

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**VECTORISATION SYNTHETIQUE
D'ACIDES NUCLEIQUES**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE de Nantes
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

*présentée
et soutenue publiquement par*

Léa DESIGAUX

le 5 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Dr. Isabelle FAJAC, *Praticien Hospitalier, Maître de Conférence de l'Université de Paris 5 – Site Cochin.*

Pr. Hervé CHERADAME, *Professeur de l'Université d'Evry.*

Examineurs :

Pr. Denis ESCANDE, *Praticien Hospitalier, Professeur de l'Université de Nantes - L'Institut du Thorax, Inserm U533.*

Pr. Pierre LEHN, *Praticien Hospitalier, Professeur de l'Université de Brest – Inserm U613.*

Pr. Jacques LEBRETON, *Professeur de l'Université de Nantes – Faculté des Sciences de Nantes.*

Directeur de thèse :

Dr. Bruno PITARD, *Chargé de Recherche CNRS - L'institut du Thorax – Inserm U533.*

SOMMAIRE

Remerciements.....	2
Abréviations.....	4
Introduction.....	7
Généralités.....	12
Tables des matières.....	12
Le transfert d'acides nucléiques.....	13
Les différents types d'acides nucléiques.....	13
Les techniques de transfert d'acides nucléiques.....	33
Les barrières biologiques dans la vectorisation synthétique.....	36
Critères de développement d'un vecteur synthétiques.....	47
Vecteurs synthétiques : les différents concepts.....	49
L'auto-assemblage des acides nucléiques et des vecteurs cationiques...49	
L'ADN : catalyseur et support de synthèse du vecteur synthétiques.....	70
Encapsulation de l'ADN dans des nanoparticules.....	79
Objectifs de l'étude.....	88
Matériel et Méthodes.....	89
Résultats.....	96
Les systèmes auto-assemblés.....	97
Inhibition d'expression par ARN interférence.....	97
Transfert de gènes <i>in vivo</i>	111
Les hydroxydes doubles lamellaires.....	124
Conclusions, Discussion et Perspectives	133
Bibliographie.....	143
Annexes.....
Article 1 : Non ionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the Lung	
Article 2 : Self-assembly and characterization of layerd double hydroxide/DNA Hybrids	
Article 3 : Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for <i>in vivo</i> gene transfer	
Article 4 : Amphiphilic block copolymers promote gene delivery <i>in vivo</i> to pathological skeletal muscle	

ABREVIATIONS

(E/H)/E	émulsion « eau dans l'huile, dans l'eau »
+/-	rapport de charges positives/charges négatives
304	poloxamine 304 ([poly(éthylèneoxyde) ₁₃ -poly(propylèneoxyde) ₃₀] ₂ -ethylènediamine-[poly(éthylèneoxyde) ₁₃ -poly(propylèneoxyde) ₃₀] ₂)
704	poloxamine 704 ([poly(éthylèneoxyde) ₁₃ -poly(propylèneoxyde) ₃₀] ₂ -ethylènediamine-[poly(éthylèneoxyde) ₁₃ -poly(propylèneoxyde) ₃₀] ₂)
AAP	azobis(2-amidino-propane)
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN _L	fragments d'ADN de 6000 à 8000 pb
ADN _S	fragments d'ADN de 100 à 500 pb
AEPD	bis(2-amioéthyl)-1,3-propanediamine
AFM	« Atomic Force Microscopy »
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double-brin
ARNi	interférence ARN
ARNm	ARN messenger
BET	bromure d'éthidium
BGSC	(bis(guanidinium)-spermine-cholesterol)
BGTC	(bis(guanidinium)-tren-cholesterol)
CAT	enzyme Chloramphénicol-Acéthyl-Transférase
CdiA	N,N'-Dinonacrylate-N,N,N',N'-tetraméthylpropane-diammonium bromide
CFTR	« Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator »
cmc	Concentration Micellaire Critique
COS-7	fibroblastes de rein de singe vert d'Afrique
cryo-TEM	cryo-microscopie électronique à transmission
<i>d</i>	distance inter-feuillet
d2GFP	cellules obtenue à partir de la lignée H1299 carcinome de cancer de poumon humain
DC-Chol	(3[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholesterol)
DOGS	dioctadécylamine-glycine-spermine
DOPC	dioléoylphosphatidylcholine
DOPE	di-oléoylphosphatidyléthanolamine
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	méthylsulfate de dioléylloxypropyl-triméthylammonium
DOTMA	chlorure de diolelyloxypropyltriméthyl-ammonium
DPDPB	1,4-di[3',2'-pyridyldithio-(propionamido)butane]
DSP	dithiobis succinimidyl propionate
DTBP	diméthyl-3,3'-dithiobis propionimide
E/H	émulsion « eau dans l'huile »
ELISA	« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay »
EO	éthylène oxyde
EPO	érythropoïétine murine
F127	pluronic F127
F68	pluronic F68 (appelé Lutrol®)
GFP	protéine fluorescente en vert (« Green Fluorescent Protein »)

GFP-CFTR	protéine de fusion contenant la protéine CFTR et la protéine GFP
H/E	émulsion « huile dans l'eau »
HDL	hydroxydes double lamellaires
HE	phase hexagonale inversée
HeLa	cellules tumorales issues d'un carcinome du col utérin
HSPGs	protéoglycanes du type sulfate d'héparine
IL-6	interleukine-6
L61	pluronic L61
L64	pluronic L64 (appelé également PE6400)
LNA	« Locked Nucleic Acid »
Lutrol®	(poly(éthylèneoxyde) ₇₅ -poly(propylèneoxyde) ₁₃ - poly(éthylèneoxyde) ₇₅)
M	ion métallique
Mg ₂ Al, Mg ₂ Fe et	HDL composé de magnésium-aluminium, magnésium-fer et de magnésium-
Mg ₂ Ga	gallium, respectivement
miARN	microARN
motifs CpG	dinucléotide CpG non méthylé (ou « motif CpG »)
N/P	rapport azotes/phosphates
NaCl	chlorure de sodium
ODN(s)	OligoDeoxyNucleotides antisens
P123	pluronic P123
PAMAM	polyamidoamine
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	phosphatidylcholine
pCIK-Cat	plasmide codant pour le gène rapporteur de la CAT
pCMV	promoteur précoce du cytomégalovirus humain
pCMV-LacZ	plasmide codant pour le gène rapporteur de la β-Galactosidase
pCMV-luc	plasmide codant pour le gène rapporteur de la Luciférase
PE6400	(poly(éthylèneoxyde) ₁₃ -poly(propylèneoxyde) ₃₀ - poly(éthylèneoxyde) ₁₃)
PEG	poly(éthylène-glycol)
PEG-AEPD	N ₂ ,N ₂ ,N ₃ ,N ₃ (3'-PEG ₅₀₀₀ aminopropane)bis(2-aminoéthyl)-1,-3-propanedi amonium
	di-trifluoroacetate
PEI	polyéthylène-imine
PEO	poly(éthylène oxyde)
PG	phosphatidylglycerol
PGA	poly(glycolic acid)
PKR	complexe qui contient une protéine kinase et un signal de transduction
PLA	poly(lactic-acid)
PLGA	poly(glycolactic-acid)
PLL	polylysine
PO	propylène oxyde
PPO	poly(propylène oxyde)
PS	phosphatidylsérine
pTER	plasmide codant pour le shARN dirigé contre la GFP
PVA	poly(vinyl-alcool)
PVP	poly-(vinyl)pirrolidone
RISC	« RNA-Induced Silencing Complex »
RNase-H	ribonucléase H
SAXS	« Small Angle X-Rays Scattering »
SDF	« Small DNA Fragments »
SEM	Microscopie électronique à balayage
SFHR	« Small Fragment Homologous Replacement »
SFM	« Scanning Force Microscopy »
shARN	« short-hairpin » ARN
siARN	« small interfering » ARN

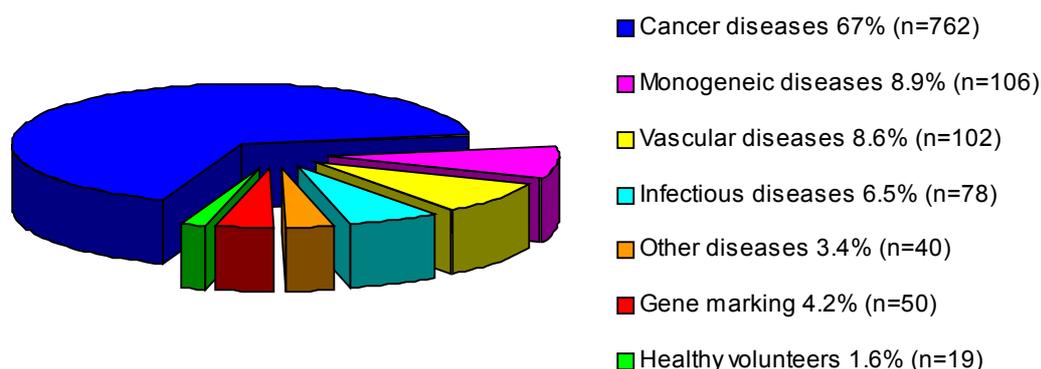
SP1017	mélange des pluronics L61 et F127
SPAN 60	sorbitane mono-stéarate
SPAN 85	sorbitane tri-oléate
SV40	promoteur précoce du virus simien SV40
TAE	tampon Tris-Acétate-EDTA
TGA	analyses thermogravimétriques
TOTO	sonde fluorescente s'intercalant entre les base d'ADN
Tyrode 2X	solution composée de NaCl 280 mM, KCl 12 mM, CaCl ₂ 6 mM, MgCl ₂ 4 mM, HEPES 20 mM et Glucose 20 mM
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
YOYO-1	sonde fluorescente s'intercalant entre les bases d'ADN

INTRODUCTION

La présence d'une mutation sur un gène, peut modifier la composition protéique de la cellule provoquant ainsi un dysfonctionnement cellulaire responsable de certaines maladies génétiques héréditaires ou acquises. Ces maladies pourraient être traitées par thérapie génique, en insérant dans la cellule une copie fonctionnelle du gène muté, afin de restaurer la composition protéique de la cellule et de rétablir ainsi son bon fonctionnement.

Les recherches dans le domaine de la thérapie génique visaient surtout à corriger les maladies héréditaires, telles l'hémophilie, la mucoviscidose ou les myopathies, mais les espoirs suscités par cette nouvelle technique se sont vite répandus aux maladies acquises, tels que les cancers, les maladies neurodégénératives ou les pathologies infectieuses (hépatites, SIDA). En effet, ces pathologies font aujourd'hui l'objet de nombreux essais cliniques ().

Essais cliniques en thérapie génique



: Répartition du pourcentage de protocoles cliniques par maladies. (chiffres actualisés au 1^{er} Janvier 2006 : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

La majorité des essais cliniques se déroule aux Etats-Unis et dans les pays industrialisés (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>). Cependant, malgré le grand nombre d'essais en thérapie génique engagés, les résultats significatifs sont peu nombreux. Le décès d'un patient aux Etats-Unis en 1999 au cours d'un protocole de thérapie génique (Carmen *et al.*, 2001) a remis en cause la faisabilité de tels traitements. Mais en 2000 le Dr. Fisher et son équipe a réalisé un protocole clinique et a permis la guérison d'enfants atteints d'un déficit immunitaire sévère lié à l'X (« bébés bulles ») (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2001 ; Fisher *et al.*, 2002).

Néanmoins, les derniers essais ont montré les limites de cette thérapie car certains enfants ont développé des leucémies à la suite de l'activation d'oncogènes provoquée par l'insertion du transgène (Gene Therapy trials. <http://www.search.wiley.com>).

D'autres résultats récents, pour le traitement de la pathologie ADA-SCID (absence de l'adénosine désaminase qui prive le sujet de système immunitaire) sont encourageants car les enfants traités par le gène de l'enzyme ont vu peu à peu leur système immunitaire se régénérer (Aiuti *et al.*, 2002).

Si le principe de la thérapie génique repose sur l'idée simple de transférer dans les cellules cibles de l'organisme le gène thérapeutique, sa mise en application est beaucoup plus complexe car la pénétration spontanée d'une molécule d'acides nucléiques (ADN ou ARN) dans une cellule est un événement exceptionnel. En effet, les acides nucléiques sont des molécules polyanioniques hydrophiles de grande taille qui ne sont pas aptes à traverser les membranes cellulaires, constituées d'une bicouche lipidique hydrophobe et chargées négativement. C'est pourquoi, différents *systèmes de transfert d'acides nucléiques* ont été développés depuis les années 1980 : soit l'acide nucléique est introduit dans les cellules cibles à l'aide d'une technique physique, soit à l'aide d'un *vecteur*. Le vecteur constitue un élément clé du succès de la thérapie génique. Son rôle est décisif car il permet de contenir les molécules d'acides nucléiques, de les vectoriser dans un nombre suffisant de cellules cibles et de les transporter jusqu'au noyau de la cellule.

La vectorisation d'acides nucléiques est un protocole qui peut se décrire en quatre principales étapes :

- ◆ Isoler, cloner ou synthétiser le gène d'intérêt thérapeutique ou d'autres types de molécules d'acides nucléiques.
- ◆ Réaliser un vecteur qui aura pour rôle de vectoriser les acides nucléiques dans le noyau cellulaire : cette étape est décisive dans l'efficacité du traitement thérapeutique.
- ◆ Administrer le vecteur au patient : trois principaux protocoles sont actuellement possibles :
 - La thérapie génique *ex-vivo* : elle consiste à prélever sur le patient les cellules cibles, à les modifier génétiquement par transfert d'acides nucléiques, puis à les réintroduire chez le patient. Cette méthode est utilisée par exemple pour les cellules sanguines qui sont faciles à prélever et à réintroduire. Cependant, ce protocole présente des limites pour d'autres types cellulaires qui ne peuvent ni être facilement prélevés, ni efficacement réinjectés.
 - La thérapie génique *in situ* : le vecteur d'acides nucléiques est directement injecté au sein du tissu cible (injection intra-musculaire, intra-trachéale...)

- La thérapie génique *in vivo* : le vecteur est directement injecté dans la circulation sanguine, celui-ci devant atteindre, via la circulation, les cellules cibles.
- ◆ Vérifier l'activité biologique des acides nucléiques transfectés, leur efficacité dans le temps, et leur effet thérapeutique.

Actuellement on distingue deux grandes familles de systèmes de vectorisation d'acides nucléiques, les vecteurs synthétiques et les vecteurs viraux. Ces derniers possèdent de nombreux avantages en termes d'efficacité d'infection des acides nucléiques, cependant ils souffrent de sévères inconvénients. En effet, les vecteurs viraux sont souvent limités par la taille du transgène à véhiculer, ils engendrent des réactions immunitaires et certains peuvent être pathogènes. D'autre part, leur production est le plus souvent très coûteuse.

Les vecteurs synthétiques ont connu un essor considérable depuis une quinzaine d'années. En effet, les vecteurs synthétiques sont simples à élaborer et peu immunogènes. Actuellement, il existe une multitude de vecteurs synthétiques qui sont des dérivés lipidiques ou polymériques. Au cours de ces dernières années, le développement des vecteurs synthétiques s'est orienté vers l'utilisation de polymères ou de lipides, biodégradables ou possédant des fonctions chimiques naturellement présentes dans la cellule. Pour être efficaces, les vecteurs synthétiques doivent répondre à plusieurs critères :

- ✓ Protéger les acides nucléiques des attaques enzymatiques des nucléases
- ✓ Empaqueter les acides nucléiques de petites et de grandes tailles
- ✓ Simplicité de leur administration
- ✓ Stabilité dans les fluides biologiques
- ✓ Cibler un type cellulaire spécifique
- ✓ Augmenter la transfection des acides nucléiques dans les cellules
- ✓ Transport des acides nucléiques jusqu'au noyau
- ✓ Libération des acides nucléiques dans la cellule
- ✓ Non toxiques, non immunogènes, non pathogènes

Les lipides et les polymères utilisés dans les systèmes de vectorisation sont capables de s'assembler pour former avec l'ADN des complexes vecteur/ADN appelé lipoplexes et polyplexes, respectivement. Les propriétés physico-chimiques des complexes vecteur/ADN dépendent principalement du rapport de charges positives/charges négatives et de la structure initiale du lipide ou du polymère cationique. En effet, il a été montré qu'il existait une relation entre les caractéristiques physico-chimique des complexes (taille, charge de surface, stabilité colloïdale, entre autres) et l'efficacité de transfection de l'ADN. Cette relation structure/activité, qui peut varier selon le type de vecteur utilisé, a permis de déterminer les paramètres qui contrôlent l'association du vecteur et de l'ADN, la stabilité dans les fluides biologiques, et la capacité d'interaction et de franchissement des membranes cellulaires. Ainsi,

l'évolution des vecteurs synthétiques au cours de ces dernières années a évolué vers la conception de nouveaux vecteurs. Les données de la littérature montrent que l'étude de la relation structure/activité a été principalement étudiée pour les molécules d'ADN plasmidique. Or, les mécanismes d'inhibition de l'expression d'un gène ou de correction *in situ* d'une mutation sur un gène font intervenir des petits fragments d'ARN et d'ADN. Il est aujourd'hui nécessaire de déterminer si ces petits fragments répondent aux mêmes relations structure/activité que l'ADN afin de maîtriser leur transfection dans la cellule.

Au niveau des vecteurs synthétiques, trois différents modes d'assemblage du vecteur et de l'ADN ont été distingués. Le premier mode d'assemblage est basé sur l'utilisation de molécules organiques fortement chargées positivement qui interagissent avec les phosphates de l'ADN chargé négativement. Ainsi, le vecteur cationique et l'ADN vont s'associer par interactions électrostatiques pour former un complexe où l'ADN est dans un état condensé. Le deuxième mode d'assemblage consiste à se servir de la molécule d'ADN comme support de synthèse du vecteur synthétique. La synthèse du vecteur par réaction d'oxydation ou de polymérisation est réalisée dans une solution contenant déjà les molécules d'ADN. Dans ces synthèses, l'ADN joue un rôle de catalyseur et de support de la réaction chimique entre les molécules initiales. Le vecteur est synthétisé sur mesure, autour de la molécule d'ADN. Enfin, le troisième mode d'assemblage fait intervenir un procédé de synthèse dans le but d'encapsuler les molécules d'ADN au sein d'une particule constituée d'une paroi, de nature lipidique ou polymérique, renfermant un cœur aqueux ou huileux dans lequel l'ADN est solubilisé. Cette particule se forme par des procédés d'émulsion qui nécessitent un apport d'énergie extérieur (chauffage, agitation mécanique ou magnétique).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au développement de nouveaux vecteurs synthétiques basés sur deux de ces trois différents concepts d'assemblage.

Ainsi, une nouvelle classe de lipides cationiques dérivés de composés naturels, les *aminoglycosides*, a été développée pour le transfert *in vitro* de petits fragments d'ARN double-brin dans l'objectif d'induire l'inhibition de l'expression d'un gène. Les propriétés physico-chimiques des complexes vecteurs/ARN ont été comparées aux complexes vecteurs/ADN, tout d'abord en analysant leur taille et leur efficacité de condensation de l'ADN ; puis en étudiant la morphologie des complexes formés par microscopie électronique. L'efficacité de transfection des dérivés lipidiques d'aminoglycosides a été évaluée en fonction de la quantité d'acides nucléiques et du rapport de charges lipides cationiques/acides nucléiques. Cette étude a permis de comparer les relations entre la structure des complexes et leur efficacité de transfection pour des complexes formulés en présence d'ADN plasmidique ou de petits fragments ARN.

Ensuite, une nouvelle classe de polymères amphiphiles, les *copolymères à blocs*, a été développée pour le transfert de gène *in vivo*, dans les cellules de l'épithélium bronchique et

alvéolaire chez la souris. En effet, les vecteurs synthétiques actuels souffrent d'une faible efficacité de transfection *in vivo*. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux systèmes de transfections. Les premiers types de copolymères à blocs développés, les triblocs, se sont montrés très efficaces pour le transfert d'un gène rapporteur par instillation dans les cellules épithéliales des poumons de souris, cependant leur efficacité a été nettement diminuée lors d'une administration par aérosolisation. Ainsi, une seconde classe de copolymères à blocs a été testée et a conduit à une bonne efficacité de transfection suite à une administration par aérosolisation, qui est un mode d'administration plus adapté à des applications cliniques.

Dans une troisième partie, j'ai étudié la synthèse de vecteurs synthétiques inorganiques et labiles à pH acide. Les vecteurs synthétiques actuels sont principalement des molécules organiques. L'utilisation de vecteurs synthétiques de nature inorganique est un concept original. Les matériaux inorganiques choisis ont été des hydroxydes double lamellaires (HDL), qui sont des feuillets inorganiques chargés positivement. Les HDL ont été réalisées en utilisant l'ADN comme support de synthèse afin de générer des complexes hybrides HDL/ADN. Les résultats ont montré que les HDL et l'ADN s'organisaient en une structure supramoléculaire dans laquelle les molécules d'ADN étaient intercalées entre les feuillets cationiques des HDL. Il a été montré qu'en milieu acide ces complexes HDL/ADN avaient la capacité de relarguer l'ADN des HDL par hydrolyse des feuillets hydroxydes. De plus, ces nouveaux complexes hybrides HDL/ADN ont montré leur capacité d'internalisation dans des cellules HeLa, et les expériences ont été réalisées en présence de petits fragments d'ADN et d'ADN plasmidique.

GENERALITES

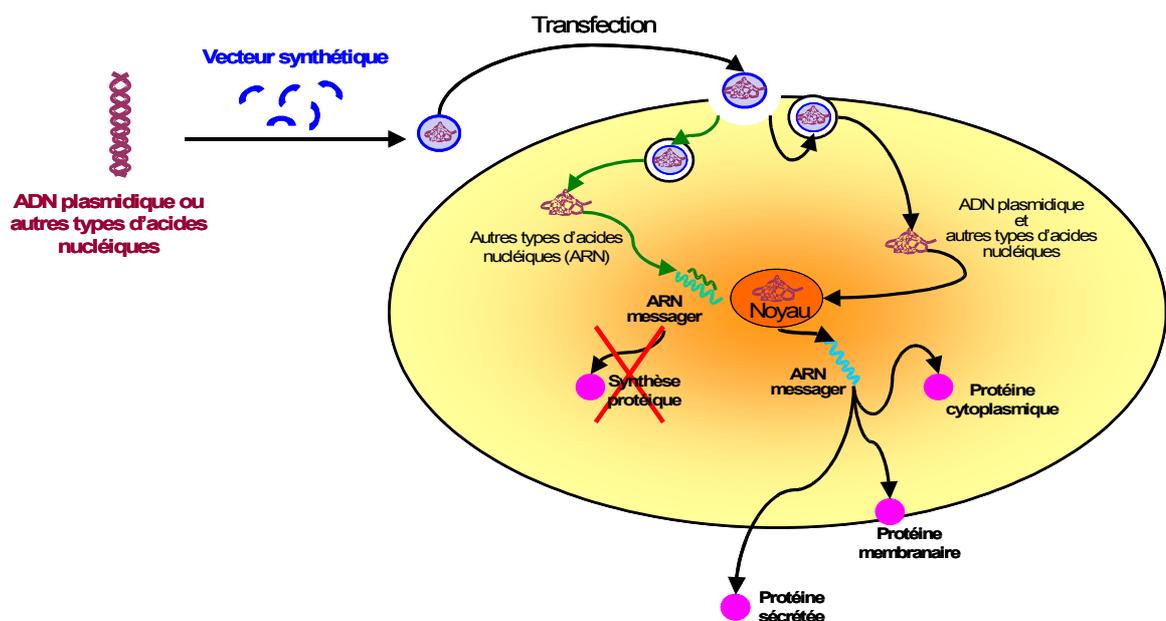
LE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES.....	15
I LES DIFFÉRENTS TYPES D'ACIDES NUCLEIQUES.....	15
I.1 Rétablir l'expression d'un gène : l'ADN plasmidique.....	16
I.2 Inhiber l'expression d'un gène : les technologies antisens.....	19
I.2.a Les antisens ODNs, les rybozymes et les DNazymes.....	19
I.2.b RNAi : le phénomène d'interférence ARN.....	21
I.2.c Avantages et inconvénients des technologies « antisens ».....	32
I.3 Modifier ou corriger l'expression d'un gène :.....	33
I.3.a Les SFHR.....	33
I.3.b Les chiméraplastes.....	35
I.3.c Le saut d'exon.....	36
II LES TECHNIQUES DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES.....	38
II.1 L'injection d'ADN nu.....	38
II.2 L'utilisation de techniques mécaniques ou physiques.....	38
II.3 Les vecteurs viraux.....	39
II.4 Les vecteurs non-viraux.....	40
III LES BARRIÈRES BIOLOGIQUES DANS LA VECTORISATION SYNTHÉTIQUE :.....	41
III.1 Le trafic extracellulaire.....	42
III.2 Adhésion des complexes à la membrane cellulaire.....	44
III.3 Entrée des complexes dans la cellule.....	48
III.4 Libération du matériel génétique.....	50
III.5 Le transport cytosolique et l'entrée nucléaire.....	51
IV CRITÈRES DE DÉVELOPPEMENT D'UN VECTEUR SYNTHÉTIQUE.....	52
VECTEURS SYNTHETIQUES : LES DIFFERENTS CONCEPTS.....	54
I L'AUTO ASSEMBLAGE DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES VECTEURS CATIONIQUES.....	54
I.1 Les lipides cationiques.....	54
I.1.a Structure de lipides cationiques :.....	55
I.1.b Caractérisation physico-chimiques des lipoplexes.....	58
I.1.c Transfection d'acides nucléiques avec les lipides cationiques in vitro.....	63
I.2 Les polymères cationiques.....	64
I.2.a Structure des différents polymères.....	64
I.2.b Caractérisation physico-chimique des polyplexes.....	70
I.2.c Le devenir des polymères cationiques pour le transfert de gènes in vivo.....	74
I.3 Les polymères amphiphiles.....	75
II L'ADN : CATALYSEUR ET SUPPORT DE SYNTHÈSE DU VECTEUR SYNTHÉTIQUE.....	77
II.1 Dimérisation de détergents cationiques.....	78
II.1.a Les détergents cationiques.....	78
II.1.b Formation et caractérisation des particules obtenues.....	80
II.2 Polymérisation de détergents et de monomères.....	83
II.2.a Les procédés de polymérisation et caractérisation des particules formées.....	83
III ENCAPSULATION DE L'ADN DANS DES NANOPARTICULES.....	88
III.1 Vésicules lipidiques : évaporation en phase-inversée.....	88
III.2 Nanoparticules de polymère : l'émulsion par évaporation de solvant.....	91
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	99
LES SYSTEMES AUTO-ASSEMBLES.....	109
I INHIBITION D'EXPRESSION PAR ARN INTERFÉRENCE.....	109
Transfection des siARN avec les agents de transfection de l'ADN.....	110
Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides.....	111

<u>Caractérisation physico-chimique des complexes lipides cationiques/acides nucléiques</u>	113
<u>Inhibition de l'expression d'un gène par transfection de siARN avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides</u>	118
<u>TRANSFERT DE GÈNES IN VIVO</u>	125
<u>Les copolymères à blocs</u>	126
<u>Utilisation des triblocs pour le transfert d'un gène rapporteur dans les poumons</u>	126
<u>Aérosolisation des formulations Triblocs/ADN et PEI /ADN</u>	131
<u>Utilisation des tétrafonctionnalisés pour le transfert de gènes dans les poumons</u>	133
<u>Transfert de la protéine de fusion GFP-CFTR dans les poumons</u>	137
<u>LES HYDROXYDES DOUBLES LAMELLAIRES</u>	139
<u>Synthèses des HDL en absence ou en présence d'ADN</u>	140
<u>Paramètres influençant la structure des feuillet hydroxydes des phases MgGa/ADN</u>	141
<u>Potentiel des HDL pour la vectorisation d'acides nucléiques</u>	145
CONCLUSIONS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	149
BIBLIOGRAPHIE	159

LE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES

I Les différents types d'acides nucléiques

L'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) sont les deux types de molécules d'acides nucléiques présentes au sein d'une cellule. Il est possible d'introduire des ADN ou ARN exogènes au sein d'une cellule à l'aide des vecteurs synthétiques, c'est la **transfection**. Les vecteurs synthétiques ont pour rôle d'assembler les acides nucléiques au sein d'une structure qui a la capacité de traverser la membrane cellulaire (I). Les acides nucléiques exogènes peuvent être utilisés dans des expériences de modification génétique d'une cellule, soit pour rétablir l'expression d'un gène, soit pour inhiber son expression.



: Représentation schématique du mécanisme de transfection par les vecteurs synthétiques. Les acides nucléiques sont mélangés aux vecteurs synthétiques pour former une structure supramoléculaire capable de transfecter les cellules. Une fois dans la cellule, les acides nucléiques sont libérés dans le cytoplasme et sont ensuite transportés jusqu'au niveau des ARN messagers ou dans le noyau de la cellule.

Avant de concevoir un vecteur synthétique efficace pour le transport des acides nucléiques jusqu'à leur cible, il est important tout d'abord de comprendre quels sont les

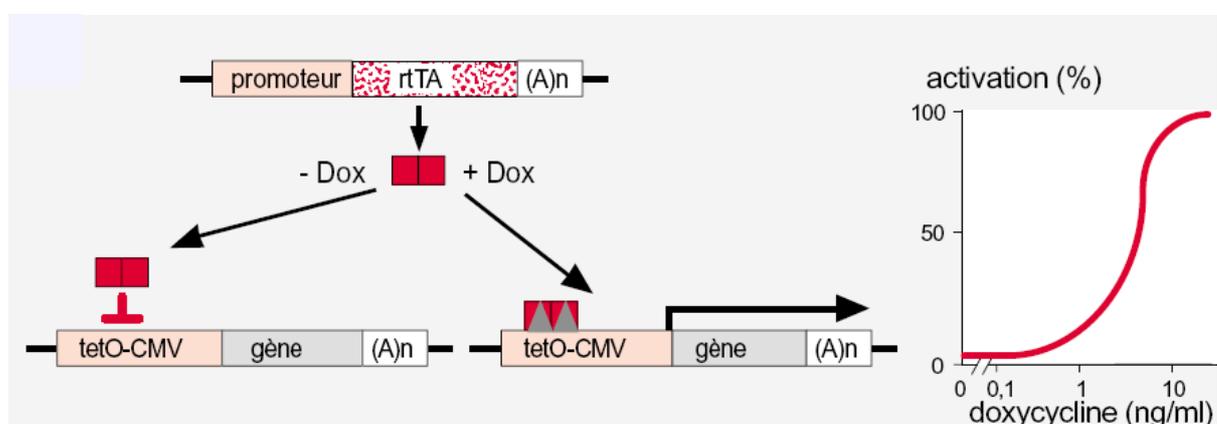
caractéristiques des molécules d'acides nucléiques à transporter (taille, morphologie, double- ou simple-brin, ADN ou ARN), ainsi que le site de leur activité biologique (cytoplasme ou noyau). Ensuite, les différentes techniques qui ont été utilisées pour des expériences de transfection seront décrites. Et enfin, cette première partie décrit également les différentes barrières biologiques que rencontrent les vecteurs synthétiques et les acides nucléiques au cours de leur transport.

I.1 Rétablir l'expression d'un gène : l'ADN plasmidique

Il est possible de rétablir l'expression d'une protéine en introduisant dans la cellule le gène qui code pour cette protéine. Le transgène est introduit dans la cellule à l'aide de vecteurs d'expression, ou plasmides, qui sont des molécules d'ADN double brin circulaires superenroulées (Kreiss, 1999). Les plasmides utilisés contiennent généralement :

- une origine de répllication bactérienne qui permet la production des plasmides dans les souches bactériennes.
- un gène dont l'expression confère la résistance à un antibiotique, souvent la kanamycine, qui permet le maintien du plasmide dans les bactéries sous pression de sélection.
- une cassette d'expression, qui contient le transgène thérapeutique dont l'expression est contrôlée par un **promoteur** et par une **séquence de terminaison** de transcription.

Le choix du promoteur qui gouverne l'expression du transgène revêt une importance particulière. Les promoteurs viraux, comme le promoteur précoce du virus simien SV40 ou le promoteur précoce du cytomégalovirus humain (pCMV) sont caractérisés par un haut niveau d'expression constitutive du transgène (Boshart *et al.*, 1985). Alternativement, le choix peut se porter sur des promoteurs inductibles, qui placés devant un gène peuvent réguler l'expression de ce dernier. Plusieurs systèmes de régulation ont été décrits, dont le système de régulation par la doxycycline, appelé système Tet-on (I.1).



: Représentation schématique du système Tet-on réglés par la doxycycline. Le transactivateur *rtTA*, est sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif. Les gènes d'intérêt sont placés sous le contrôle d'un promoteur inductible et un promoteur minimal du cytomégalo virus (CMV), spontanément muet. La transcription est initiée en présence de la doxycycline. En fonction de la concentration en doxycycline la transcription est plus ou moins induite (extrait de Bohl, 1999).

En présence doxycycline (+Dox), le transactivateur *rtTA* peut se fixer sur les séquences tetO et initier la transcription. Par exemple, il a été montré que l'injection en présence de polymères amphiphiles d'un plasmide codant pour l'érythropoïétine murine (EPO), sous le contrôle d'un système Tet-on (I.1) permettait de réguler l'expression de l'EPO chez la souris. En présence de doxycycline, l'expression de l'EPO a été activée ce qui se traduit physiologiquement par une augmentation du taux d'hématocrite (Richard *et al.*, 2005).

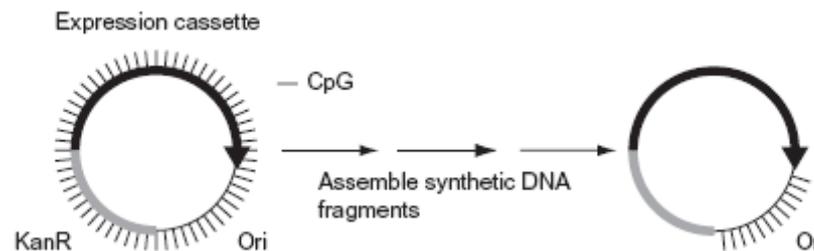
Les promoteurs spécifiques d'un tissu, quant à eux, présentent l'avantage de cibler l'expression du transgène, par exemple vers les cellules tumorales (promoteur de l'antigène carcinoembryonnaire, CEA, ou de l' α -foetoprotéine, AFP), vers les hépatocytes (promoteur de la phosphoénolpyruvate carboxylase, PEPCK), vers les cellules musculaires (enhancer de la créatine kinase) (Fabre *et al.* 2006), ou encore vers les cellules épithéliales (Glasser *et al.*, 2000).

D'autres promoteurs proviennent de gènes qui codent pour des protéines abondantes comme les β -actines (Kosuga *et al.*, 2000), le facteur d'élongation 1- α (EF-1 α) (Gill *et al.*, 2001), ou l'ubiquitine (Yew *et al.*, 2001). À ces promoteurs peuvent être ajoutés des éléments activateurs, pour former des promoteurs dit composites, pour lesquels l'expression du transgène a été observée jusqu'à plusieurs semaines après l'injection (Yew, 2005).

Enfin, des promoteurs synthétiques ont été créés par l'assemblage de séquences de différents promoteurs (Edelmann *et al.*, 2000, Li *et al.*, 1999). Par exemple, des éléments muscle-spécifique provenant de quatre promoteurs muscle-spécifique ont été aléatoirement assemblés pour former de nouveaux promoteurs synthétiques. L'activité de ces promoteurs a été évaluée pour chaque combinaison, et a permis de montrer qu'un des promoteurs synthétiques a conduit à augmenter de 8 fois l'expression par rapport à un promoteur naturel muscle-spécifique (Li *et al.*, 1999).

Les expériences de transfections nécessitent une quantité minimale de copie d'ADN plasmidique contenant le gène d'intérêt. L'ADN plasmidique qui est généralement amplifié dans des bactéries, puis purifié, est ainsi d'origine procaryote et est donc une entité totalement étrangère dans des cellules de mammifères. En effet, on sait depuis plusieurs années que l'ADN bactérien possède une puissante activité immunostimulatrice. L'analyse de ce phénomène a permis de montrer que des petits motifs d'ADN contenant le dinucléotide CpG non méthylé (ou « motif CpG ») était responsable de cette activation (Krieg, 2000). En ce qui concerne ces motifs CpG, deux différences importantes existent entre l'ADN des mammifères

et l'ADN bactérien : premièrement, la fréquence des dinucléotides CpG est fortement réduite chez les mammifères par rapport à la fréquence théorique attendue, ce qui n'est pas le cas chez les bactéries ; et deuxièmement 70 % des résidus cytosine présents dans un motif CpG dans l'ADN des mammifères sont méthylés, ce qui n'est généralement pas le cas dans l'ADN génomique bactérien (Imler and Reichhart, 2001).



: Diminution du nombre de motifs CpGs dans un plasmide. Les motifs CpGs peuvent être éliminés de la cassette d'expression (promoteur, intron, transgène, signal de polyadénylation) et du gène de résistance à l'antibiotique (KanR), ne laissant des motifs CpGs qu'au niveau de l'origine de réplication (extrait de Yew, 2005).

Il a été montré qu'il est possible de diminuer le pourcentage de CpG dans un plasmide par assemblage de fragments d'ADN synthétiques (I.1). Délivré en systémique, ce plasmide a permis une diminution de la réponse inflammatoire aiguë et du niveau des cytokines proinflammatoires (Yew *et al.*, 2002).

Ainsi, l'efficacité d'expression d'une protéine à partir d'un ADN plasmidique ne dépend pas principalement de l'efficacité de la transfection, mais du choix du promoteur et des autres constituants du plasmide, ainsi que du contrôle de la présence des motifs CpG.

I.2 Inhiber l'expression d'un gène : les technologies antisens

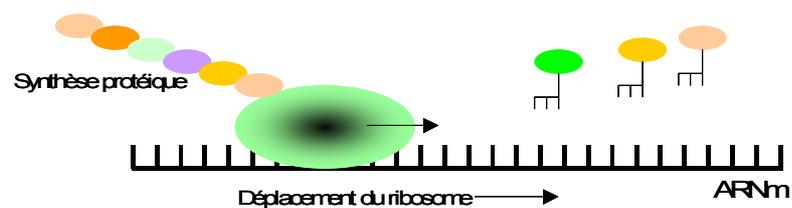
L'utilisation de molécules d'acides nucléiques, comme agents inhibiteurs de l'expression d'un gène, connaît depuis plusieurs années une forte activité de recherche. En effet, la chimie de l'ADN a permis, au milieu des années 1980, de synthétiser des OligoDeoxyNucleotides antisens (antisens ODNs) qui ont la propriété d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène (Scherrer and Rossi, 2003). Très rapidement, au début des années 1990 la découverte de l'activité catalytique d'ARN, appelés les *ribozymes*, offrait une nouvelle technologie pour inhiber l'expression d'un gène. Cependant, la plus récente et la plus prometteuse découverte dans le domaine de régulation d'un gène, est celle de l'équipe de Andy Fire et Craig Mello en 1998 chez *Caenorhabditis elegans* qui ont montré qu'un ARN double brin induisait la dégradation de l'ARNm possédant des séquences complémentaires, par un processus appelé le phénomène d'interférence ARN (ARNi) (Fire *et al.*, 1998).

Tous ces processus d'inhibition de l'expression d'un gène utilisent comme molécules actives des acides nucléiques, comme des ADN ou des ARN, cependant les mécanismes d'action, l'activité et la spécificité d'inhibition, sont très différents d'une technologie à l'autre.

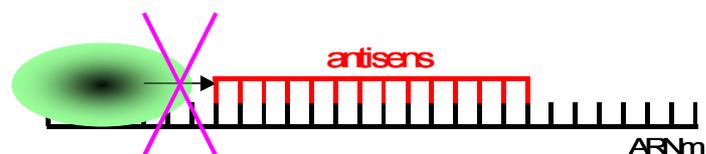
I.2.a Les antisens ODNs, les rybozymes et les DNAzymes

Les oligodeoxynucleotides antisens. Les antisens ODNs sont des molécules d'ADN simple brin de 13 à 25 nucléotides qui s'apparient par complémentarité de base avec l'ARN messenger (ARNm) cible, et inhibe ainsi l'étape de traduction.

