 229 the other constituting a single-layer membrane with a
 230 higher degree of physical rigidity than bilayer membranes.
 231 These features have been applied to design archaeal bipolar
 232 lipid analogues for lipoplex mediated gene delivery

(Benvegna et al. 2005; Brard et al. 2007). The dicationic
 glycine betaine-based tetraether GRcat **10** (Fig. 3) in
 combination with 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoetha-
 nolamine (DOPE), showed half of Lipofectamine trans-
 fection efficiency, while lipoplex formulations of MM18
11 (Gilot et al. 2002) and the neutral archaeal derivative
 GR **12** led to in vitro transfection efficiency similar to
 Lipofectamine (Rethore et al. 2007). These results dem-
 onstrated that archaeal bipolar lipids can promote DNA
 delivery, either as helper lipids or as cationic vectors, and
 constitute a promising class of bio-inspired gene delivery
 systems (Montier et al. 2008).

Natural polar hydrophilic headgroups

The structural features of positively charged headgroups
 that interact with negatively charged phosphates of nucleic
 acids strongly impact on the transfection efficiency of
 cationic lipids. Therefore, the use of natural compounds
 including polyamine, amino acids and aminoglycoside as
 polar headgroups in cationic lipids has been studied to
 promote DNA interaction and biocompatibility.

Cationic lipids derived from natural polyamines

Spermine is a natural polyamine found in eukaryotic cells.
 This molecule exists in a polycationic form at physiologi-
 cal pH and is likely to associate with nucleic acids. The
 lipid DOGS **2** (Fig. 1) was the first-reported spermine
 derivative that led to efficient DNA delivery into cells
 (Behr et al. 1989). A structure–activity relationship study
 of geometrically differing polyamines as cationic head-
 groups (Fig. 4) revealed that the linear spermine derivative
 RPR120535 **13** displayed up to 18-fold higher transfection
 efficiency in HeLa cells compared with the T-shaped
 RPR126096 **14** or the globular and branched spermine
 analogues **15** and **16** (Pitard et al. 1997; Byk et al. 1998;
 Turek et al. 2000). This cationic lipid **13** was also found to
 possess a transfection efficiency similar to the commer-
 cially available Transfectam® (DOGS **2**) and Lipofect-
 amine™ in four different cell lines (NIH3T3, 3LL mouse
 Lewis lung carcinoma, Caco-2 human colon carcinoma and
 primary rabbit smooth muscle cells). The interesting
 properties of this linear shaped spermine derivative **13**
 might result from a high steric flexibility of the polyamine
 linked to the lipid by one of its extremities, allowing a
 constructive interaction with DNA.

Amino acid-based cationic lipids

Amino acids have been described either as linkers or
 headgroups for the design of cationic lipids for DNA

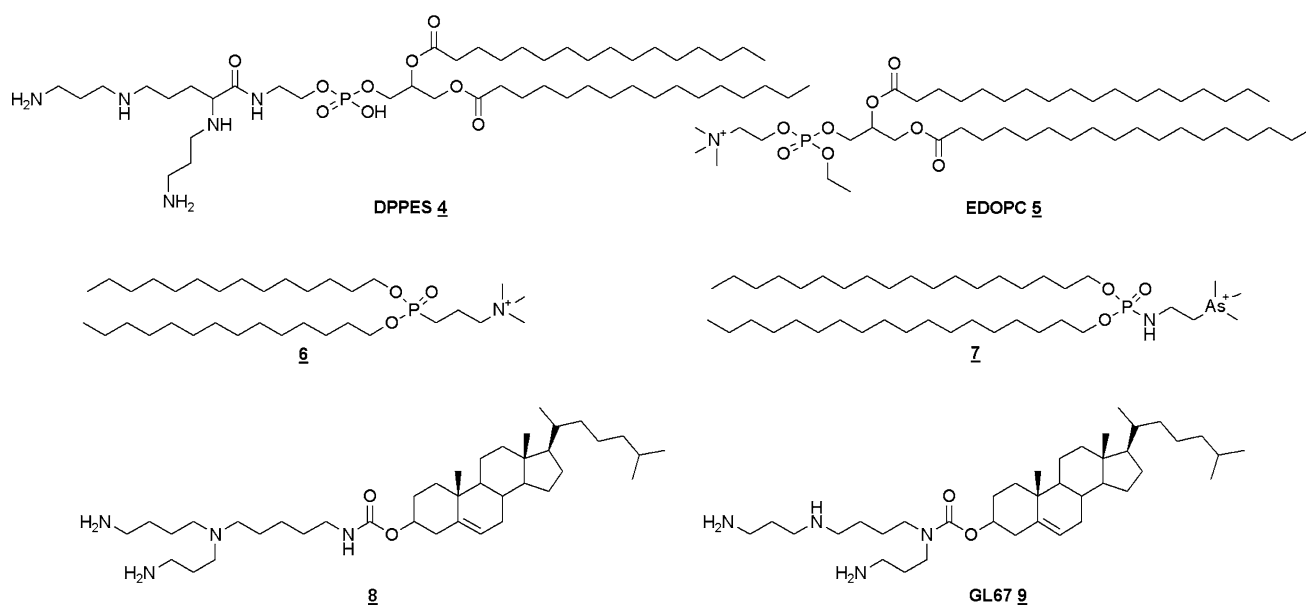
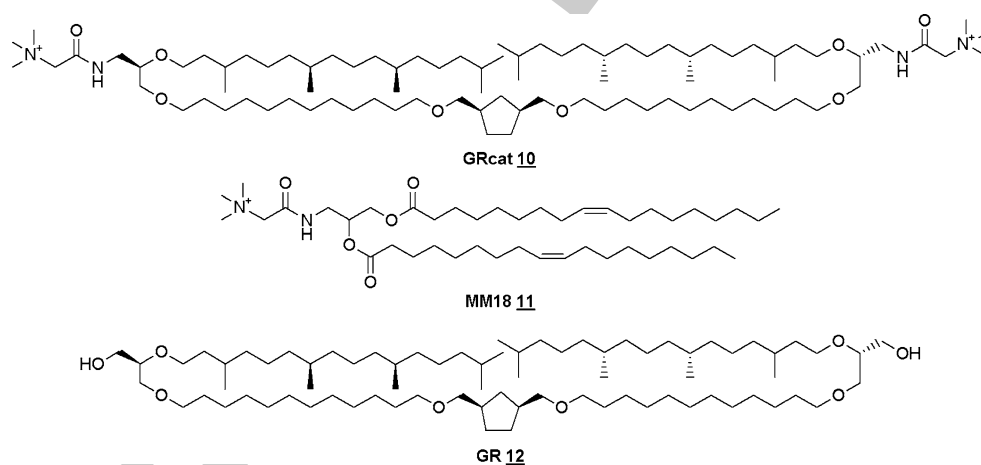


Fig. 2 Structure of cationic phospholipids and cholesterol derivatives

Fig. 3 Structure of archaeal lipid analogues and MM18



279 delivery. For instance, the spermine headgroup in **13** is
 280 linked to the dialkyl hydrophobic chain via a glycine
 281 (Fig. 4). The replacement of this neutral amino acid by a
 282 positively charged arginine or lysine (cationic lipids **17** and
 283 **18**, Fig. 5) increased the net positive charge of the vector
 284 and resulted in slightly decreased transfection efficiency. In
 285 contrast, the introduction of glutamic acid reduced the
 286 overall cationic charge available for DNA binding, without
 287 a loss in transfection activity (Byk et al. 1998). These
 288 results underlined the fact that increasing the net charge of
 289 the cationic headgroup is not necessarily beneficial for
 290 DNA delivery.

291 The introduction of a single histidine residue as a polar
 292 headgroup in cationic amphiphiles has been reported to
 293 confer endosome-disrupting characteristics that enhance
 294 gene transfer (Kumar et al. 2003). Indeed, the membrane
 295 fusion activity of the histidylated cationic lipid **20** (Fig. 5),

296 as measured by fluorescence resonance energy transfer
 297 (FRET) experiments, was induced at pH 5.0 or 6.0,
 298 supporting the endosome-fusion property of the histidine-
 299 containing lipid **20** in the acidic environment of endo-
 300 somes. The transfection efficiency of DNA complexed with
 301 lipid **20** lipoplexes compared with FuGENETM6 and DC-
 302 Chol **3** lipoplexes was similar in A549, 293T3 and HeLa
 303 cell lines and up to 100-fold higher in HepG2 cells (Kumar
 304 et al. 2003).

305 Novel amino acid-based cationic lipids incorporating
 306 lysine, histidine or arginine as the polar headgroup have
 307 been synthesized and tested for their transfection efficien-
 308 cies (Heyes et al. 2002; Kim et al. 2004; Obata et al. 2008).
 309 The diether lipids **21** and **22**, with C₁₂ alkyl chains and a
 310 lysine or an arginine headgroup (Fig. 5), were found to
 311 promote gene transfection up to tenfold higher than
 312 DC-Chol **3**/DOPE lipoplexes. The formulations containing

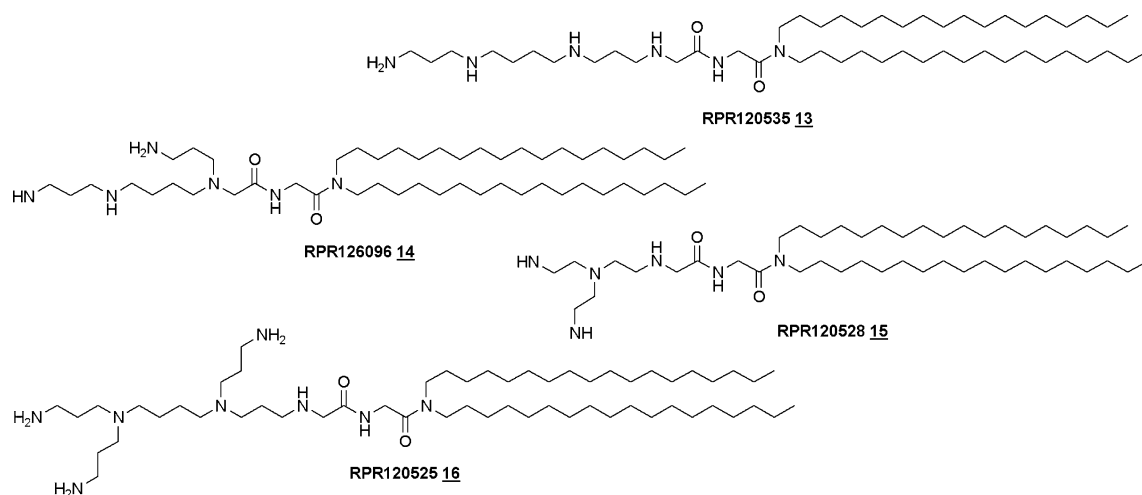


Fig. 4 Geometrically differing polyamines

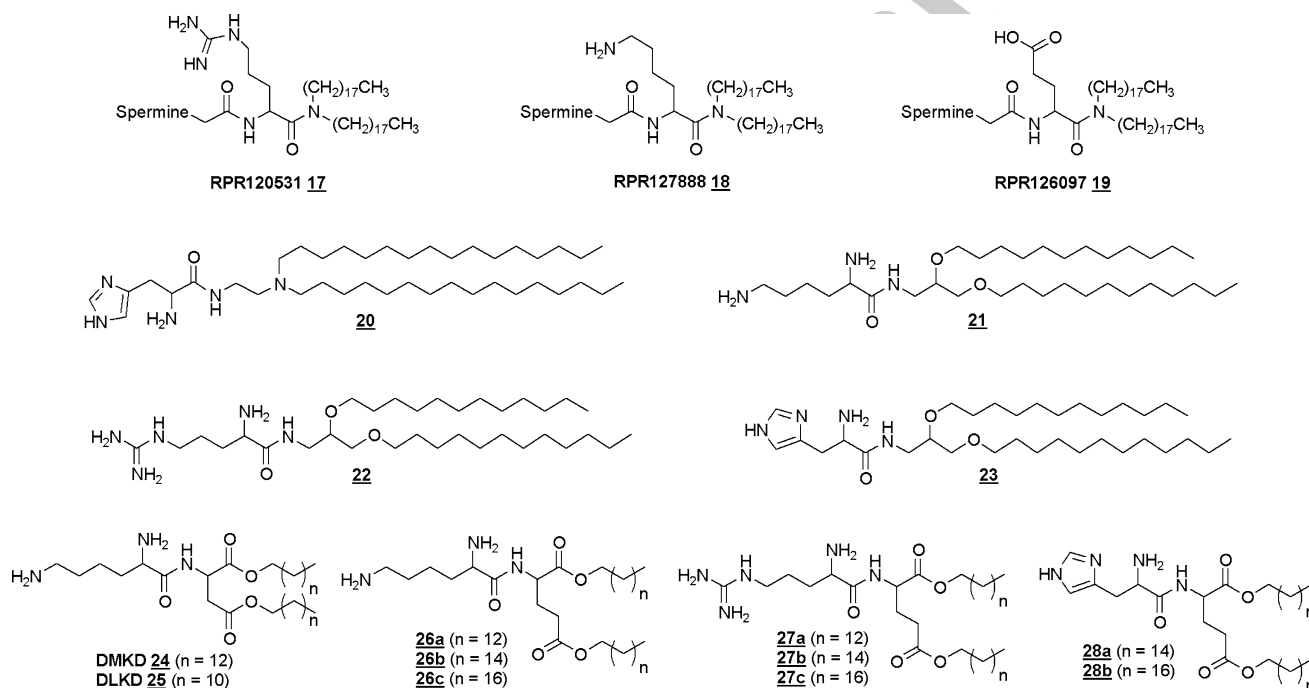


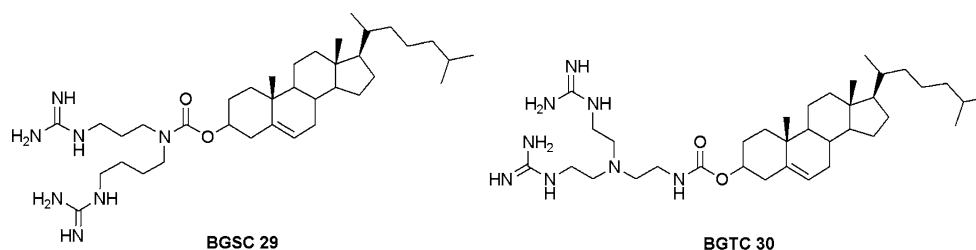
Fig. 5 Amino acid based cationic lipids

313 the histidinylated diether lipid **23** achieved a threefold
314 increase in transfection efficiency compared with the control
315 (Heyes et al. 2002). The lysine-containing cationic
316 lipids *O,O'*-dimyristyl *N*-lysylaspartate (DMKD) **24** and
317 *O,O'*-dilauryl *N*-lysylaspartate (DLKD) **25** with, respec-
318 tively, C₁₄ and C₁₂ alkyl chains, were reported to be more
319 efficient in transfecting 293 and B16BL6 cell lines than
320 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonio propane (DOTAP), con-
321 trary to the C₁₆ and C₁₈ derivatives (Kim et al. 2004).
322 Moreover, the lysine- and arginine-type lipids **26a–c** and
323 **27a–c**, having a glutamate backbone, exhibited higher gene
324 expression efficiencies than Lipofectamine2000TM, and

325 this effect tended to increase with shorter alkyl chains.
326 Lipoplexes containing the histidinylated lipids **28a–b** pro-
327 duced no detectable levels of gene expression (Obata et al.
328 2008).

329 Taken together, these observations suggest that the
330 transfection efficiency obtained with cationic lipids con-
331 taining amino acid-based headgroups is higher using lysine
332 and arginine than with histidine, despite the endosome-
333 disrupting characteristics of histidine. A putative explana-
334 tion may be inferred from the physicochemical properties
335 of the lipoplexes; indeed lysine and arginine derivatives **26**
336 and **27** formed unilamellar vesicles, whereas the histidine-

Fig. 6 Structure of bis-guanidinium-cholesterol derivatives BGSC **29** and BGTC **30**



337 type lipid **28** formed a tube-like structure (Obata et al.
338 [2008](#)). In addition, gene expression seems to be enhanced
339 by decreasing the length of the hydrophobic chain, irre-
340 spective of the linker backbone.