Expression protéique en absence d'antisens ODNs :



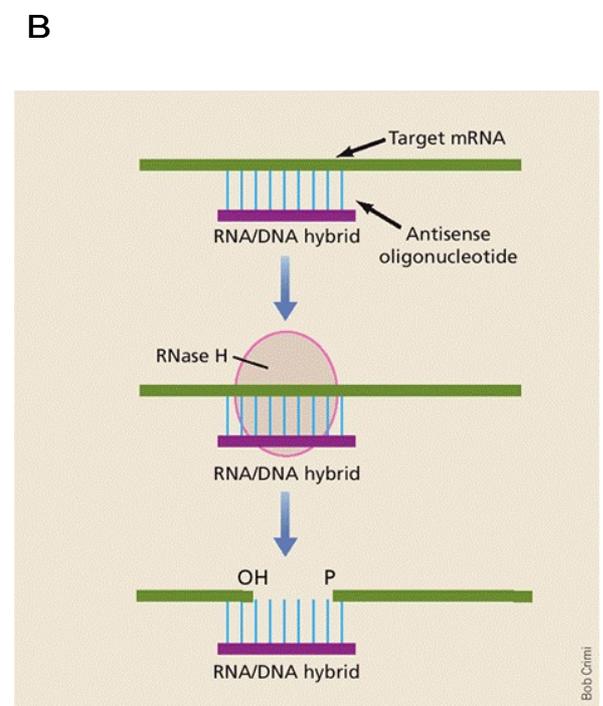
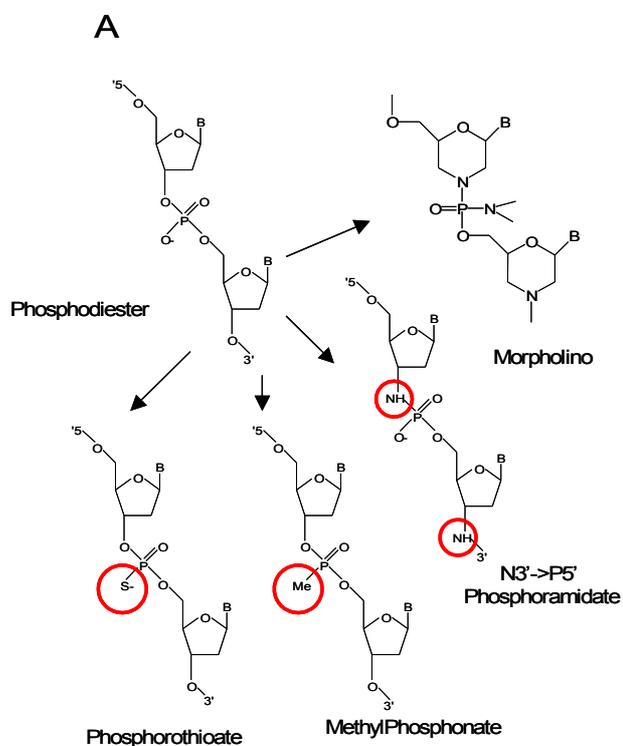
Inhibition de la synthèse protéique en présence d'antisens ODNs :



: Inhibition de l'étape de traduction de l'ARNm en présence d'antisens ODNs. Les acides nucléiques antisens sont des séquences nucléotidiques complémentaires d'un ARNm. La fixation du fragment antisens empêche le déplacement du ribosome sur l'ARNm, bloquant ainsi l'étape de traduction.

L'utilisation des antisens ODNs, possédant des liaisons phosphodiesters, s'est cependant avérée limitée car les ODNs sont très rapidement dégradés par les endonucléases et les exonucléases intracellulaires. De plus, les produits de dégradation des oligonucléotides phosphodiesters peuvent être toxiques et avoir un effet anti-prolifératif. Ainsi, pour améliorer l'efficacité et la stabilité des antisens ODNs plusieurs types de modifications chimiques ont été apportées au niveau de certains groupements chimiques (I.2.a-A). La modification chimique la plus utilisée est le remplacement de la liaison phosphodiester, entre chaque bases, par une liaison phosphorothioate (remplacement de l'oxygène libre par un atome de soufre) (Dias and Stein, 2002).

Le mécanisme exact d'inhibition peut varier, en fonction du type de modifications chimiques, mais il fait généralement intervenir une ribonucléase H (RNase-H), une enzyme ubiquitaire qui hydrolyse les complexes ARN/ADN. Ce sont les antisens ODNs fortement chargés négativement (phosphodiesters ou les phosphorothioates) qui une fois appariés à l'ARNm cible recrutent la RNase-H qui clive l'ARNm (I.2.a-B) (Scherrer and Rossi, 2003).



: Modifications chimiques sur les acides nucléiques (Dias and Stein, 2002) et mécanisme d'action des ODNs faisant intervenir la RNase-H (Scherrer and Rossi, 2003). (A) Modifications chimiques des phosphodiesteres (B) La RNase-H est recrutée par les ODNs antisens fortement chargés négativement, comme les phosphorothioates, et induit le clivage de l'ARNm.

Les autres ODNs, ne faisant pas intervenir la RNase-H, agissent par un mécanisme de blocage stérique qui inhibe la progression de la machinerie de traduction et ils ne sont efficaces que lorsque l'ODNs cible la région 5' ou un codon AUG d'initiation de l'ARNm (Dias et Stein).

Les ribozymes et les DNazymes. Les ribozymes sont des molécules d'ARN, qui présentent une activité catalytique capable de cliver les liaisons phosphodiesteres. Le site catalytique est associé à des séquences complémentaires d'un ARNm, assurant ainsi une fixation du ribozyme par complémentarité des bases, puis le clivage de l'ARNm. A la différence des antisens ODNs, les ARN ribozymes peuvent être exprimés à partir d'un plasmide, ce qui offre l'avantage d'une production intracellulaire de ces molécules. Les ribozymes jouant le rôle d'enzyme, doivent d'une part se lier à leur substrat qui est l'ARNm, mais doivent ensuite s'en dissocier pour agir sur de nouveaux substrats. Cette étape serait l'étape limitante de l'efficacité des ribozymes. D'autre part, certains ribozymes nécessitent une forte concentration en cations divalents pour que leur efficacité de clivage soit maximale, ce qui n'est pas compatible avec la concentration intracellulaire (Shih *et al.*, 1999). Alors que les études se concentraient sur l'amélioration des propriétés catalytiques des ribozymes, Breaker et Joyce ont émis l'hypothèse que l'ARN et l'ADN étant des composés chimiques très similaires, les molécules d'ADN pouvaient également présenter une activité catalytique similaire aux ARN (Breaker and Joyce, 1995). Cette hypothèse s'est avérée correcte et se sont alors développés les DNazymes, capables de cliver l'ARN. Le mécanisme d'action est basé sur le même principe que les ribozymes par appariement de l'ARNm avec des séquences complémentaires présentées sur la DNzyme, suivi du clivage de l'ARNm. Le coût de synthèse des DNazymes synthétiques est peu onéreux et elles présentent d'intéressantes propriétés catalytiques, ce qui les rend plus utilisables que les antisens ODNs et les ribozymes (Santoro and Joyce, 1997 et 1998).

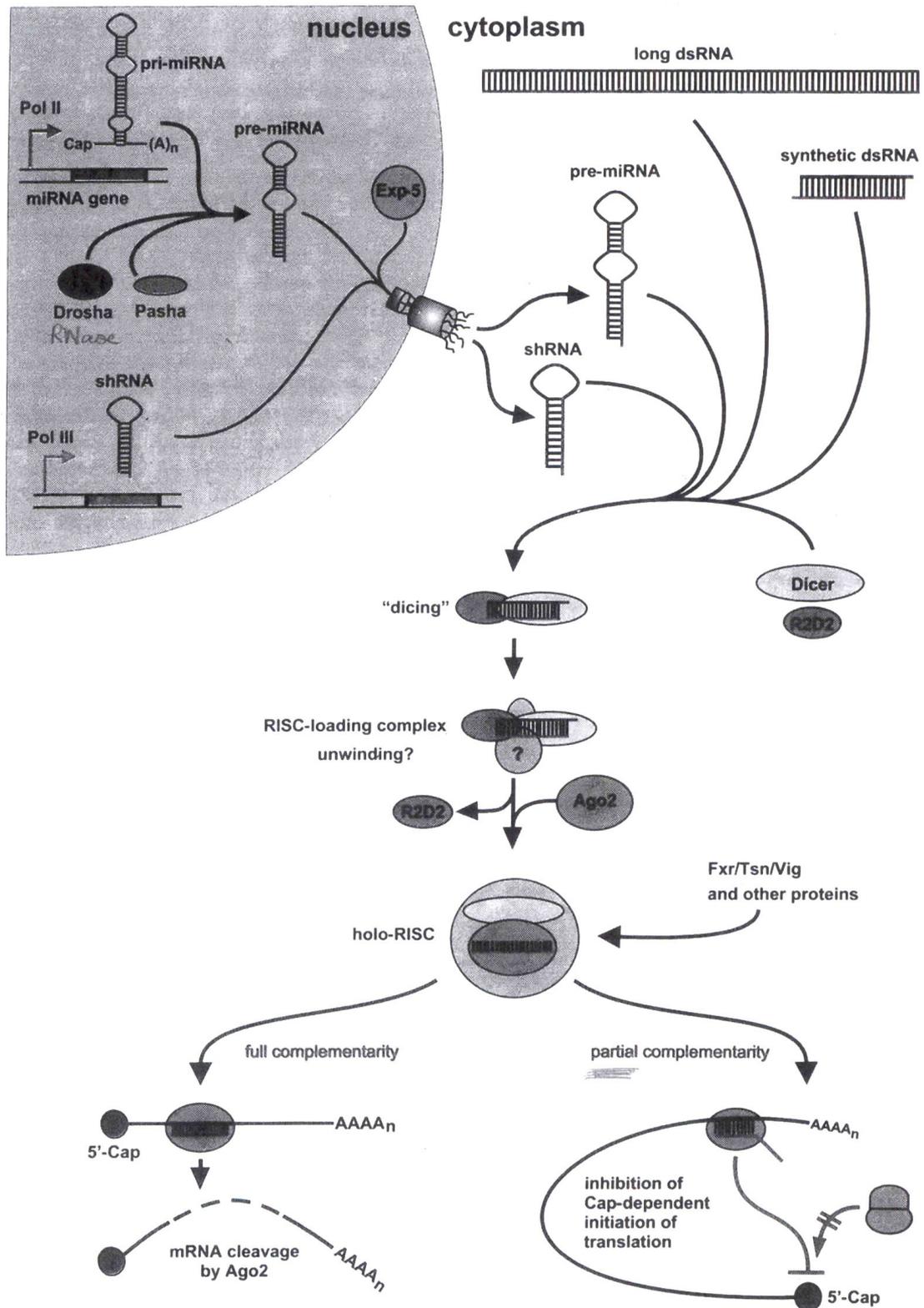
I.2.b RNAi : le phénomène d'interférence ARN

La découverte du phénomène d'interférence ARN (ARNi) dans les cellules eucaryotes a été l'un des nombreux succès dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire ces dernières années. Dans la cellule, le phénomène ARNi est un processus naturel, impliqué dans la régulation de l'expression des gènes et dans les mécanismes de défense de la cellule contre les attaques virales (Fire *et al.*, 1998 ; Hamilton and Baulcombe, 1999 ; Hammond *et al.* 2000). Le potentiel du processus ARNi dans l'inhibition de n'importe quel gène d'intérêt, de manière si efficace et spécifique via l'utilisation d'ARN double brin (ARNdb) de petite taille, a

réellement révolutionné la génétique moderne. Ainsi, le rôle cellulaire de chaque gène exprimé dans des organismes comme les mammifères a pu être évalué et le processus ARNi se présenterait, par exemple, comme une alternative aux animaux transgéniques invalides pour un gène (« knock-out »).

Le mécanisme du processus d'ARNi. Le phénomène ARNi a été décrit dans les cellules eucaryotes pour la première fois par Andy Fire et Craig Mello chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). En effet, ils ont observé que l'injection d'un ARNdb induisait une dégradation de l'ARNm cytoplasmique présentant des séquences complémentaires avec l'ARNdb. Des mécanismes similaires avaient également été décrits chez les plantes, dans lesquels il avait été montré l'implication des ARNdb dans un processus d'inhibition d'expression de gène, (Hamilton and Baulcombe, 1999 ; Waterhouse *et al.*, 2001 ; Fagard *et al.*, 2000). Le phénomène ARNi dans les cellules eucaryotes est un processus qui, en général, agit au niveau post-transcriptionnel de l'expression génétique soit en bloquant l'étape de traduction soit en dégradant l'ARNm cible. Le mécanisme général du ARNi est décrit par la I.2.b (Grünweller and Hartmann, 2005).

Tout d'abord, le processus ARNi se déclenche par l'entrée d'ARNdb (>30pb) dans la cellule, qui sont très rapidement clivés par l'enzyme DICER en petits brins d'ARNdb d'une longueur variable de ~21 à 25 pb, appelés siARN (pour « small interfering » RNA) ou miARN (« microARN ») matures.



: **Schéma général du procédé d'ARN interférence.** Les pre-miARN, les shARN, les ARNdb synthétiques et les ARNdb (>30pb) sont les substrats de l'endonucléase DICER qui génère les siARN et les miARN matures. Chez *Drosophila*, le complexe RISC se forme et conduit au désappariement des brins sens et antisens des siARN ou miARN. Seul le brin antisens reste au sein du complexe RISC. La complémentarité parfaite du brin antisens à l'ARNm conduit à la dégradation de ce dernier par Ago2, alors que les brins antisens qui ne sont pas totalement complémentaires à l'ARNm conduisent à un arrêt de la traduction (Grünweller and Hartmann, 2005).

Ensuite, les deux brins du siARN ou du miARN mature s'associent à un complexe protéique pour former le complexe RISC (pour « RNA-Induced Silencing Complex »). Il y a alors désappariement des deux brins du siRNA, et seul le brin complémentaire de la séquence de l'ARNm cible, le **brin antisens**, reste associé au complexe RISC. Ce complexe RISC guide le brin antisens jusqu'à l'ARN (ARNm) cible et provoque l'appariement du brin antisens avec la séquence de l'ARNm complémentaire.

Les acides nucléiques impliqués dans le mécanisme du processus ARNi, les siARN et les miARN, ne proviennent pas de la même source puisqu'ils ne sont pas codés par la même partie du génome. Les premiers, miARN, proviennent de gènes endogènes à la cellule qui leurs sont propres et dont ils sont les uniques produits (Bartel, 2004 ; Kim, 2005). Les seconds, siARN, dérivent de deux sources, exogène ou endogène. La source exogène correspond soit à l'apport extérieur d'un ARN double brin par injection expérimentale soit à un apport en provenance de génome à ARN double brin de certains virus à ARN. La source endogène correspond à une production naturelle par utilisation des parties exoniques (codantes ou non codantes) d'un gène plus étendu.

Les miARNs. Les miARNs sont exprimés par le génome de la cellule, transcrits par la RNA polymérase II, et leurs transcrits sont une molécule d'ARN simple brin de plusieurs centaines de nucléotides (I.2.b) (Lee *et al.*, 2004 ; Grünweller and Hartmann, 2005). Ces ARN, appelés précurseurs primaires des miARN (miARN-pri), présentent le long de leur séquence des motifs nucléotidiques partiellement complémentaires qui les conduisent à adopter une structure secondaire en forme d'une longue épingle à cheveux (Lee *et al.*, 2003). Cette structure peut être divisée en trois parties : le « corps » qui est formé des séquences plus ou moins complémentaires, la « tête » (en forme de boucle) et les « jambes » simple brin de l'épingle qui portent les séquences qui n'ont pas trouvé de complémentaires (I.2.b). Les précurseurs des miARN matures (miARN-pre) sont générés à partir des miARN-pri par le complexe protéique contenant une endonucléase RNase de type III, la Drosha, qui génère deux à trois nucléotides non-appariés aux extrémités du pre-miARNs (Lee *et al.*, 2002). La particularité des miARN réside dans le fait que les miARN ne sont que **partiellement complémentaires** à une séquence de l'ARNm cible et, de plus, cette séquence cible est généralement située dans la région non-codante en 3' de l'ARNm. Les miARN n'entraînent pas la dégradation de l'ARNm, mais inhibent la traduction (Bartel, 2004) (I.2.b).

Le premier miARN a été identifié en 1993, chez le nématode *C.elegans*, par une équipe qui tentait de décrypter les mécanismes moléculaires régissant le développement larvaire de ce petit ver (Lee *et al.*, 1993). En effet, le miARN lin-4 est essentiel au développement larvaire, il est capable d'inhiber l'expression des protéines LIN-14 et LIN-18, qui sont des inhibiteurs de la transition entre deux stades larvaires. L'absence de l'expression du miARN lin-4 conduit à un arrêt du développement larvaire de *C.elegans*. En 2000, un nouveau miARN, le let-7, a été identifié chez *C.elegans* ; il contrôle la transition entre le dernier stade larvaire et la stade adulte (I.2.b) (Reinhart *et al.*, 2000).

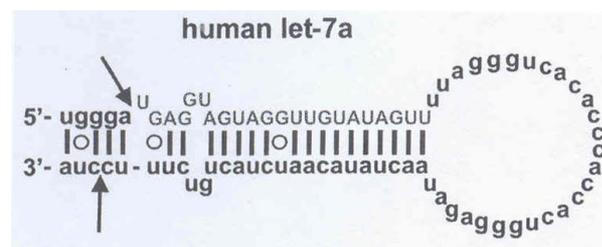


Figure 1 : Représentation schématique du miARN human let-7a (Grünweller and Hartmann, 2005).

Le rôle des miARNs dans les organismes étudiés reste versatile puisque les miARN sont impliqués dans différents processus fondamentaux de régulation comme le développement larvaire et neuronal chez *C.elegans*, l'apoptose, la prolifération et le métabolisme des lipides chez la *Drosophila*, et, la différenciation hématopoïétique chez les mammifères. Les différents miARN, dont la fonction biologique et/ou les cibles ARNm ont été caractérisées, sont résumés dans le tableau suivant.

miARN	Organismes	Gènes cibles	Fonctions biologiques contrôlées
lin-4	<i>C. elegans</i>	<i>lin-14, lin-28</i>	Mise en place des stades larvaires
let-7	<i>id</i>	<i>lin-41, lin-57/hbl-1</i>	Mise en place des stades larvaires
lsey-6	<i>id</i>	<i>cog-1</i>	Asymétrie neuronale droite/gauche
Bantam	<i>D. melanogaster</i>	<i>hid</i>	Apoptose, prolifération cellulaire
miR-14	<i>id</i>	?	Apoptose, métabolisme des lipides
miR-2	<i>id</i>	<i>reaper/grim/sickle</i>	Apoptose ?
miR-7	<i>id</i>	<i>E(spl), Brd, hairy</i>	Signalisation Notch?
miR-277	<i>id</i>	Multiples gènes	Voies de dégradation de la Valine, Leucine et Isoleucine ?
miR-165/-166	<i>A. thaliana</i>	<i>Phabulosa, Phavoluta</i>	Morphogenèse des feuilles
Jaw	<i>id</i>	gènes <i>TCP</i>	Morphogenèse des feuilles
miR-172	<i>id</i>	<i>APATA2</i>	Développement floral
miR-127/-136	Mammifères	<i>Rtl1</i> (rétrotransposon-like)	Extinction de <i>Rtl</i> ? Empreinte parentale ?
miR-181	<i>id</i>	?	Différenciation hématopoïétique
miR-15/-16/142/-155	<i>id</i>	?	Oncogenèse ?

Tableau 1 : Exemple de microARN dont la fonction biologique et/ou les cibles ARNm sont caractérisées (extrait de Cavallé, 2004)

Identifier le répertoire complet des ARNm cibles des miARN représente un réel défi à la fois expérimental et conceptuel, car les appariements imparfaits mis en jeu lors du blocage de la traduction sont difficiles à caractériser, de plus un même miARN peut intervenir sur des ARNm différents ; l'inverse est également vrai, une même région 3'UTR peut se lier à plusieurs miARN différents. La découverte des miARN, et plus généralement celle du processus ARNi, a révolutionné la vision du contrôle de l'expression des gènes et rappelle que l'étude du monde des ARN non codants ne ferait que commencer...

Les shARN. Des siARN synthétiques peuvent être synthétisés de manière endogène à partir de vecteur d'expression (plasmide ou virus), ce sont les « short hairpin » ARN (I.2.b). Ces vecteurs d'expression possèdent un promoteur dépendant de la RNA-polymérase-III, comme le promoteur U6 et H1 (Brummelkamp *et al.*, 2002). Ils sont idéaux pour transcrire des petits ARN, car les transcrits ne sont pas modifiés après la transcription. Le transcrit est un ARN simple brin, possédant deux séquences complémentaires (la séquence du brin sens et celle du brin antisens), qui par appariement des bases va former un ARN double brin de type « épingle à cheveux ». Les shARN sont pris en charge par l'enzyme DICER pour générer des siARN matures, puis entrent dans le complexe RISC (Doench *et al.*, 2003). Alors que les siARN duplex synthétiques n'induisent qu'une inhibition de l'expression transitoire, les shARN permettent d'obtenir une expression à plus long terme (Zhang *et al.*, 2005 ; Grunweller and Hartmann, 2005).

Les siRNAs. Les siARNs sont d'origines diverses, ils peuvent dériver de virus, de transposons ou de pseudogène, pour les formes endogènes ; mais ils peuvent également être apportés de manière exogène. En effet, les siARN peuvent être introduits expérimentalement dans la cellule soit sous forme de siARN synthétiques, appelés les siARN « duplex » (21~25 pb) ou les ARNdb (>30pb), qui sont les précurseurs des siARN matures (I.2.b). Dans le processus ARNi, les siARN sont responsables de la dégradation de leur ARNm cible. Le brin antisens du siARN qui reste associé au complexe RISC doit être entièrement (ou à une ou deux bases près) complémentaire de la séquence de l'ARNm. La structure générale des siARN matures est représentée sur la I.2.b, et montre que les siARN consistent en deux brins de 21 nucléotides parfaitement appariés sur 19 des 21 nucléotides, avec 2 nucléotides non appariés à chacune des extrémités 3'-OH de chaque brin du siARN.

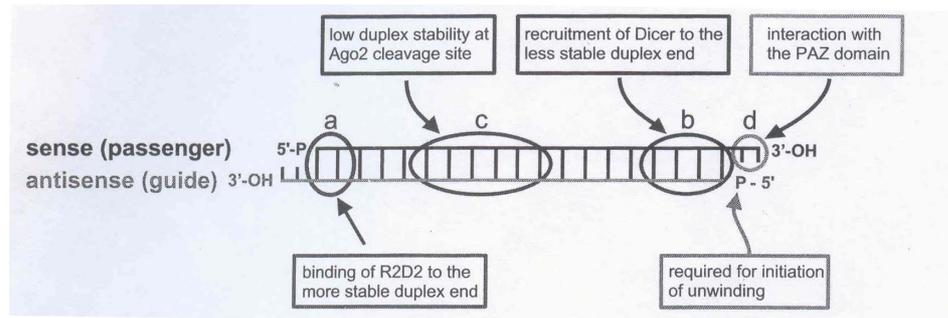


Figure 2 : *Structure et propriétés thermodynamiques des siARNs.* Le siARN présente des domaines de stabilité thermodynamique différents qui ont un rôle dans l'efficacité du siARN. L'incorporation du brin antisens dans le complexe RISC est favorisée par une région (a) stable et une région (b) qui n'est pas très stable thermodynamiquement. (Grünweller and Hartmann, 2005).

Les propriétés thermodynamiques des régions (a) et (b) ont un rôle très important lors du processus de sélection du brin restant associé au complexe RISC (Khovorova *et al.*, 2003 ; Schwarz *et al.*, 2003). Une bonne stabilité au niveau de la région (a) et une plus faible stabilité pour la région (b) favorise l'incorporation du brin antisens dans le complexe RISC. De plus, chez *Drosophila*, il a été montré que la protéine R2D2, se lie préférentiellement à l'extrémité du brin la plus stable, d'où l'importance de la différence de stabilité entre la région (a) et (b). En effet, le complexe RISC est sensible à la force des interactions entre les bases des 4 dernières bases de la région (b), dans laquelle une simple mauvaise complémentarité entre la position 2 et 4 favorise l'incorporation préférentielle du brin antisens. D'autre part, la présence d'une majorité de résidus A et U au niveau de la région (c), c'est à dire entre les positions 9 à 14, augmente l'efficacité des siARN (Khovorava *et al.*, 2003).

Les protéines du processus ARNi. Les protéines DICER présentent un domaine PAZ et deux domaines RNaseIII, et se fixent par conséquent préférentiellement aux ARN double brin qui présentent deux nucléotides non appariés en 3' (Carmell *et al.*, 2004). Les produits catalytiques des DICER sont des ARN d'environ 22 nucléotides. La protéine R2D2 se lie de préférence à l'extrémité 5'-phosphate du brin sens (extrémité la plus stable), laissant ainsi la place au brin antisens pour s'incorporer dans le complexe RISC (Tomari *et al.*, 2004). R2D2 est une protéine qui a pour fonction tout d'abord de vérifier « l'asymétrie » thermodynamique du siARN, et ensuite qui a pour rôle de guider uniquement le brin *antisens* dans le complexe RISC. Ce dernier est un complexe multi-protéique qui va médier la dégradation des ARNm et inhiber leur traduction. Les premières protéines identifiées comme faisant partie du complexe RISC ont été Ago2 chez *Drosophila* (Bernstein *et al.*, 2001 ; Hammond *et al.*, 2001 ; Nykanen *et al.*, 2001) ainsi que Ago1 et Ago2 chez l'humain (Martinez *et al.*, 2002). La composition exacte du complexe RISC demeure méconnue et les études à ce sujet se poursuivent activement. Parmi les autres protéines identifiées, il y a deux protéines pouvant lier l'ARN, soit la protéine FXR (dFXR) et la protéine VIG (« Vasa Intronic Gene ») chez *Drosophila*

(Caudy *et al.* 2002). Le rôle de ces protéines dans la voie de l'ARNi n'est toutefois pas connu. Le complexe RISC activé est dirigé, jusqu'à l'ARNm cible, par le brin antisens complémentaire. La dégradation de l'ARNm est effectuée par la protéine Ago2 au niveau de la partie centrale du brin antisens et l'inhibition de l'initiation de la traduction est m⁷G-cap dépendante.

Synthèse de siARN synthétiques stables et efficaces. L'efficacité d'un siARN mature dépend de sa stabilité thermodynamique, et donc de sa séquence nucléotidique. Lors des premières synthèses de siARN synthétiques, seuls quelques paramètres étaient pris en considération, comme la présence de deux nucléotides non appariés en 3', un contenu en bases G/C inférieur à 50% dans les 19 nucléotides de la partie double brin, une recherche de non complémentarité du siARN avec le reste du génome et une préférence des régions non codantes en 3' de l'ARNm cible (Elbashir *et al.*, 2002). Cependant, l'accumulation des informations sur la relation entre la structure et l'activité du siARN a fortement augmenté le nombre de paramètres pris en compte. En effet, en plus des paramètres comme le contenu en bases G/C, les deux nucléotides non appariés aux extrémités, et une séquence ciblant les régions non codantes en 3' de l'ARNm, la stabilité thermodynamique des différentes régions du siARN, décrite dans le paragraphe précédent, vient s'ajouter à tous ces paramètres et rend plus difficile la recherche de la séquence du siARN la plus efficace (Mittal *et al.*, 2004 ; Reynolds *et al.*, 2004).

D'autre part, pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques (stabilité envers les dégradations nucléolytiques), certaines modifications chimiques ont été apportées au siARN. Des modifications chimiques aux extrémités 5' et 3' du brin sens sont généralement bien tolérées et ne modifient pas l'efficacité d'inhibition du siARN. Plusieurs types de modifications chimiques ont été réalisés, comme l'ajout d'un groupement méthoxy (5'-méthoxy), d'un groupement amine, ou d'un groupement fluorescéine couplé au phosphate-5', par une chaîne carbonée (I.2.b). Cependant, ces mêmes modifications en 5' sur le brin antisens interfèrent avec l'efficacité des siARN, il est donc préférable de conserver une extrémité 5'-monophosphate sur ce brin (Nykanen *et al.* 2001 ; Chiu *et al.*, 2002 ; Schwarz *et al.*, 2002 ; Matinez *et al.*, 2002). Des modifications sur ce même brin, mais en 3', a beaucoup moins d'effet sur l'efficacité du siARN, avec l'exception d'un chromophore fluorescent couplé en 3' par une liaison phosphodiester qui diminue l'efficacité du siARN.

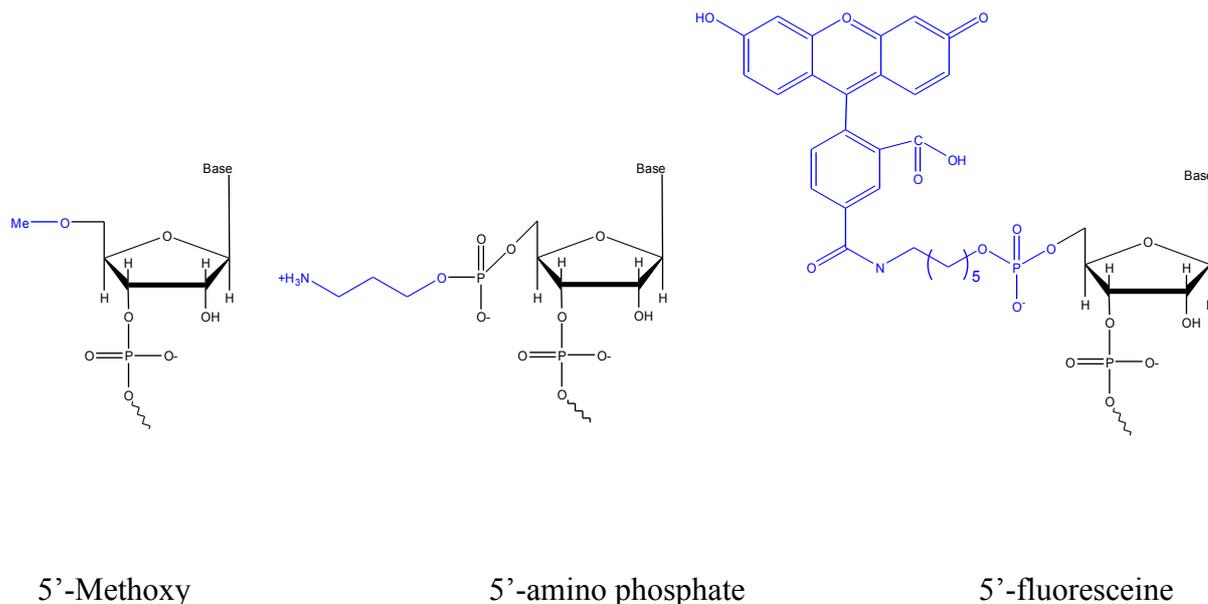


Figure 3 : Exemple de modifications chimiques des siARN en position 5' du brin sens.

D'autres modifications ont également été testées comme des méthylations (2'-*O*-méthylation) ou des substitutions par un atome de fluor sur le carbone en position 2' (I.2.b). Ces deux dernières modifications ont montré qu'elles induisaient une meilleure persistance de processus ARNi dans des cellules *in vitro*. Czauderna *et al.*, ont rapporté que la dégradation des siARN non-modifiés était principalement due à l'action des endonucléases, plus que des exonucléases. Ainsi, les modifications « 2'-*O*-méthylation » placées sur des nucléotides internes, à des places choisies, permettraient une meilleure protection des siARN (Czauderna *et al.*, 2003). Par contre, une modification de ce type réalisée sur tous les nucléotides internes d'un ou des deux brins interfère avec l'efficacité du siARN (Czauderna *et al.*, 2003). Une modification très intéressante pour protéger les siARN des dégradations nucléolytiques, est le blocage du ribose par un pont de liaison entre l'oxygène en position 2' et le carbone C4' (I.2.b). Cette modification donne des résidus appelés LNA pour « Locked Nucleic Acid residues » qui présentent une meilleure stabilité thermodynamique et sont nettement plus stable en présence de différents sérums (veau, humain ou de souris), tout en conservant une activité d'inhibition. La modification de type LNA favoriserait la complexation au niveau du complexe RISC du brin qui ne porte pas la modification, indiquant qu'il est préférable de placer ces modifications sur le brin sens (Elmen *et al.*, 2005).

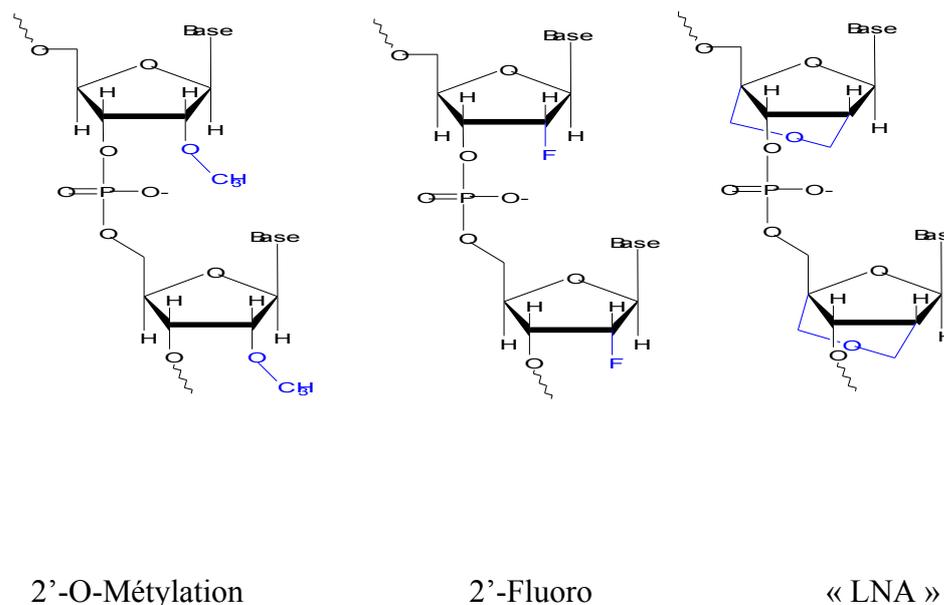


Figure 4 : Exemple de modification chimique des siARN sur le carbone en position 2'.

Enfin, Soutschek *et al.* ont synthétisé un siARN dirigé contre l'ARNm de l'apolipoprotéine B. Ces siARN ont été modifiés chimiquement par conjugaison d'un groupement cholestérol à l'extrémité 3' du brin sens (chol-siARN). *In vitro*, le chol-siARN ne présente pas de différence significative d'efficacité par rapport à un siARN non modifié (Soutschek *et al.*, 2004). Les auteurs ont ensuite montré qu'après une injection dans la circulation sanguine, l'internalisation du chol-siARN a été observée dans différents organes comme le foie, le jéjunum (partie du petit intestin), le cœur, les reins, les poumons et les tissus graisseux ; alors que les mêmes expériences réalisées avec un siARN ne contenant pas un groupement cholestérol n'ont pas conduit à l'internalisation de siARN dans différents organes. Le chol-siARN a induit à une diminution des niveaux d'ARNm en apolipoprotéine B de plus de 50% dans le foie et de 70% dans le jéjunum. Cette diminution a conduit à une réduction du taux de cholestérol dans le sang, pour atteindre un taux comparable à celui observé chez des souris dont le gène de l'apolipoprotéine B a été supprimé (Soutschek *et al.*, 2004).

La plupart de ces études, incluant l'effet des modifications sur l'efficacité des siARN ont été réalisées sur des cellules en culture. La question est de savoir si ces relations modifications chimiques/activité sont également valables pour des études *in vivo*. Par exemple, il a été montré qu'un siARN modifié par remplacement du groupement hydroxyle de la pyrimidine en position 2' par un atome de fluor (I.2.b) permettait d'augmenter le temps de demi-vie de ce siARN dans le plasma humain (Layzer *et al.*, 2004). Cependant, ces propriétés ne se sont pas traduites par une augmentation de l'activité d'inhibition ou de la durée d'inhibition par rapport à un siARN non modifié. A l'inverse, dans une étude très récente Morrissey *et al.* ont montré qu'un siARN « hyper-modifié » (contenant plusieurs types de modifications sur le même siARN) induisait une meilleure efficacité d'inhibition (Morrissey *et al.*, 2005).

Des études *in vivo* plus poussées seraient vraiment nécessaires pour comprendre comment augmenter les propriétés pharmaco-cinétique et pharmaco-dynamique par des modifications chimiques des siARN en dehors d'un aspect de formulation.

Les ARN doubles brins et la réponse interféron. La réponse d'interféron dans une cellule est un système de défense naturel contre les infections virales. Elle se déclenche quand un ARN double-brin, qui est produit par une réplication virale, active un complexe qui contient une protéine kinase et un signal de transduction (PKR). Ceci conduit à l'activation d'une cascade de signaux responsable de la sur-expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse interféron (Moss and Taylor, 2003). PKR est responsable également de la phosphorylation de eIF2 α , un facteur de transcription, qui stoppe la synthèse protéique en général. Ainsi, quand la réponse interféron est suffisamment activée, les cellules cessent de proliférer, ce qui conduit éventuellement à l'apoptose puis la mort la cellulaire (Stark *et al.*, 1998). Bien que les siARNs soient des ARN double-brin il a longtemps été suggéré qu'ils ne déclenchaient pas de réponse interféron dans les cellules, de part leur petite taille (~21 pb) (Moss and Taylor, 2003). Cependant, deux récentes études ont montré que les siARN, en plus d'inhiber l'expression du gène contre lequel ils étaient dirigés, activaient également les composants de la réponse interféron (I.2.b) (Moss and Taylor, 2003 ; Sledz *et al.*, 2003 ; Bridge *et al.*, 2003).

Certains gènes impliqués dans la réponse interféron ont été sur-exprimés aussi bien suite à la transfection de siARN synthétiques que de shARN produit par des vecteurs d'expression (Sledz *et al.*, 2003). Ces résultats sont en accord avec une autre étude, qui a montré que le complexe PKR possédait deux copies de domaines de liaison à l'ARN double-brin (comme chez les protéines DICER) (Bevilacqua *et al.*, 1998).

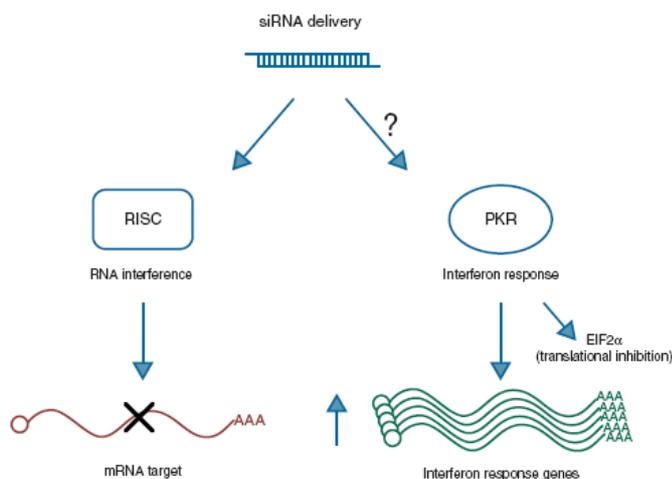


Figure 5 : *Effets spécifiques et/ou non spécifiques des siARN. Les siARN internalisés dans une cellule sont pris en charge par la machinerie cellulaire de l'ARNi. Cependant, il se pourrait qu'ils activent la voie de la réponse interféron par interférence avec le complexe PKR (Moss and Taylor, 2003).*

Néanmoins, sur les différents siARN synthétiques testés, tous n'activent pas la réponse interféron, ce qui montre qu'elle dépend de la séquence du siARN et de la méthode de transfection de siARN (Moss and Taylor, 2003 ; Bridge *et al.*, 2003). D'autre part, ces deux études ont montré que l'augmentation de la quantité de siARN délivrée dans la cellule amplifiait l'activation de la réponse interféron. L'hypothèse émise est, qu'en présence d'un vecteur d'expression synthétisant des shARN, la machinerie d'ARNi est saturée, laissant ainsi s'accumuler des shARN libres.