341 The strength of the electrostatic interactions between
342 nucleic acids and cationic lipids that lead to DNA compac-
343 tion mostly depends on the protonation state of ammonium
344 groups and, consequently, relies on pH. The highly basic
345 guanidinium function found in arginine amino acid residues
346 remains protonated over a wide range of pHs, leading to
347 DNA binding that is less sensitive to pH variations. Its
348 binding to the DNA phosphate anions proceeds through a
349 structural organization involving characteristic pairs of
350 parallel hydrogen bonds (Cotton et al. [1973](#)); the guanidi-
351 nium group can also interact with nucleic acids via hydrogen
352 bonds and plays a key role in DNA-binding proteins. These
353 favorable features of the guanidinium function underlie its
354 use as a headgroup in the development of a novel class of
355 cationic cholesterol derivatives for DNA delivery. Bis-gua-
356 nidinium-spermidine-cholesterol (BGSC) **29** and bis-gua-
357 nidinium-tren-cholesterol (BGTC) **30** (Fig. [6](#)) were the first
358 two guanidinium-containing cationic lipids to be reported
359 and tested for transfection (Vigneron et al. [1996](#)). Both
360 BGTC **30** and BGSC **29** showed higher transfection effi-
361 ciencies than LipofectinTM (DOTMA/DOPE, 1/1,w/w) in
362 several mammalian cell lines when formulated as liposomes
363 with DOPE. Moreover, BGTC **30** used alone as a micellar
364 solution was found to promote efficient *in vitro* transfection,
365 but to a lesser extent than its liposome formulation (Vigneron
366 et al. [1996](#); Oudrhiri et al. [1997](#); Pitard et al. [1999](#), [2001](#)).
367 These results highlight the point that cationic lipids charac-
368 terized by headgroups composed of guanidinium functions
369 represent an attractive option for gene delivery.

370 Aminoglycoside-derived cationic lipids

371 Aminoglycoside antibiotics constitute a large family of
372 natural polycationic compounds that are widely used for the
373 treatment of gram-negative infections (Umezawa and
374 Hooper [1982](#)). Most of aminoglycosides are naturally syn-
375 thesized by Actinobacteria (e.g., streptomycetes) and they
376 exhibit their antibacterial activity by selective binding to the
377 ribosomal RNA of bacteria, which disrupts protein bio-
378 synthesis (Mingeot-Leclercq et al. [1999](#)). Aminoglycosides

are known to interact with A-form nucleic acids, especially
the major groove of double-stranded RNA (Moazed and
Noller [1987](#); Ogle et al. [2001](#)), and their interactions with
DNA have been reported to be weaker but sufficient to
protect against nuclease activity. Structurally, aminogly-
cosides usually comprise a 2-deoxy-streptamine moiety that
is monosubstituted (e.g., neamine), 4,5-disubstituted (e.g.,
neomycin) or 4,6 disubstituted (e.g., kanamycin) with
amino sugars via a glycosidic linkage, and they carry up to
six amino groups, which are mostly protonated at physio-
logical pH (Dorman et al. [1976](#); Botto and Coxon [1983](#);
Szilagy et al. [1993](#)). Thus, aminoglycosides provide a
versatile polycationic framework that has been used for the
design of novel cationic lipids for DNA delivery.

A series of kanamycin A-derived cationic lipids con-
taining various spacers and lipophilic moieties has been
synthesized (Sainlos et al. [2003](#)) and their transfection
efficiencies have been investigated (Belmont et al. [2002](#);
Sainlos et al. [2005](#)). The cholesterol-containing cationic
lipid β -[6'-kanamycin-carbamoyl] cholesterol (KanaChol)
31 (Fig. [7](#)) mediated efficient *in vitro* gene delivery in
several mammalian cell lines, when formulated alone as
micelles. The addition of DOPE into the cationic lipid
formulation led to a higher transfection efficiency and
decreased cytotoxicity (Belmont et al. [2002](#)). The intro-
duction of a spacer arm between kanamycin and chole-
sterol resulted in an increase in the mean molecular area and
more-fluid lipidic layers that globally improved transfec-
tion efficiency; indeed cholesteryl caproyl kanamycin
(KanaCapChol) **32** showed up to tenfold increased trans-
fection activity compared with KanaChol **31** in HeLa,
HEK293 and 3T3 cells (Sainlos et al. [2005](#)). Kanamycin A-
based cationic lipids with aliphatic hydrophobic moieties
have also been synthesized and evaluated for DNA deliv-
ery in HeLa and 16HBE cells. Dioleoyl succinyl kanamycin
(KanaSucDOLA) **33** with unsaturated oleyl chains showed
a higher transfection efficiency than dioctadecyl succinyl
kanamycin (KanaSucDODA) **34** with saturated aliphatic
chains, whether formulated with or without DOPE. A
putative explanation arises from the enhancement of the
layer fluidity induced by unsaturation that may give fusio-
genic activity to KanaSucDOLA **33** (Sainlos et al. [2005](#)).
The guanidinylated aminoglycosides β -[6'-(1,3,3'-trigua-
nidino)kanamycin-carbamoyl] cholesterol (TGKC) **35** and

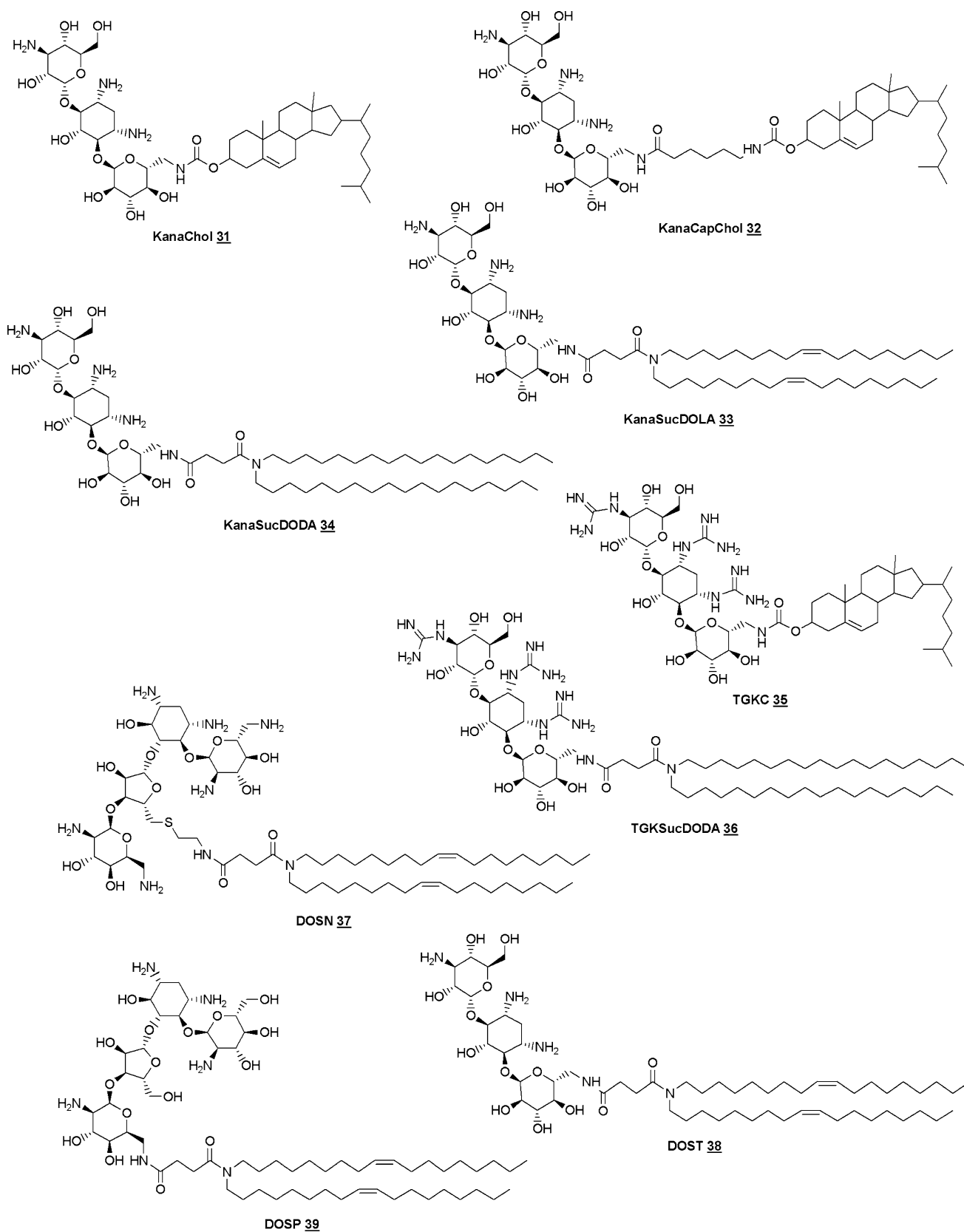


Fig. 7 Structure of aminoglycoside-based cationic lipids

423 triguanidinium dioctadecyl succinyl kanamycin (TGK-
424 SucDODA) **36** were less efficient for gene delivery than
425 their respective amino counterparts KanaChol **31** and
426 KanaSucDODA **34**. This lower transfection activity may
427 originate from a decreased endosomal escape of lipoplexes,
428 caused by a lower buffering capacity of fully guanidiny-
429 lated aminoglycosides (Belmont et al. 2002; Sainlos et al.
430 2005). It is noteworthy that aliphatic chain derivatives
431 appeared to be more efficient than KanaChol **31**, irre-
432 spective of the formulation and the nature of the functional
433 groups present in the aminoglycoside-based headgroup.

434 Aminoglycoside-based cationic aliphatic lipids for DNA
435 transfer were also reported to promote efficient siRNA
436 delivery and specific RNA interference into cells (Desig-
437 aux et al. 2007). Liposomes of such lipidic aminoglycoside
438 derivatives, mixed with siRNA, exhibited various mor-
439 phologies depending of the type of aminoglycoside.
440 KanaSucDOLA **33** and dioleoyl succinyl tobramycin
441 (DOST) **38** (Fig. 7) are characterized by a 4,6-disubstituted
442 2-deoxystreptamine (4,6-DDS) ring and formed concentric
443 multilamellar (“onion-like”) structures consisting of a
444 regular packing of lipid bilayers and siRNA molecules,
445 very similar to those obtained with BGTC **30** liposomes.
446 On the contrary, dioleoyl succinyl ethylthioneomycin
447 (DOSN) **37** and dioleoyl succinyl paromomycin (DOSP) **39**
448 containing a 4,5-disubstituted 2-deoxystreptamine (4,5-
449 DDS) ring formed smaller lipoplexes of a much more
450 irregular structure, composed of stacks of alternating lipid
451 bilayers and siRNA with ordered microdomains, charac-
452 terized by flat, fingerprint-like repetitions. The most active
453 cationic lipid/siRNA complexes for gene silencing were
454 obtained with 4,5-DDS aminoglycoside derivatives. In
455 engineered cells expressing GFP, DOSN **37** and DOSP **39**,
456 formulated as liposomes and complexed with GFP-target-
457 ing siRNA, effected a minimal residual GFP expression of
458 less than 10% compared with control siRNA-transfected
459 cells and untransfected cells. Identical results were
460 obtained in RNA interference experiments of an endoge-
461 nous gene in various human cell lines (d2GFP, HeLa and
462 HEK293 cells) with complexes of DOSP **39** and siRNA
463 targeting the endogenous lamin A/C expression. In trans-
464 fected cells, only very low amounts of lamin A/C mRNA
465 were detected by real-time quantitative RT-PCR, as com-
466 pared with the amount detected in cells transfected with
467 control siRNA (Desigaux et al. 2007). The evaluation of
468 the cytotoxicity of aminoglycoside derivatives/siRNA
469 complexes in the three different cells lines clearly showed
470 that the viability of the transfected cells was not affected.

471 Altogether, these results demonstrate that aminoglyco-
472 side-based lipidic derivatives constitute a highly versatile
473 and powerful class of cationic lipids that display a
474 remarkably high efficiency for non-viral-mediated gene
475 delivery and siRNA-based gene knockdown.

The contribution of organic chemistry to enhanced transfection efficiency

Escaping endosome by using fusogenic lipid strategy

479 Once internalized in the cell, lipoplexes must overcome
480 several additional steps to effect efficient gene expression,
481 and ultimately DNA molecules must be decomplexed from
482 cationic lipids in order to be active because lipoplexes
483 micro-injected into the nuclear compartment does not
484 allow gene expression. As lipoplexes are generally thought
485 to enter cells through a non-specific endocytosis mecha-
486 nism (Gao and Huang 1995; Miller 1998; Aissaoui et al.
487 2002), their escape from the endosomal compartment is
488 required to avoid lysosomal degradation of the DNA (El
489 Ouahabi et al. 1997; Noguchi et al. 1998). Introduction of
490 the natural phospholipid DOPE **40** (Fig. 8) in lipoplex
491 formulations has been shown to provide a higher trans-
492 fection efficiency in the case of many cationic lipid sys-
493 tems. This effect is possibly due to the fusogenic properties
494 of DOPE that are attributed to its ability to undergo a
495 transition from a lamellar to a hexagonal phase (Farhood
496 et al. 1995; Hui et al. 1996). The resulting hexagonal
497 complexes are more likely to fuse with the endosomal
498 membrane, which may increase the subsequent disruption
499 of this membrane and, thus, facilitate DNA release into the
500 cytoplasm.

501 Several structural modifications of the helper lipid
502 DOPE have been investigated to increase the transfection
503 efficiency of liposome formulations. Partially fluorinated
504 analogs of DOPE were thought to display a higher
505 tendency to promote the transition from the lamellar to
506 the hexagonal phase, due to their more pronounced cone-
507 shape geometry compared to DOPE. For example, the
508 fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid
509 [F8E11][C16]OPE **41** (Fig. 8) led to up to 90-fold higher
510 transfection efficiency in A549 cells when formulated with
511 the lipopolyamine pcTG90 **42** in HEPES compared to
512 formulation containing DOPE (Boussif et al. 2001).
513 However lipoplexes of pcTG90, DOGS or DOTAP with
514 this fluorinated colipid formulated in 5% glucose resulted
515 in comparable transfection efficiencies to those obtained
516 with control DOPE lipoplexes (Gaucheron et al. 2001).
517 Substitution of the double bond in the oleoyl fatty acid
518 chain of DOPE with an acetylenic bond has also been
519 investigated (Fletcher et al. 2006). The more phase-stable
520 dialkynoyl analogue of DOPE, di(octadec-9-ynoyl) phos-
521 phatidylethanolamine (DS(9-yne)PE) **43** (Fig. 8), allowed
522 for a reduction of the amount of the cationic lipid
523 *N*¹-cholesteryloxycarbonyl-3,7-diazanonane-1,9-diamine
524 (CDAN) **44** in lipoplex formulations with a cationic
525 lipid/helper lipid molar ratio from 1/1 to 1/10, without
526 apparent loss in transfection activity in Panc-1 cell line.

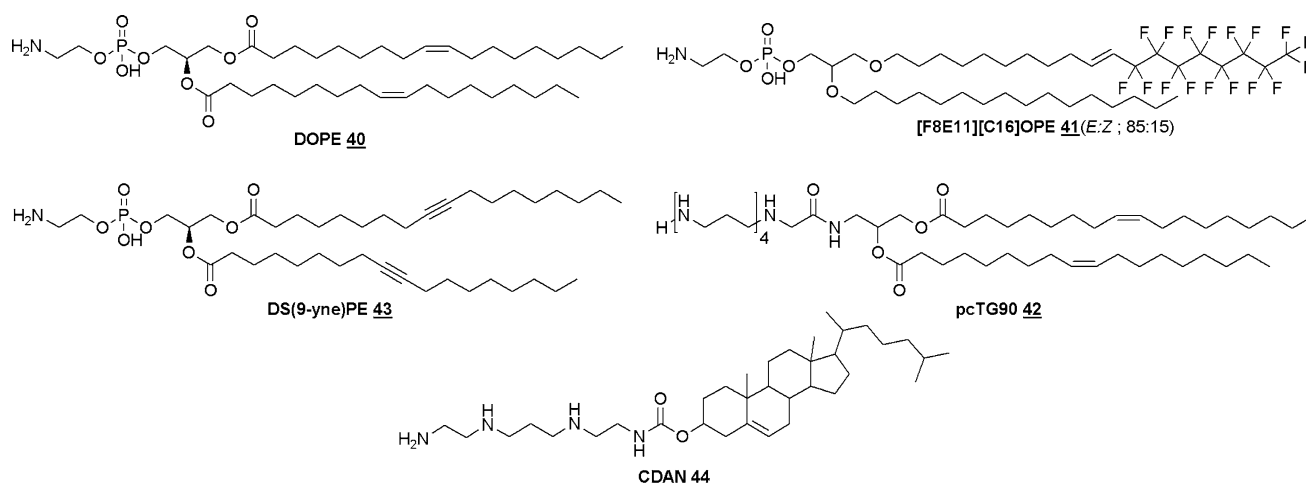


Fig. 8 Structure of helper lipids and cationic lipids pcTG90 and CDAN

527 Nevertheless, DOPE, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-
528 choline (DOPC) and cholesterol still represent the most
529 used helper lipids in lipoplex-mediated transfection (Far-
530 hood et al. 1995; Hui et al. 1996; Pedroso de Lima et al.
531 2001; Zhang and Anchordoquy 2004; Majeti et al. 2005)
532 and the development of new colipids that enhance gene
533 delivery remains highly challenging.