I.2.c Avantages et inconvénients des technologies « antisens »

Devant l'engouement de la technologie du processus ARNi, il s'agit de faire le point sur la place actuelle des premières technologies antisens comme les antisens ODNs, les ribozymes et les DNAzymes, comparée à celle du ARNi.

L'ARNi est un processus dans lequel les siARN ciblent les ARNm au niveau du cytoplasme des cellules, ce qui explique qu'ils n'ont pas la capacité d'inhiber des ARN purement nucléaires. Les ribozymes et les antisens ODNs, au contraire, peuvent être conçus pour cibler des parties introniques ou des ARN nucléaires. Mais pour la plupart des séquences, le ciblage de l'ARNm au niveau cytoplasmique peut être suffisant pour inhiber l'expression d'un gène. Ensuite, les siARN présentent l'avantage par rapport aux autres technologies d'une très bonne efficacité d'inhibition pour de faibles concentrations que celles utilisées pour les autres agents antisens. Cependant, il n'y a pas été publié de comparaison directe entre l'efficacité des siARN, des ribozymes ou des DNAzymes. Les différents avantages et inconvénients présentés par chaque technologie antisens sont résumés dans le I.2.c ci-dessous.

Table 1 Relative strengths and weaknesses of antisense technologies

Approach	Advantages	Disadvantages
Antisense ODNs	Can be modified to improve selectivity and efficacy Can be targeted to introns Easy to make	Can induce interferon (if long and has CpG) Can bind proteins (aptamer activity) Only exogenous delivery possible (synthetic) Off-target effects
Ribozymes	Can discriminate single base polymorphisms Can be used to correct defects Sequences can be appended to change target specificity Simple catalytic domain Can target introns/subcellular compartments	Requires GUC triplet—limits choice of target Binds proteins (aptamer activity)
DNAzymes	Inexpensive to make Good catalytic properties Can be modified for systemic delivery	Only exogenous activity Off-target effects?
RNAi	Effective at low concentrations Bypasses interferon pathway Can be delivered by multiple pathways Tissue-specific expression possible Nontoxic? Lasts longer?	Cannot target nuclear RNAs or introns No option for improving if target refractory Some reports of off-target effects

Tableau 2 : *Tableau comparatif des avantages et inconvénients des technologies antisens (Scherrer and Rossi, 2003).*

D'une manière générale, l'inconvénient majeur des technologies antisens est l'inhibition non spécifique d'autres gènes dans la cellule (« Off target effects », I.2.c). Effectivement, il est possible que les acides nucléiques antisens se fixent de manière non-spécifique sur un ARNm non ciblé, entraînant une inhibition non souhaitée d'une protéine. Par exemple, il a été montré dans la technologie des antisens ODNs, que la RNase-H pouvait cliver des ARN non ciblés du fait que l'appariement de six ou sept bases successives entre l'ODN et l'ARN étant suffisant pour déclencher la réaction de clivage de l'ARN (Scherrer and Rossi, 2003). Les ribozymes sont par contre plus sensibles et l'inhibition non spécifique n'est par leur inconvénient majeur (I.2.c). En ce qui concerne les siARN, il est aujourd'hui trop tôt pour dresser des conclusions sûres de l'inhibition non-spécifique des siARN, mais ce point est un des axes de recherche qui doit être approfondi. Par rapport aux autres technologies antisens, les siARN présentent l'avantage d'être efficaces pour de faibles concentrations.

I.3 Modifier ou corriger l'expression d'un gène :

Dans les cas de mutation ponctuelle d'un gène, une des stratégies envisagées, consiste à corriger *in situ* la séquence mutée et rétablir ainsi une expression correcte du gène. En effet, plusieurs techniques ont été développées et consistent à introduire des oligonucléotides capables de se fixer spécifiquement à la séquence cible, puis d'intervertir une partie de la séquence contenant la mutation avec une séquence correcte.

I.3.a Les SFHR

Des petits fragments homologues de remplacement (SFHR : « Small Fragment Homologous Replacement ») sont impliqués dans une stratégie de correction du gène qui consiste à introduire dans la cellule des petits fragments d'ADN double-brin ou simple-brin (SDF : « Small DNA Fragments »), dont la taille ne dépasse pas 1 kb. Ces SDF ont été utilisés pour modifier *in situ* la séquence du gène muté, aussi bien dans des cellules humaines que murines (Goncuz *et al.*, 2001 et 1998 ; Kaspas *et al.*, 2001 et 2002 ; Colosimo *et al.*, 2002 ; Bruscia *et al.* 2002). Les SDF utilisés contiennent des séquences d'ADN, non-codantes, qui s'apparient avec la séquence homologue située sur le gène d'intérêt, et échangent la séquence endogène avec la séquence exogène apportée par le SDF (I.3.a). Le mécanisme d'échange des séquences n'a pas été clairement défini, cependant il agirait de manière similaire aux mécanismes de la recombinaison homologue et/ou des voies de réparation de l'ADN.

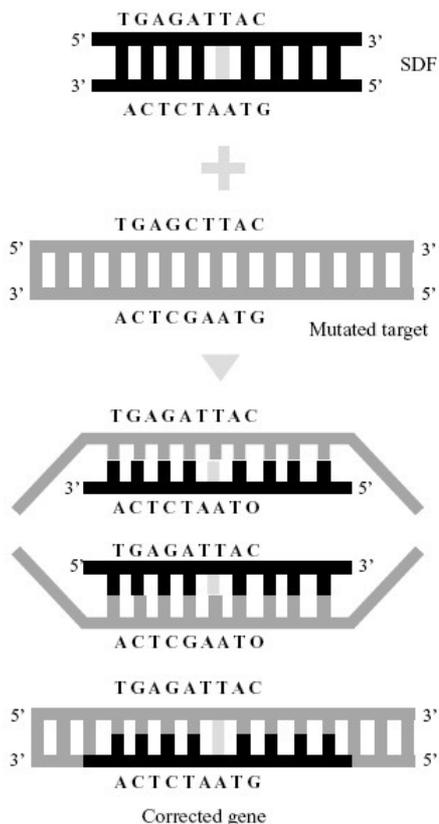


Figure 6 : Représentation schématique de l'échange entre la séquence des SDF et du gène endogène. Les SDF s'apparient avec la séquence pour laquelle ils sont dirigés et conduisent à un échange homologue entre leur séquence et la séquence mutée.

Les SFHR ont montré leur efficacité dans plusieurs études pour la correction de la mutation $\Delta F508$ du gène codant pour le canal CFTR (« Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator »), impliquée dans la maladie de la mucoviscidose (Gruenert *et al.*, 1998 ; Gruenert *et al.*, 1999 ; Gruenert *et al.*, 2003 ; Goncz *et al.*, 1998 ; Sanguiolo *et al.*, 2002). La mutation $\Delta F508$ est la mutation la plus fréquemment associée à la mucoviscidose (Kerem *et al.*, 1989 ; Tsui *et al.*, 1992) et la correction de cette mutation *in situ* présente une intéressante approche thérapeutique. Ces études ont montré que les SFHR ont conduit à l'échange entre la séquence génomique mutante et la séquence génomique de type sauvage apporté par les SFHR, suite à l'introduction de petits fragments d'ADN (491/488 nucléotides) dans des cellules épithéliales en culture (Goncz *et al.*, 1998). Une étude *in vivo* a également montré que les SFHR ont conduit à la correction du gène endogène CFTR chez la souris dans

le poumon et les intestins (Goncz *et al.*, 2001). Des analyses genotypiques (ARNm) et phénotypiques (transport de l'ion chlore) ont pu montrer que la modification induite par les SFHR avaient une fréquence d'occurrence de 1 à 10% dans les cellules transfectées. Cependant, dans cette étude il n'a pas été précisé la stabilité à long terme des SFHR suite à la transfection des SFHR par des vecteurs synthétiques.

I.3.b Les chiméraplastes

Les chiméraplastes, appelés également oligonucléotides chimériques ARN/ADN, ont été conçus pour cibler une séquence spécifique homologue et induire la correction **d'une seule base** au niveau d'un site spécifique (Rando, 2002 ; Bartlett *et al.*, 2000 ; Bertoni and Rando, 20002 ; Thorpe *et al.*, 2002 ; Colosimo *et al.* 2002). Les chiméraplastes sont des molécules simple brin constituées d'environ 70 à 80 bases. L'appariement du chiméraplaste et de la séquence cible, est représentée sur la I.3.b avec le gène de la dystrophine et son chiméraplaste associé. La séquence du gène de la dystrophine sauvage est soulignée sur la I.3.b-A et présente un codon CAA qui se traduit en une glutamine, alors que le gène muté présente un codon TAA qui se traduit en un codon stop (Rando *et al.*, 2000). La séquence du chiméraplaste (I.3.b-B) contient une région de mutation de 6 nucléotides ADN complémentaire de la séquence cible (TTGTTG), sauf pour le site de mutation qui n'est pas complémentaire, encadrée par deux blocs d'une dizaine de nucléotides chacun de résidus ARN modifiés (ARN 2'-O-méthyl) également complémentaires à la séquence. La modification chimique des résidus ARN correspond à une méthylation sur le carbone en position 2', qui apporte une protection contre les nucléases. Le chiméraplaste adopte une structure secondaire (I.3.b-B) qui lui apporte une stabilité chimique et thermique et également une résistance aux hélicases et aux nucléases (ARN et ADN). Après appariement entre le chiméraplaste et le gène (I.3.b-C), sauf pour le site d'échange où il n'y a pas appariement, l'échange entre les deux bases se fait pas un mécanisme similaire au mécanisme endogène de réparation de l'ADN (Rando *et al.*, 2000).

génomique. Chez le modèle dystrophique de la souris (*mdx*), l'exon 23 présente une mutation ponctuelle qui code pour un codon stop. Le mécanisme du saut d'exon (I.3.c) est basé sur l'utilisation d'un **oligonucléotide antisens (ARN synthétique)** qui va se fixer spécifiquement sur l'exon 23, porteur de la mutation, de l'ARN pré-messager du gène de la dystrophine. Ainsi, la présence de l'antisens va au cours de l'épissage de l'ARN pré-messager, produire un ARN messager dont l'exon 23 sera absent. La mutation sur l'exon 23 code pour un codon stop qui produit une protéine dystrophine tronquée et non fonctionnelle. En l'absence de l'exon 23, le codon stop disparaît et la protéine dystrophine synthétisée est plus courte que la protéine sauvage, mais elle est fonctionnelle. La présence de protéine dystrophine tronquée est d'ailleurs observée chez une forme moins sévère de la maladie, la myopathie de Becker. Les patients atteints de la myopathie de Becker expriment une protéine tronquée qui garde une partie de ses fonctionnalités.

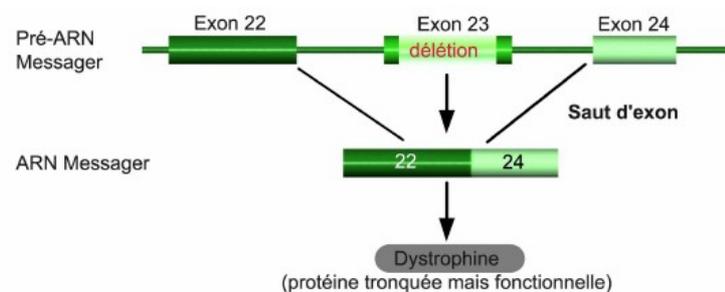


Figure 8 : *Le saut d'exon chez les souris modèle Duchenne. Le saut d'exon consiste à fixer un oligonucléotides antisens sur l'exon 23, avant l'épissage de l'ARN pré-messager. La présence de l'antisens va au cours de l'épissage de l'ARN pré-messager, produire un ARN messager dont l'exon 23 est absent. Le codon stop, présent sur l'exon 23 chez le modèle de souris de la dystrophie de Duchenne, est ainsi supprimé et l'ARNm permet de produire une protéine tronquée, mais fonctionnelle (<http://www.afm-france.org/>).*

Différentes études ont testé l'effet du saut d'exon par des oligonucléotides antisens ARN aussi bien *in vitro* (Mann *et al.*, 2001 ; McClorey *et al.*, 2005) qu'*in vivo* (Goyenvallé *et al.*, 2004 ; McClorey *et al.*, 2005). Les expériences ont montré que la transfection sur des myoblastes en culture (Mann *et al.*, 2001 ; Aartsma-Rus *et al.*, 2002) et l'injection intramusculaire chez la souris (Goyenvallé *et al.*, 2004 ; Mann *et al.*, 2001), des oligonucléotides antisens ARN ont conduit à l'expression de la protéine dystrophine fonctionnelle. Le groupe de Partridge a montré qu'après une seule injection intramusculaire d'oligonucléotides antisens ARN (dirigé contre l'exon 23), l'expression de la dystrophine était rétablie dans une large partie des fibres musculaires et persistait jusqu'à 12 semaines et la quantité de protéine exprimée représentait environ 20% de la quantité de protéine exprimée dans une souris normale (Lu *et al.*, 2005 ; Lu *et al.* 2003).

II Les techniques de transfert d'acides nucléiques

Les acides nucléiques présentés dans le paragraphe précédent sont actifs dans la partie nucléaire pour l'ADN plasmidique et dans le cytoplasme pour les siARN, c'est pourquoi la première étape limitante est le transfert de ces molécules au sein de la cellule.

Les techniques de transfert d'acides nucléiques, *in vivo* ou *in vitro*, peuvent être subdivisées en deux catégories : 1) l'utilisation de vecteurs biologiques naturels, c'est le transfert de gène viral, qui est basée sur le phénomène naturel de « l'infection » des cellules par des virus, appelés vecteurs viraux ; et 2) les techniques utilisant soit des approches chimiques ou physiques pour la « transfection » du matériel génétique. Le matériel génétique peut également être injecté directement, sans l'aide de vecteur, c'est la transfert « d'ADN nu » (Lechardeur *et al.*, 1999 ; Mehier-Humbert *et al.*, 2005 ; Wolff *et al.*, 1991 ; Sebestyen *et al.*, 2006).

II.1 L'injection d'ADN nu

De part sa nature polyanionique, on a longtemps pensé que l'ADN ne pouvait pénétrer passivement à travers la membrane cellulaire, elle-même relativement anionique. Mais depuis les années 1990, diverses expériences d'injection directe *in situ* d'ADN ont démontré une expression du gène dans plusieurs tissus (muscle cardiaque, muscle squelettique, cerveau) (Lu *et al.*, 2003 ; Jayankura *et al.*, 2003). Cependant, l'injection intramusculaire d'ADN nu reste faiblement efficace, car moins de 1% de la dose injectée est internalisée par les cellules. De plus, cette expression reste très localisée au niveau du site d'injection. Récemment, l'injection hydrodynamique rapide (5-8 secondes), d'un grand volume (1,6 ml) d'une solution d'ADN nu dans la veine caudale, l'artère fémorale et iliaque d'une souris, a permis d'obtenir une expression du transgène non négligeable dans divers organes (Niidome and Huang, 2002 ; Budker *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.* 2001 ; Liu and Huang, 2001).

Cependant, comparée aux autres techniques de transfert de gènes, l'expression du transgène reste assez faible (Niidome and Huang, 2002).

II.2 L'utilisation de techniques mécaniques ou physiques

Les techniques mécaniques

La micro-injection. La micro-injection est la méthode la plus directe pour introduire des molécules d'acides nucléiques dans le cytoplasme ou le noyau des cellules, cependant elle se limite à une application *in vitro*. C'est un procédé réalisé sur une seule cellule à la fois utilisant une micro-pipette en verre, un micro-injecteur et un système qui contrôle précisément les mouvements de la micro-pipette. Le matériel génétique est administré à la cellule à travers la micro-pipette par une pression hydrostatique. Cette technique a été utilisée avec succès pour la première fois en 1980 (Capecchi, 1980) et est aujourd'hui la technique la plus couramment utilisée pour produire les animaux transgéniques (Gordon *et al.*, 1980 ; Auerbach, 2004 ; Uchida *et al.*, 2001 ; Hofmann *et al.*, 2004).

La propulsion de particules : « Gene gun ». Cette technique a été utilisée en 1987 pour le transfert de gène dans des cellules d'origine végétale, et s'est étendue aux cellules de mammifères dans les années 1990. Les molécules d'ADN sont précipitées sur des micro-particules (1-1,5 μm) de métaux lourds, qui sont propulsées dans la cellule cible sous l'effet d'un arc électrique. Deux systèmes sont actuellement commercialisés : Accell gene gun (Agracetus, Inc., Middleton, WI, USA) et l'Helios gene gun (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). L'application majeure de cette technique est le transfert de gène dans l'épiderme de la peau (Eisenbraun *et al.*, 1993). Elle a également montré son efficacité dans des organes comme le foie ou le cerveau (Yoshida *et al.* 1997 ; Sato *et al.*, 2000).

Les techniques physiques

L'électroporation. L'électroporation est une technique qui consiste à appliquer un champ électrique contrôlé, après une injection d'ADN nu. Le champ électrique est appliqué au niveau du tissu cible à l'aide de deux électrodes, liées à un générateur, et placées de part et d'autre de celui-ci. Durant la période d'exposition au champ électrique, la membrane des cellules devient plus perméable aux molécules exogènes telles que l'ADN, et permet ainsi son internalisation. L'électroporation s'est montrée efficace pour le transfert de gène dans différents organes comme le muscle, la peau, le foie et les tumeurs (Mehier-Humbert *et al.*, 2005).

La sonoporation. Cette technique est basée sur le même principe que l'électroporation, mais le champ électrique est remplacé par une irradiation aux ultra-sons. Une augmentation de l'expression du transgène a été observée lors de l'irradiation aux ultra-sons d'un tissu, après une injection d'une solution d'ADN. En effet, les ultra-sons, associés à une solution qui génère des microbulles, sont capables comme pour l'électroporation, d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires à des macromolécules comme l'ADN (Miller, 2000).

La magnétofection. La magnétofection est une méthode récente (Scherer, 2002) qui est basée sur l'association de nanoparticules d'oxyde de fer avec l'ADN et son vecteur (chimique ou viral). Les nanoparticules de fer sont enrobées d'un polymère et une fois associées à l'ADN et son vecteur, elles sont concentrées au niveau des cellules cibles par la force d'un champ magnétique externe. Cette technique est donc une amélioration des procédures de transfection utilisant des vecteurs viraux ou chimiques.

II.3 Les vecteurs viraux

Les virus, de part leur longue évolution, représentent des outils de choix pour le transfert d'acides nucléiques. Ils pénètrent spécifiquement et efficacement dans de multiples cellules en utilisant divers mécanismes (Whittaker, 2003). Ensuite, ils s'approprient la machinerie cellulaire pour exprimer leur patrimoine génétique et se multiplier afin d'infecter d'autres

cellules. Cependant, les virus sauvages ne peuvent servir directement à des expériences de transfert d'acides nucléiques, car la plupart d'entre eux sont pathogènes et dangereux. Afin de devenir un vecteur non-pathogène, le virus est modifié par génie génétique. La partie infectieuse de son patrimoine génétique est retirée et remplacée par le gène thérapeutique. Toutefois, le virus conserve les nombreuses structures qui lui permettent d'infecter une cellule (protéines de l'enveloppe, protéines fusogènes, par exemple). Ces particules virales non-pathogènes ont été utilisées pour de nombreuses applications *in vivo* et suivant le type de tissus ou de cellules ciblées, différents vecteurs ont été utilisés (Kay, 2001). Les vecteurs viraux sont classés en deux grands groupes : ceux qui intègrent leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule hôte (virus adénoassociés et rétrovirus) et ceux qui ne l'intègrent pas (adénovirus et virus herpétique) (Ruitenber *et al.*, 2002 ; Lai *et al.*, 2002 ; Buchschacher, 2001).

Les vecteurs viraux possèdent de nombreux avantages pour le transfert d'acides nucléiques. Leur succès dans les protocoles de transfert de gène repose sur leur important potentiel de transfection *in vivo*. Cependant, ils souffrent de sévères inconvénients. En effet, l'intégration d'un transgène de grande taille est difficile, certains engendrent des réactions immunitaires, d'autres peuvent redevenir pathogènes après mutagenèse, et enfin, leur production et leur manipulation sont compliquées et coûteuses.

II.4 Les vecteurs non-viraux

Les vecteurs non-viraux, appelés également vecteurs synthétiques, sont des molécules généralement cationiques de nature lipidique ou polymérique, capables d'interagir avec les charges négatives des acides nucléiques. Ces complexes « vecteurs/acides nucléiques » sont pour la plupart d'entre eux très efficaces *in vitro*, mais leur efficacité *in vivo* reste assez faible. Ces complexes se présentent généralement sous forme de sphères d'un diamètre allant d'une vingtaine de nanomètres à plusieurs micromètres et peuvent être chargés positivement ou négativement ou bien être neutre. Par ailleurs, il est très difficile de comparer les différents vecteurs synthétiques entre eux car leur efficacité de transfection et leur toxicité dépendent de nombreux paramètres tels que la structure chimique du vecteur, la formulation des complexes vecteur/acides nucléiques et la nature de la transfection (*in vitro* / *in vivo*).

Cependant, ces vecteurs ont le grand avantage d'être simples à élaborer et à utiliser, peu coûteux, et ils sont avant tout peu immunogènes. En effet, ils n'ont pas de risque de virulence puisque ce sont des particules inertes ; de plus, les recherches se sont concentrées sur l'utilisation de molécules naturelles telles que des lipides ou des polymères.

Les vecteurs synthétiques présentent un potentiel prometteur dans le domaine du transfert d'acides nucléiques. Le dernier paragraphe de cette partie est entièrement consacré à la description des différentes approches de conception d'un vecteur synthétique.

III Les barrières biologiques dans la vectorisation synthétique :

En l'absence de vecteurs synthétiques, les acides nucléiques présentent une forte densité de charge négative qui empêche leur passage à travers la membrane cellulaire hydrophobe. L'association des acides nucléiques avec des vecteurs synthétiques chargés positivement permet de diminuer cette densité de charge négative, et de faciliter le passage à travers les membranes cellulaires (Roth and Sundaram, 2004). L'internalisation des acides nucléiques dans la cellule se déroule en plusieurs étapes : (1) le trafic extracellulaire des complexes jusqu'aux cellules ; (2) l'adhésion des complexes à la surfaces des cellules ; (3) l'entrée des complexes dans la cellule ; (4) la libération du matériel génique dans le cytoplasme ; (5) le transport du matériel génétique jusqu'au noyau ; (6) l'entrée du matériel génétique dans le noyau.

L'efficacité de la transfection repose tout d'abord sur la capacité des vecteurs synthétiques utilisés à franchir chacune de ces étapes tout en préservant l'activité biologique du matériel génétique transporté. Les principales étapes du trafic extracellulaire et intracellulaire des complexes sont schématisées en III.

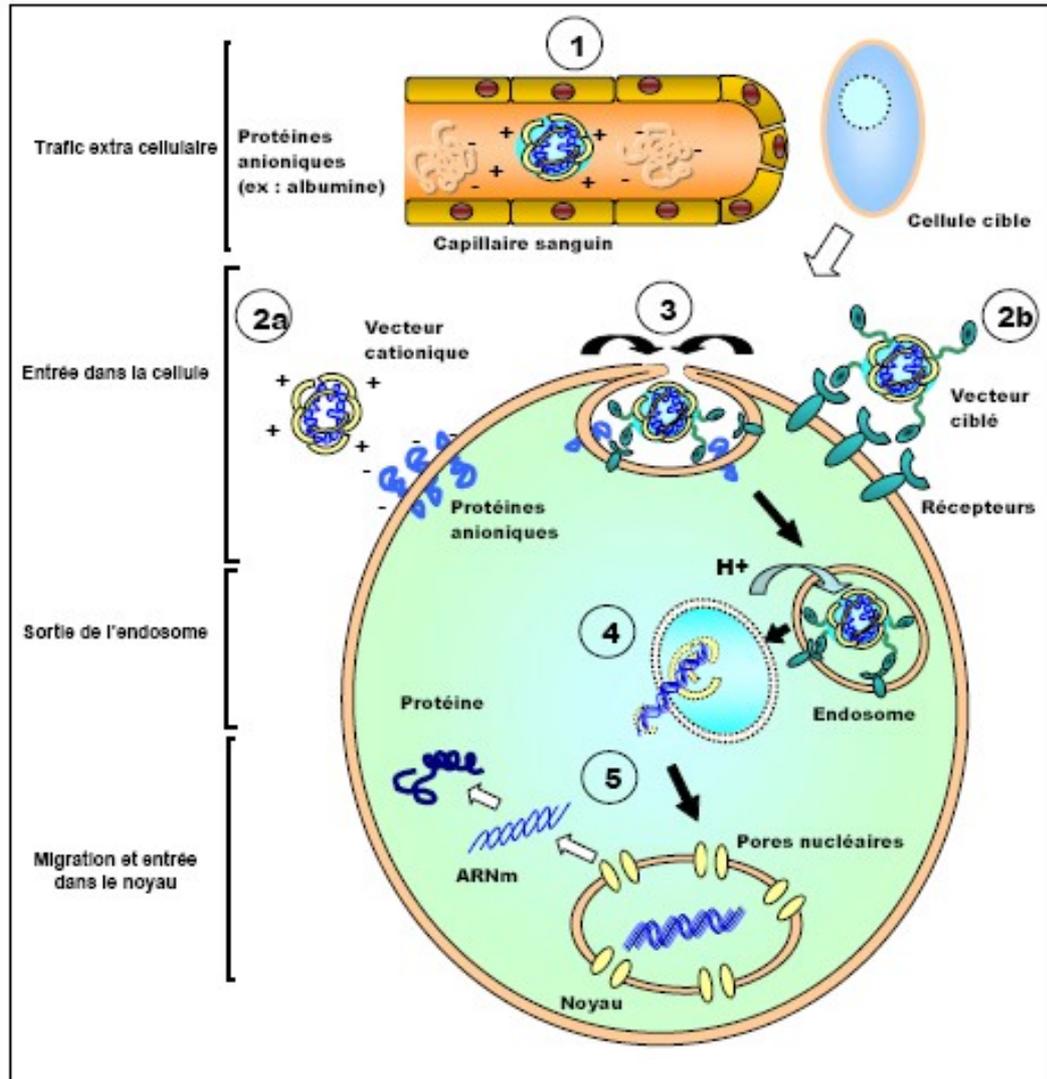


Figure 9 : Le trafic extracellulaire et intracellulaire des complexes vecteurs/acides nucléiques.

Les voies d'internalisation des complexes vecteurs synthétiques/acides nucléiques ont été principalement étudiées pour des vecteurs synthétiques comme les lipides cationiques et les polymères cationiques.

III.1 Le trafic extracellulaire

Les composants du milieu extracellulaire

Un ADN plasmidique ou des acides nucléiques de type ARN, non protégés, sont très rapidement dégradés en quelques minutes par la présence des RNases et des DNases présentes dans l'espace extracellulaire. Les vecteurs synthétiques ont pour premier rôle de compacter l'ADN dans des structures supramoléculaires, bloquant ainsi l'accès des enzymes nucléolytiques aux acides nucléiques. Pour cette raison, le vecteur synthétique doit être chimiquement stable contre des attaques enzymatiques ou chimiques.

La formation des lipoplexes et des polyplexes est entièrement dirigée par l'entropie du système et les interactions électrostatiques, entre les charges positives du vecteur et les charges négatives des acides nucléiques. Pour cette raison, la stabilité du complexe vecteur/ADN est très sensible aux divers composés chargés et la concentration en sels présents dans les fluides biologiques. En effet, les interactions entre l'ADN et le vecteur sont affaiblies pour des concentrations en sels croissantes, le vecteur perd ainsi son rôle de protection de l'ADN contre les attaques enzymatiques (Kang *et al.*, 2005). D'autre part, il a été montré que des complexes présentant une charge globale neutre formaient, dans des conditions de concentrations en sels physiologiques, des agrégats qui sont généralement inefficaces pour le transfert de gènes (Pitard *et al.*, 2001). Par contre, des complexes qui présentent une charge globale positive sont stables colloïdalement dans les mêmes conditions. Cependant, une adsorption de l'albumine ou d'autres protéines chargées négativement sur ces complexes chargés positivement peut être responsable d'une agrégation qui conduit rapidement à une prise en charge des complexes par les cellules phagocytaires (Kang *et al.*, 2005). Des complexes chargés positivement injectés par voie intramusculaire interagissent très rapidement avec les charges négatives de la matrice extracellulaire, composée de protéoglycanes, ce qui limite leur pouvoir de diffusion et empêche les complexes d'atteindre les cellules.

Ainsi, les principales barrières que les complexes rencontrent sont les concentrations en sels, la présence de protéines, circulantes ou de surface, chargées négativement et la présence des macrophages.

Comment générer des complexes « furtifs » dans des fluides biologiques

Il est possible de greffer sur les vecteurs synthétiques des polymères hydrophiles comme le poly(éthylène-glycol) (PEG) qui ont pour rôle de stabiliser les complexes contre les inactivations dues aux protéines chargées négativement. Trois possibilités s'offrent aux vecteurs : soit le PEG est greffé directement sur le vecteur, soit le PEG est greffé après complexation du vecteur avec les acides nucléiques, soit au moment de la formulation le PEG est ajouté comme stabilisateur colloïdal (Pitard *et al.*, 2001 ; Ogris *et al.*, 1999 ; Kircheis *et al.* 1999).

Les PEG sont des molécules hydrophiles et non immunogènes. Le recouvrement de la surface des complexes par des PEG crée un réseau hydrophile dense autour de ces particules. La morphologie qu'adoptent ces polymères (PEG) est variable (brosse, champignon) et l'enrobage qui en résulte crée une barrière stérique entre la particule et le milieu qui l'entoure

(III.1). Cet enrobage stérique et hydrophile empêche toutes interactions hydrophobes ou électrostatiques et entraîne une diminution des phénomènes d'adsorption ou d'adhérence des constituants sanguins sur les particules.

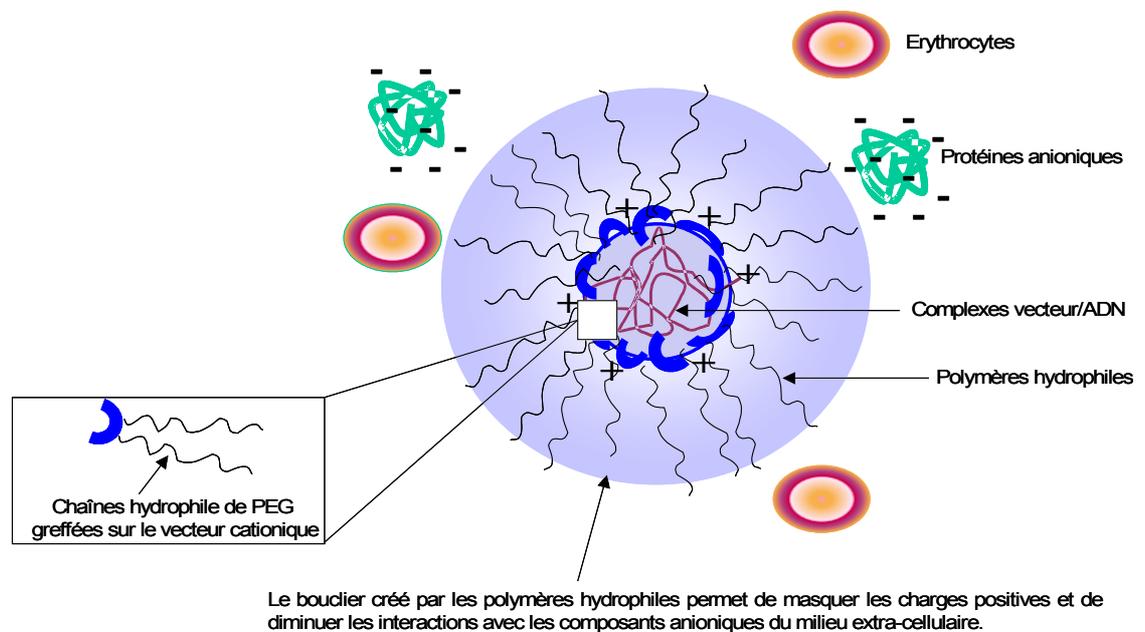


Figure 10 : *Effet des polymères hydrophiles sur la biodisponibilité.* Les chaînes hydrophiles de PEG s'orientent vers la périphérie du complexe et forme un bouclier, permettant de masquer les charges positives des complexes.

Il a été montré que le greffage de polymères hydrophiles PEG sur les polymères cationiques a permis d'augmenter le temps de circulation des polyplexes dans le sang, par rapport à des polyplexes ne présentant pas de PEG (Merdan *et al.*, 2005 ; Oupicky *et al.*, 2002). De plus, les polyplexes présentant des groupements hydrophiles ont une meilleure solubilité dans l'eau et augmente la viabilité des cellules après transfection et permet en plus de formuler des complexes à de fortes concentrations en ADN (Lee and Kim, 2005 ; Kang *et al.*, 2005).

III.2 Adhésion des complexes à la membrane cellulaire

L'une des première hypothèse émise pour l'entrée des complexes dans la cellule était par fusion membranaire entre les complexes et la membrane cellulaire (Felgner *et al.*, 1987).

Cependant, de plus récentes expériences ont démontré que ces complexes entraînent dans la cellule par un processus d'endocytose (Wattiaux *et al.*, 2000 ; Conner and Schmid, 2003). Ainsi, les vecteurs synthétiques interagiraient avec des composants de la membrane cellulaire présents sur la face extracellulaire. Les interactions peuvent être de deux types : interactions non-spécifiques ou interactions ligand-récepteur.

Les interactions non spécifiques avec la membrane des cellules

Les complexes vecteurs synthétiques/acides nucléiques formés à partir de lipides cationiques ou de polymères cationiques présentent généralement une charge globale positive. Ainsi, ces complexes interagissent avec la membrane cellulaire qui présente des protéines anioniques. Ces protéines anioniques de la surface de la membrane cellulaire sont des protéoglycanes du type sulfate d'héparine (HSPGs) impliquées dans de multiples processus d'adhésion et de reconnaissance cellulaire. Les protéoglycanes sont formés par un noyau protéique sur lequel se lient une ou plusieurs glycosaminoglycanes sulfatés. Les principaux glycosaminoglycanes présents sont l'acide hyaluronique, le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparane-sulfate, l'héparine, le kératane-sulfate (Medina-Kauwe *et al.*, 2005).

Par exemple, Mislick et Baldeschwieler ont montré que le polymère cationique polylysine, complexé à l'ADN avec un rapport de charges (amine/phosphate) +/- supérieur à 1, a conduit à une transfection et une expression du gène optimales, alors que des rapports de charges inférieurs à 1 ont conduit à des niveaux de transfection plus faibles (Mislick and Baldeschwieler, 2005). Le rôle des protéoglycanes dans le processus de transfection a été examiné en utilisant des inhibiteurs des glycosaminoglycanes. Le traitement des cellules avec du chlorure de sodium, qui empêche la sulfatation des glycosaminoglycanes, a montré que la transfection était inhibée de manière dose-dépendante, et que le niveau d'expression du gène était diminué de 70% comparé aux cellules non traitées. De plus, le traitement des cellules avec des lyases glycosaminoglycanes, comme l'héparinase II et la chondroitinase ABC, a conduit à une diminution de l'expression de 70% et de 20%, respectivement. Ces expériences ont montré l'importance des protéoglycanes dans l'efficacité de transfection des polyplexes (Baeurle *et al.*, 1996).

Les lipoplexes seraient également internalisés dans la cellule après interactions électrostatiques avec les protéoglycanes. En effet, Mounkes *et al.* ont démontré que des cellules Raji qui n'exprimaient pas les protéoglycanes ne pouvaient être transfectées par des lipoplexes (Mounkes *et al.*, 1998). Il a également été montré que l'efficacité de transfection dépendait de la charge positive du lipoplexe (Zabner *et al.* 1995 ; Labat-Moleur *et al.* 1996).

Des expériences d'inhibition de l'expression de ces protéines par action enzymatique ou métabolique ont permis d'établir une relation entre l'efficacité de transfection et la présence de ces protéines (Mislick and Baldeschwieler, 1996). En effet, de nombreux travaux réalisés en présence de différents lipides sur différentes lignées cellulaires, ont permis de montrer que les

lipoplexes seraient majoritairement internalisés dans la cellule par endocytose après interactions électrostatiques avec la membrane plasmique (Watanabe *et al.*, 1994 ; Friend *et al.*, 1996).

Interactions ligand-récepteur

Le ciblage cellulaire peut être réalisé par injection directe dans l'organe considéré ou par l'association du vecteur avec des ligands spécifiques qui sont reconnus par des récepteurs présents à la surface des membranes cellulaires. Ce ciblage permet de concentrer spécifiquement les complexes sur la cellule cible et d'augmenter la possibilité d'internalisation du transgène à condition que la formation du complexe ligand-récepteur induise une internalisation cellulaire du complexe.

A ce jour, de multiples vecteurs lipidiques ou polymériques couplés à divers ligands ont été synthétisés et évalués *in vitro* et *in vivo* (Anwer *et al.*, 2000 ; Ren *et al.*, 2001 ; Roth and Sundaram, 2005). Quelques exemples de ligands, de structures (principalement des protéines) et de types cellulaires qui représentent des cibles sont répertoriés dans le III.2 suivant.

Structure ciblée	Ligand	Tissus ou cellules cibles
Récepteur asialoglycoprotéine	Asialoglycoprotéine	Hépatocytes
Récepteur au galactose	Galactose	Hépatocytes
Récepteur au mannose	Mannose	Cellules dendritiques
Récepteur à la transferrine	Transferrine	Erythroblastes, cellules hématopoïétiques
Récepteur au folate	Acide folique	Cellules tumorales
Intégrine	RGD (arginine-glycine-acid aspartique)	Cellules épithéliales, fibroblastes et cellules endothéliales
Récepteur NTRH (Récepteur à la Neurotensine de haute affinité)	Neurotensine	Cellules neuronales

Tableau 3 : Exemple de différents récepteurs présents à la surface des cellules pouvant faire l'objet d'un ciblage spécifique (inspiré de Kang *et al.*, 2005).

Les vecteurs synthétiques présentent l'avantage de pouvoir être modifiés chimiquement, ainsi il est assez facile d'imaginer différentes stratégies pour rendre un vecteur synthétique spécifique à un type cellulaire en fixant par liaison covalente le ligand sur le vecteur (Kang *et al.*, 2005). Les différentes stratégies de fixation d'un ligand sur un polymère sont représentées par les III.2 et la III.2 : le ligand peut être fixé directement sur le polymère ou sur les chaînes hydrophiles que présente le polymère avant la complexation avec les acides nucléiques (III.2). Cette stratégie est avantageuse car la fixation du ligand sur un polymère cationique est assez

facile à mettre en œuvre par des synthèses chimiques simples, cependant il est possible qu'une partie des ligands se retrouvent piégés à l'intérieur du complexe (Kang *et al.*, 2005).

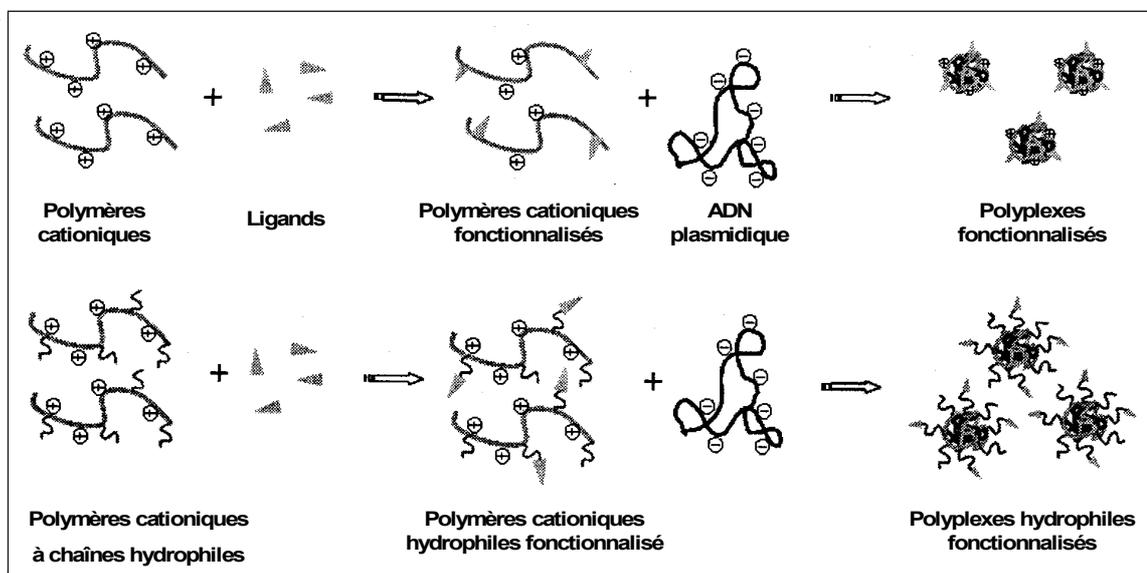


Figure 11 : Fixation du ligand sur le polymère avant la complexation avec les acides nucléiques. Le ligand peut être fixé par liaison covalente sur le polymère cationique ou sur les chaînes hydrophiles que présente le polymère cationique. Après complexation, les ligands se présentent à la surface des complexes (extrait de Kang *et al.*, 2005).

Il est également possible de fixer le ligand après la complexation du polymère avec les acides nucléiques (III.2).

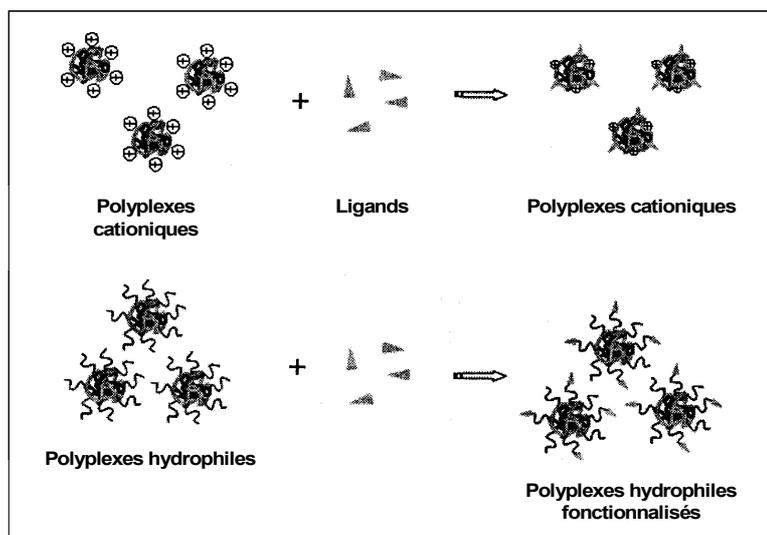


Figure 12 : *Fixation du ligand sur le polymère après la complexation avec les acides nucléiques. Le ligand est fixé après formation des complexes entre le vecteur cationique et les acides nucléiques. (extrait de Kang et al., 2005).*

Cette stratégie permet de maximiser le nombre de ligands présents à la surface du complexe, et d'augmenter ainsi la biodisponibilité des ligands à leurs récepteurs (Kangs *et al.*, 2005). Dans ce cas le ligand peut être fixé par un système d'interactions biospécifiques du type biotine-avidine à la place de la conjugaison chimique (Kang *et al.*, 2005).

III.3 Entrée des complexes dans la cellule

Les macromolécules peuvent entrer dans la cellule par différentes voies comme la phagocytoses, la macropinocytose (III.3), la micropinocytose et l'endocytose clathrine-dépendante ou cavéole-dépendante (III.3) (Mukherjee et al 1997 ; Conner and Schmid, 2003 ; Medina-Kauwe *et al.*, 2005).

La plupart des complexes récepteur-ligand entrent dans la cellule par endocytose clathrine-dépendante (Dechechi *et al.*, 2000). La liaison récepteur-ligand entraîne une accumulation localisée de la clathrine qui conduit à une invagination de la membrane créant ainsi un puits appelé « coated pits », recouvert de clathrine, qui forme des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine (III.3). Les vésicules sont ensuite débarrassées de leur habillage de clathrine par une enzyme ATP-dépendante, transformant ainsi les vésicules en endosomes précoces. L'endocytose cavéole-dépendante est également induit par une fixation d'un ligand sur son récepteur. Ce type d'endocytose conduit à la formation de vacuoles, appelées cavéoles, de 50 à 100 nm enrichies en cholestérol et sphingolipides, et caractérisées par la présence de la cavéoline (III.3) (Medina-Kauwe *et al.*, 2005). Les cavéoles internalisent généralement de larges complexes moléculaires, des toxines, des bactéries et certains virus (Parton and Richards, 2003). Par exemple, il a été montré que le transport direct du virus SV40 de la membrane plasmique au réticulum endoplasmique utilise la voie d'entrée par endocytose cavéole-dépendante (Cohen *et al.*, 2004). Après internalisation, le virus est retrouvé dans des vésicules endosomales marquées à la cavéolines, les cavéosomes. A partir des cavéosomes, les substances internalisées sont distribuées au niveau du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et peut-être dans d'autres compartiments (Pelkmans and Helenius, 2002).

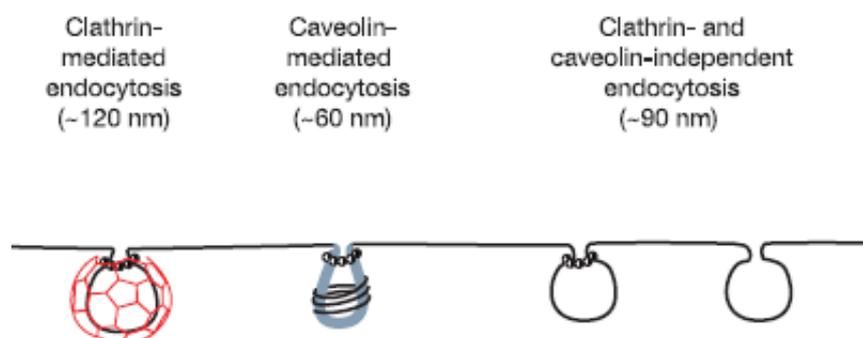


Figure 13 : Représentation schématique de l'endocytose clathrine-dépendante et cavéole-dépendante, et de la micropinocytose (Extrait de Conner and Schmid, 2003).

La micropinocytose (III.3) est une endocytose non spécifique qui donne la formation de vésicules de 150 nm de diamètre.

Les autres types d'endocytoses sont représentés sur la III.3. Les larges particules sont généralement endocytées par phagocytose ou macropinocytose, alors que les plus petites molécules ou particules sont endocytées par micropinocytose ou l'endocytose clathrine- ou cavéole-dépendantes. La phagocytose correspond à un processus d'internalisation de larges complexes comme des bactéries et forme des vacuoles de plus de 500 nm de diamètre. Elle est déclenchée par une reconnaissance ligand-récepteur, qui conduit à la formation d'expansions membranaires qui entourent la particule à internaliser. Les phagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour donner des phagolysosomes. La macropinocytose forme également des vacuoles, les macropinosomes, très hétérogènes (de 0,5 à 500 μm) et de grande taille. Comme pour la phagocytose, ces vacuoles se forment par extensions membranaires.

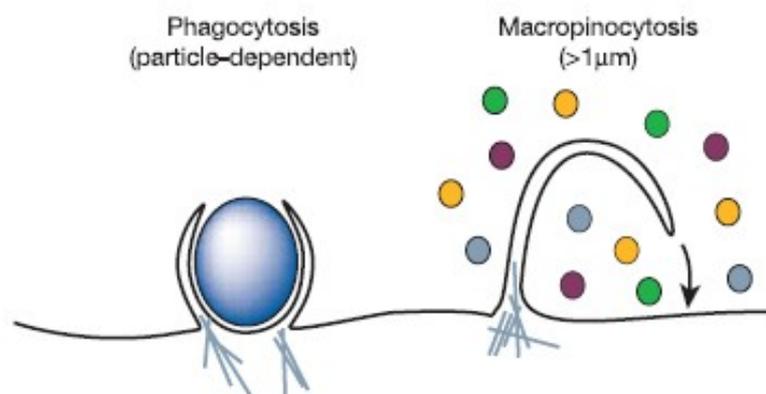


Figure 14 : Représentation schématique des endocytoses par phagocytose et macropinocytose.

Dans le cas des **lipoplexes**, l'endocytose se ferait principalement par phagocytose (Labat-Moleur *et al.*, 1996). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la phagocytose, la cytochalasine B (Pratten and Lloyd, 1986) a conduit à une diminution de l'efficacité de transfection. D'autre part, d'autres études ont montré que l'endocytose par pinocytose et par endocytose clathrine dépendantes était également une voie utilisée par les lipoplexes (Zabner *et al.*, 1995 ; Labat-Moleur *et al.*, 1996 ; Zuhorn *et al.*, 2002).

Les **polyplexes** sont également internalisés majoritairement par pinocytose (Mislick *et al.* 1996 ; Bieber *et al.*, 2002). Cependant, des études ont montré que l'internalisation des

polyplexes se faisait par phagocytose et par endocytose clathrine-dépendante (Erbacher *et al.* 1999).

III.4 Libération du matériel génétique

Une fois internalisés, les lipoplexes et les polyplexes se retrouvent piégés dans les endosomes dits précoces. L'échappement des complexes des endosomes représente une étape limitante dans le processus de transfection et en particulier pour les vecteurs présentant un ligand (Medina-Kauwe *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que des vecteurs possédant un ligand présentaient un important niveau d'internalisation des complexes, pourtant l'efficacité de transfection restait faible. Dans ce cas, l'efficacité de transfection a pu être améliorée par adjonction au milieu de culture de chloroquine, une molécule déstabilisant les endosomes permettant un éclatement des vésicules (Mislick *et al.*, 1995 ; Zatloukal, 1992).

Pour les lipoplexes un mécanisme de fusion membranaire entre le liposomes et la membrane des endosomes est un mécanisme qui a permis d'expliquer la sortie des lipoplexes des endosomes. La déstabilisation initiale liée à la fusion des deux membranes est une étape cruciale qui explique l'emploi courant de lipides fusogènes. En effet, les lipides cationiques sont très souvent formulés sous forme de liposomes en présence du lipide neutre dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) qui présente des propriétés fusogènes. Ce pouvoir fusogène est lié aux changements morphologiques (passage d'une phase lamellaire à une phase hexagonale inverse) initiés par l'acidification. En effet, à pH neutre et acide la DOPE adopte une géométrie cylindrique et conique, respectivement (Hafez and Cullis, 2001). Ainsi, les lipoplexes contenant de la DOPE peuvent passer d'une phase lamellaire à une phase hexagonale inversée (Koltover *et al.*, 1998 ; Allen *et al.*, 1990) qui, de part l'instabilité créée, fusionne rapidement avec la membrane des endosomes et relargue l'ADN. D'autre part, un mécanisme de fusion membranaire et de relargage de l'ADN a été proposé et est basé sur l'habilité des phospholipides à passer d'une membrane à l'autre (flip-flop) (Fattal *et al.*, 1994 ; Medina-Kauwe *et al.*, 2005). Dans ce modèle, représenté par la III.4, les lipoplexes internalisés dans les endosomes (1) déstabilisent la membrane des endosomes, et induisent le « flip » des lipides anioniques de la face cytoplasmique vers la face interne des endosomes (2). Les lipides anioniques forment des paires d'ions neutres avec les lipides cationiques des lipoplexes (3), ce qui conduit au relargage de l'ADN dans le cytoplasme (4) (Devaux *et al.*, 1992).

Dans le cas des polyplexes, l'échappement des endosomes a été expliqué par un mécanisme de « l'éponge à protons » qui caractérise certains polymères. En effet, les polymères comme le PEI ou le dendrimètre poly(amidoamine) (PAM) possèdent des groupements amines non protonés à pH physiologique, ce qui permet de tamponner le milieu acide des endosomes. Or les endosomes possèdent des pompes à protons ATPase dépendantes dont le rôle est d'acidifier l'intérieur du compartiment.

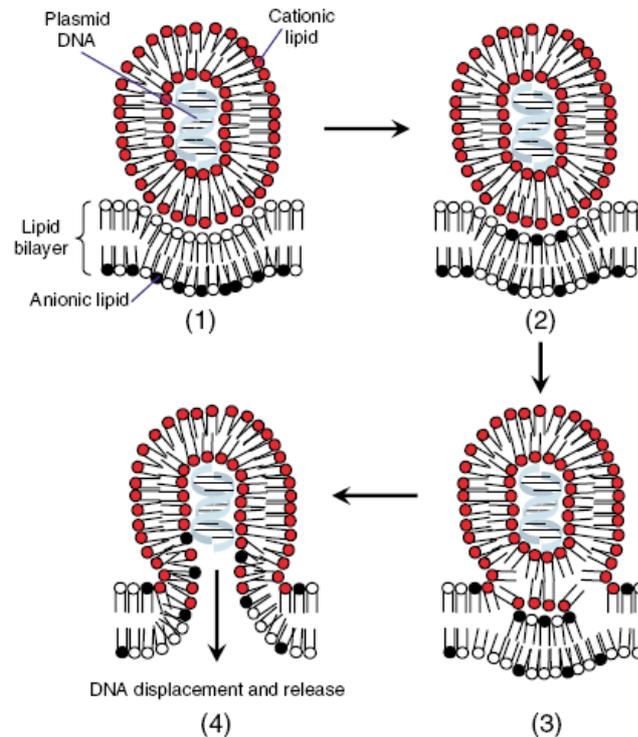


Figure 15 : *Fusion membranaire entre un liposome et la membrane des endosomes.* Les lipoplexes endocytés déstabilisent la membrane des endosomes en induisant un « flip » des lipides anioniques de la face cytoplasmique vers la face interne des endosomes (2) Les lipides anioniques forment des paires neutres avec les lipides cationiques (3) ce qui permet à l'ADN d'être libéré dans le compartiment cytoplasmique (Medina-Kauwe *et al.*, 2005).

La présence d'amines protonnées ayant un rôle de tampon va s'opposer à cette acidification sans pour autant pouvoir arrêter le fonctionnement de la pompe à protons ; ceci conduit à une hypertonicité endosomale, à une entrée importante d'eau puis à la rupture de la membrane endosomale, libérant ainsi les polyplexes dans le cytosol (Behr *et al.*, 2002, Kichler *et al.*, 2001). Il a d'ailleurs été montré que l'utilisation de la bafilomycine A1, un inhibiteur des pompes à protons des vésicules, empêche la transfection en présence de PEI de manière type cellulaire-dépendant (Kichler *et al.*, 2001).

III.5 Le transport cytosolique et l'entrée nucléaire

L'ADN libéré dans le compartiment cytosolique peut-être libre ou toujours complexé à son vecteur. Le cytosquelette permettrait un transport actif de l'ADN dans le cytoplasme. En

effet, il a été rapporté que le cytosquelette serait impliqué dans le transport de vésicules le long de microtubules ou de microfilaments d'actine, de la périphérie cellulaire vers la région péri-nucléaire (Godbey *et al.*, 1999 ; Wiethoff and Middaugh, 2003). L'importation nucléaire des molécules d'ADN par les pores nucléaires est possible pour des petits fragments d'ADN puisque les pores nucléaires permettent le passage de molécules dont le poids moléculaire est <40 kDa. Par exemple, dans des expériences de transfection d'ODNs antisens, le transport nucléaire se fait généralement par les pores nucléaires (Roth and Sundaram, 2004). Pour les lipoplexes et les polyplexes, et en particulier les longs fragments d'ADN, il a été montré que l'entrée de l'ADN se faisait au moment de la rupture des membranes des noyaux lors de la division cellulaire. Il a en effet été montré que la transfection des cellules qui sont en phase S ou G2 avait conduit à une amélioration de l'efficacité de transfection (Brunner *et al.*, 1995).

IV Critères de développement d'un vecteur synthétique

La vectorisation d'acides nucléiques en utilisant les vecteurs synthétiques doit répondre à plusieurs critères pour donner de bonne efficacité de transfection. Les paragraphes précédents ont montré que les vecteurs synthétiques devaient être capables de vectoriser différents types d'acides nucléiques à travers plusieurs barrières biologiques. Ces éléments nous ont permis de résumer de manière non exhaustive les différents critères qui doivent être pris en compte pour le développement de nouveaux vecteurs :

- ✓ Simplicité, facilité, et faible coût de synthèse du vecteur synthétique
- ✓ Purification simple et biocompatible
- ✓ Complexation de plasmide de grande taille
- ✓ Facilité d'administration
- ✓ Protection des acides nucléiques
- ✓ Stabilité des complexes en présence de sérum
- ✓ Ciblage des cellules d'intérêt
- ✓ Efficacité d'internalisation
- ✓ Echappement endosomal
- ✓ Transport nucléaire
- ✓ Désassemblage des complexes
- ✓ Possibilité de maîtriser l'amplitude de la réponse biologique en fonction de la dose injectée
- ✓ Transfection des cellules non prolifératives
- ✓ Non toxique
- ✓ Non-immunogène et non-pathogène

Ces différents critères permettent de comprendre les différentes étapes que constitue le développement d'un vecteur synthétique. Par exemple, les deux premiers points concernent le procédé chimique de synthèse du vecteur synthétique : la synthèse de la molécule doit être simple, reproductible, et peu coûteuse. Ensuite, les quatre critères suivants font appel à l'étude physico-chimique des complexes vecteur/ADN formés. Cette étude est primordiale car elle permet de déterminer la structure supramoléculaire des complexes, et d'en déduire des relations de structure/activité, qui sont nécessaires pour mieux comprendre les paramètres impliqués dans l'étape de transfection (taille, charge...). Enfin, les derniers points font appel à la structure moléculaire du vecteur. Par exemple, le ciblage cellulaire, l'échappement endosomal, le désassemblage des complexes dans la cellule, sont des critères qui peuvent être améliorés en apportant des fonctions sensibles au pH, ou en introduisant des fonctions biodégradables, ou naturellement présentes dans la cellule.

Le développement de nouveaux vecteurs synthétiques doit donc émerger d'une stratégie qui vise à remplir au maximum les critères cités ci-dessus, en apportant des groupements chimiques nouveaux, et des structures moléculaires originales capables de vectoriser l'ADN, dont les propriétés peuvent changer en fonction du stimulus intracellulaire.

VECTEURS SYNTHETIQUES : LES DIFFERENTS CONCEPTS

Le développement des vecteurs synthétiques pour la vectorisation d'acides nucléiques a donné naissance à de nombreux vecteurs de nature chimique différente. Il ne s'agit pas de décrire dans cette partie une liste exhaustive de tous les vecteurs jusqu'à présent synthétisés mais plutôt de décrire les stratégies qui ont été élaborées pour créer de nouveaux vecteurs synthétiques. Elles ont pu être classées en trois concepts différents, qui consistent soit 1) à produire des molécules capables de s'auto-assembler avec les acides nucléiques, soit 2) à utiliser l'ADN comme support de synthèse du vecteur synthétique, soit 3) à faire appel à un procédé de synthèse par émulsion capable d'encapsuler l'ADN.

I L'auto assemblage des acides nucléiques et des vecteurs cationiques

Dans la cellule, il existe des molécules qui sont capables d'interagir naturellement avec les acides nucléiques et de les condenser, avec l'exemple du rôle physiologique des protamines au niveau des spermatozoïdes, qui est de se fixer à l'ADN, pour former une structure compacte et de le délivrer dans le noyau après fertilisation (Oliva, 2006). Ainsi, la première stratégie mise au point pour le développement des vecteurs synthétiques a été de mimer les situations qui existent naturellement dans la cellule, comme la condensation des molécules d'ADN par les protamines, qui sont des molécules chargées positivement. Cependant, il fallait créer un système qui soit capable de traverser les membranes lipidiques. Ainsi, les premiers vecteurs synthétiques développés ont fait appel à des molécules organiques cationiques, divisées en deux grandes classes, les lipides et les polymères cationiques.

I.1 Les lipides cationiques

La découverte du premier lipide cationique pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules de mammifères a été suivie par la synthèse d'un très grand nombre de lipides cationiques (Liu *et al.*, 2003 ; Miller, 2003 ; Ilies *et al.*, 2002). Ces lipides diffèrent par leur structure moléculaire.

I.1.a Structure de lipides cationiques :

Les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles et chargées positivement qui contiennent trois domaines fonctionnels : une tête polaire, une partie hydrophobe et un bras espaceur qui relie les deux premières parties.

- ◆ **La tête polaire** est la partie du lipide qui porte les charges positives, et peut être mono- ou polycationique, c'est à dire, qui présente une ou plusieurs fonctions protonables à pH physiologique.
- ◆ **Le bras espaceur**, dont la taille et la nature de ses fonctions influencent la stabilité et la biodégradabilité du lipide.
- ◆ **La partie hydrophobe**, est composée soit de deux chaînes aliphatiques, soit d'un groupement cholestérol.

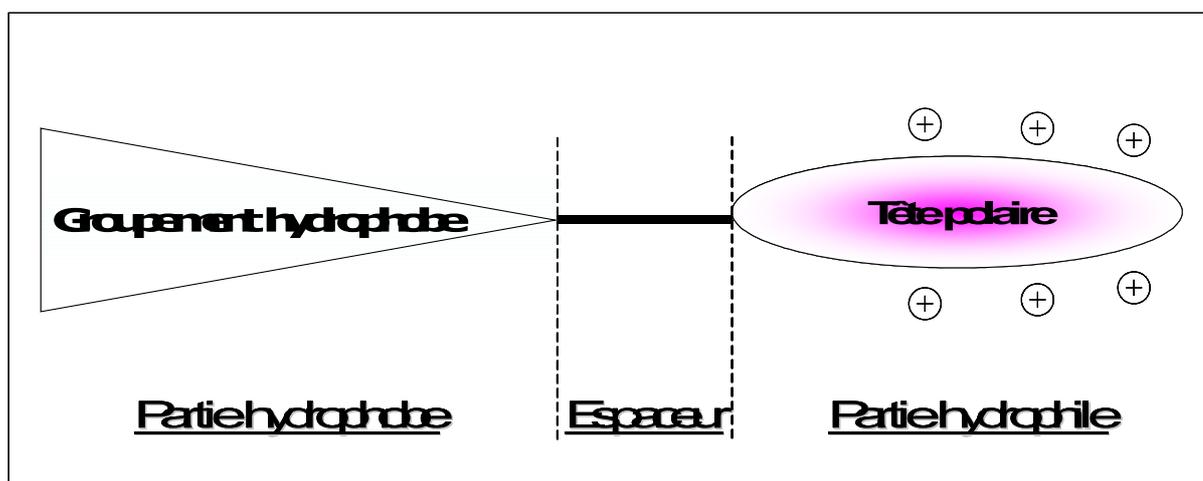


Figure 16 : *Structure schématique des lipides cationiques.* Les lipides cationiques sont constitués de 3 parties : la tête polaire qui porte les charges positives, le bras espaceur qui peut être utilisé pour introduire dans les lipides des fonctions biodégradables, et la partie hydrophobe qui généralement constituée de deux chaînes aliphatiques ou d'un groupement cholestérol.

Les lipides cationiques ont été classés en différentes catégories (Zhang, 2004) : les lipides cationiques *monocationiques*, les lipides cationiques *polycationiques* et les dérivés du *cholestérol*.

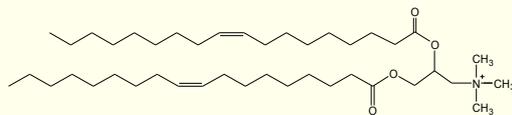
Lipides cationiques monocationiques. C'est l'équipe californienne de Felgner qui a développé le premier vecteur lipidique cationique synthétique appelé **DOTMA** (chlorure de diolexypropyltriméthyl-ammonium) (Felgner *et al.*, 1987). Dans ce lipide cationique, la

charge positive de la tête polaire est portée par l'amine quaternaire, liée à deux chaînes aliphatiques insaturées par une liaison éther (I.1.a). Un autre lipide cationique, le **DOTAP** (méthylsulfate de dioléylloxypropyl-triméthylammonium) est un analogue du DOTMA où les chaînes aliphatiques sont liées à l'amine quaternaire par une liaison ester (I.1.a).

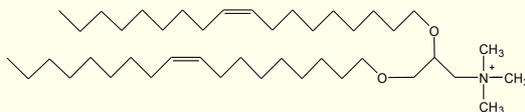
Lipides polycationiques. Peu de temps après, en 1989 sont apparus les lipides polycationiques. Plusieurs charges positives ont été introduites au niveau de la tête polaire afin d'augmenter la densité de charges positives, facilitant ainsi la condensation des acides nucléiques (Berh *et al.*, 1989). Dans le but de générer des lipides peu toxiques ou biodégradables, plusieurs équipes ont cherché à introduire au niveau de la tête polaire des composés polycationiques naturels. C'est l'équipe française du Pr. J.P. Behr qui a mis au point le premier lipide polycationique, le **DOGS** (dioctadécylamine-glycine-spermine), où la spermine, une polyamine, est un composé naturel (I.1.a). Les nombreuses amines protonées de la spermine permettent une meilleure compaction des acides nucléiques et la liaison peptidique, au niveau du bras espaceur, est une liaison métabolisable par la cellule (Berh *et al.*, 1989). Un autre lipide polycationique connu est le **DOSPA** (2,3-dioléyloxy-N-2-(spermine-carboxamido)éthyl-N,N-diméthyl-1-propanammonium) commercialisé sous le nom de Lipofectamine® lorsqu'il est mélangé à la **DOPE** (dioléylphosphatidyléthanolamine) (Hawley-Nelson *et al.*, 1993). La Lipofectamine® est utilisée *in vitro* pour la transfection de très nombreuses lignées cellulaires stables et de cultures cellulaires primaires et présente une efficacité supérieure par rapport aux lipides monocationiques.

Les dérivés du cholestérol. Plus récemment, plusieurs équipes ont développé des lipides dérivés du cholestérol, mono ou polycationiques. Le cholestérol facilite la fusion avec la membrane plasmique des cellules et permet ainsi une meilleure entrée cellulaire des vecteurs (Chen et Rand, 1997). Le premier dérivé cationique du cholestérol a été le **DC-Chol** (3[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholestérol), un lipide monocationique (Gao and Huang, 1991 et 1995). Cependant, la plupart des dérivés du cholestérol développés sont aujourd'hui polycationiques, avec l'exemple du **cholestéryl-spermine**, commercialisé sous le nom de Transfectall® (Moradpour *et al.*, 1996) et le **GL67** (Lee *et al.*, 1996), qui ont une efficacité supérieure à d'autres lipides cationiques (I.1.a).

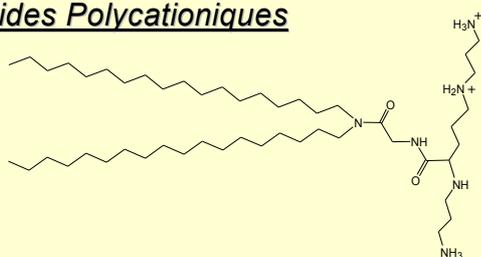
La fonction guanidine. La fonction guanidine se trouve naturellement dans les arginines et joue un rôle important dans les liaisons de l'ADN avec certaines protéines comme les histones et les protamines. Différents dérivés lipidiques contenant une fonction guanidine ont été synthétisés : le **BGSC** (bis(guanidinium)-spermine-cholestérol) et le **BGTC** (bis(guanidinium)-tren-cholestérol) (Vigneron *et al.*, 1996 ; Pitard *et al.*, 1999) en sont deux exemples (I.1.a).

Lipides Monocationiques

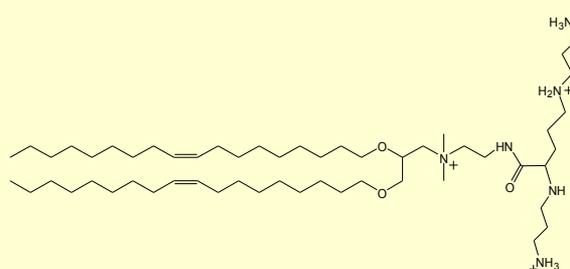
DOTAP



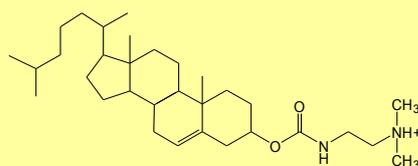
DOTMA

Lipides Polycationiques

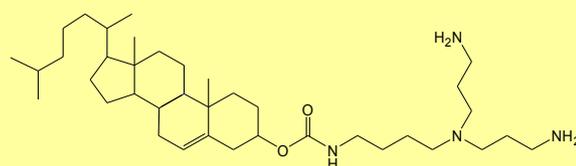
DOGS



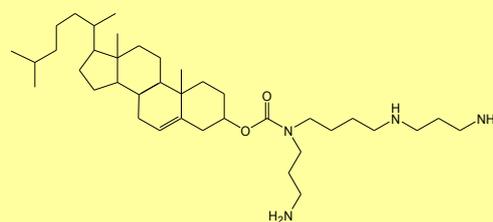
DOSPA

Dérivés du cholestérol

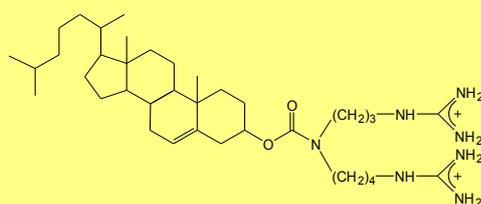
DCChol



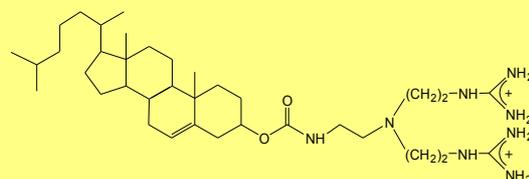
Cholestéryl-Spermidine



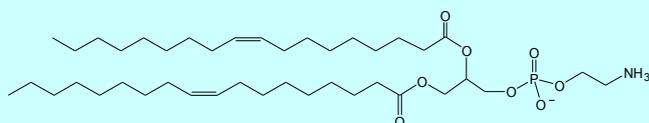
GL67

Porteurs de la fonction guanidinium

BGSC



BGTC

Lipide Neutre

DOPE

Figure 17 : Structure chimique des vecteurs lipidiques cationiques et d'un lipide neutre (DOPE).

Les lipides neutres. Dans le transfert d'acides nucléiques, les lipides cationiques sont souvent associés à des lipides neutres, tels que la DOPE (dioléoylphosphatidyléthanolamine) (I.1.a) ou la DOPC (dioléoylphosphatidylcholine). La DOPE aide à déstabiliser la membrane plasmique des cellules, ce qui permet une meilleure entrée des complexes dans les cellules et qui par ces propriétés fusogènes, permet un meilleur trafic intracellulaire (Hirsch-Lerner, 2005).

Les liposomes et les micelles. Pour permettre la formation des complexes lipides/acides nucléiques, les lipides cationiques doivent tout d'abord être préparés sous forme de liposome ou micelle (Pitard *et al.*, 2002). Les liposomes utilisés sont unilamellaires d'une taille de 100 à 200 nm, et généralement associé à un lipide neutre tel que la DOPE. Les liposomes peuvent être préparés par réhydratation du film lipidique (<http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes.html>, and Szoka and Papahadjopoulos, 1980).

Aujourd'hui les chercheurs disposent d'une multitude de réactifs de transfection commercialisés. Cependant, ces molécules optimisées pour le transfert de gène *in vitro* s'avèrent en général inefficaces *in vivo*. 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 du lipoplexe, en fonction de son efficacité de transfection. Ainsi, plusieurs méthodes ont été développées pour caractériser les propriétés physico-chimiques des lipoplexes.

I.1.b Caractérisation physico-chimiques des lipoplexes

Diverses techniques de physico-chimie et de microscopie ont été développées pour caractériser les lipoplexes sur le plan de leur structure supramoléculaire afin de comprendre les mécanismes impliqués dans leur formation :

- ◆ La mesure de la taille des lipoplexes a généralement été étudiée par diffusion quasi-élastique de la lumière et par microscopie électronique ;
- ◆ L'état de compaction de l'ADN a été évalué par migration électrophorétique sur gel d'agarose et par mesure de l'extinction de la fluorescence du bromure d'éthidium ;
- ◆ La mesure du potentiel zêta (par migration électrophorétique) a permis de déterminer la charge de surface ;
- ◆ La morphologie a pu être observée par microscopie électronique et par la technique des rayons X à petits angles (SAXS) ;

La structure des lipoplexes dépend de plusieurs paramètres tels que la structure moléculaire du lipide cationique, le rapport de charges (amines primaires des lipides/phosphates de l'ADN ou charges positives/charges négatives), la concentration en sels du milieu de formulation, et la concentration finale en acides nucléiques.

Stabilité colloïdale : taille et charge de surface des lipoplexes :

La stabilité dans le temps de la taille des lipoplexes, désignée par le terme de stabilité colloïdale, est essentielle pour leur utilisation en tant que système de transfert d'acides nucléiques. En effet, une augmentation de la taille des objets au cours du temps rend difficile leur utilisation *in vivo* (difficulté d'injection, risque d'obstruction). C'est pourquoi il était indispensable de comprendre les paramètres impliqués dans cette stabilité colloïdale.

Il a été montré que la taille des lipoplexes formés en présence d'ADN plasmidique et de lipopolyamine variaient en fonction du rapport de charges lipopolyamine/ADN (+/-). En effet, une quantité fixe d'ADN complexée avec une quantité croissante de lipopolyamine a mis en évidence trois zones principales : les zones A, B et C représentées sur la I.1.b (Pitard *et al.*, 1997). La zone A, qui correspond aux faibles rapports de charges (<1) où le lipide est en défaut par rapport à l'ADN, donne des lipoplexes stables de petites tailles (<500 nm). La zone B, pour des rapports de charges plus élevés ($1 < r < 2$) donne un précipité de lipoplexes sous forme agrégés (> 700 nm). La zone C, pour des rapports de charges supérieures à 2 donne des lipoplexes stables, de petites tailles (<100 nm). L'existence de ces trois zones A, B et C a été montrée pour d'autres lipides cationiques comme le BGTC (Pitard *et al.*, 1999), et le DOTMA (Sakurai, 2000).

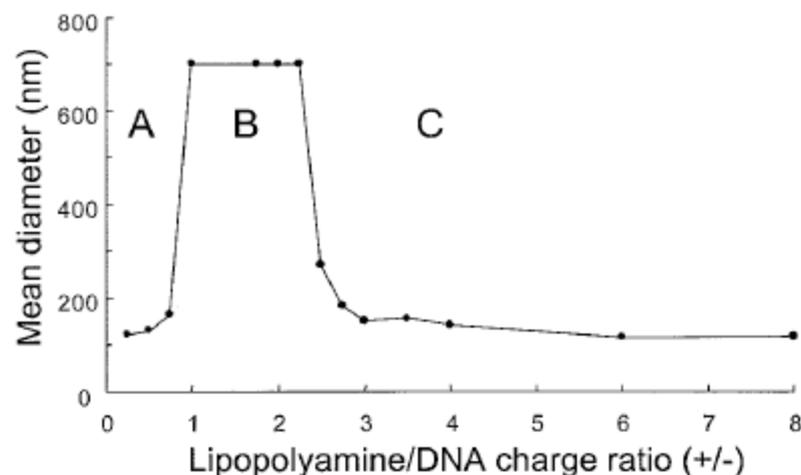


Figure 18 : Mesure de taille des lipoplexes en fonction du rapport de charges Lipopolyamine/ADN. L'ADN a été complexé en présence d'une quantité croissante de lipopolyamine (exprimée en rapport de

charges +/-). La taille des complexes formés a été exprimée en fonction du rapport de charges et montre l'existence de trois zones : A, B et C. Les zones A et C révèlent la présence de complexes de petites tailles (<200 nm) stables colloïdalement alors que les complexes de la zone B ont une taille supérieure à 700 nm, correspondant à un état agrégé (extrait de Pitard, 2002).

Des mesures du potentiel zêta des lipoplexes ont montré que les lipoplexes de la zone A sont chargés négativement, ceux de la zone B sont à l'électroneutralité et dans la zone C, les lipoplexes sont chargés positivement.

Le rapport de charges n'est pas le seul paramètre impliqué dans la structure finale des lipoplexes. En effet, l'augmentation de la concentration en NaCl, la longueur de la chaîne aliphatique du lipide, le pH, et la concentration en ADN a tendance à étendre la zone B, donnant des lipoplexes plus agrégés (Turek *et al.*, 2000).

Ainsi, la stabilité colloïdale des lipoplexes de la zone A et C est assurée par la répulsion des charges entre les lipoplexes, alors que les lipoplexes de la zone B s'agrègent par force de Van der Waals.

Compaction de l'ADN dans les lipoplexes :

Une solution de bromure d'éthidium (BET) est ajoutée à celle des lipoplexes et le BET fluoresce quand il est intercalé entre les bases de l'ADN. La I.1.b montre que l'intensité de la fluorescence du BET diminue lorsque le rapport de charges (+/-) augmente. Ceci indique que l'ADN est accessible au BET pour des rapports de charges inférieurs à 1, alors que pour des rapports de charges plus élevés, l'ADN est condensé au sein des lipoplexes et est inaccessible au BET.

D'autre part, l'ADN a la capacité de migrer à travers un gel d'agarose chargé de BET et placé dans un champ électrique. Formulé en présence de lipides cationiques, l'ADN perd progressivement cette capacité : pour un rapport de charges croissant, la bande d'ADN plasmidique disparaît progressivement (I.1.b-B).

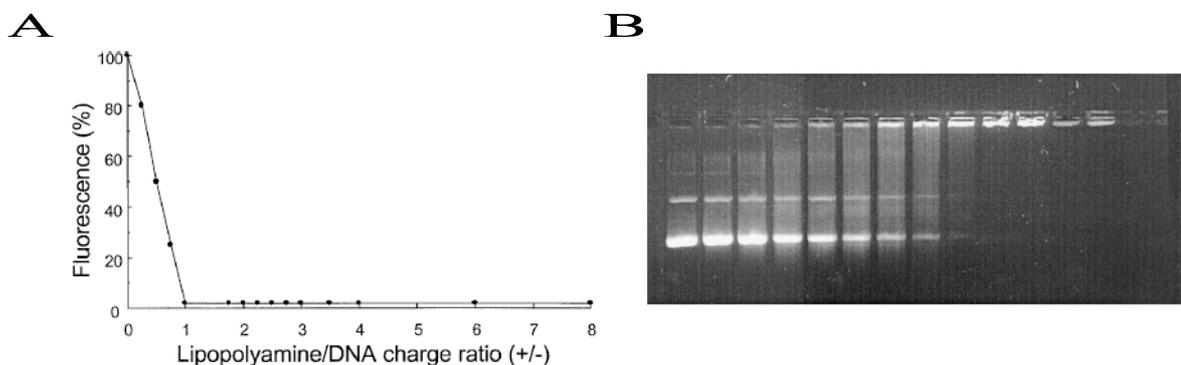


Figure 19 : *Condensation de l'ADN au sein des lipoplexes (A) Mesure de la fluorescence résiduelle du BET en fonction du rapport de charges. (B) Migration électrophorétique de l'ADN en fonction du rapport de charges (extrait de Pitard, 2002).*

Structure et morphologie des lipoplexes:

La diffraction des rayons-X à petits angles est la technique la plus utilisée pour déterminer l'organisation supramoléculaire des lipoplexes. Plusieurs groupes de recherche ont montré que des phases hautement ordonnées sont formées quand l'ADN est complexé en présence de lipides cationiques. Différentes études ont proposé plusieurs modèles d'organisation structurale des lipoplexes :

- En 1994, Sternberg *et al.* proposaient une structure **tubulaire** de type « Spaghetti » et **sphérique** de type « Meatballs » obtenues à partir de lipides unilamellaires qui condense l'ADN sur une surface (Sternberg *et al.*, 1994)
- En 1997, Templeton *et al.*, proposaient une structure **bilamellaire** où l'ADN plasmidique est intercalé entre deux couches lipidiques bilamellaires (Templeton *et al.*, 1997)
- En 1997, le groupe de Safinya propose un organisation **multilamellaire** (I.1.b-A), avec une alternance d'un feuillet lipidique et de monocouche d'ADN pour des lipoplexes DOTAP/ADN (Rädler *et al.*, 1997). Ce même type de structure lamellaire a été observé pour des lipoplexes BGTC/ADN (Pitard *et al.*, 1999). En 1997, Pitard *et al.* ont montré que la structure lamellaire est aussi obtenue pour des lipides polychargés, les lypopolyamines (Pitard *et al.*, 1997).
- En 1998, Koltover *et al.*, identifie une nouvelle structure pour les lipoplexes DOTAP-DOPE/ADN de type **hexagonale inversée** (HE) (I.1.b-B) (Koltover *et al.*, 1998).