534 Release of DNA in cytoplasm by intracellular disulfide
535 reduction strategy

536 Another critical step to overcome, in order to achieve
537 efficient transfection is the release of DNA molecules from

538 DNA-cationic lipid lipoplexes. To ensure the intracellular
539 collapse of the lipid-DNA complex, a rationale based on a
540 reductive, environment-sensitive chemical function has
541 been developed. The synthesis of disulfide bond-bearing,
542 divalent cationic lipids that can undergo reduction by intra-
543 cellular glutathione has been reported (Tang and Hughes
544 1998, 1999). These lipids (Fig. 9), namely cholesteryl
545 hemidithiodiglycolyl tris(aminoethyl)amine (CHDTAEA)
546 45 and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-succinyl-2-hydroxyethyl
547 disulfide ornithine (DOGSDSO) 46, showed, respec-
548 tively, up to 7- and 50-fold higher transfection efficiencies
549 in several cell lines compared with their non-disulfide
550 analogues.

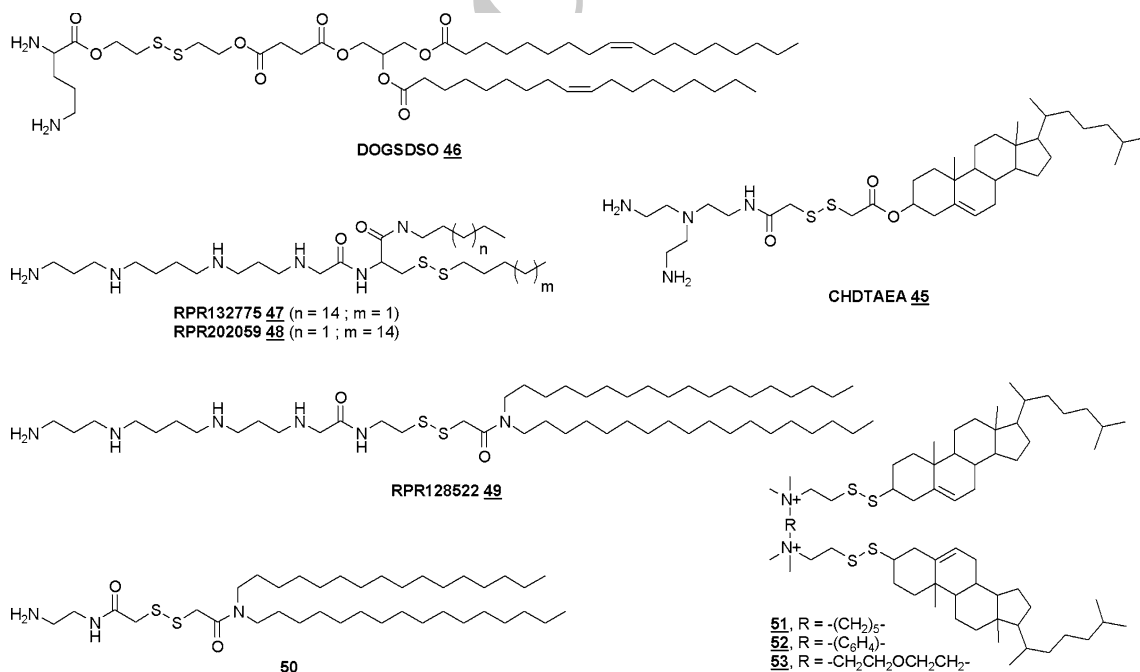


Fig. 9 Reducible cationic lipids

551 A structure–efficiency relationship study of reduction-
 552 sensitive lipopolyamines that contain a disulfide bond at
 553 various positions in the backbone of the lipids has also
 554 been published (Byk et al. 2000; Wetzer et al. 2001). The
 555 insertion of the disulfide bond inside one lipid chain
 556 (Fig. 9, lipids 47 and 48) resulted in up to 1000-fold
 557 increased transfection efficiency compared with the non-
 558 disulfide lipid (Wetzer et al. 2001). In contrast, the intro-
 559 duction of the disulfide bond between the polyamine and
 560 the lipid (RPR128522 49) led to a total loss of transfection
 561 efficiency, probably due to a higher reduction kinetic,
 562 implying an early release of DNA (Byk et al. 2000).
 563 Another example of a cationic lipid that contains a disulfide
 564 bond inside the linker (Fig. 9, lipid 50) also showed an
 565 extremely poor transfection activity compared with the
 566 non-disulfide control lipid (Kumar and Chaudhuri 2004).
 567 Electrophoretic gel retardation and DNase I sensitivity
 568 experiments supported the hypothesis that the inefficient
 569 transfection activities of the disulfide bond containing
 570 lipoplexes 50 originated in part from the high degradation
 571 sensitivity of the lipoplexes by cellular DNase I. Recently,
 572 a series of thiocholesterol-derived gemini cationic lipids
 573 possessing hydrophobic flexible (Fig. 9, lipid 51), hydro-
 574 phobic rigid (lipid 52) and hydrophilic flexible (lipid 53)
 575 spacers were synthesized (Bajaj et al. 2008). The trans-
 576 fection efficiencies of the liposomal formulations were
 577 found to be dependent upon the cell line used, however the
 578 disulfide bond influence was not evaluated by comparison
 579 with the non-disulfide counterparts.

580 Several groups have also investigated the use of disul-
 581 fide bonds to develop monomolecular particles by the
 582 dimerization of a thiol-containing, cationic detergent,
 583 entrapping only one DNA molecule per lipoplex (Blessing
 584 et al. 1998; Ouyang et al. 2000; Dauty et al. 2001; Fabio
 585 et al. 2005). The strategy relies on the ability of the cationic
 586 detergent to condense DNA into discrete particles that can
 587 consist of a single nucleic acid molecule. The particles are
 588 then “frozen” by oxidation of the thiol function that led to
 589 disulfide lipids on the template DNA (Blessing et al. 1998).
 590 The resulting small, monomolecular lipoplexes are stable
 591 in physiological conditions, have a negative zeta potential,
 592 but are not able to promote efficient transfection in cultured
 593 cells unless a large excess of detergent is present (Dauty
 594 et al. 2001) or they are mixed with a cationic vector
 595 (Ouyang et al. 2000). In these latter cases, reduction of the
 596 disulfide bond may occur inside the cell, leading to DNA
 597 release from DNA-liposome complexes. However such an
 598 effect has not yet been proven.

In conclusion, the disulfide reduction strategy is likely to
 promote the release of DNA from DNA-liposome com-
 plexes, leading to greater transfection activity. Neverthe-
 less, such disulfide bond-containing cationic lipids must be
 designed carefully in order to avoid early lipoplex disso-
 ciation and/or degradation.

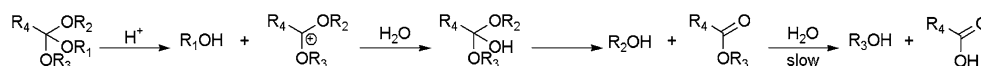
Escaping endosomes by using pH-sensitive strategy

In the cationic lipid-mediated transfection process, the
 endocytosis of lipoplexes is a cellular pathway character-
 ized by a significant drop in pH. The medium of early
 endosomes at physiological pH, is progressively acidified
 to pH 6.5–6.0 in the late endosome, finally reaching pH 5.0
 in the lysosome, where extensive degradation takes place
 (Mukherjee et al. 1997; Wiethoff and Middaugh 2003).
 The introduction of acid-labile groups into cationic lipids
 to form pH-sensitive lipoplexes represents an attractive
 strategy to enhance transfection efficiency because the
 decrease of pH in the endosome promotes the hydrolysis of
 the cationic lipid, leading to endosome disruption and
 concomitant DNA release from the lipoplex.

Ortho esters are one of the most acid-sensitive func-
 tional groups described in the literature (Cordes and Bull
 1974; Deslongchamps et al. 2000) and polyortho esters
 have shown excellent biocompatibility for controlled drug
 release (Heller et al. 2002). The hydrolysis of an ortho ester
 starts with the rapid, acid-catalyzed cleavage of two alkoxy
 groups followed by the slower cleavage of the third alkoxy
 group that relies on the hydrolysis of an ester bond
 (Fig. 10).

Several ortho ester-containing cationic lipids have been
 synthesized and characterized for their susceptibility to
 undergo hydrolysis under mild acid conditions (Zhu et al.
 2000; By and Nantz 2004; Chen et al. 2007). For instance,
 ortho ester lipid 54 (Fig. 11) underwent complete hydro-
 lysis within 12 h after exposure to a pH 4.5 buffer solution
 at 38°C and its transfection efficiency in NIH 3T3 cells was
 up to tenfold higher than DOTAP and DC-Chol 3 (Zhu
 et al. 2000). A putative explanation of this improvement in
 transfection efficiency may lie in the detergent’s behavior,
 induced by the hydrolysis product of 54, a single amphi-
 philic alkyl chain, that is speculated to aid the escape of
 DNA from endosomes. The cyclic ortho ester lipid 61
 (Fig. 11) also showed a significantly higher transfection
 efficiency than DOTAP in CV-1 and HTB-129 cells (Chen
 et al. 2007). In this case, two concomitant effects are
 thought to promptly destabilize the endosome membrane,

Fig. 10 General mechanism of ortho esters hydrolysis



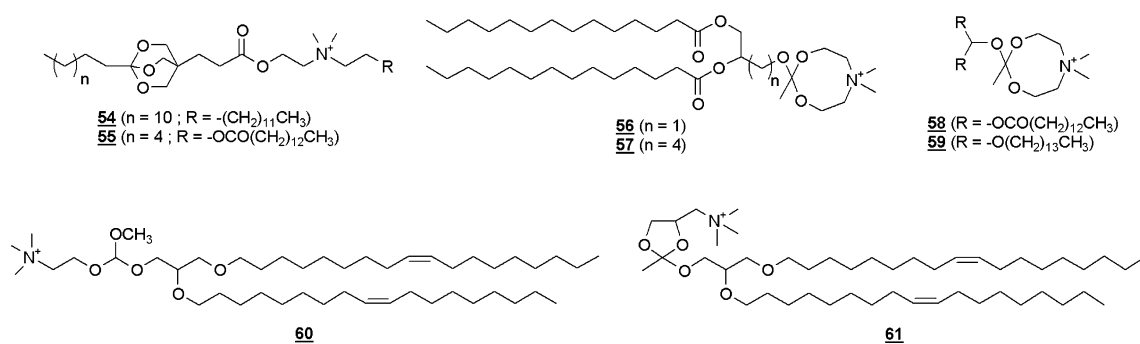


Fig. 11 Acid-labile cationic ortho esters lipids

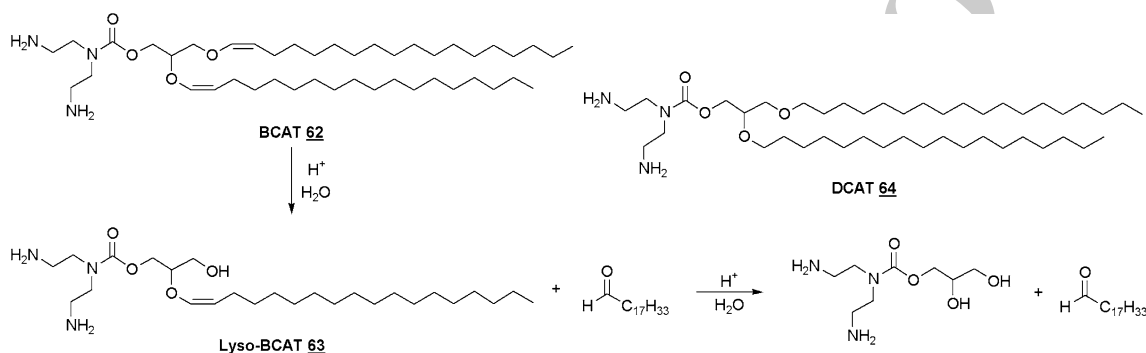


Fig. 12 Hydrolysis pathway of acid-labile lipid BCAT **62** and structure of lipid DCAT **64**

645 the acid-catalyzed cleavage of the cationic head groups that
 646 caused the aggregation of the lipoplexes and the generated
 647 conelike lipid diolelyglycerol (DOG) that favored the forma-
 648 tion of the fusogenic hexagonal phase.

649 The use of an acid-sensitive vinyl ether linkage between
 650 the headgroup and the hydrocarbon side chains has been
 651 reported for a diplasmenyl lipid derivative (Boomer and
 652 Thompson 1999; Boomer et al. 2002). The hydrolysis
 653 pathway of the cationic lipid *O*-(2*R*-1,2-di-*O*-(1'*Z*,9'*Z*-oc-
 654 tadecadienyl)-glycerol)-3-*N*-(bis-2-aminoethyl)-carbamate
 655 (BCAT) **62** involves the protonation of the vinyl ether
 656 β -carbon as the rate determining step, followed by the
 657 addition of water to the intermediate carbocation. The
 658 formed hemiacetal is then decomposed to generate a fatty
 659 aldehyde and a single chain cationic lipid fragment
 660 (Fig. 12, lyso-BCAT **63**) that undergoes hydrolysis fol-
 661 lowing the same pathway (Boomer et al. 2002). Transfec-
 662 tion experiments revealed that the acid-sensitive cationic
 663 lipid BCAT **62** exhibited luciferase expression levels five
 664 to eight times greater than the acid-insensitive control lipid
 665 *O*-(1,2-di-*O*-(9'*Z*-octadecenyl)-glycerol)-3-*N*-(bis-2-ami-
 666 noethyl)-carbamate (DCAT) **64**, in four cells lines, without
 667 significant differences in the amount of DNA being
 668 delivered. These results strongly support the pH-sensitive

669 strategy using vinyl ether linkage to enhance transfection
 670 efficiency.

671 The acid-sensitive acylhydrazone function has shown
 672 successful applications in drug delivery (Mueller et al.
 673 1990; Kaneko et al. 1991; Kratz et al. 1997; Rodrigues
 674 et al. 1999) and has recently been applied to lipoplex-
 675 mediated gene delivery. The synthesis, characterization
 676 and transfection efficiency of a series of four cationic lipids
 677 incorporating an acylhydrazone linker between a guanidi-
 678 nium-based headgroup and a steroid hydrophobic moiety
 679 was reported (Aissaoui et al. 2004). The saturated steroid
 680 derivatives **65** and **66** (Fig. 13) were found to hydrolyze at
 681 a faster rate than the corresponding unsaturated lipids **67**
 682 and **68**, which contain a double bond conjugated to the
 683 C=N hydrazone double bond that provides a higher sta-
 684 bility of the cationic lipids. Moreover, the saturated lipids
 685 **65** and **66** were unable fully to condense DNA even at high
 686 lipid/DNA charge ratios and to promote gene delivery,
 687 contrary to the unsaturated cholest-4-enone derivatives **67**
 688 and **68**. These results highlight the fact that the acid sen-
 689 sitivity of an acylhydrazone bond must be adjusted to
 690 promote efficient gene transfection.

691 The design of acid-labile cationic lipids to enhance
 692 transfection efficiency is highly versatile. The use of

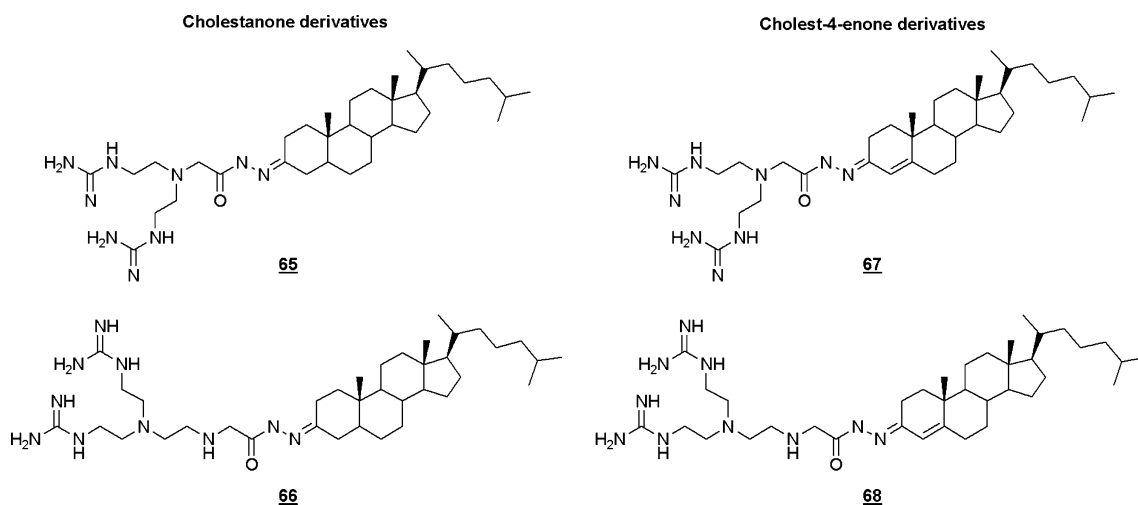


Fig. 13 Acylhydrazone containing guanidinium-based lipids

693 different hydrophilic headgroups, lipophilic tails and link-
694 age configurations with acid-sensitive functional groups
695 such as ortho esters, vinyl ethers or acylhydrazones, pro-
696 vides lipids with different hydrolysis kinetics and hydro-
697 lysis products of different membrane-destabilizing
698 properties. Further development will focus on improving
699 knowledge of structure–activity relationships and on the
700 investigation of other sensitive functional groups.