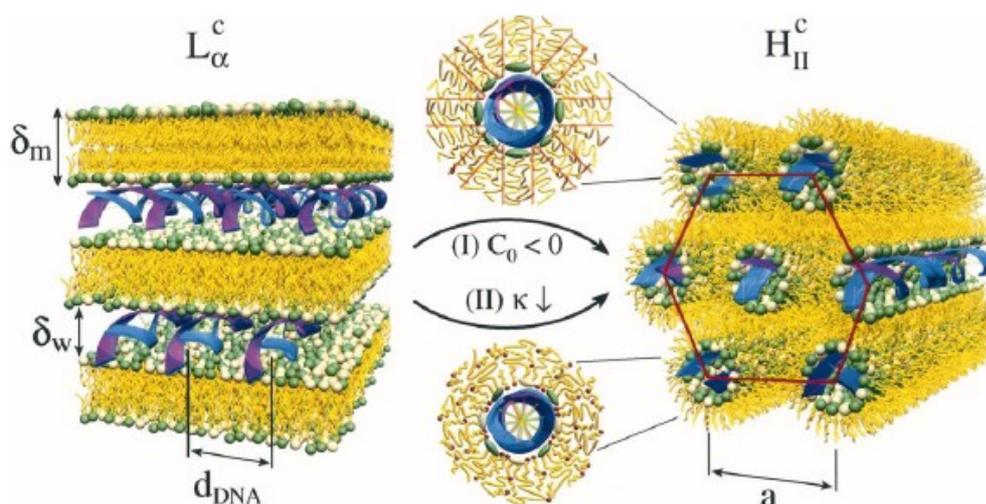


Figure 20 : Représentation schématique de la phase multilamellaire (à gauche) et de la phase hexagonale inversée (à droite) proposée pour les lipoplexes DOTAP/DOPE. L'ADN (en bleu) s'organise avec les lipides (en jaune) en une structure de type lamellaire (L) ou hexagonale inverse (H) (Koltover *et al.*, 1998).

La phase HE a été observée pour des formulations de DOTAP-DOPE/ADN et serait due à la présence de la DOPE. Cependant, il est difficile d'établir des règles générales quant à l'effet de la DOPE sur la formation de la phase HE.

Dans la majorité des études qui ont été réalisées avec différents lipides cationiques, c'est la structure *multilamellaire* qui a été le plus souvent caractérisée (I.1.b).

Lipide cationique (ratio molaire)	Structure observée par SAXS	Référence
DOTAP/DOPE	Multilamellaire	Rädler, 1997
DODAB/Chol	Multilamellaire	Lasic <i>et al.</i> , 1997
DOTAP/DOPE	Multilamellaire ou hexagonale inversée ; la structure obtenue dépend du ratio molaire DOTAP/DOPE	Koltover <i>et al.</i> , 1998
DODAB/DOPE	Multilamellaire ou hexagonale inversée ; la structure obtenue dépend du ratio molaire DODAB/DOPE	Mel'nikova <i>et al.</i> , 1999
EDOPC	Multilamellaire	McDonald <i>et al.</i> , 1999
BGTC/DOPE (3/2)	Multilamellaire	Pitard <i>et al.</i> , 1999
DOGS	Multilamellaire	Boukhnikachvili <i>et al.</i> , 1997
DOGS/DOPE/Cardiolipin (0.35/0.52/0.13) (Micelles cationiques)	Multilamellaire	Schmutz <i>et al.</i> , 1999
Micelles sphériques de lipopolyamine	Multilamellaire	Pitard <i>et al.</i> , 1997
Micelles de BGTC	Multilamellaire	Pitard <i>et al.</i> , 1999

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de la structure des lipoplexes pour différents lipides cationiques. (d'après Pitard, 2002).

Différentes techniques de microscopie électronique ont été utilisées pour étudier les lipoplexes. La microscopie électronique par cryofracture ne permet pas de voir l'ADN seul, cependant cette technique a montré la formation de structures de type « spaghetti » dans lesquels l'ADN est condensé (Sternberg *et al.*, 1994). La microscopie électronique à transmission (TEM) a montré que le DOGS formaient une matrice de micelles tubulaires dans lesquelles étaient intercalé et condensé l'ADN plasmidique (Labat-Moleur *et al.*, 1996). Enfin, la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) a été utilisée par plusieurs groupes (Lasic *et al.*, 1997, Mel'nikova *et al.*, 1999, Pitard *et al.*, 1999, Pitard *et al.*, 1997, Templeton *et al.*, 1997). Templeton *et al.* ont observé par cryo-TEM que l'ADN était condensé

entre deux bicouches lipidiques, il a également été montré la formation d'une structure concentrique multilamellaire pour des lipoplexes BGTC-DOPE/ADN (I.1.b) (Pitard *et al.*, 1999).

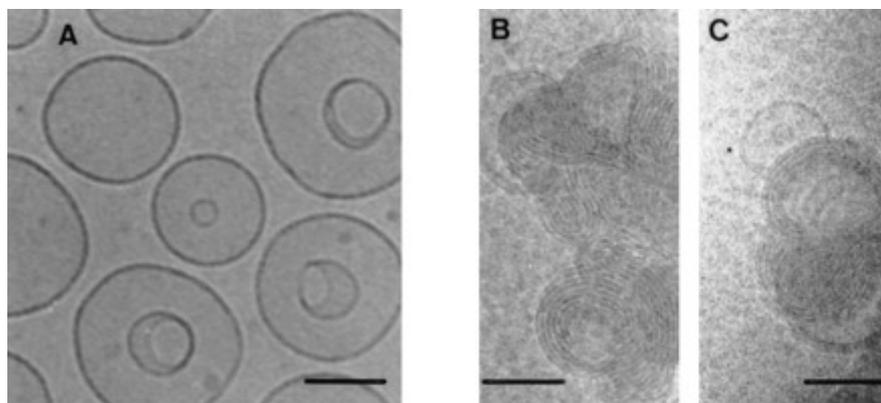


Figure 21 : Cryo-TEM de lipoplexes de BGTC-DOPE/ADN. (A) Liposomes de BGTC-DOPE ; (B) et (C) Lipoplexes BGTC-DOPE/ADN de la zone C (extrait de Pitard *et al.* 1999).

I.1.c Transfection d'acides nucléiques avec les lipides cationiques *in vitro*

Une comparaison de l'efficacité de transfection de tous les lipides cationiques serait d'une part assez difficile à réaliser en raison du grand nombre de lipides synthétisés et d'autre part, l'efficacité de transfection d'un lipide est dépendante de la lignée cellulaire utilisée (Liu *et al.*, 2003). Cependant, les données de la littérature permettent d'établir des conclusions générales quant à l'effet de la structure du complexe formé en présence d'acides nucléiques sur l'efficacité de transfection. En effet, il a été largement montré que le rapport de charges +/- influençait la taille, la stabilité colloïdale et le potentiel zêta des complexes lipides/ADN, et donc les interactions avec les membranes des cellules et leur internalisation (Pitard, 2002). Les complexes lipides/ADN qui présentent les meilleures efficacités de transfection sont des lipoplexes appartenant à la zone B ou à la zone C. En effet, ces zones correspondent à des complexes qui permettent une condensation complète des molécules d'ADN. D'ailleurs, dans la plupart des protocoles de transfection *in vitro* disponibles dans le commerce, les fournisseurs recommandent généralement d'utiliser un excès de lipide par rapport à l'ADN. Le tableau suivant indique les fournisseurs qui commercialisent certains lipides qui ont été donnés en exemple précédemment.

Lipide	Formulation	Nom commercial/Fournisseur
DOTMA	DOTMA/DOPE 1:1 (m/m)	Lipofectin™/GIBCO BRL

DOTAP	DOTAP	DOTAP/Roche Molecular
DOSPA	DOSPA/DOPE 3:1 (m/m)	LipofectAMINE™/GIBCO BRL
DOGS	DOGS (micelle)	Transfectam®/Promega
DC-Chol	DC-Chol/DOPE 6:4 (m/m)	DC-Chol/Sigma

Tableau 5 : Exemple de quelques lipides actuellement commercialisés.

L'efficacité de transfection dépend aussi du type de cellules à transférer et les fournisseurs recommandent généralement de réaliser une optimisation de la quantité d'ADN et du rapport lipide/ADN pour chaque lignée cellulaire.

I.2 Les polymères cationiques

Les acides nucléiques peuvent également être condensés par d'autres espèces cationiques, les polymères cationiques. Les interactions entre l'ADN et les polymères cationiques sont, comme pour les lipides cationiques, de nature électrostatique. Les polyplexes ne présentent pas la même organisation moléculaire que les lipoplexes car il n'y a pas de lipides donc l'organisation lamellaire lipidique est impossible. En effet, les polymères cationiques présentent une structure chimique différente des lipides, au niveau de leur poids moléculaire et de la densité des charges positives par exemple. Comme pour les lipides, la mise en évidence des relations structure/efficacité ont été l'une des principales approches concernant les polyplexes.

I.2.a Structure des différents polymères

Le Polyéthylène-imine(PEI). Le PEI est un polymère cationique, qui est utilisé depuis longtemps pour le transfert d'ADN, a été largement documenté (Boussif *et al.*, 1995 ; Kircheis *et al.*, 2001 ; Demeneix, 2005). Le PEI est un polymère aminé présentant une importante densité de charges cationiques, due à la présence des fonctions amines protonables à pH physiologique. Suivant le mode de polymérisation, le PEI est disponible sous deux formes principales : le PEI linéaire et le PEI ramifié (I.2.a), à différents poids moléculaires : 700 Da, 2, 25, 50, 79, et 800 kDa. Le PEI ramifié, est composé de 25% d'amines primaires, 50% d'amines secondaires et 25% d'amines tertiaires. La forte densité de charges fait du PEI une véritable « éponge à proton », qui participe à l'échappement des endosomes lors du trafic intracellulaire des polyplexes (Boussif *et al.*, 1995). Le PEI à l'avantage d'être un polymère versatile puisqu'il a montré son efficacité dans le transfert de gène aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (McLachan *et al.*, 1995).

Au cours des différentes études de comparaison, il a été montré que le PEI linéaire est un vecteur plus efficace que le PEI branché (Wightman *et al.*, 2001). La distribution du poids moléculaire et la purification sont plus faciles à contrôler avec le PEI linéaire. Ainsi, il a été montré que le PEI linéaire est très efficace pour transférer des cellules qui se divisent

lentement (Brunner *et al.*, 2002). D'autre part, il a été montré que les complexes PEI/ADN avaient moins tendance à s'agréger au niveau des érythrocytes (Kricheis *et al.*, 2001(b)), ce qui limitait les risques de microembolies après une injection systémique (Abdallah *et al.*, 1996).

Mais en contre-partie le PEI présente une importante toxicité et les polyplexes PEI/ADN efficaces pour le transfert de gène sont fortement chargés positivement, et interagissent donc avec les protéines du sérum. Ainsi, plusieurs types de PEI modifiés ont été synthétisés afin d'augmenter la durée de vie des polyplexes dans la circulation sanguine et de diminuer sa toxicité. L'introduction de polyéthylène-glycol (PEG) a été étudié et il a été montré que les polyplexes PEI-PEG/ADN avaient une meilleure solubilité et une plus faible toxicité (Ahn *et al.*, 2002, Nimesh *et al.*, 2006, Leclercq *et al.*, 2000).

Les poly(β -amino-ester), sont des polymères cationiques synthétisés par l'addition conjuguée d'amines primaires et secondaires à des di-acrylates (Lynn *et al.*, 2001). Ces polymères offrent l'avantage de pouvoir être synthétisés sous forme de librairie de molécules et la synthèse de 500 poly(β -amino-ester) différents ont permis d'identifier deux poly(β -amino-ester) en particulier, présentant des niveaux de transfection 4 à 8 fois supérieurs par rapport au PEI (Akinc *et al.*, 2003(a)). Des relations entre l'efficacité de transfection et la structure des poly(β -amino-ester) ont été mises en évidence, comme par exemple, la présence de plusieurs amines par unité de répétition qui donnait la formation de polyplexes de plus petite taille avec une augmentation du potentiel zêta (positif) (Akinc *et al.* 2003(a) and (b) ; Greenland *et al.* 2005).

Les dendrimères. Les dendrimères sont une classe unique de polymères, récemment bien documentés (Lee *et al.*, 2005(a) ; Svenson and Tomalia, 2005 ; Dufes *et al.*, 2005, Hughes, 2005), qui ont été conçus au début des années 1980 et en 1993 l'équipe de Szoka développe un dendrimère pour le transfert d'acides nucléiques (Haensler and Szoka, 1993). La plupart des dendrimères utilisés sont des polyamines, des polyamides ou des polyesters, mais le plus fréquemment rencontré est le Polyamidoamine (PAMAM), représenté sur la I.2.a. Les dendrimères (du grec « dendron » : arbre) ont la spécificité d'avoir une structure tridimensionnelle hiérarchique : le cœur de la molécule joue le rôle de point central à partir duquel les monomères se ramifient de façon ordonnée et symétrique (I.2.a).

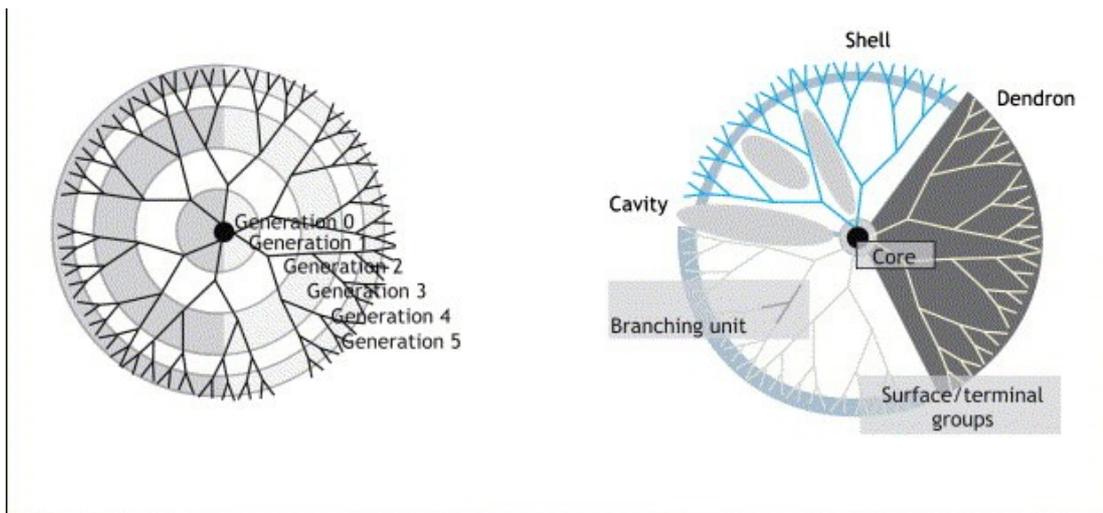


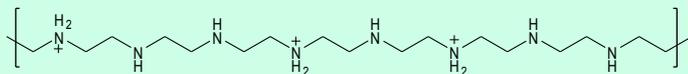
Figure 22 : Schéma de la structure générale des dendrimères (d'après Dufès *et al.* 2005).

Chaque point de ramification correspond à une génération, ainsi les dendrimères peuvent être synthétisés en contrôlant le nombre de générations. La densité de charges positives est plus importante au niveau de la surface de la molécule, c'est à dire au niveau des groupements terminaux (amines). Cette architecture moléculaire leur confère des propriétés différentes par rapport à tous les autres polymères rencontrés pour le transfert d'acides nucléiques : leur méthode de synthèse, qui se fait génération par génération, permet d'obtenir d'une manière générale des dendrimères cationiques avec une taille et une structure bien caractérisées, et une faible polydispersité. Les amines protonnées 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 des endosomes. La taille et le diamètre du dendrimère ont une influence dans l'efficacité de transfection des dendrimères. 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 maximum (Kukowska-Latallo *et al.*, 1996).

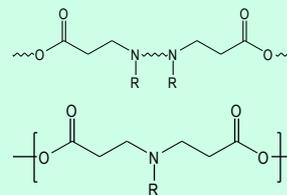
La Polylysine (PLL). La PLL est considérée comme l'un des polymères cationiques les plus utilisés pour le transfert d'ADN (Wolfert *et al.*, 1996 et 1999). C'est un polymère de la lysine, naturel et biodégradable, ce qui fait de lui un bon candidat pour des applications *in vivo* (I.2.a). Cependant, une toxicité plus ou moins élevée de ce polymère a été démontrée lors d'applications dans le transfert d'ADN (Choi *et al.*, 1998 ; Farhood *et al.*, 1992). De plus, même si les polyplexes PLL/ADN sont internalisés dans des cellules de façon comparable à des polyplexes PEI/ADN, l'efficacité de transfection de la PLL en tant que tel est peu active. Afin d'augmenter son efficacité de transfection, la PLL a été substituée par différents ligands

reconnus spécifiquement par des récepteurs membranaires et l'efficacité de transfection a pu également être améliorée par addition d'agent endo-osmolytique dans le milieu de transfection (Pouton *et al.*, 1998 ; Wagner *et al.*, 1992).

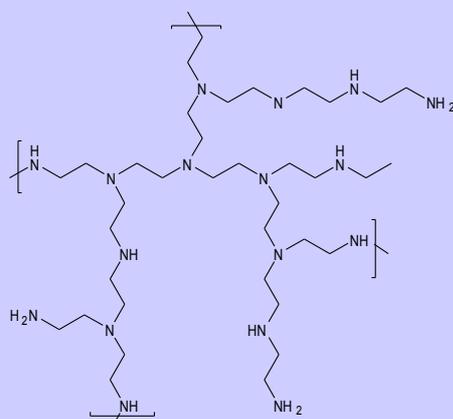
Les chitosans. Les chitosans sont des dérivés d'un polysaccharide naturel qui correspond à un polymère d'unités glucosamide. Les chitosans sont des polysaccharides cationiques linéaires composés de segments N-acétyl-glucosamide liés par des liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$ (I.2.a) (Liu and Yao, 2002). Les chitosans sont connus pour être biodégradables et peuvent être modifiés chimiquement pour donner différents dérivés des chitosans (Kim *et al.*, 2001). Le premier polymère de type chitosan présentant un potentiel pour le transfert de gène a été proposé par l'équipe de Mumper (Mumper *et al.*, 1995).

Polymères cationiques linéaires

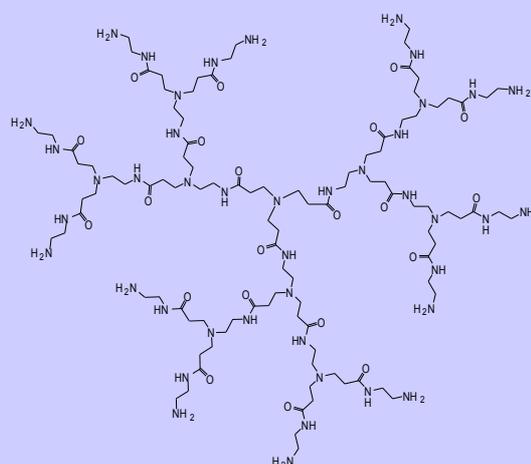
PEI Linéaire



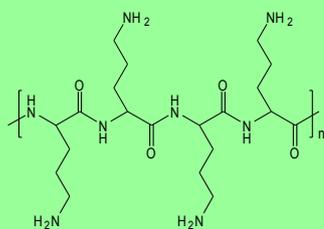
Poly(B-amino ester)

Polymères cationiques ramifiés

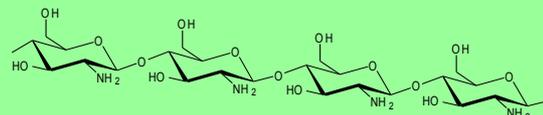
PEI Branché



PAMAM

Polymères cationiques naturels

PLL



Chitosan

Figure 23 : Structure des polymères cationiques utilisés dans le transfert de gène.

I.2.b Caractérisation physico-chimique des polyplexes

Les diverses techniques physico-chimiques et microscopiques utilisées pour caractériser les lipoplexes (page 58), ont également été employées pour caractériser les polyplexes, sauf pour l'étude de la morphologie et de la structure des polyplexes, où en plus de la microscopie électronique (ME), la microscopie à forces atomiques (AFM), la microscopie à effet de force (SFM, Scanning Force Microscopy) et le dichroïsme circulaire (DC) ont été utilisés.

La structure des polyplexes dépend de plusieurs paramètres tels que la structure du polymère cationique, le rapport de charges (amines primaires des polymères/phosphates de l'ADN ou charge positive/charge négative), la concentration en sels du milieu de formulation, et la concentration finale en ADN.

Stabilité colloïdale et compaction de l'ADN : rapport de charges, concentration saline et poids moléculaire

La formation des polyplexes repose principalement sur les interactions électrostatiques. Ainsi, le rapport de charges et les concentrations respectives en sels, polymères et ADN, sont les paramètres qui ont une importance majeure dans la formulation des polyplexes, comme pour les lipoplexes. Cependant, dans le cas des polymères cationiques, le paramètre supplémentaire à prendre en compte dans la formulation est le poids moléculaire du polymère, qui est variable pour ce type de molécules.

Par exemple, pour des polyplexes PEI/ADN, une condensation complète de l'ADN est observée pour un rapport de charges compris entre 2 et 3 (Bieber *et al.*, 2002).

Cependant, pour obtenir une bonne efficacité de transfection, il est préférable de formuler l'ADN et le polymère à des rapports de charges plus élevés, c'est à dire en excès de charges positives. En effet, l'utilisation d'un rapport de charges <2 ne permet pas un transfert de gène efficace alors que l'utilisation d'un rapport de charges >2 permet une meilleure efficacité de transfection (Bieber *et al.*, 2002). De plus, une augmentation du rapport de charges de 2 à 20 induit une diminution de la taille des polyplexes d'une taille >1000 nm à une taille proche de 100 à 200 nm, accompagnée simultanément d'une diminution de la polydispersité.

- Effet de la concentration saline :

Une augmentation de la concentration saline entraîne, dans le cas des polyplexes PEI/ADN, une augmentation de la taille des complexes qui serait expliquée en écrantage des charges présentes à la surface des complexes (Neu *et al.*, 2005). En effet, les polyplexes en présence de concentrations en sels physiologiques présentent une taille de 100 et 1000 nm, alors que ceux formés dans un milieu faiblement concentré en sels, la taille est plus petite (de 10 à 100 nm) (Dunlap *et al.*, 1997 ; Tang et Szoka, 1997, Goula *et al.*, 1998(a), Ogris *et al.*,

1998). Cependant, il a été montré que ce sont les polyplexes PEI/ADN de grande taille, qui permettaient un transfert d'ADN *in vitro* (Ogris *et al.*, 1998 ; Wightman *et al.*, 2001). Les complexes formant de larges agrégats auraient une meilleure sédimentation dans le milieu de transfection permettant un meilleur contact avec les cellules en culture. Par contre, pour des études *in vivo*, ce sont les complexes PEI/ADN de petites tailles qui présentent une meilleure efficacité de transfection, grâce à une meilleure diffusion dans l'espace extracellulaire (Goula *et al.*, 1998b, Wightman *et al.*, 2001).

- Le poids moléculaire du polymère :

La taille des polyplexes PEI(25 kDa)/DNA et PEI(5 kDa)/DNA, pour un rapport N/P = 6,7, était de 156 ± 7 et 587 ± 143 nm, respectivement. L'utilisation d'un PEI de poids moléculaire plus élevé (25 kDa) permettaient d'obtenir des polyplexes de plus petite taille (Kunath *et al.*, 2003). Cependant le PEI de plus faible poids moléculaire présente une meilleur efficacité de transfection et une plus faible toxicité lors de transfection sur des fibroblastes de souris (Kunath *et al.*, 2003, Fisher *et al.*, 1999). L'influence de la taille des chaînes de polymère sur la condensation de l'ADN a également été testée pour la PLL par mesure de fluorescence du BET. Les PLL présentant des chaînes plus longues permettent une meilleure condensation de l'ADN (Kwoh *et al.*, 1999).

- Etude comparative :

Tang et Szoka ont comparé les propriétés des différents polymères cationiques : le PEI, la PLL, les dendrimères intacts et les dendrimères fracturés (Tang and Szoka, 1997). Les différents polymères ont été étudiés aux concentrations en sels, en polymère, en ADN qui donnaient les meilleures efficacités de transfection *in vitro*. Dans ces conditions optimales définies, les études ont montré que la PLL et les dendrimères intacts formaient des polyplexes polydispersés plus agrégés que ceux obtenus avec le PEI et les dendrimères fracturés. En effet, le diamètre moyen des polyplexes de dendrimères intacts et de PLL sont supérieurs à 1000 nm (I.2.b-A). Le PEI forment des polyplexes agrégés (taille > 1000 nm) uniquement pour des rapports de charges compris entre 0,5 et 1 (Tang et Szoka, 1997).

La mesure du potentiel zêta des différents polyplexes dendrimères/ADN, PEI/ADN et PLL/ADN présente le même profil : pour des rapports de charges inférieurs à 1, le potentiel zêta est négatif, et devient positif pour des rapports de charges supérieurs à 1 et à partir d'un rapport de charges de 3, le potentiel zêta présente un plateau à +40mV (I.2.b-B). D'autres études sur le potentiel zêta ont montré des profils de courbes similaires pour d'autres polymères comme les chitosans. Ces derniers forment des complexes de petite taille (~100nm), sauf pour des rapports de charges de 2 (neutralité) où les polyplexes sont agrégés (Erbacher *et al.*, 1998).

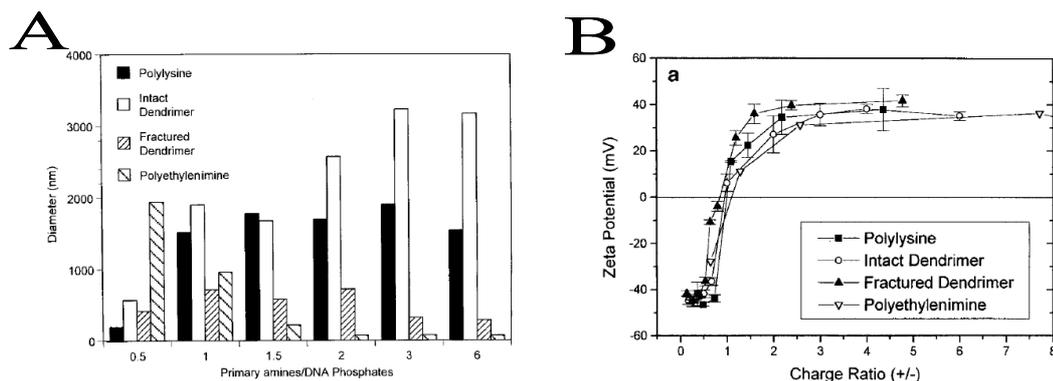


Figure 24 : *Propriétés physicochimiques des principaux polymères cationiques.* (A) Mesure de la taille des complexes en fonction du rapport de charges et du polymère. (B) Mesure du potentiel zêta en fonction du rapport de charges pour les différents polymères (Tang et Szoka, 1997).

Morphologie des polyplexes formés :

Si des similitudes peuvent être établies entre les polymères cationiques et les lipides cationiques pour certains paramètres comme l'influence du rapport de charges sur le potentiel zêta ou la taille des polyplexes, la structure supramoléculaire des polyplexes est très différente de celle des lipides cationiques. Le type de structure le plus couramment observé pour les polyplexes sont des structures qui s'apparentent à des tores (« Toroids » en anglais, appelés aussi « Donuts » ou « Rings »). D'autres formes, de type baguette (« Rod » en anglais), ou de type boucle (« Loop ») ont également été caractérisées (Bloomfield, 1997 ; Golan *et al.*, 1999, Tang *et al.*, 2005).

En 1997, Dunlap *et al.* publie l'étude de la structure des polyplexes PEI/ADN par SFM et ils ont observé l'existence de différentes formes sphériques des polyplexes pour un même rapport de charges : des structures de type « Donuts », mais également de type « Loops » sous une forme plus ou moins compacte (I.2.b) (Dunlap *et al.*, 1997).

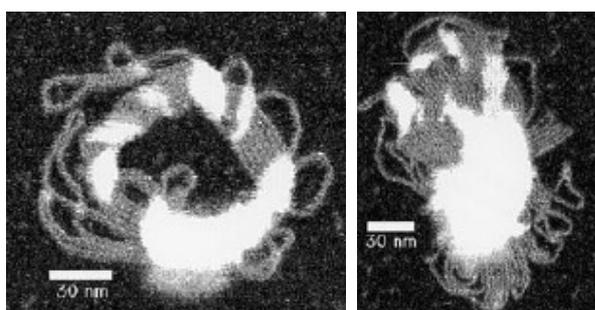


Figure 25 : *Microscopie de force atomique : visualisation des polyplexes PEI/ADN. A) Structure sphérique sous forme « Donuts », B) Structure sous forme de « Loops » compactes (Dunlap et al., 1997).*

Des analyses par microscopie électronique ont permis de montrer que les polyplexes de PLL/ADN formaient également des structures de type « Toroids » d'un diamètre compris entre 25 et 50 nm ou sous forme de « Rods » d'une longueur de 40 à 80 nm (I.2.b). Dans cette étude, environ 60 à 65 % des polyplexes formés se présentent sous la forme « toroids », le reste étant des « rods » (Kwoh *et al.*, 1999).

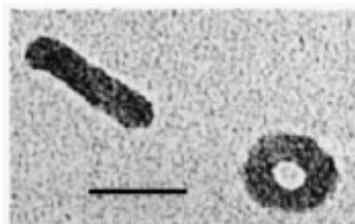


Figure 26 : *Visualisation d'un « toroid » et d'un « rod » par microscopie électronique. L'ADN a été complexé en présence de PLL et visualisé par microscopie électronique (Kwoh et al., 1999).*

D'autres études ont largement décrit les polyplexes PLL/ADN (Golan *et al.*, 1999, Wagner *et al.*, 1991 ; Liu *et al.*, 2001) et cette structure a également été observés pour des polyplexes chitosan/ADN et dendrimères/ADN (Danielsen *et al.*, 2005, Erbacher *et al.*, 1998, Tang *et al.*, 2005).

Tang *et al.* ont récemment proposé un schéma de formation de ces « Toroids » en présence d'ADN qui fait intervenir la flexibilité du polymère (I.2.b).

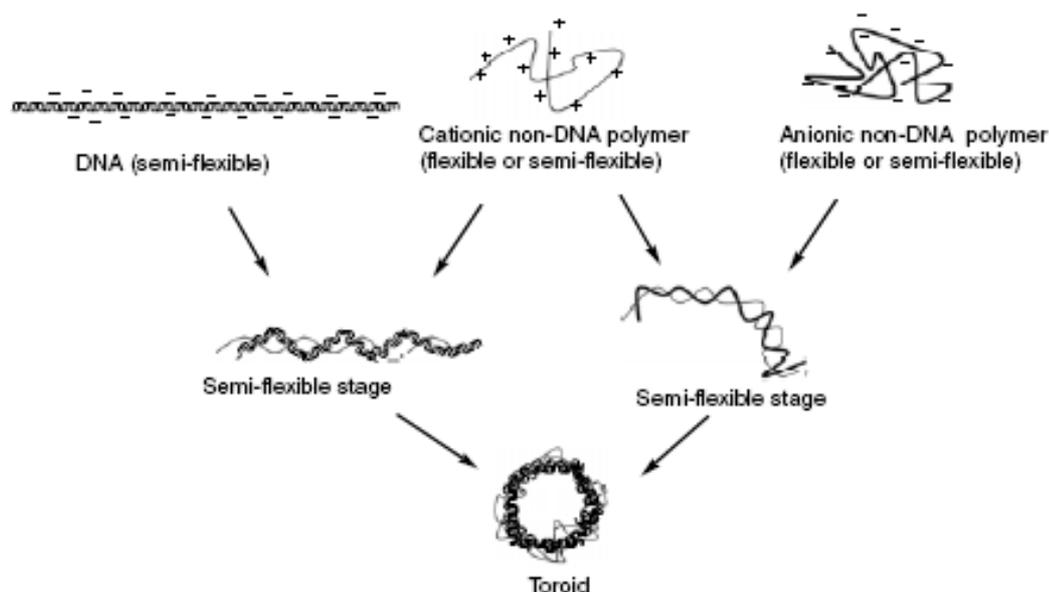


Figure 27 : **Formation des « toroids » en présence d'ADN.** Les auteurs ont proposé un mécanisme au cours duquel l'ADN, considéré comme un polymère semi-flexible (« DNA semi-flexible »), et le polymère cationique (« Cationic non-DNA polymer ») s'assemblerait en passant par un stade semi-flexible pour donner le « toroid » (Tang *et al.*, 2005).

La théorie prédie que seul les polymères semi-flexibles peuvent adopter une structure toroid, et que les polymères flexibles forment des globules amorphes. Cependant, la PLL est un exemple de polymère présentant une importante flexibilité et aussi capable de former des toroids. Le phénomène s'expliquerait par une neutralisation du contre-ion qui induirait une rigidification du polymère (Tang *et al.*, 2005).

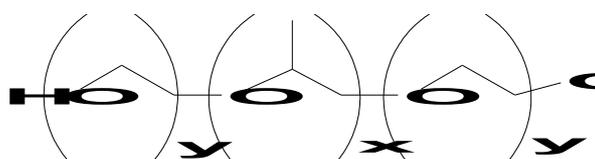
I.2.c Le devenir des polymères cationiques pour le transfert de gènes *in vivo*

Les études réalisées sur la première génération des polyplexes pour le transfert d'ADN sont basées sur l'utilisation d'homopolymères cationiques ou de dendrimères cationiques qui ont permis d'obtenir de bonnes efficacités de transfection *in vitro*. Cependant, la taille et la stabilité des polyplexes est très sensible à la nature du milieu dans lequel ils se trouvent et à la présence des protéines du sérum. C'est pourquoi l'utilisation des polyplexes *in vivo* s'est montrée limitée en raison de leur toxicité, de leur faible efficacité de transfection et de leur faible biodistribution. En effet, les polyplexes présentent une importante charge positive de surface qui conduit à une agrégation rapide des polyplexes dans les fluides biologiques, et ils sont préférentiellement pris en charge par les cellules phagocytaires de l'organisme (Mahato *et al.*, 1995, Verbaan *et al.*, 2001, Kabanov *et al.*, 2005). Cette charge positive est aussi responsable d'une reconnaissance par le système immunitaire des polyplexes qui conduit à leur élimination rapide de la circulation (Hwang and Davis, 2001).

Ainsi plusieurs équipes ont développé une seconde génération de polymères : des **copolymères cationiques** (Choi *et al.*, 1998 ; Kabanov and Kabanov, 1995 ; Kataoka *et al.* 1996 ; Katayose and Kataoka 1997 ; Maruyama *et al.*, 1997 ; Vinogradov *et al.*, 1998, Wolfert *et al.*, 1996). Ces molécules sont des copolymères à blocs constitués de groupements non-ioniques hydrophiles, comme des poly(éthylène oxyde) (PEO) ou des poly(N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide) (PHPMA), conjugués à un polycation comme une polyperméine (Kabanov, 1995), une PLL (Choi *et al.*, 1998) ; Kataoka *et al.*, 1996) ou un PEI (Kircheis *et al.*, 2001c ; Nguyen *et al.*, 2000 ; Ogris *et al.*, 2000 ; Vinogradov *et al.*, 1998) entre autres. Les interactions électrostatiques entre ces copolymères cationiques et l'ADN ont conduit à former des complexes hydrophiles peu chargés, dans lesquels le cœur est constitué d'ADN neutralisé par les polycations et la surface du complexe est constituée des chaînes non-ioniques hydrophiles. Cependant, ces complexes n'ont pas amélioré l'efficacité de transfection de l'ADN plasmidique, qui peut s'expliquer par la présence des chaînes non-ioniques en surface qui empêche les interactions avec les membranes cellulaires (Nguyen *et al.*, 2000 ; Harper *et al.*, 1991).

I.3 Les polymères amphiphiles

Pour palier à la faible efficacité de transfection *in vivo* observée pour les polymères cationiques ou les copolymères cationiques, l'approche proposée a été d'utiliser des copolymères à blocs amphiphiles et non-ioniques (Nguyen *et al.*, 2000). Les copolymères à blocs « Pluronic » sont constitués de groupements éthylène oxyde (EO) hydrophiles et de groupements propylène oxyde (PO) hydrophobes, arrangés en une structure de type A-B-A : $(EO)_x-(PO)_y-(EO)_x$. La variation de la longueur des groupements (EO) et (PO) permet d'obtenir différents pluronics, dont chacun est caractérisé par une balance hydrophile-lipophile et une concentration micellaire critique (cmc) qui lui est propre.



Copolymère	Masse molaire	Nombre moyen d'unités EO	Nombre moyen d'unités PO	HLB	cmc (M) à 37°C
L61	2000	5	30	3	1.1 10E-4
P123	5750	40	70	8	4.4 10E-6
L64	2900	26	30	15	4.8 10E-4
F127	12600	200	65	22	2.8 10E-6
F68	8400	150	30	29	4.8 10E-4

Figure 28 : Structure et caractéristiques physicochimiques des copolymères à blocs de type pluronic (Kabanov *et al.*, 2005).

L'utilisation de ces copolymères pour le transfert de gènes vient de l'idée que les chaînes PPO hydrophobes dans un polyplexe devaient améliorer les interactions avec la membrane et agir comme un agent fusogène pour faciliter le passage des polyplexes à l'intérieur de la cellule. Les chaînes PEO, hydrophiles, auraient pour rôle de maintenir la solubilité des polyplexes en solution (Kabanov *et al.*, 2005).

L'approche consiste à injecter l'ADN plasmidique en présence d'une solution de pluronic seul. Plusieurs études ont montré que cette combinaison ADN/pluronic augmentait l'efficacité d'expression dans les muscles squelettique et cardiaque (Hartikka *et al.*, 2001 ; Lemieux *et al.*, 2000 ; Liaw *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2003 ; Pitard *et al.*, 2002 ; Riera *et al.*, 2004). Une de ces études a montré qu'un mélange des pluronics L61 et F127 (SP1017) a permis d'augmenter le niveau et la durée de l'expression du gène rapporteur de la β -Galactosidase et du gène thérapeutique de l'érythropoïétine dans le muscle squelettique de la souris (C57 Black 6 et

BalbC), et chez le rat (Lemieux *et al.*, 2000). Les résultats ont montré que la concentration optimale des polymères, pour laquelle le niveau de transfection est maximal, était assez faible : 0,01 % (m/v). L'efficacité de transfection du SP1017 a été comparée à un autre polymère non-ionique, le PVP (poly-(vinyl)pirrolidone) connu également pour améliorer le transfert de gène (Mumper *et al.*, 1996, Rolland et Mumper, 1998). Le SP1017 a été plus efficace que le PVP et nécessite une quantité d'ADN bien moins importante pour obtenir des niveaux d'expression similaires au PVP (I.3).