701 Conclusion

702 Cationic lipid-mediated DNA delivery is a powerful
703 alternative to the use of viral vectors and has prompted
704 extensive research that has resulted in the synthesis of
705 hundreds of molecules. Evaluation of the structure–activ-
706 ity relationships of numerous series of cationic lipids has
707 allowed for the clear identification of the important
708 parameters that govern in vitro transfection efficiency.
709 However, despite having widely used for more than 10
710 years for in vitro transfection applications, the use of these
711 molecules has not yet been translated to application in
712 humans because of low in vivo transfection efficiencies
713 and some toxicity issues. Therefore, there is a need to
714 identify new cationic lipid structures. The strategies for
715 the design of these synthetic vectors are now more
716 rational, based on a better understanding of the critical
717 barriers that lipoplexes must overcome, from DNA com-
718 plexation to transgene expression. The synthesis of bio-
719 compatible and non-toxic cationic lipids can be achieved
720 using natural compounds, known for their safety. Natural
721 hydrophilic headgroups (e.g., aminoglycosides, amino
722 acids, polyamines) and lipophilic tails derived from
723 components of biological membranes (e.g., phospholipids,
724 cholesterol, archaeal bipolar lipids) constitute a large pool

of building blocks for the design of bio-inspired cationic
lipids for gene delivery. Once cationic lipid/DNA lipoplexes
are internalized in the cell, several strategies have been developed
to enhance transfection efficiency by for instance, promoting the
escape of lipoplexes from the endosomal compartment and the
release of DNA from cationic lipid/DNA lipoplexes. The addition
of fusogenic lipids into the cationic lipid formulation is thought
to enhance endosomal membrane disruption, which generally leads
to higher transfection efficiencies. The use of a disulfide bond,
a reductive, environment-sensitive chemical function, may improve
transfection efficiency, however this strategy requires the careful
design of cationic lipids to avoid early lipoplex dissociation and/or
DNA degradation. The versatile use of acid-sensitive functional
groups in the design of cationic lipids provides synthetic vectors
with different properties that are likely to promote transfection
efficiency. In the future, the combination of these strategies may
result in the development of sophisticated and versatile systems
containing multiple components. The specific characteristics of
each component will help to overcome each critical barrier en-
countered during transfection, such as toxicity, endosomal escape
and DNA release from lipoplexes. Such multi-modular synthetic
vectors will be specifically designed for particular targets and
will constitute serious alternatives to viral vectors for gene therapy
applications.

Acknowledgments This contribution was supported by the University of Nantes and funded by grants from the European Commission (Project SyntheGeneDelivery, No. 018716), the CNRS, the INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, the "Association Française contre la Myopathie" (Evry, France), "Vaincre la Mucoviscidose" (Paris, France) and IN-CELL-ART (Nantes, France). We are also grateful to our colleagues of several years for fruitful discussions.

- 761 Aissaoui A, Oudrhiri N, Petit L et al (2002) Progress in gene delivery
762 by cationic lipids: Guanidinium-cholesterol-based systems as an
763 example. *Curr Drug Targets* 3:1–16
- 764 Aissaoui A, Martin B, Kan E et al (2004) Novel cationic lipids
765 incorporating an acid-sensitive acylhydrazone linker: synthesis
766 and transfection properties. *J Med Chem* 47:5210–5223
- 767 Anderson WF (1998) Human gene therapy. *Nature (London)* 392:25–
768 30
- 769 Bajaj A, Kondaiah P, Bhattacharya S (2008) Effect of the nature of
770 the spacer on gene transfer efficacies of novel thiocholesterol
771 derived Gemini lipids in different cell lines: a structure–activity
772 investigation. *J Med Chem* 51:2533–2540
- 773 Barteau B, Chevre R, Letrou-Bonneval E et al (2008) Physicochem-
774 ical parameters of non-viral vectors that govern transfection
775 efficiency. *Current Gene Therapy* 8:313–323
- 776 Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP et al (1989) Efficient gene transfer
777 into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-
778 coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6982–6986
- 779 Belmont P, Aissaoui A, Hauchecorne M et al (2002) Aminoglycoside-
780 derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection
781 in vitro and in vivo. *J Gene Med* 4:517–526
- 782 Benvegna T, Rethore G, Brard M et al (2005) Archaeosomes based on
783 novel synthetic tetraether-type lipids for the development of oral
784 delivery systems. *Chem Commun (Camb)* 553:6–5538
- 785 Blessing T, Remy JS, Behr JP (1998) Monomolecular collapse of
786 plasmid DNA into stable virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci*
787 *USA* 95:1427–1431
- 788 Boomer JA, Thompson DH (1999) Synthesis of acid-labile diplasmeyn-
789 yl lipids for drug and gene delivery applications. *Chem Phys*
790 *Lipids* 99:145–153
- 791 Boomer JA, Thompson DH, Sullivan SM (2002) Formation of
792 plasmid-based transfection complexes with an acid-labile cationic
793 lipid: characterization of in vitro and in vivo gene transfer.
794 *Pharm Res* 19:1292–1301
- 795 Botto RE, Coxon B (1983) Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance
796 spectroscopy of neomycin B and related aminoglycosides. *J Am*
797 *Chem Soc* 105:1021–1028
- 798 Boussif O, Gaucheron J, Boulanger C et al (2001) Enhanced in vitro
799 and in vivo cationic lipid-mediated gene delivery with a
800 fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid. *J Gene*
801 *Med* 3:109–114
- 802 Brard M, Laine C, Rethore G et al (2007) Synthesis of archaeal
803 bipolar lipid analogues: a way to versatile drug/gene delivery
804 systems. *J Org Chem* 72:8267–8279
- 805 By K, Nantz MH (2004) Dioxazocinium ortho esters: a class of highly
806 pH-vulnerable amphiphiles. *Angew Chem, Int Ed* 43:1117–1120
- 807 Byk G, Dubertret C, Escriou V et al (1998) Synthesis, activity, and
808 structure–activity relationship studies of novel cationic lipids for
809 DNA transfer. *J Med Chem* 41:224–235
- 810 Byk G, Wetzler B, Frederic M et al (2000) Reduction-sensitive
811 lipopolyamines as a novel nonviral gene delivery system for
812 modulated release of DNA with improved transgene expression.
813 *J Med Chem* 43:4377–4387
- 814 Chen H, Zhang H, McCallum CM et al (2007) Unsaturated cationic
815 ortho esters for endosome permeation in gene delivery. *J Med*
816 *Chem* 50:4269–4278
- 817 Cordes EH, Bull HG (1974) Mechanism and catalysis for hydrolysis
818 of acetals, ketals, and ortho esters. *Chem Rev* 74:581–603
- 819 Cotton FA, Day VW, Hazen EE Jr et al (1973) Structure of
820 methylguanidinium dihydrogen orthophosphate. Model com-
821 pound for arginine-phosphate hydrogen bonding. *J Am Chem*
822 *Soc* 95:4834–4840
- Dauty E, Remy JS, Blessing T et al (2001) Dimerizable cationic
823 detergents with a low Cmc condense plasmid DNA into
824 nanometric particles and transfect cells in culture. *J Am Chem*
825 *Soc* 123:9227–9234
- De Rosa M, Gambacorta A, Gliozzi A (1986) Structure, biosynthesis,
827 and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Micro-*
828 *biol Mol Biol Rev* 50:70–80
- DeLong EF (1998) Everything in moderation: archaea as ‘non-
830 extremophiles’. *Curr Opin Genet Dev* 8:649–654
- 831 Desigaux L, Sainlos M, Lambert O et al (2007) Self-assembled
832 lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside
833 derivatives promote efficient siRNA delivery and interference.
834 *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16534–16539
- 835 Deslongchamps P, Dory YL, Li S (2000) The relative rate of
836 hydrolysis of a series of acyclic and six-membered cyclic acetals,
837 ketals, orthoesters, and orthocarbonates. *Tetrahedron* 56:3533–
838 3537
- 839 Dorman DE, Paschal JW, Merkel KE (1976) Nitrogen-15 nuclear
840 magnetic resonance spectroscopy. The nebramycin aminoglyco-
841 sides. *J Am Chem Soc* 98:6885–6888
- 842 El Ouahabi A, Thiry M, Pector V et al (1997) The role of endosome
843 destabilizing activity in the gene transfer process mediated by
844 cationic lipids. *FEBS Lett* 414:187–192
- 845 Fabio K, Di Giorgio C, Vierling P (2005) New perfluorinated
846 polycationic dimerizable detergents for the formulation of
847 monomolecular DNA nanoparticles and their in vitro transfection
848 efficiency. *Biochim Biophys Acta* 1724:203–214
- 849 Farhood H, Serbina N, Huang L (1995) The role of dioleoyl
850 phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene
851 transfer. *Biochim Biophys Acta, Biomembr* 1235:289–295
- 852 Felgner PL, Gadek TR, Holm M et al (1987) Lipofection: a highly
853 efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl*
854 *Acad Sci USA* 84:7413–7417
- 855 Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP et al (1997) Nomenclature for
856 synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 8:511–512
- 857 Fletcher S, Ahmad A, Perouzel E et al (2006) A dialkynoyl analogue
858 of DOPE improves gene transfer of lower-charged, cationic
859 lipoplexes. *Org Biomol Chem* 4:196–199
- 860 Floch V, Le Bolc’h G, Gable-Guillaume C et al (1998) Phosphonolipids
861 as non-viral vectors for gene therapy. *Eur J Med Chem*
862 33:923–934
- 863 Floch V, Loisel S, Guenin E et al (2000) Cation substitution in
864 cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection
865 activity and decrease cellular toxicity. *J Med Chem* 43:4617–
866 4628
- 867 Gao X, Huang L (1991) A novel cationic liposome reagent for
868 efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res*
869 *Commun* 179:280–285
- 870 Gao X, Huang L (1995) Cationic liposome-mediated gene transfer.
871 *Gene Ther* 2:710–722
- 872 Gaucheron J, Boulanger C, Santaella C et al (2001) In vitro cationic
873 lipid-mediated gene delivery with fluorinated glycerophosphoethanolamine
874 helper lipids. *Bioconj Chem* 12:949–963
- 875 Gilot D, Miramon ML, Benvegna T et al (2002) Cationic lipids
876 derived from glycine betaine promote efficient and non-toxic
877 gene transfection in cultured hepatocytes. *J Gene Med* 4:415–
878 427
- 879 Guenin E, Herve AC, Floch V et al (2000) Cationic phosphonolipids
880 containing quaternary phosphonium and arsonium groups for
881 DNA transfection with good efficiency and low cellular toxicity.
882 *Angew Chem, Int Ed* 39:629–631
- 883 Heller J, Barr J, Ng SY et al (2002) Poly(ortho esters): synthesis,
884 characterization, properties and uses. *Adv Drug Deliv Rev*
885 54:1015–1039
- 886

- 887 Heyes JA, Niculescu-Duvaz D, Cooper RG et al (2002) Synthesis of
888 novel cationic lipids: effect of structural modification on the
889 efficiency of gene transfer. *J Med Chem* 45:99–114
- 890 Hui SW, Langner M, Zhao YL et al (1996) The role of helper lipids in
891 cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J* 71:590–599
- 892 Junk T, Pappalardo GC, Irgolic KJ (1990) Synthesis and character-
893 ization of rac-1,2-bis(Palmitoyloxy)-3-propyl[2-(trimethylarso-
894 nio)ethyl]phosphonate, an arsenic-containing phosphonolipid.
895 *Appl Organomet Chem* 4:103–109
- 896 Kaneko T, Willner D, Monkovic I et al (1991) New hydrazone
897 derivatives of adriamycin and their immunoconjugates—a
898 correlation between acid stability and cytotoxicity. *Bioconj*
899 *Chem* 2:133–141
- 900 Kim HS, Moon J, Kim KS et al (2004) Gene-transferring efficiencies
901 of novel diamino cationic lipids with varied hydrocarbon chains.
902 *Bioconj Chem* 15:1095–1101
- 903 Koga Y, Morii H (2007) Biosynthesis of ether-type polar lipids in
904 archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol*
905 *Rev* 71:97–120
- 906 Kratz F, Beyer U, Schumacher P et al (1997) Synthesis of new
907 maleimide derivatives of daunorubicin and biological activity of
908 acid labile transferrin conjugates. *Bioorg Med Chem Lett* 7:617–
909 622
- 910 Kumar VV, Chaudhuri A (2004) On the disulfide-linker strategy for
911 designing efficacious cationic transfection lipids: an unexpected
912 transfection profile. *FEBS Lett* 571:205–211
- 913 Kumar VV, Pichon C, Refregiers M et al (2003) Single histidine
914 residue in head-group region is sufficient to impart remarkable
915 gene transfection properties to cationic lipids: evidence for
916 histidine-mediated membrane fusion at acidic pH. *Gene Ther*
917 10:1206–1215
- 918 Lamarche F, Mevel M, Montier T et al (2007) Lipophosphoramidates
919 as lipidic part of lipospermines for gene delivery. *Bioconj Chem*
920 18:1575–1582
- 921 Le Bolc'h G, Le Bris N, Yaouanc JJ et al (1995) Cationic
922 phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection.
923 *Tetrahedron Lett* 36:6681–6684
- 924 Lee ER, Marshall J, Siegel CS et al (1996) Detailed analysis of
925 structures and formulations of cationic lipids for efficient gene
926 transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 7:1701–1717
- 927 Majeti BK, Karmali PP, Reddy BS et al (2005) In vitro gene transfer
928 efficacies of *N, N*-dialkylpyrrolidinium chlorides: a structure–
929 activity investigation. *J Med Chem* 48:3784–3795
- 930 Mevel M, Montier T, Lamarche F et al (2007) Dicationic lipop-
931 hosphoramidates as DNA carriers. *Bioconj Chem* 18:1604–1611
- 932 Miller AD (1998) Cationic liposomes for gene therapy. *Angew Chem*
933 *Int Ed* 37:1769–1785
- 934 Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM (1999) Amino-
935 glycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemot-*
936 *her* 43:727–737
- 937 Moazed D, Noller HF (1987) Interaction of antibiotics with functional
938 sites in 16S ribosomal RNA. *Nature (London)* 327:389–394
- 939 Montier T, Cavalier A, Delepine P et al (2003) The use of in situ
940 hybridization to study the transgene pathway following cellular
941 transfection with cationic phosphonolipids. *Blood Cells Mol Dis*
942 30:112–123
- 943 Montier T, Benvegnu T, Jaffres PA et al (2008) Progress in cationic
944 lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids
945 as an example. *Curr Gene Ther* 8:296–312
- 946 Moradpour D, Schauer JI, Zurawski VR Jr et al (1996) Efficient gene
947 transfer into mammalian cells with cholesteryl-spermidine.
948 *Biochem Biophys Res Commun* 221:82–88
- 949 Mueller BM, Wrasidlo WA, Reisfeld RA (1990) Antibody conjugates
950 with morpholinodoxorubicin and acid cleavable linkers. *Bioconj*
951 *Chem* 1:325–330
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol*
952 *Rev* 77:759–803
- Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science*
953 (Washington, DC, 1883) 260:926–932
- Niculescu-Duvaz D, Heyes J, Springer CJ (2003) Structure–activity
954 relationship in cationic lipid mediated gene transfection. *Curr*
955 *Med Chem* 10:1233–1261
- Noguchi A, Furuno T, Kawaura C et al (1998) Membrane fusion plays
956 an important role in gene transfection mediated by cationic
957 liposomes. *FEBS Lett* 433:169–173
- Obata Y, Suzuki D, Takeoka S (2008) Evaluation of cationic
958 assemblies constructed with amino acid based lipids for plasmid
959 DNA delivery. *Bioconj Chem* 19:1055–1063
- Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM Jr et al (2001) Recognition of
960 cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*
961 292:897–902
- Oudrhiri N, Vigneron JP, Peuchmaur M et al (1997) Gene transfer by
962 guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial
963 cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1651–1656
- Ouyang M, Remy JS, Szoka FC Jr (2000) Controlled template-
964 assisted assembly of plasmid DNA into nanometric particles
965 with high DNA concentration. *Bioconj Chem* 11:104–112
- Pedroso de Lima MC, Simoes S, Pires P et al (2001) Cationic lipid-
966 DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological
967 applications. *Adv Drug Deliv Rev* 47:277–294
- Picquet E, Le Ny K, Delepine P et al (2005) Cationic lipophosph-
968 oramidates and lipophosphoguanidines are very efficient for in
969 vivo DNA delivery. *Bioconj Chem* 16:1051–1053
- Pitard B (2002) Supramolecular assemblies of DNA delivery systems.
970 *Somatic Cell Mol Genet* 27:5–15
- Pitard B, Aguerre O, Airiau M et al (1997) Virus-sized self-
971 assembling lamellar complexes between plasmid DNA and
972 cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci*
973 *USA* 94:14412–14417
- Pitard B, Oudrhiri N, Vigneron JP et al (1999) Structural character-
974 istics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-
975 cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci*
976 *USA* 96:2621–2626
- Pitard B, Oudrhiri N, Lambert O et al (2001) Sterically stabilized
977 BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfec-
978 tion into the mouse airways in vivo. *J Gene Med* 3:478–487
- Rethore G, Montier T, Le Gall T et al (2007) Archaeosomes based on
979 synthetic tetraether-like lipids as novel versatile gene delivery
980 systems. *Chem Commun (Camb)* 205:4–2056
- Rodrigues PCA, Beyer U, Schumacher P et al (1999) Acid-sensitive
981 polyethylene glycol conjugates of doxorubicin: preparation, in
982 vitro efficacy and intracellular distribution. *Bioorg Med Chem*
983 7:2517–2524
- Rosenzweig HS, Rakhmanova VA, McIntosh TJ et al (2000) O-Alkyl
984 dioleoylphosphatidylcholinium compounds: the effect of varying
985 alkyl chain length on their physical properties and in vitro DNA
986 transfection activity. *Bioconj Chem* 11:306–313
- Sainlos M, Belmont P, Vigneron JP et al (2003) Aminoglycoside-
987 derived cationic lipids for gene transfection: synthesis of
988 kanamycin derivatives. *Eur J Org Chem* 276:4–2774
- Sainlos M, Hauchecorne M, Oudrhiri N et al (2005) Kanamycin
989 A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection.
990 *Chembiochem* 6:1023–1033
- Stekar J, Noessner G, Kutscher B et al (1995) Synthesis, antitumor
991 activity, and tolerability of phospholipids containing nitrogen
992 homologs. *Angew Chem Int Ed* 34:238–240
- Szilagy L, Pusztahelyi ZS, Jakab S et al (1993) Microscopic
993 protonation constants in tobramycin. An NMR and pH study
994 with the aid of partially *N*-acetylated derivatives. *Carbohydr Res*
995 247:99–109

- 1017 Tang F, Hughes JA (1998) Introduction of a disulfide bond into a
 1018 cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA.
 1019 Biochem Biophys Res Commun 242:141–145
- 1020 Tang F, Hughes JA (1999) Use of dithiodiglycolic acid as a tether for
 1021 cationic lipids decreases the cytotoxicity and increases transgene
 1022 expression of plasmid DNA in vitro. Bioconj Chem 10:791–796
- 1023 Turek J, Dubertret C, Jaslin G et al (2000) Formulations which
 1024 increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition
 1025 of transfection. J Gene Med 2:32–40
- 1026 Umezawa H, Hooper IR (eds) (1982) Aminoglycoside antibiotics.
 1027 Springer, New York
- 1028 Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M et al (1996) Guanidinium-
 1029 cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection
 1030 of eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci USA 93:9682–9686
- Wetzer B, Byk G, Frederic M et al (2001) Reducible cationic lipids
 for gene transfer. Biochem J 356:747–756
- Wiethoff CM, Middaugh CR (2003) Barriers to nonviral gene
 delivery. J Pharm Sci 92:203–217
- Zhang Y, Anchordoquy TJ (2004) The role of lipid charge density in
 the serum stability of cationic lipid/DNA complexes. Biochim
 Biophys Acta Biomembr 1663:143–157
- Zhu J, Munn RJ, Nantz MH (2000) Self-cleaving ortho ester lipids: a
 new class of pH-vulnerable amphiphiles. J Am Chem Soc
 122:2645–2646
- 1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041

UNCORRECTED PROOF

Physicochemical Parameters of Non-Viral Vectors that Govern Transfection Efficiency



Benoit Barteau^{#,1}, Raphaël Chèvre^{‡,§,3}, Emilie Letrou-Bonneval^{‡,§}, Romain Labas^{‡,§},
Olivier Lambert¹ and Bruno Pitard^{‡,§}

[‡]INSERM, U915, Nantes, F-44000 France. [§]Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France. [#]IN-CELL-ART, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, F44093 France. ¹CBMN UMR-CNRS 5248 IECB, Université de Bordeaux I-ENITAB, Avenue des Facultés, Talence, F-33405 France

Abstract: Gene therapy is based on the vectorization of nucleic acids to target cells and their subsequent expression. Cationic lipids and polymers are the most widely used vectors for the delivery of DNA into cultured cells. Nowadays, numerous reagents made of these cationic molecules are commercially available and used by researchers from the academic and industrial field. By contrast their evaluations in preclinical programs have revealed that their use for *in vivo* applications will be more problematic than their massive use *in vitro*. This is mostly due to the physicochemical properties of cationic vectors/DNA complexes, which are the result of their mode of interaction. Indeed, these cationic vectors interact through electrostatic forces with negatively charged DNA. This results in the formation of highly organized positively charged supramolecular structures where DNA molecules are condensed. Association of DNA with cationic lipids under a micellar or liposomal form leads to lamellar organization with DNA molecules sandwiched between lipid bilayers. Although the lamellar phase is the common described structure, as evidenced by small-angle X-ray scattering and electron microscopy, some cationic lipid combined with a hexagonal forming lipid could also result with DNA in an inverted hexagonal structure. Despite a lot of effort, the precise mechanism of gene transfer with cationic vector is still ill-defined. Here, our objective was to overview the main relationships between the physico chemical properties of cationic lipid/DNA complexes and their transfection efficiency. An overview of a new class of vectors consisting of amphiphilic block copolymers designed for *in vivo* delivery is also presented and discussed.

Keywords: Cationic lipid, cryo-TEM, small-angle X ray scattering, morphology, DNA, Amphiphilic block copolymer.

INTRODUCTION

The synthetic non viral vectors most actively investigated belong to cationic lipids or cationic polymers. The non viral vectors resulting from the association of DNA with cationic lipid and cationic polymer are called lipoplexes and polyplexes, respectively [1]. Spontaneous formation of self-assembled nanometric vector/DNA complexes is due to electrostatic interactions between the positive charges of cationic lipid and the negative phosphate groups of the nucleic acids. Cationic lipids are particularly attractive as relatively straightforward chemical procedures allow to synthesize a great variety of well-characterized reagents with favorable features compared to viral vectors such as non immunogenicity, biodegradability, low toxicity and simplicity of use. Thus, numerous cationic lipids have been developed over the last decade (see Montier *et al.* in this issue). Cationic liposomes have even already been used in the clinical setting gene therapy trials for cancer and cystic fibrosis [2]. Despite the extensive use and diverse applications of lipoplexes or polyplexes, it must be stressed that their supramolecular characteristics related to their mechanisms of transfection is in many ways surprisingly ill defined. This is to some extent understandable, as most of the efforts were focused on the

synthesis of new cationic lipids and not on the understanding of physicochemical parameters involved in the lipoplexes formation and transfection. Historically, a hypothetical “bead on the string” model in which unmodified cationic liposomes were distinctly attached to the DNA was originally proposed [3]. Over the years, various electron microscopy techniques have been used to visualize the structures of lipoplexes. Freeze-fracture electron microscopy has shown uncondensed DNA fibers coated with lipid connected to the surface of aggregated fused cationic liposomes displaying a “spaghetti-meat balls-like” structures [4]. Electron microscopy performed with negative staining of DNA complexes with cationic liposomes suggested that cationic liposomes initially form clusters along the DNA molecule. Above a critical liposome density, these clusters coalesce by DNA-induced membrane fusion, leading to DNA encapsulation by the lipids [5]. Cryo-transmission electron microscopy (TEM) examination suggested that an excess of cationic lipid led to DNA encapsulation between the lamellae of aggregated multilamellar structures [6]. This was the first evidence of the lamellar structure of lipoplexes. Then, synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) has been used and permit to elucidate the precise structural characteristics of these condensed structures of the lipoplexes formed with various cationic lipids (see below). Results obtained by SAXS confirmed that most of cationic lipid/DNA complexes were indeed organized as lamellar structures.

*Address correspondence to this author at the INSERM, U915, 1 Rue Gaston Veil, 44035 Nantes, France; Tel: 33240412974; Fax: 33240412950; E-mail: bruno.pitard@univ-nantes.fr

In this review we will focus on the physicochemical characteristics of non viral vectors at two length scale; macroscopic and microscopic length scale, and the relationships between their physicochemical properties and transfection efficiency. In this forward looking review, we will also discuss some of new classes of vectors composed of amphiphilic block copolymers of various chemical structures which are very promising for gene transfer *in vivo* in various organs including skeletal, cardiac muscle, lung and fat tissue.

1. LIPOPLEXES ON THE MACROSCOPIC LENGTH SCALE

Lipoplexes are formed by mixing plasmid DNA with cationic lipids under a liposomal or a micellar form. Mixing polyanionic DNA with the polycationic surface of the liposomes or micelles leads to the formation of lipoplexes through electrostatic interaction between the two opposite charged molecules. The lipoplexes are usually described by the theoretical charge ratio which is the ratio expressed as moles of positive charge per mole of negative charge. Cationic lipids (Fig. 1) are composed of hydrophobic moiety (i.e. cholesterol, alkyl chains, etc.) linked to a cationic headgroup including a quaternary ammonium such as dioctadecyldiammonium bromide (DODAB), or dioleoyl trimethylammonium propane (DOTAP) [7], or a polycation such as a lipopolyamine (RPR120535) [8], Bis guanidinium tren cholesterol (BGTC) [9] and lipidic aminoglycoside derivatives [10,11].

During the formation of lipoplexes, DNA is complexed and the initial lipid organization is rearranged to form supramolecular assemblies. Two essential physicochemical properties for *in vitro* or *in vivo* applications can be monitored at the macroscopic length scale; i.e. DNA complexation and the size of the lipoplexes.

1.1. DNA Complexation

Fluorescence experiments are usually performed to evaluate DNA condensation in the formed aggregates [12-14]. Thus, lipoplexes are exposed to ethidium bromide,

which upon intercalation between DNA base pairs acts as a fluorescence probe. Fig. (2) shows a typical experiment, with a cationic lipid such as the lipopolyamine RPR120535, where fluorescence intensity is monitored as a function of the charge ratio which is expressed as moles of positive charge per mole of negative charge. For charge ratios ranging from 0 to 1, fluorescence intensity sharply decreases, from 100% to a value close to zero and stays at this level for lipoplexes with charge ratio above 1. This indicates that plasmid DNA was, in part, accessible to the probe for charge ratios ranging from 0 to 1, whereas for higher charge ratios, DNA molecules were condensed by the cationic lipid. This observation is common to several cationic lipids. However, fluorescence experiment in solution, does not allow to determine whether the fluorescence of complexes with a charge ratio below 1 is due to free DNA or loosely bound DNA to complexes which is still accessible to ethidium bromide molecules.

Gel electrophoresis experiments on a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide is used to follow more precisely DNA condensation by the cationic molecules [13,14]. Fig. (3) shows that the amount of uncomplexed or free DNA decreases as the charge ratio (+/-) was raised. A charge ratio in excess of 1 resulted in aggregates that did not migrate out of the well under these conditions. This observation is in good agreement with the above spectrofluorescence experiments performed in solution but allows to show that for charge ratio below 1, solutions are composed of not only complexes with loosely bound DNA as evidenced by the fluorescence of the complexes present in the wells of the gel but also of free DNA molecules migrating out of the well. For charge ratio strongly positive, no fluorescence can be visualized in the wells, indicating that DNA molecules are firmly packed with cationic lipid preventing the accessibility to ethidium bromide molecules.

1.2. Colloidal Stability and Size of Lipoplexes

Colloidal stability and size of lipoplexes are key parameters for the *in vivo* application of non viral gene delivery

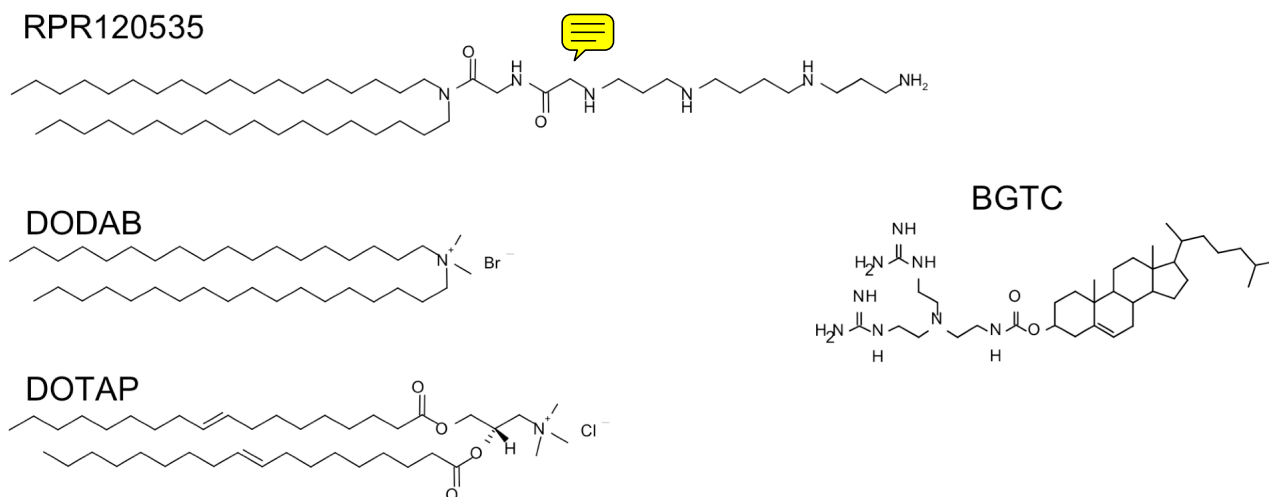


Fig. (1). Structure of the cationic lipids lipopolyamine RPR120535, dioctadecyldiammonium bromide (DODAB), dioleoyl trimethylammonium propane (DOTAP) and Bisguanidinium tren cholesterol (BGTC).

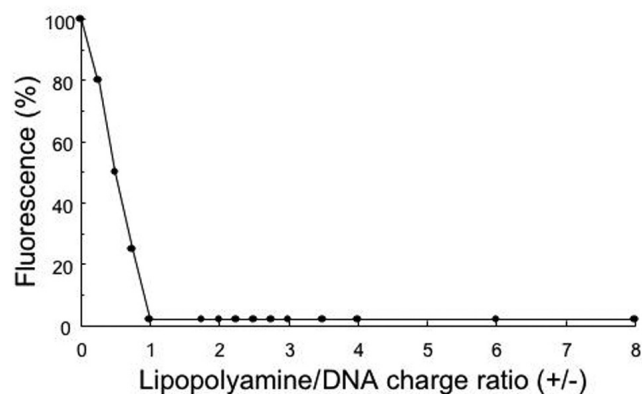


Fig. (2). DNA entrapment as a function of the cationic lipid/DNA ratio. To assess DNA entrapment, ethidium bromide was added to lipoplex solutions 1 hour after complexation at room temperature, and fluorescence was monitored. For lipopolyamine/DNA ratios from 0 to 1, fluorescence intensity sharply decreased from 100% to a value close to zero and stayed at this minimal level for charge ratio above 1.