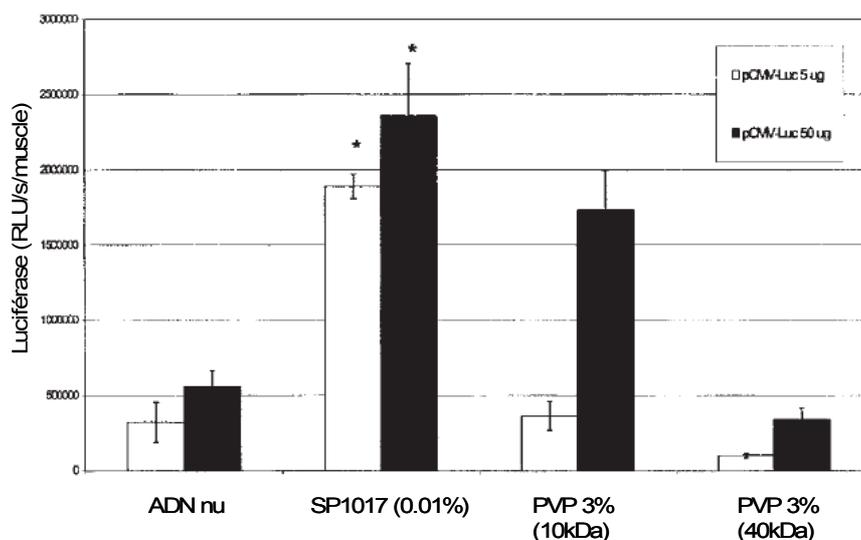


Figure 29 : Comparaison de l'efficacité de transfection du SP1017 avec le PVP en présence de 5 µg ou 50 µg d'ADN. 50 µl du mélange SP1017 (0,01%) contenant la quantité souhaitée d'ADN, ont été injectés dans le tibia antérieur de la souris C57 Black 6, âgée de 6 à 8 semaines. L'activité de la luciférase a été dosée dans la broyat musculaire 7 jours après l'injection et chaque valeur correspond à une moyenne et une SEM de 6 valeurs indépendantes (Lemieux *et al.*, 2000).

Plus récemment, il a été montré au sein de notre laboratoire que des formulations ne contenant qu'un seul pluronic, le L64 (ou PE6400) a permis d'augmenter le niveau d'expression du gène rapporteur de la β -Galactosidase et de la GFP dans le muscle squelettique de la souris (I.3) et le muscle cardiaque de rat immunotolérant (Pitard *et al.*, 2002), mais également du gène thérapeutique de l'érythropoïétine et de la minidystrophine (Richard *et al.*, 2005a et Richard *et al.*, 2005b).

Des mesures de taille et de potentiel zêta ont montré qu'en absence de pluronic l'ADN plasmidique présente une taille de 394 ± 38 nm alors qu'en présence de pluronic, la taille

mesurée est de 155 ± 44 nm. D'autre part, le potentiel zêta de l'ADN plasmidique (-17.6 ± 2.3 mV) se rapproche de la neutralité quand il est formulé en présence pluronic (-4.4 ± 2.0 mV) (Liaw *et al.*, 2001). Ceci montre que les pluronics ont la capacité de condensé l'ADN (Liaw *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2004), même si certains auteurs indiquent que les pluronics sont des polymères qui à la différence des polymères cationiques, ne condensent pas l'ADN (Kabanov *et al.*, 2002).

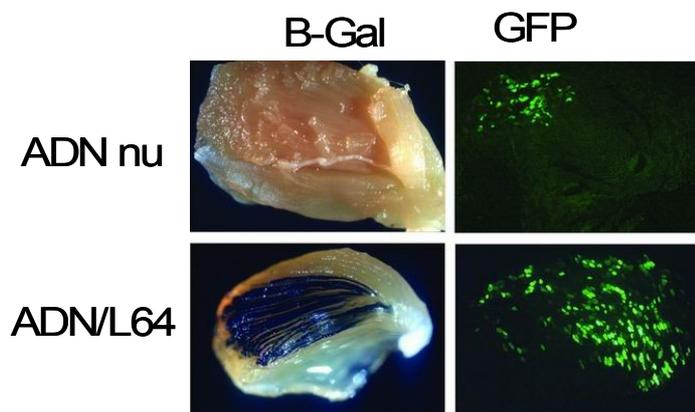


Figure 30 : Visualisation de l'expression de la β -Galactosidase et de la protéine fluorescente (GFP) dans le muscle de souris. L'ADN plasmidique de la β -Galactosidase et de la GFP ont été formulés en présence du copolymère à blocs L64 et injectés par voie intramusculaire. L'expression de la β -Galactosidase a été visualisée sur l'organe entier, et l'expression de la GFP sur des coupes musculaires (Pitard *et al.*, 2002).

Le mécanisme par lequel les pluronics agissent dans les applications précédemment décrites n'est pas encore bien établi. Plusieurs hypothèses ont été émises et décrivent que le pluronics pourraient par interactions avec la membrane, faciliter l'entrée de l'ADN dans la cellule (Lemieux *et al.*, 2000) ; les pluronics pourraient également améliorer la distribution de l'ADN dans le muscle (Lemieux *et al.*, 2000) ; enfin, ils pourraient augmenter le transport de l'ADN du cytoplasme jusqu'au noyau dans les cellules musculaires (Pitard *et al.*, 2002).

II l'ADN : catalyseur et support de synthèse du vecteur synthétique

Le point de départ de conception de la plupart des vecteurs synthétiques est de provoquer la condensation de l'ADN par des molécules polycationiques. En effet, le paragraphe précédent a montré que la condensation de l'ADN d'une molécule étendue en une molécule plus compacte au sein d'une particule, améliorerait sa stabilité chimique et ses propriétés physiques pour des applications dans le transfert de gène. La condensation de l'ADN par des polymères

cationiques ou des lipides cationiques est un assemblage quasi irréversible (Demeneix, 2004), qui produit des complexes contenant plusieurs centaines de molécules d'ADN par particule.

Contrairement aux polymères et lipides cationiques, les espèces *oligocationiques* tels que les détergents cationiques ou les monomères cationiques interagissent de façon **réversible** avec les molécules d'ADN (II).

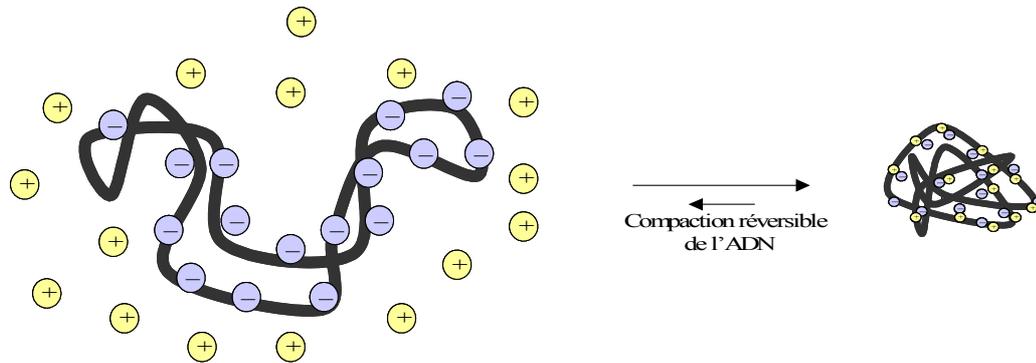


Figure 31 : *Condensation réversible de l'ADN par des espèces oligocationiques.* Les charges positives des oligocations permettent de condenser l'ADN de manière réversible (réaction équilibrée). La réaction tend à condenser individuellement chaque molécule d'ADN.

Cet équilibre réactionnel tend à diriger le système vers la condensation d'un maximum de molécules d'ADN, ainsi, chaque complexe formé contiendra une seule et unique molécule d'ADN condensée par particule. Cependant, l'existence de ces liaisons réversibles induit une faible stabilité de ces particules qui ne résistent pas à la dilution ou aux interactions avec des polyanions comme les protéoglycanes, rendant impossible l'utilisation de ces complexes pour le transfert de gène (Demeneix *et al.*, 2004, Zuber *et al.*, 2001).

Pour palier à ce désavantage, une solution chimique a été trouvée, basée sur le principe de transformer *in situ* ces espèces cationiques en molécules capables de condenser l'ADN dans des particules stables. Deux procédés ont été rapportés dans la littérature, le procédé de dimérisation, qui transforme les détergents cationiques en lipides, et le procédé de polymérisation, qui polymérise les monomères en polymère (Trubetskoy *et al.*, 1998 ; Chittimalla *et al.*, 2005). Dans cette technique, l'ADN a un rôle de support lors de la formation du vecteur synthétique, mais également le rôle de « catalyseur » de la réaction de synthèse du vecteur synthétique. Cette technique offre l'avantage de générer un vecteur « sur-mesure ».

II.1 Dimérisation de détergents cationiques

II.1.a Les détergents cationiques

Les détergents cationiques ont une meilleure solubilité dans les milieux aqueux que les lipides, et l'addition des particules détergents/ADN dans le milieu de culture des cellules pour

une transfection *in vitro*, se traduit par une solubilisation des détergents, décomplexant ainsi l'ADN. Il s'agit donc par le procédé de dimérisation, de transformer les détergents cationiques en lipides cationiques. Le groupe de J.P. Behr a proposé l'utilisation de détergents présentant des fonctions thiol (-SH) qui sont dimérisables en pont di-sulfite (S-S) par simple oxydation par l'oxygène de l'air ambiant (II.1.a) (Blessing *et al.*, 1998).

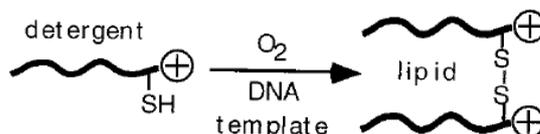


Figure 32 : *Dimérisation des fonctions thiols.* Les fonctions thiols peuvent former par une réaction d'oxydation, des ponts disulfures, créant ainsi une liaison covalente entre les deux détergents.

Le groupe s'est intéressé à la synthèse de nouveaux détergents cationiques en utilisant comme molécule de base la cystéine, qui est un composé naturellement présent dans les cellules. De plus, il a été montré que la présence excessive de micelles cationiques de détergent lors de l'étape de condensation de l'ADN était responsable d'une aggrégation des molécules d'ADN. Ainsi, pour éviter cette aggrégation, il est préférable que les détergents cationiques utilisés présentent une Concentration Micellaire Critique (cmc) élevée afin d'éviter la formation de micelle cationique. A l'inverse, il a été montré que le lipide formé après dimérisation des détergents cationique doit avoir impérativement une cmc faible, ce qui permet de former des particules lipides-ADN plus stables (Ouyang *et al.*, 2000). Le détergent idéal possède une haute cmc, et donne par dimérisation un lipide qui lui a une faible cmc.

Les différents types de détergents ont été synthétisés et ils présentent différents groupements chargés positivement, soit des groupements guanidinium, ornithine, spermine ou isothiuronium (II.1.b). La concentration en résidus phosphates de l'ADN couramment utilisée pour des expériences de transfert de gène est de l'ordre de 10 à 50 μM , ainsi les détergents présentés dans le tableau possèdent tous une cmc supérieure à la concentration des groupements phosphates (Blessing *et al.*, 1998, Dauty *et al.*, 2001, Dauty *et al.*, 2002, Ouyang *et al.*, 2000).

Tous ces détergents cationiques présentent une fonction thiol par détergent, sauf pour le détergent C_n -Isothiuronium où la fonction thiol est protégée par un groupement isothiuronium qui est une fonction pH-dépendente. Ainsi, la fonction thiol est déprotégée juste avant l'oxydation.

II.1.b Formation et caractérisation des particules obtenues

La synthèse des complexes se déroule en deux étapes : tout d'abord la condensation de l'ADN par les détergents cationiques, puis l'oxydation des fonctions thiol par oxydation naturelle de ces fonctions en présence d'oxygène.

Les complexes sont préparés par un ajout de la solution de détergents dans la solution d'ADN sous une agitation magnétique constante. Cette solution est conservée à température ambiante pendant plus de 24 heures pour laisser l'oxydation naturelle se faire (II.1.b).

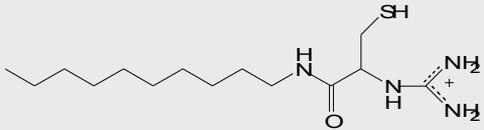
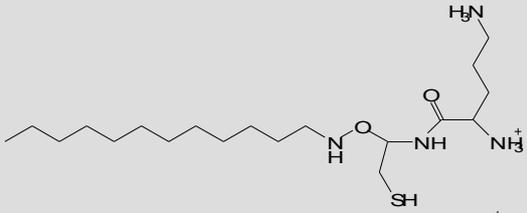
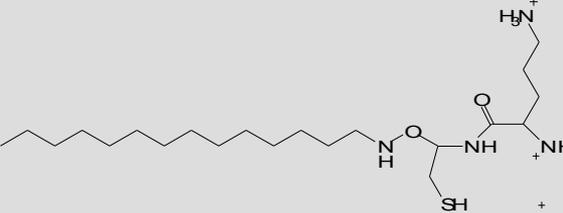
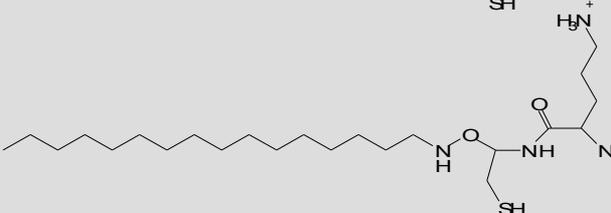
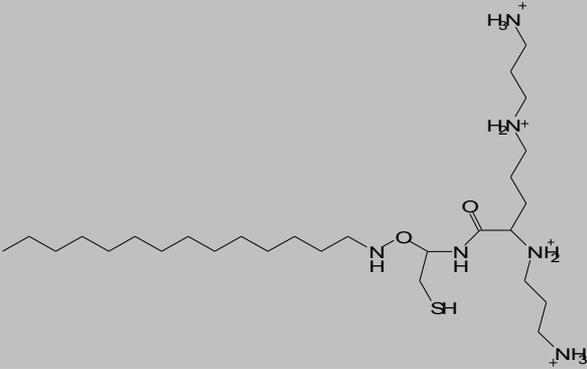
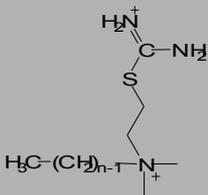
Structure chimique	Nom(cmc)
	<p>C₁₀-CG⁺ (320 μM)</p>
	<p>C₁₂COm (100 μM)</p>
	<p>C₁₄COm (45 μM)</p>
	<p>C₁₆COm (20 μM)</p>
	<p>C₁₄CSper (150 μM)</p>
	<p>C_n-Isothiuronium (>10 mM)</p>

Tableau 6 : Structure des différents détergents cationiques.

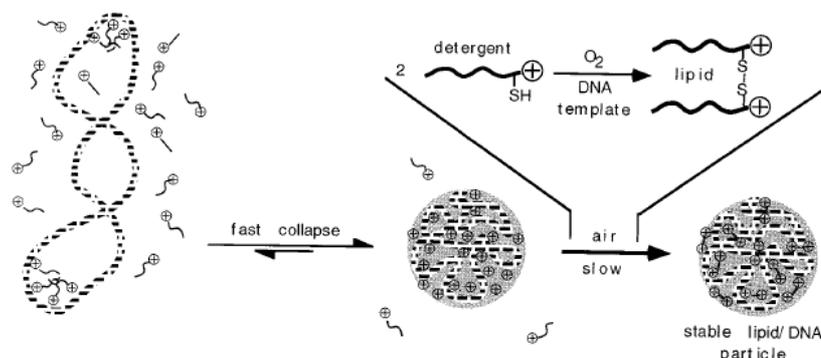


Figure 33 : Synthèse des complexes détergents/ADN et leur conversion en complexes lipide/ADN. Dans une première étape, les détergents cationiques condensent individuellement les molécules d'ADN (« fast collapse »), puis les fonctions thiols créent des ponts disulfure entre elles par oxydation lente à l'air libre transformant ainsi les détergents en lipides (Blessing *et al.*, 1998).

Les études ont montré que l'ADN avait un vrai rôle de support lors de la dimérisation des fonctions thiols. En effet, pour les détergents ($C_{10}\text{-C}^{\text{G}^+}$) et ($C_{14}\text{CSper}$), il a été montré que la vitesse de réaction d'oxydation donnant le lipide ($C_{10}\text{-C}^{\text{G}^+}$)₂ et ($C_{14}\text{CSper}$)₂, respectivement, était augmentée en présence d'ADN. L'ADN permet d'augmenter de façon locale la concentration du détergent, facilitant ainsi la réaction de dimérisation (Blessing *et al.*, 1998 et Dauty *et al.*, 2001).

L'étude physicochimique des complexes obtenus à partir des détergents ($C_{10}\text{-C}^{\text{G}^+}$), ($C_{12}\text{COrn}$), ($C_{14}\text{COrn}$), ($C_{16}\text{COrn}$), ($C_{14}\text{CSper}$) et $C_n\text{-Isothiuronium}$, a montré que les particules formées ont une structure **sphérique**, dont la taille est comprise entre **30 et 50 nm**, et présentent toutes un **potentiel zêta négatif** (entre ~ -45 mV et ~ -13 mV) pour des rapports N/P proches de 1 (Blessing *et al.*, 1998, Dauty *et al.*, 2001, Dauty *et al.*, 2002, Dauty *et al.*, 2002a, Ouyang *et al.*, 2000).

La variation de la taille des particules a également été étudiée en fonction du rapport N/P. Pour la série des détergents $C_x\text{COrn}$ et ($C_{14}\text{CSper}$), la taille des particules augmente avec le rapport N/P, et pour des rapports N/P $\geq 1,4$ les particules présentent une taille supérieure à 236 nm (Dauty *et al.*, 2001).

L'efficacité de transfection des complexes obtenus par dimérisation ne présente pas une efficacité supérieure à celle obtenue avec de l'ADN nu. En effet, les particules n'ont pas la capacité d'interagir avec la surface polyanionique des cellules car elles possèdent un potentiel zêta négatif. Des études de transfection *in vitro* ont été réalisées avec des particules formées avec un rapport N/P > 2, et ont montré que l'efficacité de transfection augmentait avec le rapport N/P. Les efficacités maximales de transfection ont été obtenues pour des rapports N/P compris entre 3 et 5, ce qui correspond aux rapports N/P généralement utilisés pour les lipides cationiques (Dauty *et al.*, 2002).

II.2 Polymérisation de détergents et de monomères

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, l'ADN peut servir de support et de catalyseur de la réaction de synthèse de vecteur synthétique, par dimérisation. Certaines équipes ont évalué le potentiel de l'ADN dans le rôle de support et de catalyseur pour une réaction de polymérisation. Comme pour le procédé de dimérisation, la première étape du procédé consiste à faire interagir l'ADN avec des espèces cationiques, ici des monomères cationiques, et dans un deuxième temps, de déclencher une réaction de polymérisation, formant ainsi des particules d'ADN condensées par un polymère. Pour mettre en œuvre ce type de procédé, différents types de monomères ont été utilisés, incluant même des détergents bi-fonctionnalisés capables de former un polymère.

II.2.a Les procédés de polymérisation et caractérisation des particules formées

Deux types de polymérisation ont été testés : la polymérisation par étapes et la polymérisation en chaîne (radicalaire). Pour le premier type de polymérisation, les monomères cationiques qui ont été utilisés sont les suivants (II.2.a) :

- l' **AEPD** (bis(2-amioéthyl)-1,3-propanediamine).
- le **PEG-AEPD** (N₂,N₂,N₃,N₃(3'-PEG₅₀₀₀aminopropane)bis(2-aminoéthyl)-1,-3-propanedi amonium di-trifluoroacetate)
- le **peptide di-Cys-NLS**, un « macro-monomère » cationique.

Ces monomères ont été polymérisés en utilisant comme agent de liaison le DSP (dithiobis succinimidyl propionate), le DTBP (diméthyl-3,3'-dithiobis propionimide) ou le DPDPB (1,4-di[3',2'-pyridyldithio-(propionamido)butane]) (II.2.a). Ce type de polymérisation donne naissance à un polymère où le monomère s'alterne avec l'agent de liaison (polymère de type A-B-A-B-A...).

Le deuxième type de polymérisation, la polymérisation en chaîne est une polymérisation radicalaire qui a été réalisée avec le monomère cationique **CdiA** (N,N'-Dionacrylate-N,N,N',N'-tetraméthylpropane-diammonium bromide) en utilisant comme initiateur l'AAP (azobis(2-amidino-propane) (Trubetskoy *et al.*, 1998) (II.2.a). Ce type de polymérisation donne naissance à un polymère de type A-A-A-A-A... (Trubetskoy *et al.*, 1998). Cette étude a

montré que l'ADN jouait un vrai rôle de support et de catalyseur de la réaction de polymérisation, car en absence d'ADN la polymérisation n'a pas eut lieu, quelque soit le type de polymérisation utilisée.

D'autre part, le groupe de J.P. Behr a synthétisé un détergent cationique bi-fonctionnalisé (deux fonctions thiols) capables de se polymériser, le C₁₂CPP (II.2.a). Ce détergent se polymérise par oxydation des deux fonctions thiols formant ainsi un pont disulfite entre chaque détergent « monomère ».

Figure 34 : *Structure chimique des monomères cationiques et détergents cationiques polymérisables utilisés pour la polymérisation.* La polymérisation par étape fonctionne par ajout des agents de liaison aux monomères cationiques pour donner des polymères de type A-B-A-B. Les agents de liaison DSP et DTBP sont utilisés avec les monomères AEPD et PEG-AEPD, et l'agent de liaison DPDPB est utilisé pour le peptide. La polymérisation en chaîne génère des polymères de type A-A-A-A, où A est le monomère (CDiA), et la réaction de polymérisation est déclenchée par un initiateur, l'AAP. Les détergents C12CPP présentent deux fonctions thiols qui par oxydation permettent de former un polymère.

Dans la polymérisation par étapes et en présence de monomère AEPD, il a été montré que le ratio AEPD/ADN et le temps avait une influence sur la taille des complexes formés lors de la polymérisation. En effet, pour de faibles rapports AEPD/ADN, les premiers complexes formés par polymérisation ont été observés à 60 minutes après l'ajout de l'agent de liaison, et 5 minutes après pour des rapports AEPD/ADN plus élevés. Pour les faibles rapports AEPD/ADN, l'ajout de PEG-AEPD dans le milieu réactionnel permet de conserver une population de particules d'une taille ~ 40 nm jusqu'à 180 minutes. Pour des rapports AEPD/ADN élevés, les complexes formés à 5 min ont une taille inférieure à 150 nm, mais 180 min après, les complexes s'agrègent en particules d'une taille supérieure à 150 nm (Trubetskoy *et al.*, 1998).

Le potentiel zêta que présentent les complexes formés, est de manière générale négatif quelque soit le ratio AEPD/ADN, ou le temps de polymérisation (II.2.a). Cependant, pour des rapports AEPD/ADN élevés (20:1), le potentiel zêta se rapproche de zéro. Pour les autres rapports, le potentiel zêta reste toujours inférieur à -5 mV. Le potentiel zêta des complexes formés en présence de PEG-AEPD est, après 180 min de réaction, de $-0,6 \pm 0,9$ mV (II.2.a).

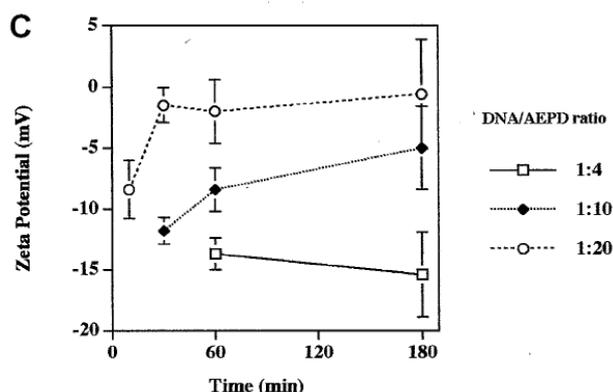


Figure 35 : *Variation du potentiel zêta en fonction du temps et du ratio AEPD/ADN.* L'ADN et l'AEPD ont été mélangés à différents rapports de charges (1:4, 1:10 ou 1:20), puis la réaction de polymérisation a été déclenchée. La mesure du potentiel zêta a été réalisée à différents temps de polymérisation pour les différents complexes (Trubetskoy *et al.*, 1998).

La morphologie des particules a été observée par microscopie électronique. Dans la phase initiale de la polymérisation les particules présentent un cœur central et sphérique,

contenant de l'ADN codensé, entouré d'un halo formé par des brins d'ADN. Pour des temps plus éloignés dans la polymérisation, les différentes polymérisations de l'AEPD en présence de DSP, ou de DTBP ou d'PEG-AEPD/DTBP donnent la formation de particules de type « baguettes ». Suivant le type de polymérisation, les « baguettes » sont plus ou moins fines ou allongées. Quelques particules sous forme de « tore » sont également observées (II.2.a).

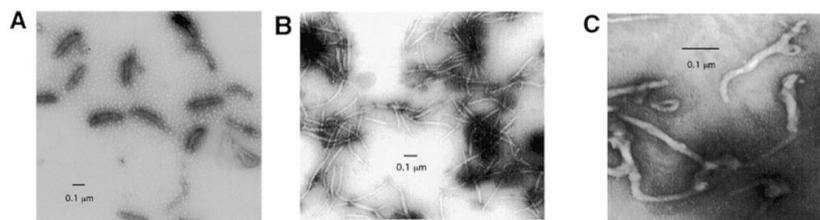


Figure 36 : Microscopie électronique des complexes obtenus par polymérisation de l'AEPD en présence d'ADN et en présence de DSP (A), de DTBP et de PEG-AEPD/DTBP (C) (Trubetskoy *et al.*, 1998).

Le monomère PEG-AEPD a également été utilisé, et l'incorporation de PEG dans les particules a permis d'éviter l'agrégation des particules, observée pour des temps supérieurs à 180 min, mais qui gardent cependant un potentiel zêta proche de la neutralité. Le procédé de polymérisation n'affecte pas l'activité biologique de l'ADN, cependant, seuls les complexes formés par polymérisation radicalaire (CDiA/ADN/AAP) ont induit une augmentation significative de l'expression de la luciférase sur des cellules NIH 3T3 (fibroblastes de souris) (Trubetskoy *et al.*, 1998).

Plus récemment, Chittimalla *et al.* ont proposé une polymérisation de **détergents cationiques** bifonctionnalisés, et donc polymérisables (II.2.a) (Chittimalla *et al.*, 2005). Le procédé de synthèse des particules par polymérisation des détergents est identique à celui de la dimérisation des détergents cationique ne possédant qu'une fonction thiol (page 79). La polymérisation induit la formation de complexes $(C_{12}CPP)_n/ADN$ (Chittimalla *et al.*, 2005).

Le potentiel zêta des particules $(C_{12}CPP)_n/ADN$ mesuré pour un rapport N/P=1, présentait une valeur de $-5 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$, alors que le potentiel zêta des particules $(C_{14}COrn)_2/ADN$ obtenues par dimérisation était fortement négatif (entre -50 mV et -20 mV) quelque soit le rapport N/P. Les particules $(C_{12}CPP)_n/ADN$, proche de la neutralité, ont été observées par microscopie électronique 48 heures après leur formation (II.2.a). Elles sont homogènes en taille ($32 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ pour 90% de la population). La structure interne de ces particules présente une phase tubulaire, comme pour les particules $(C_{14}COrn)_2/ADN$. De plus, la taille des particules est en bon accord avec une condensation monomoléculaire de l'ADN.

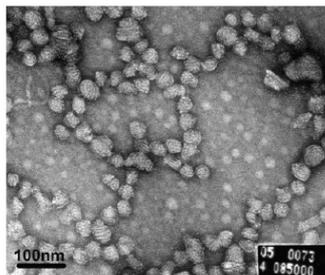


Figure 37 : Visualisation des complexes $(C_{12}CPP)_n/ADN$ par microscopie électronique (Chittimalla *et al.*, 2005).

Par rapport à d'autres systèmes cationiques comme les polyplexes ou lipoplexes, les complexes $(C_{12}CPP)_n/ADN$ se sont montrés plus résistants à des traitements avec des polyanions ou des agents réducteurs, montrant ainsi leur efficacité à conserver l'ADN complexé dans un fluide biologique. En effet, les complexes $(C_{12}CPP)_n/ADN$ possèdent un fort potentiel pour des applications de transfert de gène *in vivo* : ce sont des particules de petite taille, neutres et stables (Chittimalla *et al.*, 2005).

Les complexes $(C_{12}CPP)_n/ADN$ ont été injectés dans la circulation sanguine chez la souris et les meilleurs résultats ont été obtenus avec $(C_{12}CPP)_n/ADN$: ~50% des complexes étaient encore présents dans la circulation 10 min après l'injection ; puis ~25% , 30 minutes après l'injection (comparé à 2 et 10% pour le DOGS et les particules $(C_{14}COm)_2/ADN$, respectivement) (Chittimalla *et al.*, 2005).

III Encapsulation de l'ADN dans des nanoparticules

Les deux premiers procédés (auto-assemblage et dimérisation/polymérisation assistée) génèrent des nanoparticules, où l'ADN est associé à une matrice formée par des lipides ou des polymères cationiques. Un troisième concept consiste à encapsuler l'ADN au sein d'une vésicule formée d'une paroi, renfermant un cœur dans lequel l'ADN est encapsulé. Ce type de particules, présentant une organisation paroi/cœur, peut être obtenu par des procédés d'émulsion. Ces émulsions sont généralement réalisées avec des lipides ou des polymères, et permettent de former des vésicules lipidiques ou des nanoparticules polymériques, respectivement.

III.1 Vésicules lipidiques : évaporation en phase-inversée

Les premières vésicules lipidiques, capables d'encapsuler de l'ADN, ont été proposées par Szoka et Papahadjopoulos en 1978. Ces vésicules lipidiques ont été synthétisées dans le but de générer un vecteur synthétique capable d'encapsuler une quantité importante d'ADN au sein d'une vésicule caractérisée par un cœur aqueux, qui contient l'ADN, et d'une paroi formée par

la bicouche lipidique. Les constituants de ces vésicules sont principalement des phospholipides, comme la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylglycerol (PG), ou la phosphatidylsérine (PS), et le cholestérol.

Il a également été décrit l'emploi de surfactant, comme le SPAN 85 (sorbitane tri-oléate), le SPAN 60 (sorbitane mono-stéarate), le stéaryl-amine (1-octadécylamine) (III.1) (Vyas *et al.*, 2005 ; Szoka and Papahadjopoulos, 1978 ; Jain *et al.*, 2005).

Procédé de synthèse des vésicules lipidiques :

Les lipides ont tout d'abord été préparés sous forme de film, qui est repris par une phase organique (di-éthyle éther) (III.1-1) dans laquelle les lipides sont solubles.

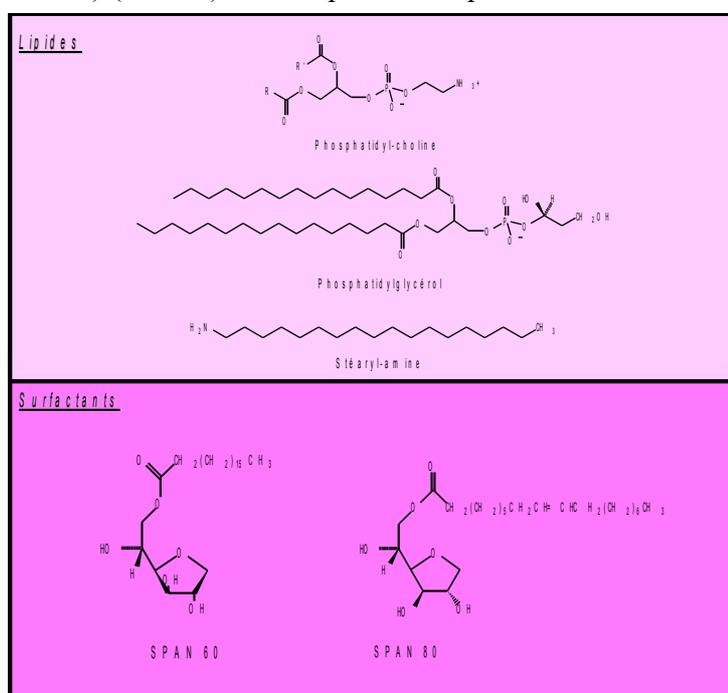


Figure 38 : Représentation des structures chimiques des lipides et des détergents utilisés pour la formation des micelles inversées.

La phase aqueuse est ajoutée, et forme un système composé de deux phases, la phase aqueuse contenant le principe actif (l'ADN) et la phase organique. Ce système est soumis à une brève sonication de quelques minutes, donnant ainsi la formation d'une émulsion de gouttelettes d'eau stabilisées par une monocouche de phospholipides (III.1-3), appelées « micelles ou phases inversées ». Le solvant est évaporé, et la phase inversée se transforme en un gel beaucoup plus visqueux (III.1-4), qui va progressivement s'agréger (III.1-5).

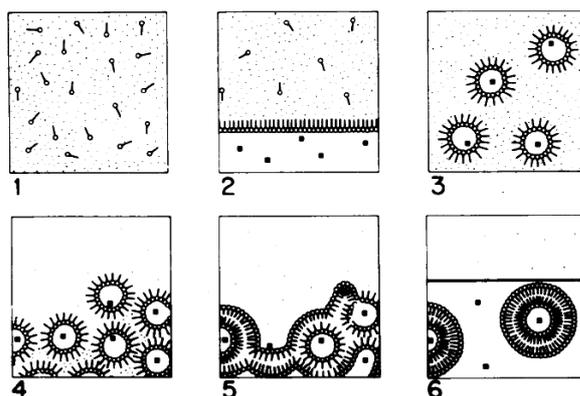


Figure 39 : Schéma représentatif de la formation des micelles inversées et des vésicules lipidiques. 1) lipides en solution dans la phase organique ; 2) ajout de la phase aqueuse ; 3) sonication et formation des micelles inversées ; 4) évaporation du solvant ; 5 et 6) dissociation de certaines micelles et formation de la double couche lipidique. (Szoka and Papahadjopoulos, 1978).

A ce point, le système est gardé sous une forte agitation magnétique, certaines micelles inversées éclatent et libèrent leur contenu, ainsi l'excès de lipide présent dans le système contribue à former autour des micelles inversées restantes une deuxième couche de lipide, formant ainsi des vésicules caractérisées par un cœur aqueux renfermant le principe actif et d'une paroi constituée par la bicouche lipidique.

L'explication du procédé de synthèse des micelles inversées (III.1) n'a pas été vérifiée par des méthodes physiques et est une interprétation de Szoka et Papahadjopoulos. Les autres études qui ont utilisé cette technique pour des applications dans le transfert de gène n'ont pas caractérisé plus en détail la formation de ces micelles inversées (Vyas *et al.*, 2005, Jain *et al.*, 2005, Fraley *et al.*, 1980, Uchida *et al.*, 1988). Les seules propriétés physico-chimiques étudiées pour ce type d'émulsion sont le potentiel zêta, la mesure de taille et le taux d'encapsulation de l'ADN.

Caractérisation des vésicules formées :

Les vésicules lipidiques proposées par Szoka et Papahadjopoulos sont constituées du mélange lipidique PC/PG avec ou sans cholestérol. La taille de ces particules est comprise entre 200 et 1000 nm (moyenne à 460 nm) ou entre 100 et 300 nm en présence ou en absence de cholestérol, et ont montré une capacité d'encapsulation de nucléotides (ARN 25S) d'environ 40% (Szoka and Papahadjopoulos, 1978) (III.1).

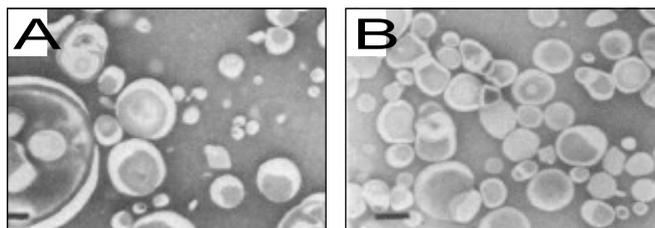


Figure 40 : Visualisation par microscopie électronique des vésicules PC/PG/cholestérol avant (A) et après filtration (B) (Szoka and Papahadjopoulos, 1978).

Jain *et al.* ont proposé l'utilisation de détergent tel que le SPAN 60 pour synthétiser des vésicules lipidiques (III.1). Le SPAN 60 est un surfactant insaturé qui permet de former des bicouches lipidiques plus stables (de part sa faible fluidité). Les vésicules obtenues par le mélange lipidique stéaryle-amine/SPAN 60/cholestérol présente un potentiel zêta positif, une taille de $2,32 \pm 0,48 \mu\text{m}$ avec un taux d'encapsulation d'ADN de 67,2 % (Jain *et al.*, 2005).

Vyas *et al.* ont proposé la synthèse de « niosomes », pour « non-ionic surfactant based vesicles » an anglais, en utilisant comme constituants des vésicules, le surfactant SPAN 85 et le cholestérol. Les vésicules lipidiques formées présentent une taille de $2,3 \pm 0,15 \mu\text{m}$ avec un taux d'encapsulation de $45,4 \pm 2,8 \%$ (Vyas *et al.* 2005).

Les vésicules lipidiques présentent l'avantage d'encapsuler des macromolécules hydrophiles avec des taux d'encapsulation proche de 50 %. Plusieurs études ont utilisé les vésicules lipidiques dans des expériences de transfert d'ADN dans un contexte de vaccins ADN. Les transfections réalisées *in vitro* (Fraley *et al.*, 1980) et *in vivo* (Vyas *et al.*, 2005 ; Jain *et al.*, 2005) ont montré le potentiel futur de ces vésicules lipidiques dans un contexte de transfert d'ADN.

III.2 Nanoparticules de polymère : l'émulsion par évaporation de solvant

Le procédé d'émulsion est un des systèmes largement utilisé dans le domaine pharmaceutique pour obtenir des microparticules et des nanoparticules capables de véhiculer des principes actifs. De nombreuses études ont publié l'efficacité de ces systèmes dans l'encapsulation de l'ADN dans des microparticules (Jones *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999 ; Hao *et al.*, 2000 ; Zuang *et al.*, 2002 ; Mohamed *et al.*, 2006 ; Dune *et al.*, 2003). Cependant les nanoparticules se sont avérées plus efficaces que les microparticules dans le transfert de gène (Prabha *et al.*, 2002), c'est pourquoi seuls les procédés ayant permis l'encapsulation d'ADN dans des nanoparticules seront abordés. Les nano-émulsions sont des systèmes colloïdaux synthétiques de type vésiculaire, constitués par un noyau central (appelé le cœur de la nanocapsule) qui est le plus souvent de nature lipophile mais aussi hydrophile, dans lequel le principe actif est solubilisé. Le cœur de la particule est entouré par une paroi mince, constituée

de polymère ou de lipide. Deux types d'émulsion sont utilisés pour préparer les nano-émulsions : la technique de double-émulsion et la technique d'émulsion-diffusion du solvant.

Synthèse de nano-émulsion par double-émulsion

L'émulsion la plus utilisée est l'émulsion « huile dans l'eau » (H/E) donnant des nano-émulsion à cœur huileux. Cependant, cette émulsion permet d'encapsuler principalement des substances lipophiles. Ainsi, pour permettre l'encapsulation de molécules hydrophiles, la technique de « double-émulsion » a été mise en œuvre, et comme son nom l'indique, elle se déroule en deux étapes. La première consiste à générer une émulsion, dite primaire, « eau dans l'huile » (E/H) par émulsion de la phase aqueuse qui contient l'ADN, dans la phase organique (constituée par un solvant non-miscible à l'eau) qui contient le polymère (III.2). L'émulsion E/H est générée par sonication, et est favorisée par une phase aqueuse ayant un volume inférieur à la phase organique. Cette première émulsion E/H est ajoutée, à une phase aqueuse, qui contient le stabilisateur, pour former une émulsion « eau dans l'huile, dans l'eau » ((E/H)/E) (III.2). L'émulsion finale (E/H)/E est gardée environ 20 heures sous agitation pour permettre l'évaporation du solvant et les particules formées peuvent être récupérées par ultracentrifugation. Les particules sont ensuite lavées et resuspendues dans de l'eau distillée avant d'être lyophilisées. Pour obtenir des particules de l'ordre du nanomètre cette technique nécessite l'utilisation d'importantes forces de cisaillement (sonication, procédé en plusieurs étapes), et ce « stress » est plus ou moins toléré par les macromolécules biologiques comme l'ADN. Cette technique a l'avantage de présenter des taux d'encapsulation de l'ADN assez importants par rapport aux autres types d'émulsion.