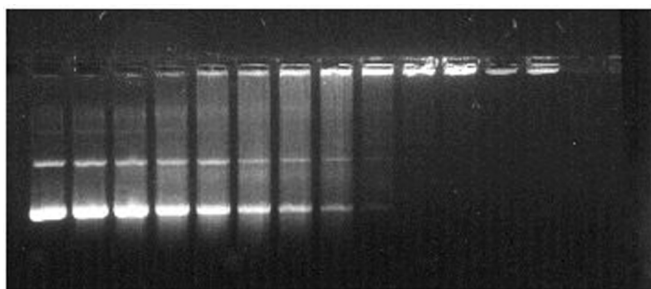


Fig. (3). Agarose gel electrophoresis of lipopolyamine/DNA lipoplexes formed at different charge ratios. The wells contain lipid and DNA at the following charge ratio (left to right): 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9, 1, 2, 4 and 8. Agarose gel electrophoresis was used to assess the relative amounts of DNA that were free or incorporated into lipoplex as a function of the lipid/DNA ratio. DNA complexed with lipid did not migrate out of the well under these conditions due to the size of lipoplexes. The amount of free DNA decreased as the charge ratio was raised.

systems. To assess the mean diameter of non viral vectors, dynamic light scattering is very often used. Fig. (4) illustrates the evolution of the mean diameter as a function of the charge ratio. Colloidal stability of lipoplexes could be defined by three main zones (A, B and C). Zone A was comprised of colloiddally stable complexes with a negative charge ratio and uncondensed DNA surrounding the lipoplexes. Zone B complexes were essentially neutrally charged with condensed DNA contained within colloiddally unstable aggregates. Finally, zone C lipoplexes were composed of colloiddally stable particles with condensed DNA and positive charge ratios, thus repelling strongly each other. Again this model of colloiddal stability is common to several cationic lipids and has been observed with either monovalent or polyvalent cationic lipids under micellar or liposomal forms. Modulation of the lipoplex formulations had a profound effect on the zone of colloiddal stability obtained for a given charge ratio. For instance, increasing the NaCl concentration, the cationic lipid acyl chain length, the pH, the DNA concen-

tration extended zone B (aggregated lipoplexes), while decreasing zone C (colloiddally stable lipoplexes). As a result, for the same charge ratio of two different formulations, the resultant lipoplexes could be of two completely different colloiddal stabilities, revealing that the charge ratio alone is neither the final determinant of the colloiddal state of lipoplexes [15]. The DNA entrapped in these self-assembled lipoplexes is protected from degradation by nucleases especially in the extracellular medium.

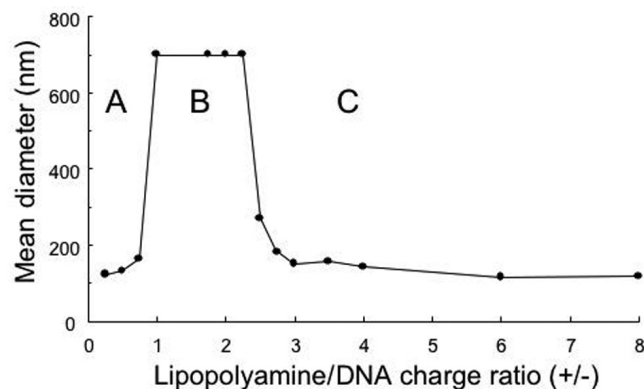


Fig. (4). Colloiddal stability of lipopolyamine RPR120535/DNA lipoplexes as a function of the charge ratio. To assess the colloiddal stability of lipoplexes, dynamic light scattering analysis was performed after several minutes of complexation at room temperature. Lipoplexes from zones A and C were stable, whereas those from zone B exhibited a visible precipitate. Thus an arbitrary value of 700 nm was attributed to zone B lipoplex particle size because the diameter of the precipitated lipoplexes can not be measured by dynamic light scattering.

One of the advantages of nonviral delivery systems over viral vectors is the possibility to transfect cells with large DNA molecules. Plasmid size from 900 to 52500 base pairs does not affect the morphology neither the structure of cationic lipid/DNA lipoplexes [16]. Therefore, the number of plasmid molecules per lipoplexes was inversely proportional to the DNA length ; i.e. the largest number of plasmid DNA molecules per lipoplex is obtained with the smallest plasmid.

It has been proposed by the laboratory of J.P. Behr a strategy that permit to entrap only one DNA molecule per lipoplex [17]. This strategy is based on the use of oligomerizable cationic detergent with one acyl chain. DNA condensation occurs with monomer of cationic detergent ; i.e. below the cmc, and then the organization of the lipoplexes is frozen by linking cationic detergent molecules via disulfide bonds. The resulting lipoplexes have a mean diameter of 23 nm, a negative zeta potential and are stable in physiological conditions. Then, numerous other studies were published following this pioneering approach [18,19].

2. LIPOPLEXES ON THE MICROSCOPIC LENGTH SCALE

2.1 Structure by Small Angle X-Ray Scattering

Small angle x-rays scattering has been used to probe the cationic lipid/DNA lipoplexes structure at the microscopic length scale. Table 1 summarizes lipoplexes structure revealed by this technique.

Table I. Analysis by Small Angle X-Ray Scattering of the Structure of Lipoplexes Resulting from the Association of DNA with Various Cationic Lipids Under Different Morphologies; i.e. liposomes, spherical or threadlike micelles. d_{lipid} and d_{DNA} represent respectively the periodicity of the lamellar organisation of lipids and the 2D arrangement of DNA molecules in the compaction plane. L_{α}^c and H_{II}^c represent respectively the lamellar and the inverted hexagonal phase of DOTAP/DOPE-DNA or DODAB/DOPE-DNA lipoplexes, H_{II} being the hexagonal phase of pure DOPE.

Cationic lipid morphology	Structure	Periodicity	Reference
Cationic liposomes			
DOTAP/DOPC (1/1)	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=65.1 \text{ \AA}$ $d_{\text{DNA}}=24.5\text{-}57.1 \text{ \AA}$	[20]
DODAB/Chol (1/1)	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=64.4 \text{ \AA}$ $d_{\text{DNA}}=36 \text{ \AA}$	[21]
DOTAP/DOPE	Multilamellar and Inverted hexagonal structure depending on the DOTAP/DOPE molar ratio	*TAP/PE<1/0.65 : L_{α}^c ($d_{\text{lipid}} L_{\alpha}^c = 63.47 \text{ \AA}$; $d_{\text{DNA}}=36.5 \text{ \AA}$) *1/0.65<TAP/PE<1/2.19 : L_{α}^c & H_{II}^c ($d_{\text{lipid}} L_{\alpha}^c = 63.47 \text{ \AA}$; $d_{\text{lipid}} H_{II}^c = 67.4 \text{ \AA}$) *1/2.19 <TAP/PE<1/5.32 : H_{II}^c ($d_{\text{lipid}} H_{II}^c = 67.4 \text{ \AA}$) *TAP/PE>1/5.32 : H_{II}^c & H_{II} ($d_{\text{lipid}} H_{II}^c = 65.1 \text{ \AA}$; $d_{\text{lipid}} H_{II} = 74.41 \text{ \AA}$)	[27]
DODAB/DOPE	Multilamellar and Inverted hexagonal structure depending on the DODAB/DOPE molar ratio	*DAB/PE= 3/1 : L_{α}^c ($d_{\text{lipid}} L_{\alpha}^c = 64.8 \text{ \AA}$; $d_{\text{DNA}}=36.1 \text{ \AA}$) *DAB/PE=2/3 : L_{α}^c & H_{II}^c ($d_{\text{lipid}} L_{\alpha}^c = 64.8 \text{ \AA}$; $d_{\text{lipid}} H_{II}^c = 66.7 \text{ \AA}$) *DAB/PE=1/3 : H_{II}^c ($d_{\text{lipid}} H_{II}^c = 68.2 \text{ \AA}$)	[22]
EDOPC	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=62.5 \text{ \AA}$	[23]
BGTC/DOPE (3/2)	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=70 \text{ \AA}$	[24]
DOGS	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=65 \text{ \AA}$	[25]
DOGS/DOPE/cardiolipin (0.35/0.52/0.13)	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=69 \text{ \AA}$	[29]
DOTAU	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=60 \text{ \AA}$	[26]
Cationic micelles			
Spherical micelles RPR120535	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=80 \text{ \AA}$	[28]
Threadlike micelles BGTC	Multilamellar	$d_{\text{lipid}}=70 \text{ \AA}$	[24]

DOTAP, dioleoyl trimethylammonium propane; DODAB, dioctadecyldiammonium bromide; EDOPC, 1,2-Dioleoyl-sn3-ethylphosphocholine; DOPE, dioleoylphosphatidylethanolamine; BGTC, Bisguanidinium tren cholesterol; DOGS, dioctadecylamidoglycylspermine; DOTAU, N-(5'-(2',3''-dioleoyl)uridine)-N',N',N'-trimethylammonium. DOTAP/DOPE (TAP/PE) and DODAB/DOPE (DAB/PE) both expressed as a molar ratio.

It was shown by several research groups that when DNA molecules are mixed with cationic liposomes or micelles highly ordered phase are formed. Cationic liposomes composed of different cationic lipids such as DOTAP [20], DODAB [21, 22], 1,2-dioleoyl-sn3-ethylphosphocholine (EDOPC) [23], BGTC [24], dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS) [25] and N-(5'-(2',3''-dioleoyl)uridine)-N',N',N'-trimethylammonium (DOTAU) [26] exhibited multilamellar phase with DNA molecules sandwiched between cationic lipid bilayers. The periodicity of the lamellar organization depends on the cationic liposomes used. In the case of DOTAP/(dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) [20],

DODAB/dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) [22] and DODAB/Cholesterol [21] a second repeat distance was observed and was attributed to the organization of the DNA molecules in a 2D plane between lipid bilayers. This periodicity of DNA packing within the lipid bilayers ranged from 2.45 et 5.71 nm, as the neutral lipid DOPC increased for a constant DOTAP/DNA charge ratio.

Inverted hexagonal phases were also observed with lipoplexes resulting from the association of DNA with cationic liposomes containing a high content of DOPE, a hexagonal forming lipid [27, 22]. In this case, DNA molecules are coated by cationic lipid monolayers and arranged on a 2D

hexagonal lattice. However, other formulations involving DOPE as a colipid such as BGTC/DOPE-DNA did not exhibit hexagonal structure even if the amount of DOPE was increased [24]. This discrepancy may be explained by the important differences between DOTAP or DODAB and BGTC. Indeed, DOTAP and DODAB are monovalent cationic lipids with two acyl chains whereas BGTC bears two positive charges linked to a hydrophobic moiety consisting of cholesterol. This highlights the absence of general rules regarding the effect of DOPE on the formation of hexagonal structure of lipoplexes.

Complexation of plasmid DNA with spherical micelles of RPR120535 of 5 nm in diameter, instead of cationic liposomes, lead to the formation of smaller lipoplexes consisting of ordered lamellar domains characterized by even spacing of 8 nm irrespective of the cationic lipid/DNA ratio [28]. Indeed, x-ray scattering scans and micrographs of negatively charged (zone A, Fig. 5), neutral (Zone B, Fig. 5) and positively charged lipoplexes (Zone C, Fig. 5) exhibited lamellar organization. Therefore, plasmid DNA is able to transform multivalent cationic lipid micelles into supramolecular organization characterized by local lamellar microdomains (Fig. 5).

2.2. Morphology by Microscopy

Data obtained by x-ray scattering experiments are extremely useful in understanding at the molecular level the inner structure of cationic lipid/DNA lipoplexes. Remarkably, the results have shown that cationic lipid/DNA lipoplexes resulting from the association of either micelles or liposomes composed of mono or polyvalent cationic lipid, give rise usually to multilamellar complexes of various even spacing depending on the cationic lipid molecule used (Table 1). DNA molecules in this multilamellar structure are sand-

wiched between lipid bilayers, and a inverted hexagonal phase, was also generated with the cationic liposomes of DOTAP/DOPE with a molar ratio ranging from 1/2.19 to 1/5.32 and with DODAB/DOPE (1/3 M/M) liposomes.

However the structural organization of lipoplexes provided by SAXS is the mean structure present in the sample, but at the same time minor structures, if existing, could not be detected. For example, it was recently suggested that both multilamellar and hexagonal phases could coexist in the same particle, although x-rays scattering scan indicated a multilamellar structure [29]. Moreover no information on the morphology of lipoplexes is brought by SAXS. Therefore, research groups used electron microscopy techniques to visualize the morphology of lipoplexes, to understand the mechanism of lipoplexes formation and to attribute the peaks observed by x-ray scattering. Various forms of electron microscopy have been used to study cationic lipid/DNA lipoplexes of different lipid compositions, and different size and topological features of the DNA molecules; i.e. supercoiled plasmid, linear DNA.

Freeze-fracture electron microscopy has shown uncondensed DNA fibers coated with lipid connected to the surface of aggregated cationic liposomes of 3- β -(*N,N'*-dimethylethane)carbamoyl)cholesterol/DOPE (DC-Chol/DOPE) [4]. Electron microscopy performed with negative staining of DNA complexed with the cationic liposome of *N*-(1-(2,3-bis(oleoyloxy)propyl)-*N,N,N*-trimethylammonium chloride)/DOPE (DOTMA/DOPE) suggested that cationic liposomes initially form clusters along the DNA molecule. Above a critical liposome density, these clusters coalesce by DNA-induced membrane fusion, leading to encapsulation of DNA molecules by the lipids [5]. Transmission electron microscopy (TEM) with uranyl acetate staining further indicated that DNA molecules might be condensed and inter-

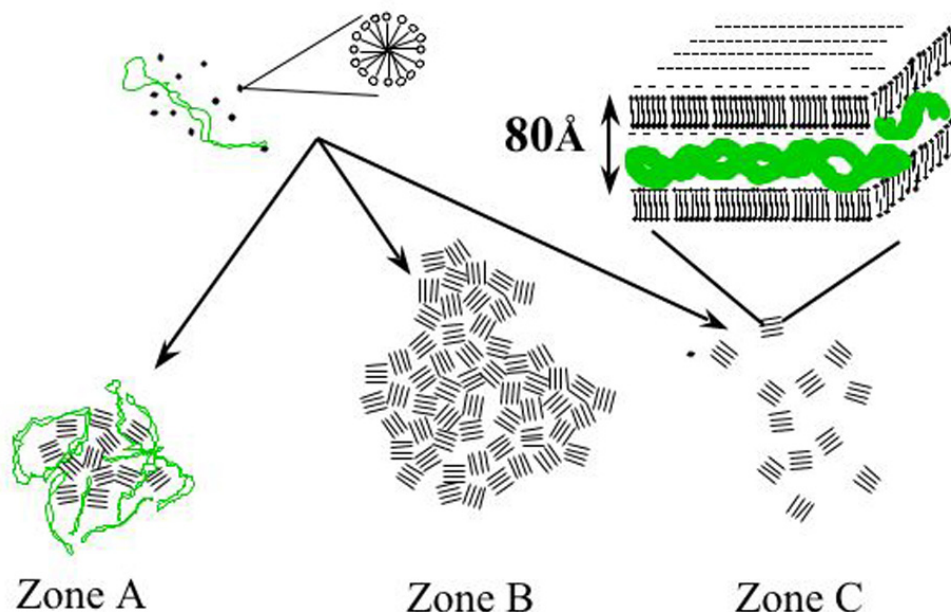


Fig. (5). Schematic representation of lipoplexes resulting from the association of plasmid DNA with spherical cationic micelles of RPR120535 of 5 nm in diameter. Structural analysis, by electron microscopy and small angle x-ray scattering, showed that lipoplexes morphology depends on the charge ratio, but the presence of lamellar microdomains is observed irrespective of the charge ratio. A, B and C represent negatively, neutrally and positively charged lipoplexes, respectively.

twined in the tubules of the lipopolyamine DOGS network, leading to hexagonal packing of DNA [30].

Cryo-transmission electron microscopy which allows to observe specimen with their native contrast without the need to use staining or dehydration procedures has also been used to study the morphology of lipoplexes formed from various cationic lipids, were performed by several research groups [6, 21, 22, 24, 28, 31-34]. Cryo electron micrographs of lipoplexes showed ordered multilamellar particles characterized by an even spacing measured usually by optical diffraction which supported the interlamellar spacing found by small angle x-ray scattering. The interlamellar spacing found in these studies ranged from 6.5 to 8.0 nm depending on the cationic lipid molecule used. The number of lamellae contained per multilamellar structure observed by cryo electron microscopy was in good agreement with those calculated from the half-width and the position of the main x-ray scattering peak of the lamellar symmetry. However, in these reported studies DNA molecules were either invisible or barely visible within the lipoplexes structures. Thus the short periodicity, which was interpreted to be the DNA interaxial spacing of the one-dimensional array of aligned DNA sandwiched between lipid bilayers, could not be definitely detected. However, in some studies DNA molecules could be visualized by cryo-TEM wrapping around cationic liposomes with a periodicity compatible with those observed by small angle x-ray scattering [29, 31, 35]. As example, lipoplexes composed of BGTC/DOPE liposomes and plasmid DNA are depicted in Fig. (6). Very thin stripes that appear regularly

disposed between dark lines correspond to a monolayer of DNA strands sandwiched between two lipid bilayers, each bilayer being composed of two continuous dark lines. This repetitive assembly produced a characteristic interlamellar spacing of 7 nm (Fig. 6a). In addition these thin stripes oriented perpendicular to the lipid membrane reveal a 2.8 nm inter axial spacing compatible with SAXS data. Addition of PEG derivatives to liposome formulation leads to the formation of controlled-size lipoplexes [35]. The presence of PEG derivatives prevents the formation of large complexes as visualized in Fig. (6). The lipoplexes expose at their surface DNA molecules wrapped around the liposomes as evidenced by the striking features regularly disposed on the lipid membrane (Fig. 6b,c).

3. PHYSICOCHEMICAL-TRANSFECTION EFFICIENCY RELATIONSHIPS

Since the synthesis of the first cationic lipid by Philip Felgner and his collaborators [36], a variety of cationic lipid for gene transfer have been synthesized [37,38]. They can be classified into two different groups: (i) monovalent cationic lipids containing only one positive charge, and (ii) polyvalent cationic lipids in which lipid moiety is usually linked through a spacer to a polar headgroup bearing more than one positive charge. The main efforts have been dedicated to generating modifications of the lipid chain and of the cationic polar headgroup. These cationic lipids are then assessed for their *in vitro* transfection efficiency. Therefore, there is still limited understanding of the factors and processes lead-

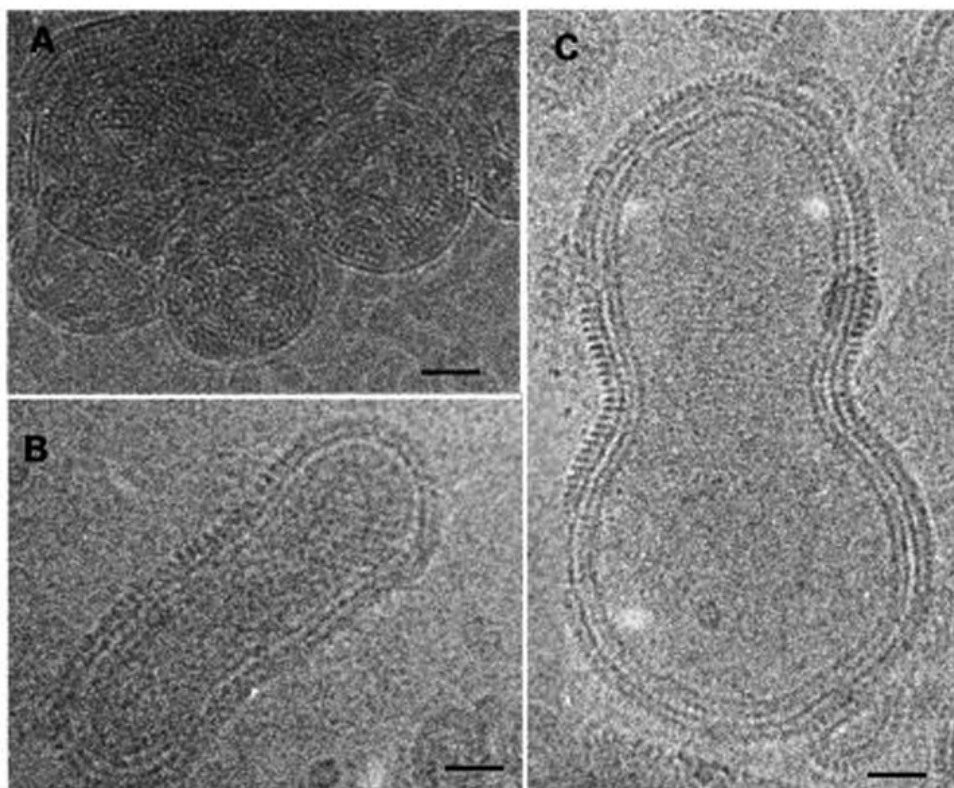


Fig. (6). BGTC/DOPE-plasmid DNA lipoplexes observed by cryo electron microscopy. (a) Multilamellar assembly revealing a DNA monolayer intercalated between two lipid bilayers leading to 7nm interlamellar spacing. (b, c) Lipoplexes formed in the presence of PEG derivative exhibit DNA strands regularly wrapped around the liposome with a lateral or interaxial spacing of 2.8 nm. Scale bars 20 nm.

ing to transfection efficiency because cationic lipids are designed on the basis of trial and error by using expression of the transgene as the end point. However, a better understanding of the lipoplex structures involved in their biological activity, cellular entry and nuclear translocation of plasmid DNA might improve their efficiency for transfection. In particular, correlations need to be established between the supramolecular assemblies formed by the lipoplexes and their subsequent transfection efficiency either *in vitro* or *in vivo*.

3.1. Optimal Positive Charge Density Promote Efficient Gene Transfer *In Vitro*

Multivalent cationic lipids emerge as efficient compound for improving cell transfection efficiency [39-41]. The interactions between cationic lipids and DNA were extensively studied by Safinya's group over the last decade to understand the relationships between structure and transfection efficiency. In order to rationally design and improve the cationic lipid formulations they comparatively study the transfection efficiency of polyvalent cationic lipids. For polyvalent lipids with head groups varying from 2 to 5 positive charges, they observe a maximum of transfection efficiency. The latter is reached at different molar fractions of cationic lipid clearly specific of the lipid composition. For a better understanding of the lipid charge effect on transfection efficiency, they introduce a membrane charge density (σ_M) parameter (i.e. the average charge per unit area of the cationic membrane) that takes into account the size of the head group with respect to its charge [42]. The plot of transfection efficiency versus membrane charge density follows a same bell-shape curve for all their polyvalent lipids. At a low (σ_M), the transfection efficiency increases with (σ_M). The maximum of transfection efficiency is reached for an optimal value of $\sigma_M = 17.4 \cdot 10^3 \text{ e}/\text{\AA}^2$. For this part of the curve, the main limitation in transfection efficiency is identified as a lack of efficiency to trigger the endosomal escape [40]. Then the transfection efficiency decreases with increasing σ_M . This reduced level of transfection efficiency is presumably due to the inability of the DNA to dissociate from the highly charged membranes. Although the transfection efficiency is not boosted with the use of the polyvalent lipid, clearly its maximum can be reached with a less amount of cationic lipids that is rather relevant due to their potential toxic effect.

In term of structural organization, complexes containing polyvalent lipid form multilamellar structures whose characteristic dimensions of the lamellar phase are close to those determined with DNA complexed with DOTAP. Interestingly, the DNA interaxial packing seems largely affected by the use of polyvalent lipid [41]. A gradual increase of neutral lipid does not lead to a continuous increase of the interaxial spacing as observed for monovalent cationic lipid. Instead three distinct regimes are identified corresponding to low, intermediate and large neutral lipid fraction respectively. For the latter regime the DNA spacing increases with the neutral lipid fraction. On the contrary, DNA strands remain tightly packed in the two first regimes (from 24-26 to 27-29 Å DNA-DNA distances), despite the increase of neutral lipid that makes a clear difference with monovalent DOTAP lipid. This peculiar behaviour could be attributed to the existence of DNA-DNA interactions mediated by polyvalent lipids. Indeed the polar heads of the polyvalent lipid are composed

of several amino groups that could have a similar effect on DNA condensation than that of polyamines (e.g. spermine, spermidine) which are very efficient condensing agents [43]. *In vitro* condensation of linear DNA strands using spermine, spermidine induces striking toroidal structures. Toroids exhibits typical circumferential fringes suggesting a regular packing of DNA strands [44, 45] with an inter strand distance of 2.6 - 2.8 nm (Fig. 7a).

DNA condensation after bacteriophage DNA release in bulk solution reveals the high propensity to form toroids of large size in the presence of spermine. Ejected viral DNA is added into the condensate in the progressive and concerted manner with its orientation automatically aligned with those in the growing toroid. This process leads to form toroids of unlimited size containing an arbitrary number of base pairs. Interestingly, supercoiled plasmid DNA in dilute solution of 1 µg/ml mixed with spermine does not spontaneously lead to toroidal structure but instead forms grapes of 70-80nm globular structures without exhibiting a regular packing (Fig. 7b,c). The difference clearly indicates that supercoiled DNA does not condensate in the same manner as long linear strand DNA.

It is important to note that cationic lipids may serve as very efficient template for DNA organization and for building well-assembled lipoplexes. Apart from this scaffolding role, it is important to clarify the mechanistic role of cationic lipids in gene delivery.

3.2. Hexagonal Packing of DNA Promote Efficient Gene Transfer *In Vitro*

The luciferase activity measured in transfected mouse fibroblasts L-cells showed that the inverted hexagonal structure resulting from the association of DNA with cationic liposomes of DOTAP/DOPE (1/2.41 M/M), were by far the most active in promoting transfection [46]. The transfection activity of these lipoplexes was 3 log greater than the activity of the DNA complexes formed with cationic liposomes of DOTAP/DOPC (1/2.28 M/M) consisting of lamellar structure. Experiments were conducted to study the intracellular trafficking of these two types of supramolecular organizations. The results suggested that the difference in transfection efficiency is a result of differences in intracellular behavior, because self-assembled lamellar lipoplexes that were internalized into cells were stable, whereas hexagonal complexes led to aggregated clusters that fused with cell membrane, thus facilitating DNA escape.

Although DOPE appears commonly used as "helper lipid" since its may act in promoting/facilitating the phase conversion to non lamellar structure, its exact role in endosomal escape has not been yet demonstrated. Other components such as cellular phosphatidyl serine lipid associated to the endosomal membrane need to be considered as potential partner for promoting the membrane destabilization and the DNA translocation into the cytosol.

3.3. Small DNA Molecules Promote High Gene Transfer *In Vitro*

An important issue of gene therapy in the future will be the transfection of large DNA fragments containing large

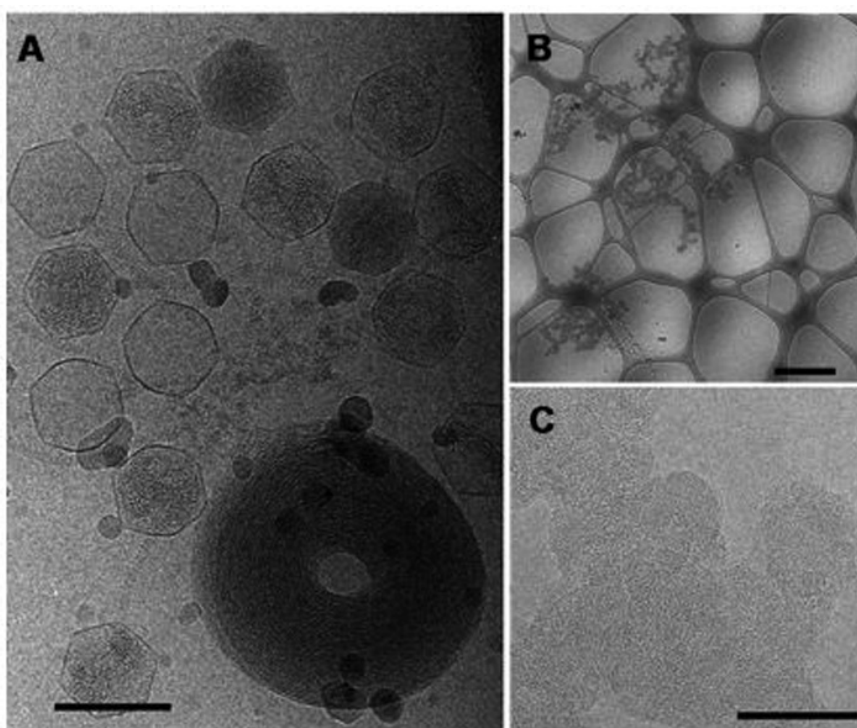


Fig. (7). DNA condensation in the presence of spermine. (a) Toroidal structures formed from linear phage genome progressively release. (b-c) Plasmid DNA condensed into grapes of globular nodules. Scale bars 100nm (a,c), 1 μ m (b).

transgene with regulatory systems [47] for gene expression induced by exogenous chemical agents or endogenous elements. Thus it will be of crucial importance to develop non-viral delivery systems capable of transfecting large DNA molecules into cells. Structural analysis of the complexes resulting from the association of plasmid DNA of various size ranging from 900 to 52,500 bp with cationic lipids showed that lipoplex morphology and structure do not depend on DNA length. The periodicity of the lamellar structure is determined by the cationic lipid, and the spherical morphology by the charge density of the DNA molecule [16]. On the other hand transfection efficiency was affected by the sized of plasmid DNA molecule; i.e. small DNA molecules had higher transfection efficiencies than larger ones. This may be due to the limiting diffusion of large DNA molecules from the endosomal compartment to the cytosol and to the nuclear pore complex into the nucleus [48].

3.4. Large-Sized Lipoplexes Promote Efficient Gene Transfer *In Vitro*

Lipoplex size and stability were also shown to be key parameters affecting transfection efficiency. In particular, large-sized, colloiddally unstable lipoplexes with a mean diameter over 700 nm induced efficient transfection in the presence or in the absence of serum [15, 49]. On the other hand, colloiddally stable complexes of less than 200 nm in diameter led to efficient transfection only in the absence of serum. These colloiddally stable or unstable lipoplexes could be obtained by varying the reaction mixture conditions such as NaCl concentration, pH, DNA concentration. The clear correlation between large-sized lipoplexes and high levels of transgene expression was shown to be independent of both the percent DNA internalized into cells and the lamellar organization of the cationic lipid/DNA lipoplexes.

Beyond these observations, lipoplexes uptake is submitted to the considerable flexibility of the cell surface. Existing machineries such as macropinocytosis, caveolae and clathrin-mediated endocytosis are capable to trigger the engulfment of the DNA complexes. Evidences exist showing that the size of the complexes may help in determining the endocytosis pathway [50]. However there is no clear consensus on the relationship between the complex size and their internalization mechanism since also changes in chemical nature of the compound may affect the pathway of complex entry [51].

4. NEW CLASSES OF VECTORS PROMOTE HIGH GENE TRANSFER *IN VIVO*

As presented in this review most of the non viral vectors are based on strongly positively charged molecules which are forming interpolyelectrolyte complexes with the negatively charged DNA. These vectors have clearly demonstrated their transfection efficiency *in vitro*. However, aggregations in tissue fluids, toxicity and low *in vivo* efficiency have thus far hampered their clinical used. These observations prompted researchers to explore and define new breakthrough approaches for *in vivo* gene transfer. In this context, others polymers displaying few or no charges have been recently developed and appear very promising to transfect efficiently and safely various organs *in vivo* after loco-regional administration in muscle and heart [52-57], lung [58] and eyes [59]. These block polymers consisting of poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(propylene oxide) (PPO) exhibit amphiphilic properties in aqueous solutions, because PPO homopolymer phase-separates from water at relative low temperature, whereas POE is well soluble in water. Slightly positively charged polymers are amphiphilic block copoly-

mers displaying a four-branched star structure. Each branch is composed of hydrophilic POE and hydrophobic PPO blocks fixed on a central diamine bearing 2 protonable tertiary amines depending on the pH. Molecular weight and hydrophilic/lipophilic balance of the block copolymers depend on the chemical composition of the molecule and especially on the relative amounts of each hydrophilic and hydrophobic block. These block copolymers are displaying amphiphilic properties and can form in solution, depending on the concentration, temperature, ionic strength and pH, micelles and various lyotropic liquid crystalline phases including lamellar structure. These block copolymers are widely used in pharmaceutical science for various applications such as the increasing of circulation time of nanoparticles by preventing their capture by the mononuclear phagocyte system which participate in their destabilization and their removal from the blood... The physicochemical characterization of DNA complexed with these block copolymers showed the formation of negatively charged nanospheres with DNA molecules wrapped around solid spheres of 50 nm in diameter. The new nanostructured material, the structure of which clearly contrasts with that of lipoplexes, where DNA molecules are entrapped inside the particles, efficiently transferred reporter and therapeutic genes in skeletal and heart muscle *in vivo*.

Uncharged (non-ionic) polymers consist of linear triblock copolymers with blocks composed of PEO and PPO. Thus, as PEO and PPO are present in the same molecule, triblock copolymers display also amphiphilic properties. Modifying the degree of polymerization of ethylene oxide and propylene oxide leads to the variation of the molecular weight and also hydrophobe/hydrophile composition. As a function of the concentration of the triblock copolymer and the medium composition they can form spherical assemblies with a core consisting of the water-insoluble PPO blocks and a corona composed of hydrated PEO segments. In addition to forming micelles in solution, triblock copolymers self-assemble into a great variety of lyotropic liquid crystals. A large number of applied studies exploit the self-assembly and surface activity properties of PEO/PPO block copolymers primarily in the pharmaceutical-biomedical field to allow for instance the solubilization of some hydrophobic drugs. More recently, the capacity of these triblock copolymers to enhance gene transfection efficiency *in vivo* has drawn particular attention on their potentialities as gene delivery systems. Different members of the triblock copolymer family have been evaluated successfully *in vivo* following loco regional injection and a study on their structure-function relationships has been described [60]. Tetrafunctional block copolymers and linear triblock copolymers share in common the presence of PEO and PPO segments in the same molecule, the capacity of dramatically enhancing the transfection efficiency *in vivo* compared to naked DNA and the absence of transfection in *in vitro* cultured cells. For that reasons they are clearly contrasting with cationic lipid that allow high transfection efficiency *in vitro* and the decrease of transgene expression obtained with naked DNA *in vivo* after intra muscular injection. The mechanism by which the block copolymers promote gene expression *in vivo* appears as markedly different from cationic lipid but remains unfortunately unclear.