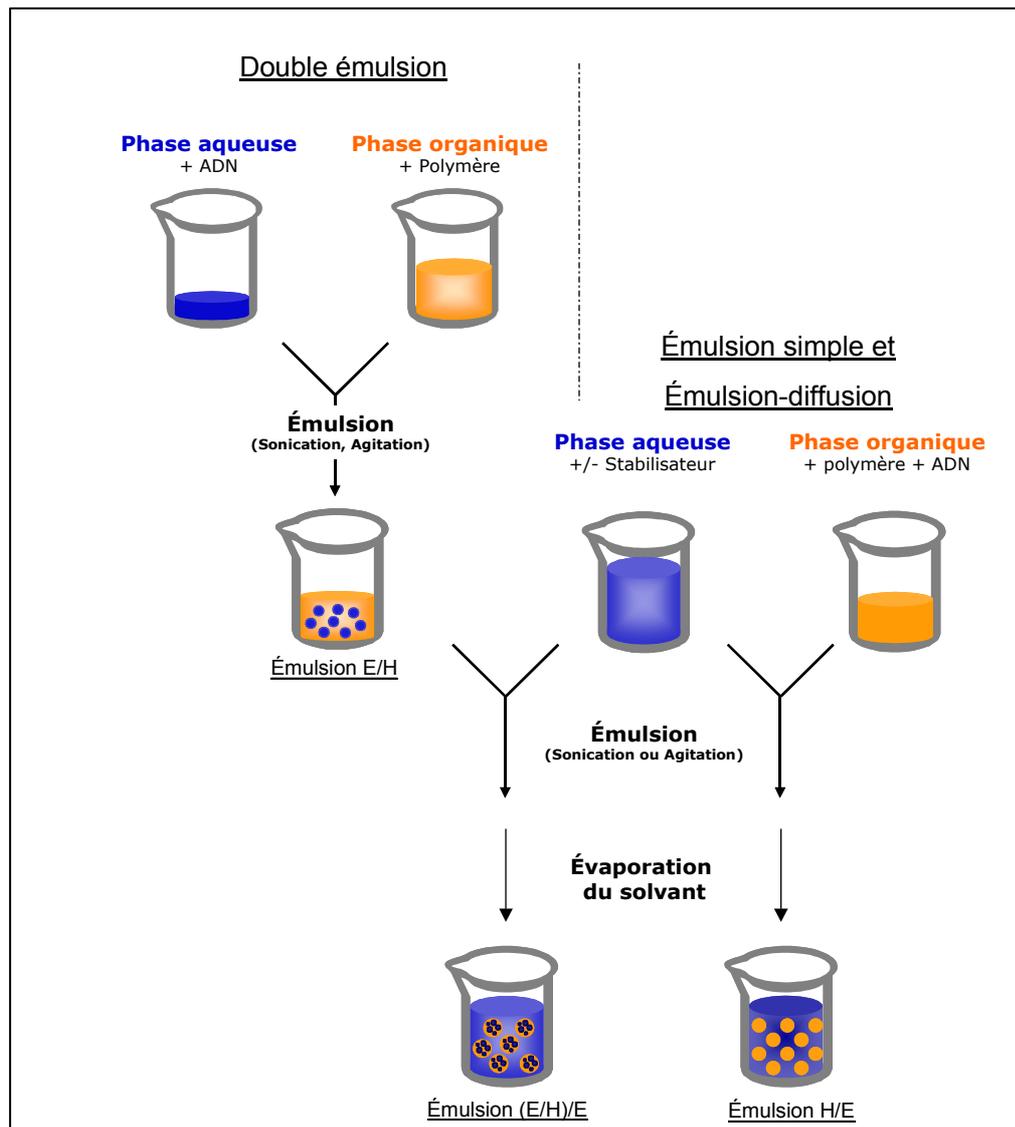


Figure 41 : *Procédé de l'émulsion et de la double émulsion.* L'émulsion simple et l'émulsion-diffusion consiste à créer une émulsion en mélangeant une phase aqueuse et une phase organique (contenant le polymère et l'ADN) par sonication ou forte agitation. L'émulsion est gardée sous agitation jusqu'à évaporation du solvant, pour donner une émulsion huile dans l'eau (H/E). La double émulsion consiste dans une première étape à générer une émulsion eau dans l'huile E/H. Cette émulsion est ensuite mélangée à une solution aqueuse et permet par agitation ou sonication de former une émulsion eau dans l'huile dans l'eau (E/H)/E. Cette émulsion est conservée sous agitation jusqu'à évaporation du solvant (adapté de Bala et al., 2004).

Technique d'émulsion-diffusion de solvant

La technique d'émulsion-diffusion du solvant est généralement utilisée pour encapsuler des molécules lipophiles et s'avère assez inefficace pour encapsuler des molécules solubles en milieu aqueux. Récemment, plusieurs groupes de recherche ont utilisés des polymères modifiés et ont permis l'encapsulation d'ADN dans des particules par cette technique (Oster *et al.*, 2006 ; Csaba *et al.*, 2005 ; Anderson *et al.*, 2005). L'émulsion est générée par ajout de la phase organique qui contient le polymère et l'ADN, à la phase aqueuse qui contient le stabilisateur par simple agitation magnétique (III.2). L'émulsion est gardée sous agitation quelques heures pour permettre l'évaporation du solvant. La formation des particules s'effectue spontanément au moment de l'ajout de la phase organique, contenant le polymère et l'ADN, dans la phase aqueuse, et forme une émulsion de type « huile dans l'eau » (H/E). Dans cette technique, les particules contiennent le solvant, le polymère et l'ADN. Le solvant va diffuser des particules vers la phase aqueuse, créant des turbulences à l'interface des particules, donnant ainsi la formation de particules de petite taille sans l'utilisation de force de cisaillement importantes.

Les composants constituant les nano-émulsions

Les polymères. Différents types de polymères naturels ou synthétiques ont été employés pour former les nano-émulsions, mais seuls certains d'entre eux sont biocompatibles (Jain 2000). Les polymères les plus fréquemment rencontrés pour la synthèse de nano-émulsion contenant de l'ADN sont le PLA (poly(lactic-acid)), le PGA (poly(glycolic acid)) et leur copolymère le PLGA (Poly(glycolactic-acid)) (III.2).

Ces polymères sont connus pour être biodégradables, biocompatibles, et non-toxiques puisqu'ils sont utilisés pour des applications biomédicales depuis plus de 20 ans (Bala *et al.*, 2004). Les produits de dégradation du PLGA sont l'acide lactique et l'acide glycolique qui sont facilement métabolisables *in vivo* via le cycle de Krebs.

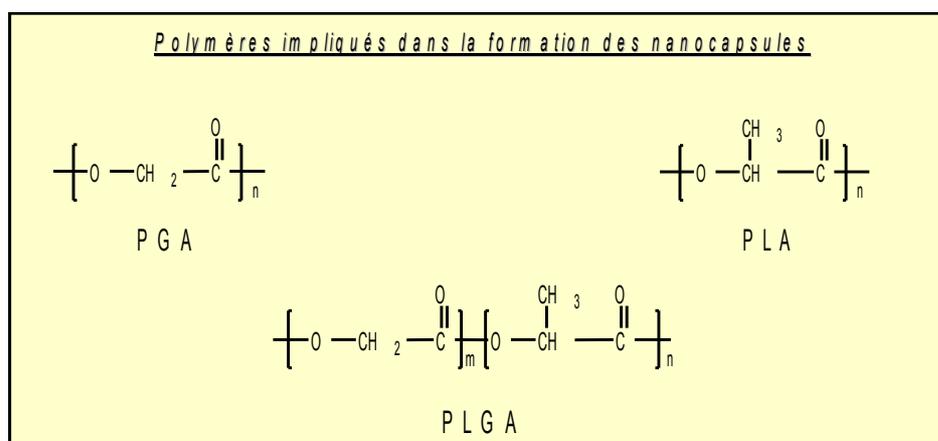


Figure 42 : *Polymères utilisés pour la synthèse de nano-émulsions. Les polymères PGA, PLA sont des polymères biodégradables.*

Les solvants. L'utilisation de solvants organiques dans le développement de nanoparticules biodégradables est un point délicat. Tout d'abord, l'indice de solubilité du solvant dans l'eau et sa capacité à solubiliser le polymère et l'ADN ont un impacte très important sur la taille des particules et le taux d'encapsulation.

Le choix du solvant dépend de la technique d'émulsion choisie. La technique de double-émulsion nécessite des solvants organiques insolubles dans l'eau comme le chlorure de méthylène ou le chloroforme, et la technique par émulsion-diffusion du solvant utilise des solvants organiques qui sont partiellement solubles dans l'eau comme l'acétone, l'alcool benzylique ou le DMSO (Bala *et al.*, 2004).

Les stabilisateurs. Les stabilisateurs sont indispensables pour la formation des nanoparticules car la formation de particule de si petite taille induit d'importantes tensions interfaciales, qui entraîne le système vers une fusion des particules pour diminuer l'énergie du système. L'adsorption du stabilisateur à l'interface de la particule permet de diminuer ces tensions interfaciales ainsi que l'énergie du système. Le stabilisateur le plus couramment utilisé est le poly(vinyl-alcool) (PVA) et il a été montré que la formation de particules sans PVA donnait des particules d'une taille supérieure à 1 μm (Vandervoort *et al.*, 2002). D'autres polymères, biodégradables, ont été référencés comme des stabilisateurs potentiels : des dérivés de la cellulose, la gélatine A et B et les poloxamères et les poloxamines (Bala *et al.*, 2004 ; Csaba *et al.*, 2005).

Propriétés physico-chimiques des nanoparticules

◆ *Taille et charge de surface des nanoparticules :*

Les nanoparticules préparées par la technique de double-émulsion ou par émulsion-diffusion avec du PLGA sont des particules dont la taille moyenne est comprise entre 100 et 400 nm et dépend de la concentration en PVA (Perez *et al.*, 2001 ; Panyam *et al.*, 2002 ; Prabha *et al.*, 2002 ; Sahoo *et al.*, 2002). L'augmentation de la concentration en PVA dans la phase aqueuse entraîne une diminution de la taille des particules. En effet, il a été montré qu'une augmentation de la concentration en PVA (>2,5% (m/v)), augmentaient les propriétés de surfactant du PVA, et la viscosité de la phase aqueuse augmentent ce qui stabilisent les particules (Sahoo *et al.*, 2002).

Les particules de PLGA formées, présentent généralement une charge de surface négative (entre -20 et -28 mV). La présence d'ADN ne modifie pas dramatiquement la valeur du potentiel zêta, par contre en absence de PVA le potentiel zêta diminue jusqu'à -45 mV. Le potentiel zêta négatif des nanoparticules « blanche » a été attribué à la présence de groupes

carboxyliques ionisés à la surface des particules. De plus, d'autres auteurs ont montré que le potentiel zêta des particules (en présence ou non d'ADN) pouvait passer d'une valeur positive à une valeur négative en fonction du pH (Panyam *et al.*, 2002, Sahoo *et al.*, 2002). Les particules présentent une charge de surface positive pour des pH inférieurs à 4 et négative pour des pH supérieurs à 4,5 (Panyam *et al.*, 2002).

◆ *Morphologie des nanoparticules :*

La morphologie des nanoparticules observée par les différentes techniques de microscopie montre la formation de sphères régulières qui présentent une surface lisse. La III.2 présente des particules formées par la technique de double-émulsion, et visualisées par SEM (A et B) et par TEM (C). La double-émulsion est nettement visible sur la III.2-B, chaque particule renferme une émulsion de gouttelettes d'eau dans le polymère.

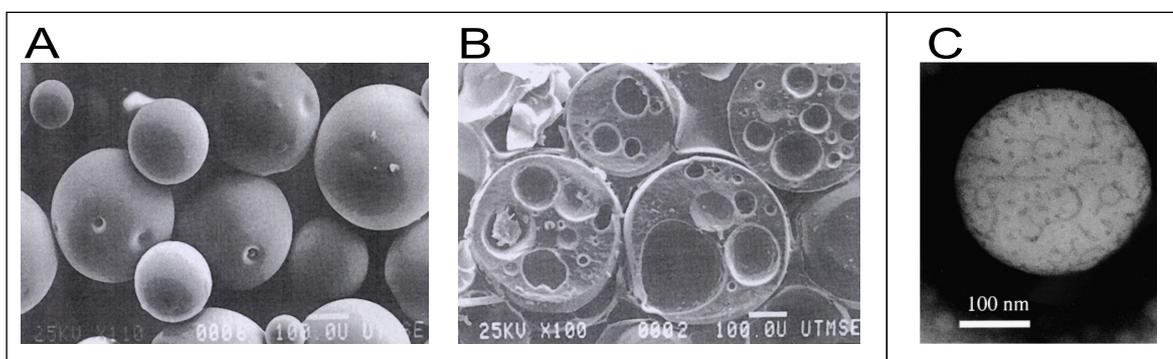


Figure 43 : Visualisation de microparticules blanches (A et B) et de nanoparticules contenant de l'ADN (C) par microscopie électronique obtenues par double-émulsion (Iwata and McGinity, 1992 (A et B) et Perez *et al.*, 2001 (C)).

Les nanoparticules formées par la technique d'émulsion-diffusion se présentent également sous forme de sphères avec une surface pas toujours régulière (III.2 A et B).

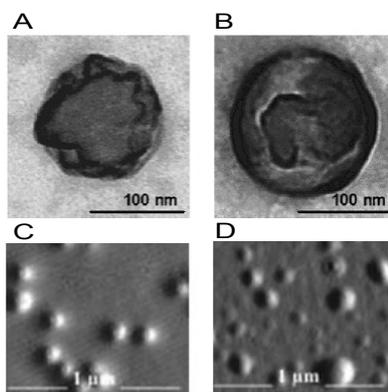


Figure 44 : Visualisation par microscopie électronique (TEM) (A et B) de nanoparticule de PLGA blanche (A) et contenant de l'ADN (B) et visualisation par AFM (C et D) de nanoparticule de PLGA contenant de l'ADN (C et D) (Oster et al., 2006 ; Csaba et al., 2005).

D'une manière générale, les nanoparticules de PLGA sont sphériques et présentent toujours une charge globale de surface négative, qu'elles soient formulées en présence ou non d'ADN. De plus, les nanoparticules qui se caractérisent par une taille inférieure au micromètre, présentent un avantage majeur pour des applications de transfert d'acides nucléiques. En effet, il a été montré que l'internalisation dans des cellules Caco-2, de particule d'une taille de 100 nm était 2,5 et 6 fois supérieure à celle des microparticules de 1 et 10 μm , respectivement.

Potentiel des nanoparticules pour le transfert d'acide nucléiques

L'internalisation et la distribution des nanoparticules ont été étudiées sur des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales de vaisseaux sanguins (Panyam et al., 2002 ; Panyam et al., 2003 ; Davda et al., 2002). Les résultats ont montré que les nanoparticules entraient dans la cellule par endocytose, et plus particulièrement par pinocytose et endocytose dépendante de la clathrine. De plus, les nanoparticules ont la capacité de s'échapper rapidement des endosomes pour se retrouver dans le cytoplasme de la cellule.

Une autre étude a montré que l'efficacité de transfection des nanoparticules contenant un gène rapporteur, sur des cellules en culture, restait inférieure à celle obtenue en présence de lipoplexes. Cependant, les nanoparticules ont permis une transfection *in vivo* d'une à deux fois supérieure par rapport aux lipoplexes, et l'expression a été maintenue jusqu'à 28 jours après la transfection (Cohen et al., 2000). Cependant, le transfert de gène avec les nanoparticules présentent une limite. En effet, le taux d'encapsulation des molécules d'ADN dans les nanoparticules est plus faible que celui des polyplexes et des lipoplexes (Panyan et al., 2003), ce qui limite la quantité d'ADN délivré. Ainsi, pour administrer une quantité satisfaisante d'ADN, il faut augmenter le volume, et donc la quantité, de nanoparticules. Les nanoparticules ne présentent pas de toxicité apparente aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Davda et al., 2002 ; Guzman et al., 1996 ; Labhasetwar et al., 1998), et l'augmentation de la quantité de nanocapsule n'a pas conduit à une toxicité associée à l'administration des nanoparticules.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le développement de nouveaux vecteurs synthétiques représente aujourd'hui un enjeu majeur, et l'analyse de la littérature a permis de classer les vecteurs synthétiques selon leur mode d'assemblage avec les acides nucléiques. Ainsi, les trois différents modes d'assemblages qui ont pu être distingués sont : (1) les systèmes auto-assemblés, (2) l'ADN, support de synthèse du vecteur synthétique et (3) l'utilisation de procédés d'émulsion.

L'objectif de ma thèse a été de développer de nouveaux vecteurs synthétiques en utilisant les deux premiers modes d'assemblages. Dans la classe des systèmes auto-assemblés, une nouvelle classe de lipides cationiques dérivés de composés naturels, les aminoglycosides, a été développée pour le transfert *in vitro* de petits fragments d'ARN, les siARN. L'efficacité de transfection des dérivés lipidiques d'aminoglycosides a été comparée à celle de lipides couramment utilisés pour transférer des molécules d'ADN. Puis, l'analyse des propriétés physicochimiques des complexes de siARN a permis d'établir de nouvelles relations entre la structure et l'activité des dérivés lipidiques d'aminoglycosides. Dans une deuxième partie, toujours dans la classe des systèmes auto-assemblés, je me suis intéressée au développement d'un système de vectorisation synthétique dans le poumon. Pour développer un nouveau système de vectorisation, nous avons choisi de changer radicalement la structure moléculaire du vecteur, en utilisant une nouvelle classe de polymères amphiphiles, les copolymères à blocs. A la différence des vecteurs cationiques, qui présentent une importante densité de charges positives, ces copolymères sont non-ioniques ou faiblement chargés positivement et sont amphiphiles. L'objectif était d'évaluer le potentiel de ces nouveaux copolymères pour le transfert de gènes dans les poumons. Deux classes de copolymères ont été étudiées, les triblocs et les tétrafonctionnalisés.

Parmi les vecteurs synthétiques qui appartiennent à la classe des systèmes auto-assemblés, certains chercheurs se sont intéressés à introduire des groupements sensibles au pH, ou aux potentiels redox. Cependant, à ce jour aucune fonction de type pH-sensible n'a réellement apporté un changement significatif de l'efficacité de transfection d'un gène. C'est pourquoi nous avons pensé qu'un vecteur qui serait entièrement dégradé à pH acide apporterait des fonctions innovantes dans ce domaine. Nous avons trouvé que les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) étaient de très bon candidat pour former un matériau hybride HDL/ADN entièrement dégradé à pH acide. Les HDL sont des feuillettes hydroxydes inorganiques, dégradables à pH acide, entre lesquels s'intercalent des espèces anioniques. L'objectif était de déterminer les conditions de synthèse des HDL pour former des matériaux hybrides HDL/ADN, où les molécules d'ADN seraient intercalées entre les feuillettes inorganiques. Ce type de synthèse fait appel au deuxième mode d'assemblage où l'ADN est utilisé comme support de synthèse des HDL.

MATERIEL ET METHODES

Acides Nucléiques :

Les plasmides pCMV-luc (Ferrari et al., 1997), pCMV-LacZ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), pCIK-Cat (gracieusement donné par D. Gill, Oxford, UK) contiennent respectivement les gènes rapporteurs de la luciférase, de la β -Galactosidase et de la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT) et sont tous contrôlés par un promoteur CMV d'origine humaine. Le plasmide pTER a été élaboré par insertion du promoteur H1 modifié entre les sites de coupures BglIII and HindII dans le plasmide pCDNA4TO (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Le plasmide pTER code pour un siARN de type hairpin dirigé contre l'ARNm de la GFP.

Les plasmides ont été amplifiés chez *E.Coli* et purifiés sur des colonnes de purification EndoFree (Qiagen, Chatsworth, CA).

Les fragments d'ADN de 6000 à 8000 pb (ADN_L) proviennent d'ADN de thymus de veau (Sigma, D1626) et sont stockés en solution aqueuse à 5 mg/ml. Les fragments d'ADN de 100 à 500 pb (ADN_S), stockés à 10 mg/ml, ont été obtenus par une extraction phénol-chloroforme (v/v) à partir d'ADN de testicules de Harengs (Sigma, D6898).

Les siARN anti-GFP et Control sont marqués à la Rhodamine en 3' et en 5' respectivement (Qiagen (Chatsworth, CA, USA). Le siARN anti-GFP non marqué a été fourni par Eurogentec (Seraing, Belgium). Les siARN anti-GFP présentent la séquence sens suivante : CAAGCUGACCCUGAAGUUCAU qui est complémentaire de l'ARNm du gène de la GFP. Le siARN Control dont la séquence sens est la suivante : UUC UCC GAA CGU GUC ACG Ud(TT) ne présente pas de complémentarité avec le reste du génome.

Vecteurs synthétiques :

Lipides cationiques :

La synthèse des dérivés lipidiques d'aminoglycosides a été décrite précédemment (Sainlos *et al.*, 2004, 2005). Les aminoglycosides utilisés pour la synthèse de leurs dérivés lipidiques sont la tobramycine, la kanamycine, la paromomycine et la néomycine dont le nombre de groupements amines protonables par molécule sont de 4, 3, 4 et de 6, respectivement.

Le lipide cationique BGTC (bis-guanidinium-tren-cholesterol) est caractérisé par deux charges positives portées par les groupements guanidinium dont la synthèse a été décrite précédemment (Vigneron *et al.*, 1996). Le lipide cationique DC-Chol (3Beta[N-(N',N'-diméthylaminoethane)-Carbamol]), portant une charge positive par molécule, a été

fourni par Avanti® Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, USA). Les lipides cationiques BGTC et DC-Chol et les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont été préparés sous forme de liposome en présence d'un co-lipide neutre la DOPE (DioleoylPhosphatidylEthanolamine (DOPE) (Avanti® Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA). Le lipide cationique et la DOPE sont mélangés dans une solution de chloroforme, qui est évaporée sous vide. Le film lipidique formé est resuspendu dans de l'eau distillée pendant 24 heures à 4°C, puis vortexé. Les liposomes sont formés dans un bain à ultra-sons pendant 10 minutes. Les concentrations finales des liposomes formés sont de 5, 20 et de 41.5 mg/ml et le rapport molaire lipide cationique/DOPE était de 1:1, 3:2 et de 3:2 pour les dérivés lipidiques d'aminoglycosides, le BGTC/DOPE et le DC-Chol/DOPE, respectivement.

Les agents de transfection pour le transfert de siARN disponibles dans le commerce comme le RNAiFect™ (Qiagen, Chatsworth, CA, USA), le X-tremeGENE siRNA Transfection reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) et la Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA) ont été utilisés selon les données du fournisseur.

Polymères :

L'homopolymère cationique polyéthylèneimine (PEI) 25 kDa (Sigma, St Louis, MO) a été préparé à une concentration de 10 mM. Les copolymères à blocs Lutrol® (poly(éthylèneoxyde)₇₅-poly(propylèneoxyde)₁₃- poly(éthylèneoxyde)₇₅), le PE6400 (poly(éthylèneoxyde)₁₃-poly(propylèneoxyde)₃₀- poly(éthylèneoxyde)₁₃) et le 704 ([poly(éthylèneoxyde)₁₃-poly(propylèneoxyde)₃₀]₂-éthylènediamine-[poly(éthylèneoxyde)₁₃-poly(propylèneoxyde)₃₀]₂) ont été gracieusement fournis par BASF (Mount Olive, NJ). Les solutions mères ont été préparées en solution aqueuse à 20% en polymère (m/v) et stockées à 4°C.

Formulation des acides nucléiques avec les vecteurs synthétiques :

Formulation des acides nucléiques avec les polymères :

Les complexes polymère/ADN sont obtenus par un mélange équimoléculaire du polymère en solution aqueuse, avec les acides nucléiques. Pour les formulations avec le Lutrol® et le PE6400, l'ADN plasmidique a été préparé à la concentration souhaitée dans une solution à 20 mM en HEPES (pH 7,4). Pour le PEI, l'ADN plasmidique a été préparé dans une solution à 10 mM en HEPES (pH 7,4) et les siARN dans une solution à 300 mM en NaCl. Dans le cas des formulations avec le 704, l'ADN a été préparé dans une solution de Tyrode 2X.

Formulation des acides nucléiques avec les lipides :

La formulation de l'ADN plasmidique et des siARN avec les lipides cationiques (dérivés lipidiques d'aminoglycosides, BGTC/DOPE, DC-Chol/DOPE) sont obtenus par un mélange

équivalométrique du lipide en solution aqueuse avec les acides nucléiques en solution concentrée à 300 mM en NaCl.

Synthèse des HDL :

La préparation des matériaux hybrides HDL/ADN par la méthode de co-précipitation a consisté en l'ajout simultané de deux solutions, celle de métaux (MgGa, MgFe ou MgAl) et celle de soude (NaOH), à la solution d'ADN, sous agitation magnétique et flux d'azote. Tout d'abord l'effet de la composition du feuillet hydroxydes ($M^{2+} = \text{Mg}$; $M^{3+} = \text{Al, Fe ou Ga}$) et la température de synthèse (température ambiante, 50°C et 60°C) ont été évalués. Cette optimisation a été réalisée pour des fragments d'ADN de 100 à 500 pb et pour des rapports molaires $R = M^{2+}/M^{3+}$ et M^{3+}/ADN de 2/1.

Ensuite, la synthèse des matériaux hybrides HDL/ADN en présence des fragments d'ADN de 6000 à 8000 pb a été réalisée avec les conditions optimales déterminées pour les petits fragments d'ADN, avec la phase MgGa préparé à 50°C. Enfin, l'effet de la variation du rapport molaire $\text{Mg}^{2+}/\text{Ga}^{3+}$ ($R = 2, 3, 4$ ou 5) a été étudié à 50°C.

Dans toutes les synthèses la concentration des solutions de métaux était de 0,033 et le pH a été ajusté à 10 au cours de la réaction par l'ajout contrôlé d'une solution de soude à 0,1M. A la fin de l'ajout de la solution contenant les métaux, les HDL sont maintenues sous agitation pendant 48 heures. Dans le cas des analyses aux rayons X, les HDL sont centrifugées à 13000 rpm pendant 30 min et le culot est lavé une fois avec de l'eau distillée, puis séché à température ambiante. Les phases $M^{2+}M^{3+}/\text{NO}_3^-$, la synthèse a été réalisée dans les mêmes conditions mais la solution d'ADN a été remplacée par de l'eau.

Caractérisation physicochimique des complexes vecteurs synthétiques/ADN :

Migration sur gel d'agarose :

Les gels d'agarose ont été préparés à 1% en agarose dans une solution de Tris-Acétate-EDTA (TAE) contenant 40 mM de Tris-Acétate, 1mM d'EDTA (pH 8,3) et du bromure d'éthidium (BET - Sigma, St Louis, MO, USA) à 5 μM . Le TAE a été utilisé comme tampon pour l'électrophorèse et les échantillons ont été mélangés au tampon de charge OrangeBlue (Promega, Madison, WI, USA).

Mesure de la fluorescence du BET en solution :

Les mesures de fluorescence du BET ont été réalisées sur un spectrofluorimètre Kontron SFM25 en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 260 nm et d'émission de 590 nm. Un microlitre d'une solution de BET à 1 mg/ml a été ajouté à 1 ml de la solution contenant les complexes. Les mesures ont été réalisées dans une cuve en quartz SUPRAZIL de 0,5 ml, et 10 mm de côté (Hellma, France).

Diffusion quasi-élastique de la lumière : mesure de la taille des complexes :

Les mesures de taille des complexes ont été réalisées sur un Zetasizer 300HSA (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) at 20°C. Les échantillons ont été préparés à 10 µg/ml en acides nucléiques et la quantité souhaitée de lipides cationiques. La mesure a été réalisée sur un échantillon de 1 ml dans une cuve de 1 cm de côté, après une incubation de 10 minutes des échantillons à température ambiante.

Cryo-microscopie à transmission (Cryo-TEM) :

5 µl de l'échantillon a été déposé sur une grille en cuivre, et plongé dans un bain d'éthane liquide refroidi à l'azote liquide (Leica EM CPC). L'observation a été réalisée avec un microscope FEI Tecnai F20 à 200 kV, avec un agrandissement initial de 50000X. Les images sont enregistrées à l'aide d'une caméra CCD 2Kx2K Gatant.

Diffraction au rayon X :

Les spectres de diffraction au rayon X ont été enregistrés à température ambiante sur un diffractomètre D501 Siemens possédant une radiation Cu K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Les mesures ont été réalisées sur un intervalle de 2θ compris entre 2 et 75°, par palier de 0.03°, toutes les 10 secondes.

Analyses thermogravimétriques :

Les analyses thermogravimétriques (TGA) ont été réalisées sur un Thermo-Gravimètre Setaram TGA 92. Les thermogrammes ont été enregistrés sous atmosphère confinée sur un intervalle de température de 25 à 800°C par palier de 5°C/minutes.

Transfection in vitro :

Cultures cellulaires :

Les cellules d2GFP (obtenue à partir de la lignée H1299 : carcinome de cancer de poumon humain), les cellules HeLa (cellules tumorales issues d'un carcinome du col utérin) ont été cultivées en flasques, sous atmosphère humidifiée à 37°C et un pourcentage de CO₂ à 5%, dans un milieu de culture D-MEM (GIBCO, Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA) complété par du sérum de veau fœtal (SVF) à 10% (Eurobio, Courtaboeuf, France), du Glucose (4500 mg/l), de la l-Glutamine (mM), du Pyruvate (mM) et un mélange streptomycine/pénicilline (GIBCO, Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA) à 1%.

Transfection des complexes lipides/acides nucléiques les cellules d2-GFP :

Le milieu de culture des d2GFP a été supplémenté en généticine à 0,8 mg/ml (GIBCO, Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Un jour avant la transfection, les cellules sont transférées sur une plaque de culture de 24 puits à 65000 cellules/ml pour obtenir une confluence de 70-80% le jour de la transfection. Les complexes lipides cationiques/acides nucléiques sont préparés 10 minutes avant la transfection et 50 µl des complexes sont ajoutés à 500 µl de milieu dépourvu de sérum et de généticine. Deux heures après la transfection le milieu est remplacé par 1 ml de milieu à 10% en SVF et 1% en streptomycine/pénicilline. Toutes les transfactions ont été réalisées en triplicate.

Dans le cas des cinétiques d'expression, les transfactions ont été réalisées de la même manière avec les modifications suivantes. Après la transfection, les cellules ont été repiquées tous les trois jours dans une nouvelle plaque 24 puits pour atteindre une confluence de 90% le jour du dosage protéique. Les transfactions ont été réalisées en triplicate et l'expression de la GFP a été mesurée 1, 2, 3, 5, 6 et 9 jours après la transfection.

Transfection des hybrides HDL/ADN sur les cellules HeLa :

Les cellules HeLa ont été incubées en présence des HDL/ADN (q.s.p 3 µ d'ADN par puits) en plaque 24 puits, pendant 2h à 37°C dans 300 µl d'OPTI-MEM. Le milieu est ensuite aspiré puis les cellules sont lavées 3 fois au PBS et fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées avec 1 ml de PBS puis montées sur une lame support en présence de Vectachield contenant du DAPI.

Transfection in vivo :

Animaux :

Des souris femelles Swiss et BALB/c ont été obtenues à l'âge de 8 semaines (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France).

Administration intra-trachéale :

Les souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine (70 mg/kg) et de xylazine (15 mg/kg). Après l'anesthésie, 100 µl de la solution d'ADN nu ou complexée a été instillée directement dans les poumons par l'intermédiaire d'un cathéter (22G). Pour l'administration des complexes par aérosolisation, les complexes (100 µl)

ont été administrés via un Microsprayer® (Penn-Century, Philadelphia, PA). La solution contrôle est une solution à 10 mM en HEPES, pH 7,4.

Dosage et détection de l'expression des gène rapporteurs et des protéines :

Dosage fluorimétrique de la GFP :

Vingt quatre heures après la transfection, les cellules sont lavées deux fois avec 500 µl de PBS, puis lysées dans 300 µl du tampon de lyse Reporter Lysis 1X Buffer (RLB) (Promega, Madison, WI) complété avec un cocktail d'anti-protéase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La lyse complète des cellules a été assurée by un cycle de refroidissement -80°C/20°C. Chaque échantillon est transféré dans un tube eppendorf, puis centrifugé 5 minutes à 10000 g. La mesure de la fluorescence de la GFP a été réalisée sur un aliquot de 180 µl du surnageant à l'aide d'un lecteur multi-plaque Victor² (Perkin Elmer, Les Ulis, France). La fluorescence a été mesurée pour une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 535 nm. L'intensité de la fluorescence est normalisée à la concentration en protéine totale de l'échantillon, dosée par une réaction de Biuret en utilisant le BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). L'expression résiduelle de la GFP est exprimée en pourcentage de fluorescence par rapport à l'échantillon contrôl.

Dosage enzymatique de la Luciférase :

Les cellules, lysées de la même manière que pour le dosage de la GFP, ont été reprises dans 200 µl de RLB1X. L'activité de la Luciférase a été mesurée à l'aide du Luciférase assay system (Promega, Madison, WI) où 100 µl du substrat de la Luciférase ont été mélangé à un aliquot de 20 µl de l'échantillon. L'activité de la Luciférase est mesurée par luminométrie sur le lecteur multi-plaque Victor². La gamme de référence a permis de déterminer la relation suivante entre le nombre de coup par seconde (cps) et la quantité de luciférase présente dans l'échantillon : $\text{ng}(\text{luciférase}) = \text{puissance} ((\text{cps}/13.201), (1/0.8799))$.

Dosage de la protéine CAT par ELISA :

Les poumons des souris euthanasiées ont été immédiatement refroidis dans de l'azote liquide puis repris dans 1 ml de RLB1X. Les échantillons ont été homogénéisés par un broyage rapide des tissus, puis centrifugés 5 minutes à 10000 g, et la quantité de protéine CAT a été dosée sur un aliquot de 200 µl du surnageant à l'aide du kit de détection CAT enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) (Roche Diagnostics). Une gamme de référence a été réalisée à chaque dosage.

Dosage des Interleukine-6 :

La concentration en Interleukine-6 a été mesurée dans le sérum et le broyat pulmonaire des souris à l'aide du kit de détection Quantikine, mouse IL-6 qui est un dosage ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Immunohistochimie et histopathologie des poumons :

Juste après l'euthanasie des souris, les poumons ont été perfusés avec une solution de fixation (paraformaldéhyde froid à 4% dilué dans du PBS). La trachée est ensuite ligaturée, puis les poumons ont été immergés dans une solution contenant la même solution de fixation. Les poumons sont maintenus à 4°C pendant 4 heures. Les poumons ont été ensuite rincés au PBS, et incubés avec le réactif X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) pendant 12h à 37°.

Pour les expériences d'histopathologie et d'immunohistochimie les poumons sont préparés comme ci-dessus (sans l'incubation dans le X-Gal), puis après le rinçage PBS, ils sont fixés dans un tampon à 10% en formaline. Ils sont ensuite inclus dans un bloc de paraffine et coupé en fines sections de 4 μ m. Les sections sont incubées dans une solution de Kernechtrot (hématoxyline-éosine) pour les analyses histopathologiques. Pour les expériences d'immunohistochimie les anticorps primaires utilisés sont l'anti CAT polyclonal (Rabbit) (Sigma, St Louis, MO, USA) et l'anti GFP polyclonal (Rabbit) (Chemicon, CA, USA) pour le marquage de la CAT et de la GFP respectivement. Ces anticorps sont ensuite couplés à l'anti Rabbit IgG-Biotinylé (Sigma, St Louis, MO, USA), puis à la Streptavidine-HRP (Dako Cytomacion, Denmark).

RESULTATS

LES SYSTEMES AUTO-ASSEMBLES.....	97
INHIBITION D'EXPRESSION PAR ARN INTERFERENCE.....	97
<i>Transfection des siARN avec les agents de transfection de l'ADN.....</i>	<i>98</i>
<i>Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides.....</i>	<i>99</i>
<i>Caractérisation physico-chimique des complexes lipides cationiques/acides nucléiques</i>	<i>100</i>
<i>Inhibition de l'expression d'un gène par transfection de siARN avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides.....</i>	<i>105</i>
TRANSFERT DE GENE IN VIVO.....	111
<i>Les copolymères à blocs.....</i>	<i>112</i>
<i>Utilisation des triblocs pour le transfert d'un gène rapporteur dans les poumons.....</i>	<i>112</i>
<i>Aérosolisation des formulations Triblocs/ADN et PEI /ADN.....</i>	<i>117</i>
<i>Utilisation des tétrafonctionnalisés pour le transfert de gènes dans les poumons.....</i>	<i>119</i>
<i>Transfert de la protéine de fusion GFP-CFTR dans les poumons.....</i>	<i>122</i>
LES HYDROXYDES DOUBLES LAMELLAIRES.....	124
<i>Synthèses des HDL en absence ou en présence d'ADN.....</i>	<i>125</i>
<i>Paramètres influençant la structure des feuilletts hydroxydes des phases MgGa/ADN.....</i>	<i>126</i>
<i>Potentiel des HDL pour la vectorisation d'acides nucléiques.....</i>	<i>129</i>
CONCLUSIONS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	143

LES SYSTEMES AUTO-ASSEMBLES

I Inhibition d'expression par ARN interférence

L'ARN interférence (ARNi) est un outil très efficace et largement utilisé pour l'inhibition de l'expression d'un gène cible. Les molécules impliquées dans ce processus post-transcriptionnel sont des petits brins d'ARN double-brins constitués de 21 à 25 paires de base (pb), appelés « small interfering » ARN (siARN) (Fire *et al.*, 1998). Pour obtenir une inhibition maximale du gène cible, les siARN doivent être transportés jusqu'au cytoplasme de la cellule. Ainsi, différentes techniques de vectorisation ont déjà montré leur efficacité pour le transfert de siARN et actuellement, la technique la plus utilisée est basée sur l'utilisation des lipides et polymères cationiques qui ont déjà montré leur efficacité pour le transfert de molécules d'ADN. Les lipides cationiques développés pour le transfert de molécules d'ADN sont composés d'une partie hydrophobe, d'un bras espaceur et d'une tête polaire cationique (Templeton *et al.*, 1997). De nombreuses études ont permis d'étudier les caractéristiques structurales des complexes vecteurs synthétiques/ADN et ont montré que les interactions électrostatiques entre l'ADN plasmidique et la partie polaire des lipides cationiques conduisaient à la formation de particules qui présentent une organisation lamellaire ou hexagonale (Pitard *et al.*, 1997 ; Koltover *et al.*, 1998). Cependant, les caractéristiques structurales des complexes lipides cationiques/siARN n'ont pas encore été décrites dans la littérature, et il n'est pas évident que les relations qui existent entre la structure des complexes lipides/acides nucléiques et leur efficacité de transfection soient identiques pour l'ADN et les siARN.

Dans ce contexte, une nouvelle classe de lipides cationiques a été caractérisée, et le potentiel de ces molécules, à interagir de façon plus spécifique avec les siARN, a été évalué. Plus précisément, notre objectif était de déterminer l'efficacité de dérivés lipidiques d'aminoglycosides pour le transfert de siARN dans des cellules de mammifères en culture. Ces dérivés lipidiques d'aminoglycosides sont des lipides cationiques qui ont la particularité d'utiliser au niveau de la tête polaire un aminoglycoside comme groupement cationique, relié à deux chaînes aliphatiques dioléyl via un groupement espaceur succinyl (Belmont *et al.* 2002 ; Sainlos *et al.*, 2004 et 2005). De plus, la famille des aminoglycosides offre l'avantage de pouvoir modifier la tête polaire en utilisant différents aminoglycosides comme la kanamycine, la tobramycine, la neomycine et la paromomycine, qui sont connus pour interagir de manière

spécifique avec l'ARN double brin et plus spécifiquement avec les acides nucléiques qui présentent une hélice en conformation A.

Ainsi l'utilisation d'un aminoglycoside comme groupement cationique a permis de générer des vecteurs synthétiques constitués de composés naturels.