5. CONCLUDING REMARKS

The understanding of the lipoplexes physicochemical characteristics involved in the *in vitro* transfection efficiency is increasing. However, there is still limited understanding of lipoplexes behavior inside cells. In particular, correlations need to be established between the supramolecular assemblies formed by lipoplexes and all steps that lead to transfection. Correlations between morphological parameters (size, shape), charge ratio, chemical surface, pathway of entry with regard to the transfection efficiency is highly desirable in the rational development of gene delivery system.

Over the last several years, various cationic lipids have been developed and shown to be highly efficient for gene transfection *in vitro*. In contrast, their *in vivo* efficiency was less satisfactory, whereas very promising results have been reported with block copolymers after loco-regional administration in muscular tissues and lung for the expression of local or systemic protein of therapeutic interest.

Although the mechanism underlying transfection with cationic lipid and block copolymers is not well understood, progress has been made to understand the physicochemical properties of the supramolecular assemblies. Thus, knowing both cellular and *in vivo* barriers to gene delivery by non viral vectors, their design can nowadays be improved by the progressive better understanding of the relationships between the physicochemistry properties of complexes and their transfection efficiency.

ACKNOWLEDGEMENTS

This contribution was sustained by the University of Nantes and funded by grants from the European Commission (Project SyntheGeneDelivery, N°018716), the CNRS, the INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, the "Association Française contre la Myopathie" (Evry, France), "Vaincre la Mucoviscidose" (Paris, France) and In-Cell-Art (Nantes, France). We are also grateful to our colleagues from several years for fruitful discussions. Emilie Letrou-Bonneval holds doctoral fellowship from "Vaincre la Mucoviscidose".

ABBREVIATIONS

DOTAP	=	Dioleoyl trimethylammonium propane
DODAB	=	Diocetadecyldiammonium bromide
EDOPC	=	1,2-Dioleoyl-sn3-ethylphosphocholine
DOPE	=	Dioleoylphosphatidylethanolamine
BGTC	=	Bisguanidinium tren cholesterol
DOGS	=	Dioactadecylamidoglycylspermine
DOTAU	=	N-(5'-(2',3''-dioleoyl)uridine)-N',N',N'-trimethylammonium dioctadecyldiammonium bromide
DOPC	=	Dioleoylphosphatidylcholine
PEO	=	Poly(ethylene oxide)
PPO	=	Poly(propylene oxide)

SAXS = Small angle x-rays scattering
 TEM = Transmission electron microscopy.

REFERENCES

- [1] Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L, Jessee JA, Seymour L, Szoka F, Thierry AR, Wagner E, Wu G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 511-2.
- [2] Anson DS, Smith GJ, Parsons DW. Gene therapy for cystic fibrosis airway disease- is clinical success imminent?. *Curr Gene Ther* 2006; 6: 161-79.
- [3] Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 1989; 337: 387-8.
- [4] Sternberg B, Sorgi F, Huang L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett* 1994; 3356: 361-6.
- [5] Gershon H, Ghirlando R, Guttman S, Minsky A. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry* 1993; 32: 7143-51.
- [6] Gustafsson J, Arvidson G, Karlsson G, Almgren, M. Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1235: 305-12.
- [7] Stamatatos L, Leventis R, Zuckerman MJ, Silvius JR. Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochemistry* 1988; 27: 3917-25.
- [8] Byk G, Dubertret C, Escriou V, Frederic M, Jaslin G, Rangara R, Pitard B, Crouzet J, Wils P, Schwartz B, Scherman D. Synthesis, activity and SAR studies of Novel cationic lipids for DNA transfer. *J Med Chem* 1998; 41: 224-235.
- [9] Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergely L, Bradley JC, Basseville M, Lehn P, Lehn JM. Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9682-6.
- [10] Belmont P, Aissauoui A, Hauchecorne M, Oudrhiri N, Petit L, Vigneron JP, Lehn JM, Lehn P. Aminoglycoside-derived cationic lipids as efficient vectors for gene transfection *in vitro* and *in vivo*. *J Gene Med* 2002; 4: 517-26.
- [11] Desigaux L, Sainlos M, Lambert O, Chevre R, Letrou-Bonneval E, Vigneron JP, Lehn P, Lehn JM, Pitard B. Self-assembled lamellar complexes of siRNA with lipidic aminoglycoside derivatives promote efficient siRNA delivery and interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 16534-9.
- [12] Ferrari M, Nguyen C.M, Zelphati O, Tsai Y, Felgner P. Analytical Methods for the characterization of cationic lipid-Nucleic Acid complexes. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 341-51.
- [13] Eastman S.J, Siegel C, Tousignant J, Smith A.E, Cheng S.H, Scheule R.K. Biophysical characterization of cationic lipid :DNA complexes. *Biochim. Biophys Acta* 1997; 1325: 41-62.
- [14] Bhattacharya S, Mandal S. Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on interaction and DNA melting. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1323: 29-44.
- [15] Turek J, Dubertret C, Jaslin G, Antonakis K, Scherman D, Pitard B. Formulations which increase the size of lipoplexes prevent serum-associated inhibition of transfection. *J Gene Med* 2000; 2: 32-40.
- [16] Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre O, Airiau M, Scherman D, Crouzet J, Pitard B. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 3792-8.
- [17] Blessing T, Remy JS, Behr JP. Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1427-31.
- [18] Ouyang M, Remy JS, Szoka FC Jr. Controlled template-assisted assembly of plasmid DNA into nanometric particles with high DNA concentration. *Bioconjug Chem* 2000; 11: 104-12.
- [19] Fabio K, Di Giorgio C, Vierling P. New perfluorinated polycationic dimerizable detergents for the formulation of monomolecular DNA nanoparticles and their *in vitro* transfection efficiency. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1724: 203-14.
- [20] Raedler JO, Koltover I, Salditt T, Safinya CR. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 1997; 275: 810-14.
- [21] Lasic D, Strey H, Stuart M, Podgornik R, Frederik PM. The structure of DNA-liposome complexes. *J Am Chem Soc* 1997; 119: 832-3.
- [22] Mel'nikova Y, Mel'nikov SM and Löfroth JE. Physico-chemical aspects of the interaction between DNA and oppositely charged mixed liposomes. *Biophys Chem* 1999; 81: 125-41.
- [23] MacDonald RC, Ashley GW, Shida MM, Rakhmanova VA, Tarahovsky YS, Pantazatos DP, Kennedy MT, Pozharski EV, Baker, KA, Jones RD, Rosenzweig HS, Choi KL, Qiu R and Mcintosh TJ. Physical and biological properties of cationic triesters of phosphatidylcholine. *Biophys J* 1999; 77: 2612-29.
- [24] Pitard B, Oudrhiri N, Vigneron JP et al. Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2621-6.
- [25] Boukhnikachvili T, Aguerre-Chariol O, Airiau M, Lesieur S, Ollivon M, Vacus J. Structure of in-serum transfecting DNA-cationic lipid complexes. *FEBS Lett* 1997; 409: 188-94.
- [26] Chabaud P, Camplo M, Payet D, Serin G, Moreau L, Barthélémy P, Grinstaff MW. Cationic nucleoside lipids for gene delivery. *Bioconjug Chem* 2006; 17: 466-72.
- [27] Koltover I, Salditt T, Rädler J.O, Safinya, C.R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* 1998; 281: 78-81.
- [28] Pitard B, Aguerre O, Airiau M, et al. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1997; 14412-17.
- [29] Schmutz M, Durand D, Debin A, Palvadeau Y, Etienne A and Thierry AR. DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12293-8.
- [30] Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugas O, Furstemberger P, Oberling F, Brambilla E, Behr J.-P. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 1996; 3: 1010-7.
- [31] Hubner S, Battersby B.J, Grimm R, Cevc G. Lipid-DNA complex formation: reorganization and rupture of lipid vesicles in the presence of DNA as observed by cryoelectron microscopy. *Biophys J* 1999; 76: 3158-66.
- [32] Templeton N, Lasic D, Frederik P, Strey H, Roberts D, Pavlakis G. Improved DNA : liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 647-52.
- [33] Battersby B.J, Grimm R, Huebner S, Cevc G. Evidence for three-dimensional interlayer correlations in cationic lipid-DNA complexes as observed by cryo-electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1372: 379-83.
- [34] Xu Y, Hui SW, Frederik P, Szoka FC. Physicochemical characterization and purification of cationic lipoplexes. *Biophys. J* 1999; 77: 341-53.
- [35] Pitard B, Oudrhiri N, Lambert O, Vivien E, Masson C, Wetzer B, Hauchecorne M, Scherman D, Rigaud JL, Vigneron JP, Lehn JM, Lehn P. Sterically stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways *in vivo*. *J Gene Med* 2001; 3: 478-87.
- [36] Felgner P.L, Gadek T.R, Holm M, Roman R, Chan H.W, Wenz M, Northrop J.P, Ringold G.M, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7.
- [37] Behr J.P, Demeneix B, Loeffler J.P, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6982-6.
- [38] Gao XA, Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 280-5.
- [39] Guillot-Nieckowski M, Joester D, Stöhr M, Losson M, Adrian M, Wagner B, Kansy M, Heinzelmann H, Pugin R, Diederich F, Gallani J.L. Self-assembly, DNA complexation, and pH response of amphiphilic dendrimers for gene transfection. *Langmuir* 2007; 23: 737-46.
- [40] Ahmad A, Evans HM, Ewert K, George CX, Samuel CE, Safinya CR. New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery. *J Gene Med* 2005; 7: 739-48.
- [41] Farago O, Ewert K, Ahmad A, Evans HM, Grønbech-Jensen N, Safinya CR. Transitions between distinct compaction regimes in

- complexes of multivalent cationic lipids and DNA. *Biophys J* 2008; 95: 836-46.
- [42] Lin AJ, Slack NL, Ahmad A, George CX, Samuel CE, Safinya CR. Three-dimensional imaging of lipid gene-carriers: membrane charge density controls universal transfection behavior in lamellar cationic liposome-DNA complexes. *Biophys J* 2003; 84: 3307-16.
- [43] Bloomfield VA. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* 1997; 44: 269-82.
- [44] Lambert O, Letellier L, Gelbart WM, Rigaud JL. DNA delivery by phage as a strategy for encapsulating toroidal condensates of arbitrary size into liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7248-53.
- [45] Hud NV, Downing KH. Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14925-30.
- [46] Lin A.J, Slack N.L, Ahmad A, Koltover I, George CX, Samuel CE and Safinya CR Structure and structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes. *J Drug Target* 2000; 8: 13-27.
- [47] Vilaboa N, Voellmy R. Regulatable gene expression systems for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2006; 6: 421-38.
- [48] Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, *et al.* Size dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2000; 275: 1625-9.
- [49] Ross PC and Hui SW Lipoplex size is a major determinant of *in vitro* lipofection efficiency. *Gene Ther* 1999; 6: 651-9.
- [50] Rejman J, Wagenaar A, Engberts JB, Hoekstra D. Characterization and transfection properties of lipoplexes stabilized with novel exchangeable polyethylene glycol-lipid conjugates. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1660: 41-52.
- [51] Mennesson E, Erbacher P, Piller V, Kieda C, Midoux P, Pichon C. Transfection efficiency and uptake process of polyplexes in human lung endothelial cells: a comparative study in non-polarized and polarized cells. *J Gene Med* 2005; 7: 729-38.
- [52] Lemieux P, Guerin N, Paradis G, Proulx R., Chistyakova L., Kabanov A., Alakhov V. A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 2000; 7: 986-99.
- [53] Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin J T, Cherel Y, Abadie J, Samuel JL, Rigaud JL, Menoret S, Anegon I, Escande D. A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery *in vivo* to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1767-75.
- [54] Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, Richard P, Desigaux L, Fernandes S, Lanctin C, Pollard H, Zeghal M, Rescan PY, Escande D. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanoparticles for *in vivo* gene transfer. *Nucleic Acids Res* 2004; 32, e159.
- [55] Richard P, Pollard H, Lanctin C, Bello-Roufai M, Desigaux L, Escande D, Pitard B.. Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation. *J Gene Med* 2005; 7: 80-6.
- [56] Richard P, Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, Pitard B.. Amphiphilic block copolymers promote gene delivery *in vivo* to pathological skeletal muscles. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1318-24.
- [57] Richard-Fiardo P, Payen E, Chèvre R, Zuber J, Letrou-Bonneval E, Beuzard Y, Pitard B. Therapy of anemia in kidney failure, using plasmid encoding erythropoietin. *Hum Gene Ther* 2008; 9: 331-42.
- [58] Desigaux L, Gourden C, Bello-Roufai M, Richard P, Oudrhiri N, Lehn P, Escande D, Pollard H, Pitard B. Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 2005; 16:821-29.
- [59] Liaw J, Chang SF, Hsiao FC. *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* 2001; 8: 999-1004.
- [60] Bello-Roufai M, Lambert O, Pitard B.. Relationships between the physicochemical properties of an amphiphilic triblock copolymers/DNA complexes and their intramuscular transfection efficiency. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 728-39.

Résumé

Etude du mécanisme d'action des copolymères à blocs amphiphiles pour le transfert de gène in vivo

Les copolymères à blocs amphiphiles comptent aujourd'hui parmi les vecteurs les plus efficaces pour le transfert de gène in vivo dans de nombreux tissus tels que le muscle squelettique, le cœur ou les poumons. Le mécanisme d'action de ces vecteurs demeure peu connu, et l'étude de ce mécanisme représente un enjeu majeur pour leur futur développement clinique. Au cours de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au Lutrol[®], polymère efficace in vivo et déjà admis par les pharmacopées internationales.

L'incapacité de ces molécules à transfecter des cellules en culture suggère que l'environnement cellulaire détermine leur mécanisme d'action. Afin d'étudier le mécanisme de ces vecteurs au niveau cellulaire, nous avons conçu un modèle permettant d'observer le mécanisme du Lutrol[®] sur les différentes étapes du trajet des acides nucléiques, depuis l'internalisation du transgène jusqu'à son expression. En utilisant plusieurs stratégies in vitro faisant intervenir le Lutrol[®] en association directe ou indirecte avec les vecteurs cationiques, nous avons déterminé son niveau d'implication dans la transfection, son rôle au niveau de la cellule et des acides nucléiques, mais également les raisons de son inaptitude à transfecter des cellules en culture en identifiant les barrières limitant son utilisation in vitro.

Les résultats obtenus suggèrent fortement que le Lutrol[®] améliore l'efficacité de transfection par un mécanisme physico-chimique inerte et passif, aboutissant in vivo à une internalisation cellulaire du plasmide par un mécanisme de délivrance directe dans le cytoplasme, indépendant de l'endocytose, et donc en rupture avec celui des lipides cationiques.

Mots-clés : transfert de gène non-viral, copolymères à blocs amphiphiles, transfection, ADN, siARN

Abstract

A mechanistic study of amphiphilic block copolymers as new in vivo gene transfer vectors

Amphiphilic block copolymers have been developed recently for their efficient in vivo transfection activities in various tissues including skeletal muscle, heart and lung. However their mechanism of action remains unknown and better understanding of this mechanism represents a major goal for the future development of this new class of vectors. In this study, we particularly focused on Lutrol[®], an FDA approved polymer, because of its high in vivo efficiency and remarkably low toxicity.

As block copolymers does not allow the transfection of cultured cells in vitro, we suggested that the cell environment was strongly involved in their mechanism of action. In order to evaluate the mechanism of these polymers at the cellular level, we designed a model allowing us to observe the impact of Lutrol[®] on the different steps involved in the nucleic acids trafficking, from the transgene internalisation to its expression. Using several in vitro transfection strategies involving direct or indirect assemblies of Lutrol[®] / nucleic acids / cationic vectors, we attempted to elucidate which steps were influenced by lutrol, its role on nucleic acids and cells, but also the reasons of its in vitro transfection inability.

Results presented in this report strongly suggest that Lutrol[®] improves transfection efficiency by a passive and inert physico-chemical mechanism, leading to the enhancement of cellular uptake through a direct delivery mechanism into the cell cytoplasm, and not via an endosomal pathway, strongly contrasting with cationic lipids internalisation pathway.

Keywords : non-viral gene transfer, amphiphilic block copolymers, transfection, DNA, siRNA

Raphaël CHEVRE

INSERM UMR 915, l'institut du thorax

IRT-UN, 8 quai Moncousu BP 70721 44007 Nantes Cedex 01

raphael.chevre@univ-nantes.fr