Dans cette étude, les molécules de siARN et d'ADN ont été mélangées aux dérivés lipidiques d'aminoglycosides et les propriétés physico-chimique des particules formées ont été étudiées et comparées à des particules obtenues avec un lipide cationique connu pour son efficacité dans le transfert d'ADN plasmidique, le BGTC-DOPE (Vigneron et al., 1996). La taille des particules a été mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière et la morphologie des particules a été visualisée par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM). Ensuite, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont été utilisés pour des expériences d'inhibition de l'expression d'un gène ont été réalisées sur des cellules d2-GFP, qui expriment de façon stable la protéine fluorescente en vert (GFP), et qui appartiennent à la lignée H1299, cellules de cancer de poumon humain. Un siARN dirigé contre la GFP a été complexé en présence des différents dérivés lipidiques d'aminoglycosides et transfecté sur les cellules d2-GFP. L'efficacité des différents aminoglycosides a été comparée à des agents de transfection de siARN disponibles dans le commerce et exprimée en fonction du rapport de charges dérivés lipidiques d'aminoglycosides/siARN et de la quantité de siARN.

Transfection des siARN avec les agents de transfection de l'ADN

Nous avons tout d'abord évalué le potentiel des vecteurs cationiques couramment utilisés pour la transfection l'ADN plasmidique sur des cellules en culture, pour le transfert de siARN. Un siARN dirigé contre la protéine GFP a été complexés en présence des lipides cationiques BGTC-DOPE et DC-Chol-DOPE, et de l'homopolymère cationique, le PEI. Vingt-quatre heures après la transfection l'inhibition de la GFP a été évaluée par mesure de la fluorescence résiduelle dans le lysat cellulaire, exprimée en fonction du rapport de charges vecteurs cationiques/siARN (+/-) (). Les résultats montrent que l'expression de la GFP diminue pour des rapports de charges vecteurs cationiques/siARN (+/-) croissants, et présente un minimum de 32, 52 et 55 % pour le BGTC-DOPE, le DC-Chol-DOPE et le PEI respectivement. Ainsi, le BGTC-DOPE apparaît être le vecteur le plus efficace comparé au PEI et au DC-Chol, pour inhiber l'expression de la GFP par transfert de siARN sur cellules d2-GFP.

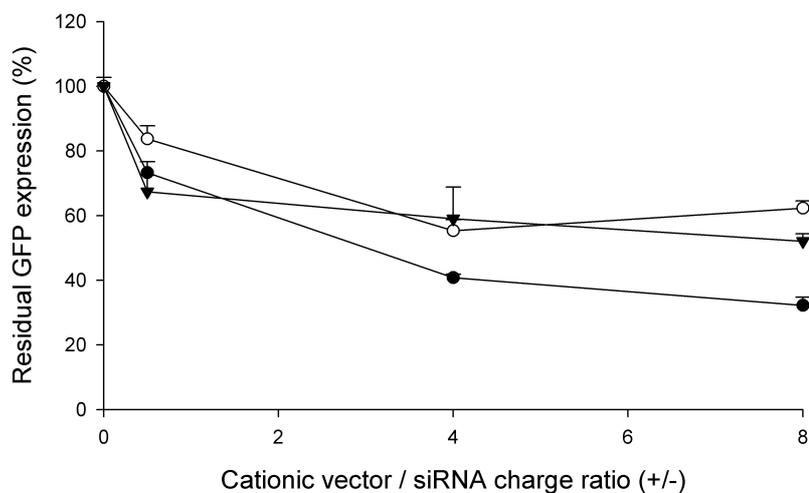


Figure 45 : *Inhibition de l'expression de la GFP dans les cellules d2-GFP par RNA interférence.* Le siARN dirigé contre la GFP a été complexé avec le BGTC-DOPE (●), le DC-Chol-DOPE (▼) et le PEI (○) à différents rapports de charges +/- allant de 0 à 8. Les complexes (50 μ l) contenant 400 ng de siARN ont été déposés dans 500 μ l de milieu sans sérum. Deux heures après la transfection 500 μ l de milieu à 20% en sérum ont été ajoutés. L'expression résiduelle de la GFP est mesurée par fluorescence 24 heures après la transfection. Chaque point représente la valeur moyenne et la SEM de 6 valeurs indépendantes.

Une expression résiduelle d'un niveau de 32% obtenue avec le BGTC-DOPE indique d'autre part, que les vecteurs cationiques communément utilisés pour le transfert d'ADN plasmidique ne permettent pas d'obtenir une efficacité d'inhibition maximale d'un gène pour des cellules en culture et mettent en évidence la nécessité de définir de nouvelles molécules pour le transport de siARN.

Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides

Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont été évalués pour le transfert de siARN *in vitro* et sont représentés sur la . La partie hydrophobe de ces lipides est constituée de deux chaînes dioléyle reliées à un groupement succinyl, qui joue le rôle du bras espaceur, et la tête polaire cationique est constituée d'un aminoglycoside. Dans cette étude, quatre aminoglycosides ont été utilisés : la tobramycine et la kanamycine qui appartiennent à la classe qui possède un groupe deoxystreptamine 4,6-disubstitués, puis la néomycine et la paromomycine qui appartiennent à la classe des deoxystreptamines 4,5-disubstitués.

Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides DiOleylamine A-Succinyl-Tobramycine (**DOST**), DiOleylamine A-Succinyl-Kanamycine (**DOSK**), DiOleylamine A-Succinyl-Paromomycine (**DOSP**) et DiOleylamine A-Succinyl-Neomycine (**DOSN**) présentent plusieurs fonctions amines protonables, au nombre de 4, 3, 4 et 6 amines par groupement aminoglycoside, respectivement.

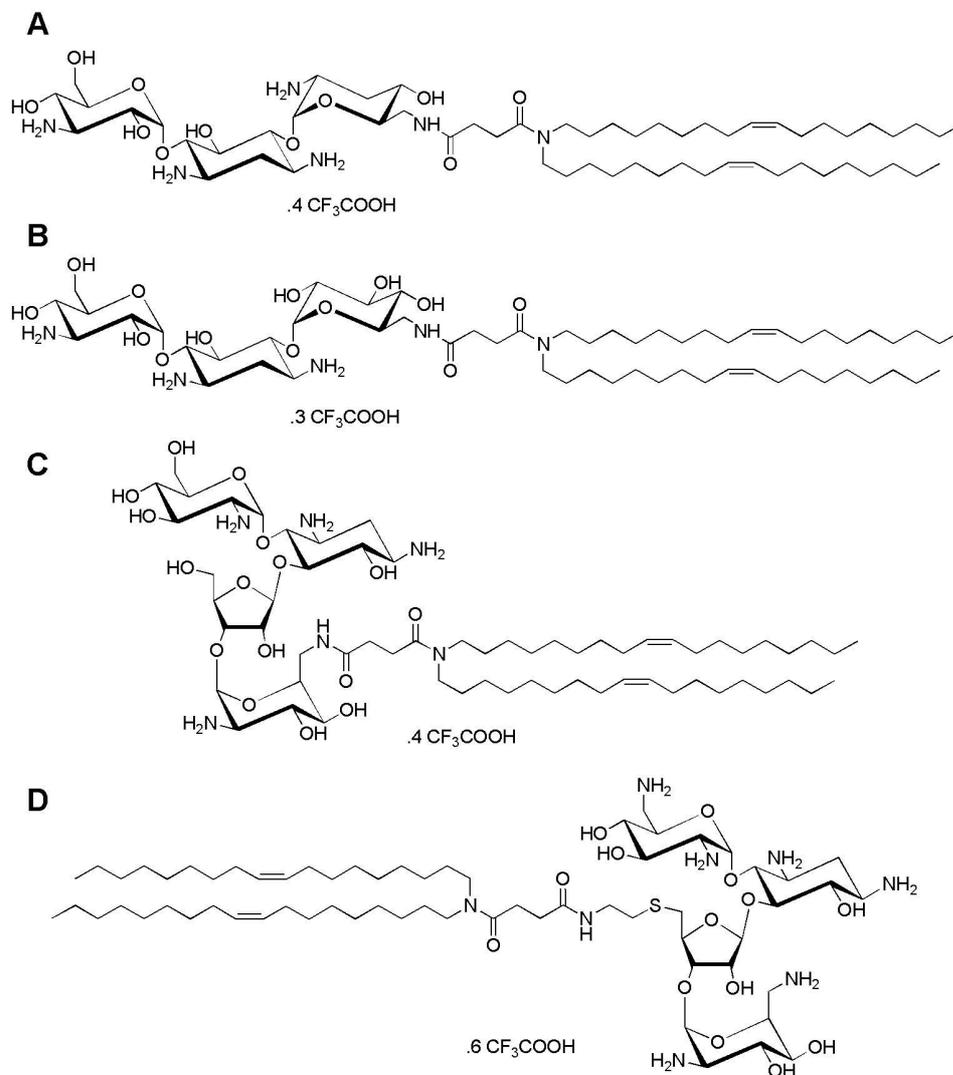


Figure 46 : *Structure des dérivés lipidiques d'aminoglycosides.* (A) DiOleylamine A-Succinyl-Tobramycine (**DOST**), (B) DiOleylamine A-Succinyl-Kanamycine (**DOSK**), (C) DiOleylamine A-Succinyl-Paromomycine (**DOSP**) and (D) DiOleylamine A-Succinyl-Neomycine (**DOSN**).

Les amines seront considérées comme protonnées et serviront au calcul du rapport de charges +/- . Pour les expériences de transfection ils ont été préparés sous forme de liposomes en présence du co-lipide, la DOPE.

Caractérisation physico-chimique des complexes lipides cationiques/acides nucléiques

Les propriétés physico-chimiques, des complexes résultants de l'association de d'ADN plasmidique ou de siARN, avec le lipide cationique BGTC-DOPE ou les dérivés lipidiques d'aminoglycosides, ont été étudiées en fonction du rapport de charges +/- . Les analyses réalisées sont représentées par la et correspondent à la mesure de la taille des complexes formés, ainsi qu'à la mesure de la fluorescence résiduelle du BET en solution avec les complexes.

La mesure de la taille des différents complexes a montré que les complexes lipides/siARN présentaient, en fonction du rapport de charges +/- , l'existence de trois zones (A, B et C) de stabilités colloïdales différentes, comme décrit dans la littérature pour les complexes lipides/ADN. La zone A, pour les faibles rapports de charges +/- , correspond à des complexes stables colloïdalement où les acides nucléiques sont partiellement condensés. La zone B, se caractérise par des complexes d'une taille supérieure à 700 nm et leur état agrégé les rend instables colloïdalement. La zone C, désigne les complexes petits en taille et stables. La - A indique que les complexes BGTC-DOPE/siARN présentent une zone B large, où les complexes présentent un diamètre supérieur à 700 nm, pour rapports de charges compris entre 2 et 8. Au contraire, les complexes obtenus avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides en présence de siARN (B-E) présentent une zone B moins étendue que celle obtenue avec le BGTC-DOPE, et la taille moyenne des complexes se situe autour de 400 nm. Dans la zone C, les complexes BGTC-DOPE/siARN ont un diamètre moyen de 225 nm, alors que le diamètre moyen est de 81, 105, 58 et 57 nm pour les complexes contenant les siARN complexés avec le DOST-DOPE, DOSK-DOPE, DOSP-DOPE, DOSN-DOPE.

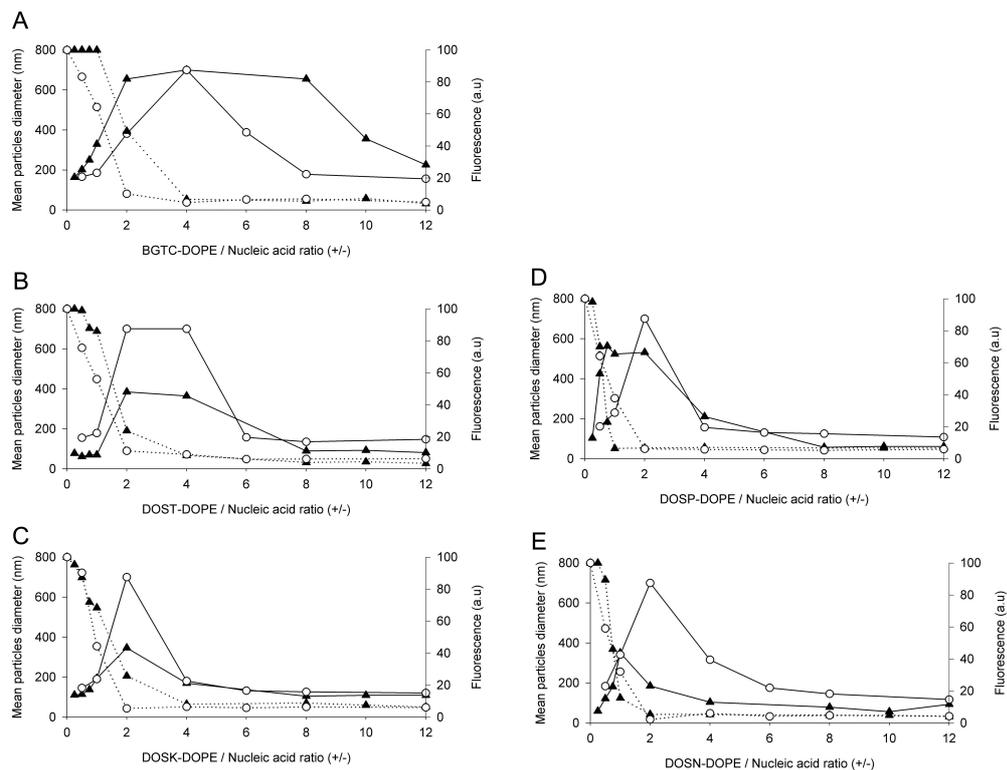


Figure 47 : *Propriétés physicochimiques des complexes résultant de l'association des différents lipides cationiques avec l'ADN plasmidique ou les siARN. L'ADN (○) ou les siARN (▲) ont été complexés en présence de BGTC-DOPE (A), de DOST-DOPE (B), de DOSK-DOPE (C), de DOSP-DOPE (D) et de DOSN-DOPE (E). Les acides nucléiques (10 µg/ml) ont été complexés avec les lipides cationiques pour des rapports de charges +/- croissant, allant de 0 à 12.*

Ainsi, les liposomes cationiques des dérivés lipidiques d'aminoglycosides sont capables de condenser les molécules de siARN dans des complexes particulièrement petits. Par contre, il est important de noter que les complexes d'ADN plasmidique formulés avec le BGTC-DOPE ou les dérivés lipidiques d'aminoglycosides présentent des diagrammes de stabilité colloïdale et de taille similaire.

Ensuite, le niveau de fluorescence du BET en solution en présence des complexes pour les différents rapports de charges a été mesuré et exprimé en pourcentage de la fluorescence obtenue dans une solution d'acides nucléiques sans lipides cationiques. La tendance générale du niveau de fluorescence montre que la fluorescence du BET diminue pour des rapports de charges +/- croissants, cependant une différence s'observe pour les siRNA complexés avec le BGTC-DOPE et les dérivés lipidiques d'aminoglycosides. En effet, pour les liposomes de BGTC-DOPE, le profil de la courbe de diminution de la fluorescence est décalé vers des rapports de charges plus élevés quand ils est complexés en présence de siARN, par rapport à l'ADN (-A). Par contre, pour les liposomes des dérivés lipidiques d'aminoglycosides les

courbes de diminution de la fluorescence sont décalées vers des rapports de charges plus faibles (B-E) par rapport au BGTC-DOPE. Par exemple, les liposomes DOSN-DOPE et DOSN-DOPE ont permis d'obtenir une diminution de la fluorescence de plus de 85% pour un rapport de charges de 1. Les mesures en solution ont été comparées par migration des complexes sur gel d'agarose et confirment les résultats obtenus en solution. Deux exemples de gels d'agarose sont représentés sur la , les complexes formés en présence de BGTC-DOPE et de DOSN-DOPE (les gels d'agarose des autres dérivés lipidiques d'aminoglycosides ne sont pas représentés).

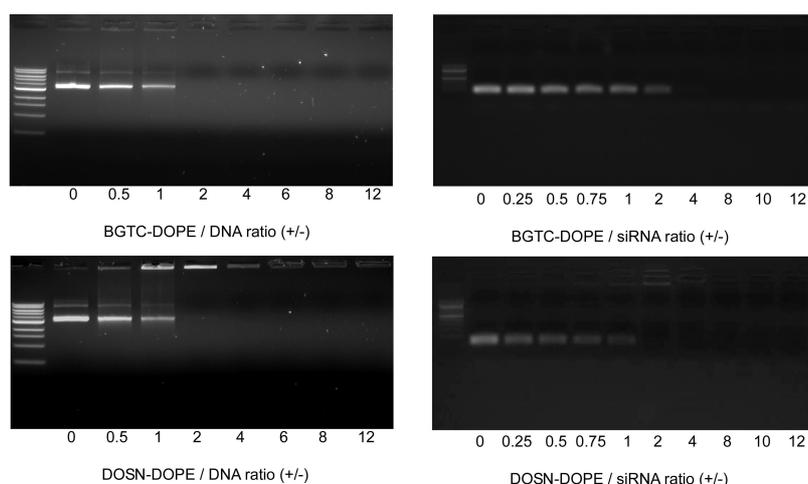


Figure 48 : Analyses des complexes d'ADN et de siARN par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN et les siARN ont été complexés en présence de BGTC-DOPE ou de DOSN-DOPE.

Ensuite, l'analyse des propriétés physico-chimiques des complexes a été complétée par visualisation de leur morphologie en cryo-microscopie électronique à transmission. La illustre la morphologie à différents agrandissements des complexes de siARN obtenu en présence de BGTC-DOPE (A-C), de DOST-DOPE (D et E), de DOSK-DOPE (F et G), de DOSN-DOPE (H et I) et de DOSP-DOPE (J et K) à des rapports de charges de 4, 12, 10 et 10, respectivement.

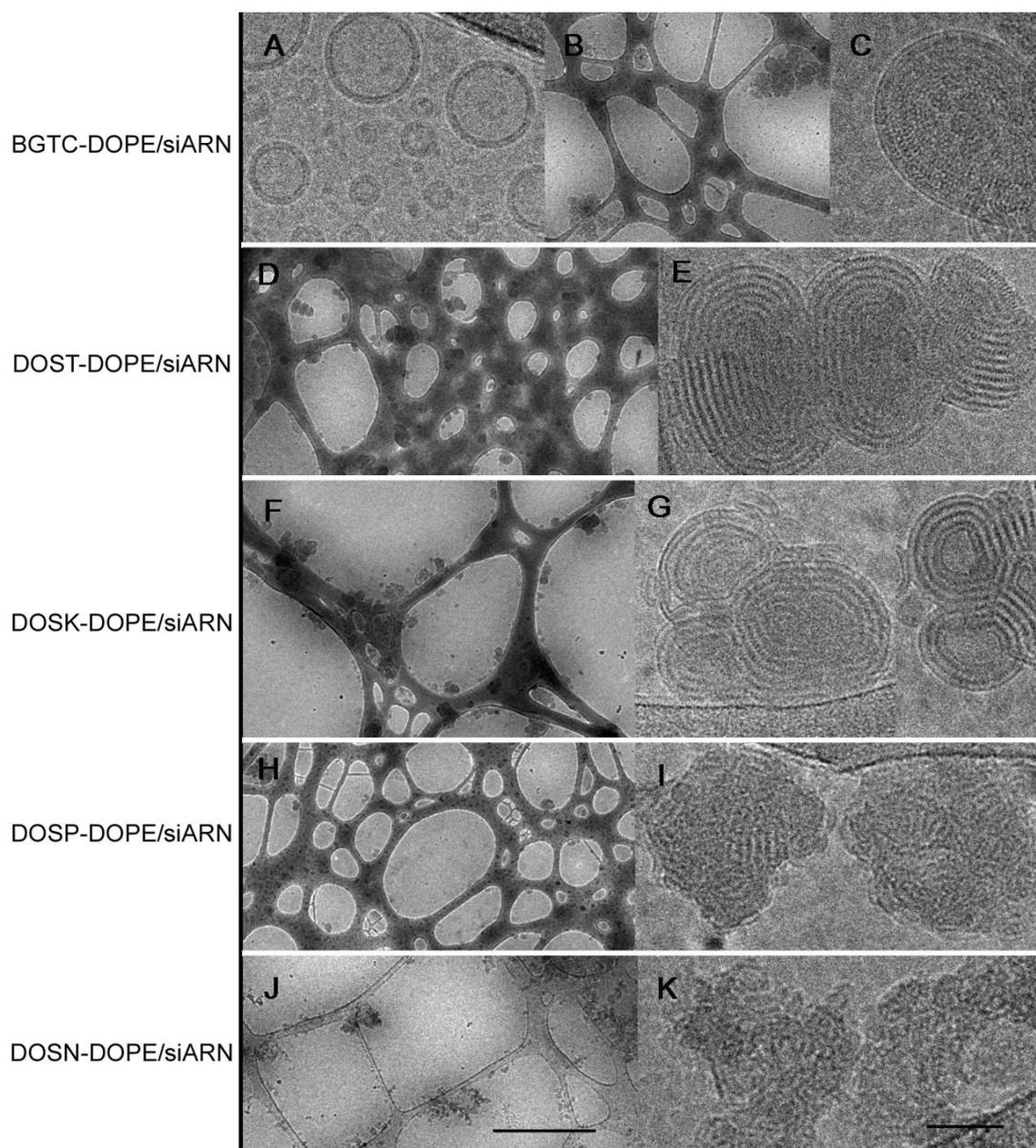


Figure 49 : *Observation des complexes lipides cationiques/siARN par cryo-microscopie électronique. (A) Liposomes unilamellaires de BGTC-DOPE. (B) Visualisation des complexes BGTC-DOPE/siARN à faible agrandissement (C) Structure des complexes BGTC-DOPE/siARN à fort agrandissement. (D) Visualisation des complexes DOST-DOPE/siARN à faible agrandissement (E) Structure des complexes DOST-DOPE/siARN à fort agrandissement. (F) Visualisation des complexes DOSK-*

DOPE/siARN à faible agrandissement (G) Structure des complexes DOSK-DOPE/siARN à fort agrandissement. (H) Visualisation des complexes DOSP-DOPE/siARN à faible agrandissement. (I) Structure des complexes DOSP-DOPE/siARN à fort agrandissement. (J) Visualisation des complexes DOSN-DOPE/siARN à faible agrandissement. (J) Structure des complexes DOSN-DOPE/siARN à fort agrandissement. Barre d'échelle : 50 nm et 1 μ m pour les faibles et forts agrandissements, respectivement.

Les liposomes de BGTC-DOPE préparés sous forme de liposomes unilamellaires (-A) présentent une taille comprise entre 30 et 70 nm. Le mélange du BGTC-DOPE avec des siARN a conduit à la formation de structures compactes et sphériques d'une taille comprise entre 200 et 500 nm (-B). Ces structures sont faites d'un empilement de plusieurs couches de lipides, séparés par des molécules de siARN, intercalés entre ces couches (-C).

Ensuite, en présence des liposomes DOST-DOPE et DOSK-DOPE, les siARN forment des complexes de petite taille, comprise entre 100 et 300 nm (D-G). Les complexes formés s'arrangent en une structure de type « oignon » avec un empilement régulier d'une couche de lipide et d'une couche de siARN (-E), comme pour les complexes BGTC-DOPE/siARN. Les molécules de siARN apparaissent très ordonnées sur la membrane lipidique, et les distances mesurées pour les complexes BGTC-DOPE/siARN sont identiques pour les complexes DOST-DOPE et DOSK-DOPE.

D'autre part, les liposomes DOSN-DOPE et DOSP-DOPE, forment des complexes en présence des siARN dont la taille est comprise entre 50 et 300 nm (H-K). Les complexes DOSN-DOPE/siARN s'organisent sous forme d'une grappe de plusieurs petites structures condensées. A la différence des complexes formés avec du BGTC-DOPE, DOST-DOPE et DOSK-DOPE, les complexes DOSN-DOPE/siARN et DOSP-DOPE/siARN présentent une structure très irrégulière (I et K). Ces complexes sont bien composés d'un empilement successif d'une couche de lipides et d'une couche de siARN, cependant cet empilement ne s'étend pas sur de longue distance.

Ainsi, les complexes BGTC-DOPE/ADN, BGTC-DOPE/siARN et DOSP-DOPE/siARN ont été analysé par diffraction des rayons X à petits angles (SAXS) pour déterminer la périodicité des la structure lamellaire ().

	q_1 (\AA^{-1})	q_2 (\AA^{-1})	d_{rep} (\AA)
BGTC-DOPE/ADN	0.091	0.182	69.1
BGTC-DOPE/siARN	0.093	0.186	67.7
DOSP-DOPE/siARN	0.093	-	67.5

Tableau 7 : Vecteurs d'onde obtenus pour les différentes diffractions (q) et distances de répétition associées (d_{rep}).

Les mesures réalisées à température ambiante ($\sim 20^\circ\text{C}$) des dispersions ont montré la présence de deux pics de diffraction (q_1 et q_2) d'une phase lamellaire pour les complexes formés en présence de BGTC-DOPE. Par contre, les complexes DOSP-DOPE/siARN ont

révélé la présence d'un seul pic de diffraction (q_1), sans la présence d'harmonique. Ces résultats confirment les observations en microscopie électronique qui ont montré la présence d'une phase lamellaire très ordonnée pour les complexes BGTC-DOPE siARN ; la présence d'une phase lamellaire a été détectée pour les complexes DOSP-DOPE/siARN et DOSN-DOPE/siARN mais qui s'étend sur de très faible distance. L'explication de cette irrégularité du complexe pourrait s'expliquer par la taille initiale des liposomes de DOSN-DOPE et de DOSP-DOPE qui avant la complexation avec les siARN avaient une taille de 30 à 50 nm (micrographes non représentés). Ils sont en effet plus petits que les trois autres liposomes (micrographes non représentés) et il est possible qu'ils ne peuvent pas s'organiser sous forme d'une structure de type « oignon ».

Inhibition de l'expression d'un gène par transfection de siARN avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides

Des siARN dirigés contre l'ARNm de la GFP ont été complexés avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides et ont été transfectés sur des cellules d2-GFP dans le but de suivre l'inhibition de l'expression de la GFP. L'effet du rapport de charges ainsi que la quantité de siARN sur l'efficacité d'inhibition de l'expression de la GFP, ont été évalués 24 heures après la transfection. La -A montre qu'après la transfection de complexes BGTC-DOPE/siARN, le niveau de fluorescence de la GFP diminue progressivement pour des rapports de charges croissants. Par contre, les complexes DOST-DOPE/siARN ont conduit à une diminution rapide de la fluorescence de la GFP à 11% de fluorescence résiduelle pour un rapport de charges +/- de 4. En revanche, les complexes DOSK-DOPE/siARN, ont conduit à une diminution progressive de la fluorescence de la GFP et atteint un minimum de fluorescence résiduelle de 41% pour un rapport de charges +/- de 12. D'autre part, les deux dérivés lipidiques des aminoglycosides appartenant à la classe des cycles 4,5-disubstitués, DOSN-DOPE et DOSP-DOPE, ont conduit à une diminution progressive de la fluorescence de la GFP pour des rapports de charges croissants et le minimum de fluorescence résiduelle obtenu a atteint 10% pour des rapports de charges de 8.

Les transfections d'un siARN « contrôle », c'est à dire qui n'est dirigé contre aucun ARNm de la cellule, en présence des différents lipides cationiques n'a montré aucun effet sur l'expression de la protéine GFP (résultats non montrés).

Ainsi, les résultats ont permis de définir que pour les expériences ultérieures le rapport de charges sélectionné est de 4 pour les siARN complexés avec le BGTC-DOPE et le DOST-DOPE, de 10 pour le DOSN-DOPE et le DOSP-DOPE et 12 pour le DOSK-DOPE.

Ensuite, la -B montre l'effet de la quantité de siARN sur le niveau de fluorescence résiduelle de la GFP. Les complexes BGTC-DOPE/siARN et DOSK-DOPE/siARN ont induit une diminution progressive de la fluorescence de la GFP, quand la quantité de siARN

augmente, et le minimum de fluorescence a été de 50%, et a été obtenu pour la quantité maximale (500 ng/puits) de siARN transfectés.

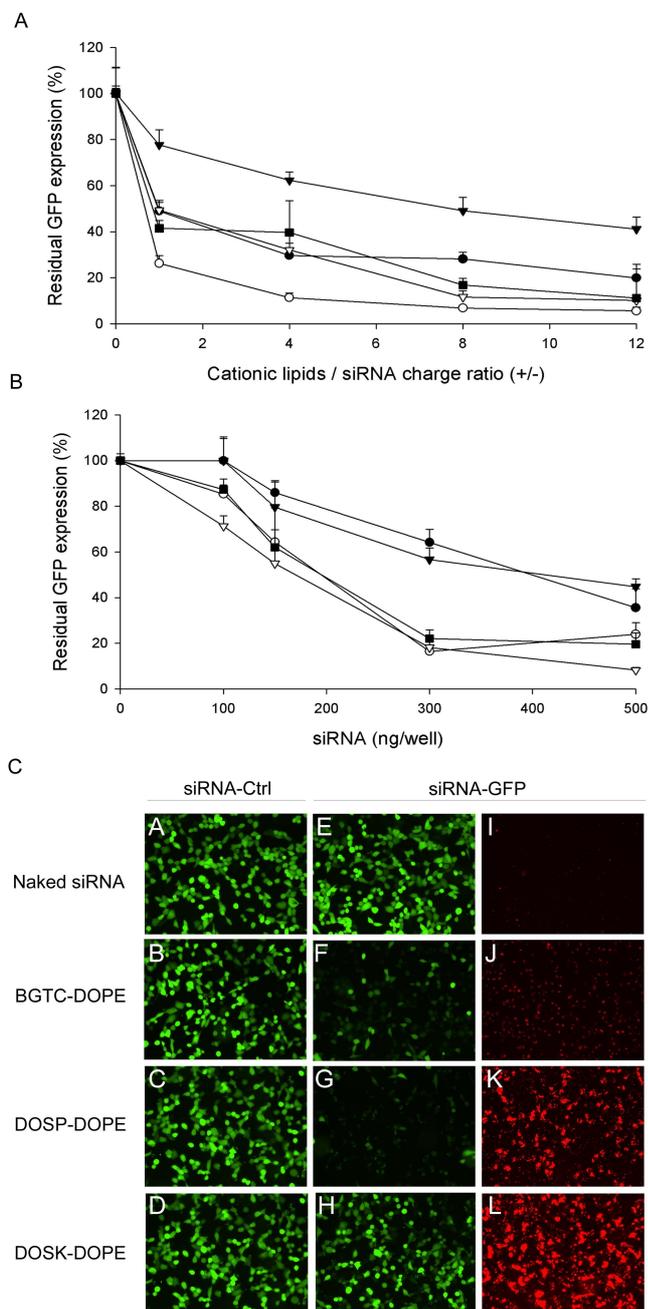


Figure 50 : *Inhibition de l'expression de la GFP dans les cellules d2-GFP par ARN interférence. L'efficacité de transfection des complexes lipides cationiques/siARN a été évaluée en fonction du rapport de charges (+/-) (A) et de la quantité de siARN (B). Le siARN dirigé contre la GFP a été complexé en présence de différents lipides cationiques : BGTC-DOPE (●), DOSK-DOPE (▼), DOST-DOPE (○), DOSP-DOPE (■) and DOSN-DOPE (▽). (A) L'expression résiduelle de la GFP est exprimée en pourcentage de la fluorescence de la GFP des cellules transfectées avec le siARN anti-GFP par rapport à la fluorescence de la GFP de cellules transfectées avec un siARN non actif. L'expression résiduelle de la GFP (%) est représentée en fonction du rapport de charges lipide cationique/siARN (+/-). Les cellules ont été transfectées en présence de 400 ng de siARN. (B) Expression résiduelle de la GFP en fonction de la quantité de siARN transfectée. Les lipides cationiques ont été utilisés à un rapport de charges de 4, 12, 4, 10, 10 pour le BGTC-DOPE (●), DOSK-DOPE (▼), DOST-DOPE (○), DOSP-DOPE (■) and DOSN-DOPE (▽) respectivement. (C) Visualisation de l'inhibition de la GFP et de l'internalisation des siARN. Les cellules ont été transfectées en présence du siARN Control (A-D) ou du siARN dirigé contre la GFP et marqué à la Rhodamine en 3' (E-L). Les siARN (500 ng) ont été formulés en absence (ADN nu) ou en présence des lipides cationiques : BGTC-DOPE, DOSP-DOPE, DOSK-DOPE. Les cellules ont été observées à travers un filtre FITC (A-H) ou un filtre Rhodamine (I-L).*

Au contraire, les trois autres dérivés lipidiques d'aminoglycosides, DOST-DOPE, DOSN-DOPE et DOSP-DOPE ont conduit à une diminution rapide de la fluorescence résiduelle de la GFP, jusqu'à 20% de fluorescence résiduelle dès 300 ng de siARN.

Enfin, la diminution de la fluorescence de la GFP et l'internalisation des siARN ont été visualisées par microscopie au cours de la même expérience (-C).

La -C montre que 24 heures après la transfection des complexes DOSP-DOPE/siARN, une très nette diminution de la fluorescence de la GFP est observée dans les cellules (image G), ainsi qu'une importante fluorescence en rouge traduisant l'internalisation des siARN (image K). Les complexes DOSK-DOPE ont également conduit à une forte internalisation des siARN (image L), cependant la diminution de la fluorescence est faible par rapport aux complexes DOSP-DOPE/siARN (image H). Les complexes BGTC-DOPE/siARN ont induit une diminution de la fluorescence dont le niveau se situe entre les complexes DOSK-DOPE/siARN et DOSP-DOPE/siARN (image F). La transfection d'un siARN control n'a pas eut d'effet sur la fluorescence de la GFP dans les cellules, et aucune internalisation de siARN n'a été observé (image E et I). Ainsi, les complexes DOSP-DOPE ont conduit à une forte inhibition de l'expression de la protéine GFP qui résulte bien d'une internalisation de siARN dans la cellule. Ils ont été comparés à des agents de transfection de siARN disponibles dans le commerce (). Vingt-quatre heures après la transfection, les complexes DOSP-DOPE ont permis, sur des cellules d2-GFP, d'obtenir une diminution de la fluorescence de la GFP significativement plus importante que les agents de transfection X-tremeGene et Lipofectamine®2000.

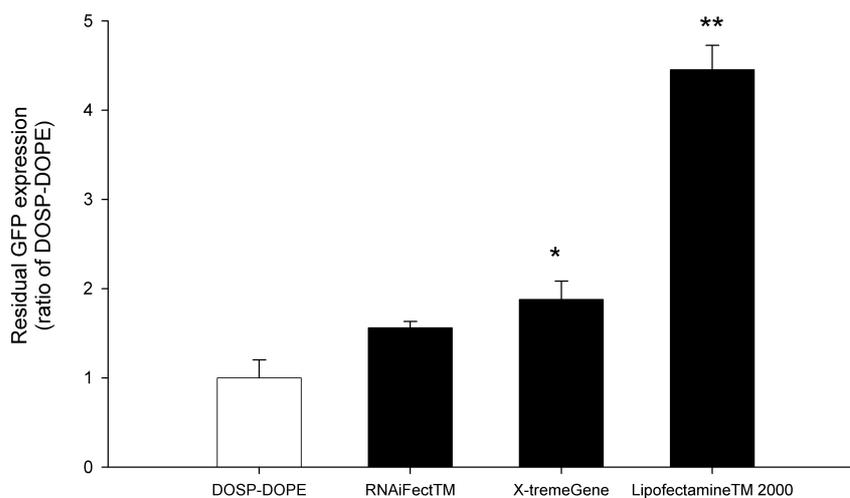


Figure 51 : *Comparaison de l'efficacité de transfection des agents de transfection de siARN disponibles dans le commerce avec celle du dérivé lipidique DOSP-DOPE. Les cellules ont été transfectées avec le siARN dirigé contre la GFP. 200 ng de siARN ont été formulés en présence de l'agent de transfection approprié selon les indications des fournisseurs. Les astérisques indiquent une différence significative ($p < 0.02$ (*) et $p < 0.001$ (**)) entre les cellules transfectées avec les agents de transfection commerciaux et la DOSP-DOPE.*

Aucune différence significative n'a été observée entre les complexes DOSP-DOPE et RNAiFect™. La fluorescence obtenue pour chaque agent de transfection a été rapportée à celle obtenue pour les complexes DOSP-DOPE/siARN.

L'efficacité d'inhibition induite par les siARN a ensuite été évaluée dans le temps. Les précédentes expériences ont permis de déterminer les rapports de charges, ainsi que la quantité de siARN optimales. La représente le niveau d'expression de la GFP en fonction du temps, après une transfection de siARN, complexés avec les différents liposomes de dérivés lipidiques d'aminoglycosides. Les liposomes DOSN-DOPE et DOSP-DOPE, complexés à 390 ng de siARN, ont permis de maintenir une expression résiduelle de la GFP autour d'une moyenne de 10% pendant 5 jours, puis l'expression de la GFP augmente progressivement pour atteindre pratiquement 100% d'expression à 9 jours. D'autre part, les cellules transfectées avec les complexes DOST-DOPE/siARN présentent le même profil d'expression de la GFP, cependant le niveau minimum d'expression résiduelle de la GFP ne descend pas en dessous de 20%. Les complexes DOSK-DOPE ont conduit à une expression résiduelle de la GFP proche de 40% jusqu'à 5 jours.

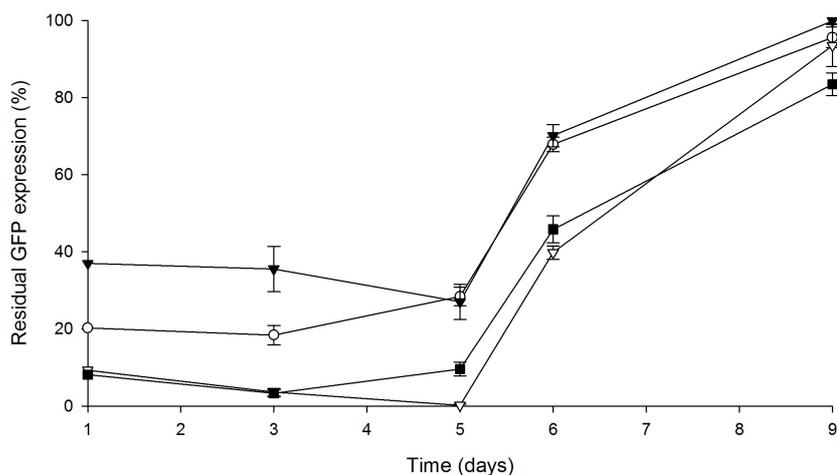


Figure 52 : Cinétique d'expression de la GFP dans les cellules d2-GFP transfectées avec le siARN dirigé contre la GFP. Le siARN anti-GFP a été formulé en présence des lipides cationiques DOSK-DOPE (▼), DOST-DOPE (○), DOSP-DOPE (■) and DOSN-DOPE (▽); les lipides cationiques ont été formulés à des rapports de charges de 4, 12, 4, 10 et 10 respectivement. Chaque valeur représente une moyenne et sa SEM de six valeurs indépendantes.

Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont ensuite été évalués pour le transfert d'ADN plasmidique afin de comparer les différences d'efficacité et de spécificité de transfection avec les siARN. Le gène rapporteur de la luciférase a été choisi comme gène rapporteur, et les transfections ont été réalisées sur les mêmes cellules (d2-GFP) que pour les transfections avec les siARN. La -A montre l'effet du rapport de charges +/- sur l'expression de la luciférase pour les différents dérivés lipidiques d'aminoglycosides et du BGTC-DOPE. En fonction du rapport de charges +/-, la tendance générale du profil d'expression de la luciférase indique un pic d'expression pour un rapport de charges +/- de 4. Les liposomes BGTC-DOPE, DOSN-DOPE et DOSP-DOPE ont conduit à une très nette augmentation de l'expression de la luciférase pour des rapports de charges allant de 0 à 4, puis l'expression de la luciférase diminue progressivement pour les rapports de charges supérieurs. Les liposomes DOSK-DOPE et DOST-DOPE, qui appartiennent à la classe des cycles 4,6-disubstitués, ont donné des niveaux d'expression de la luciférase plus faibles. Le DOSK-DOPE a montré une légère augmentation de l'expression pour les rapports de charges de 2 et 4, mais aux autres rapports de charges l'expression est très faible.

Les transfections d'ADN plasmidique ont ensuite été réalisées avec le plasmide pTER, qui code pour un siARN hairpin sous la dépendance du promoteur H1 et dirigé contre la protéine GFP.

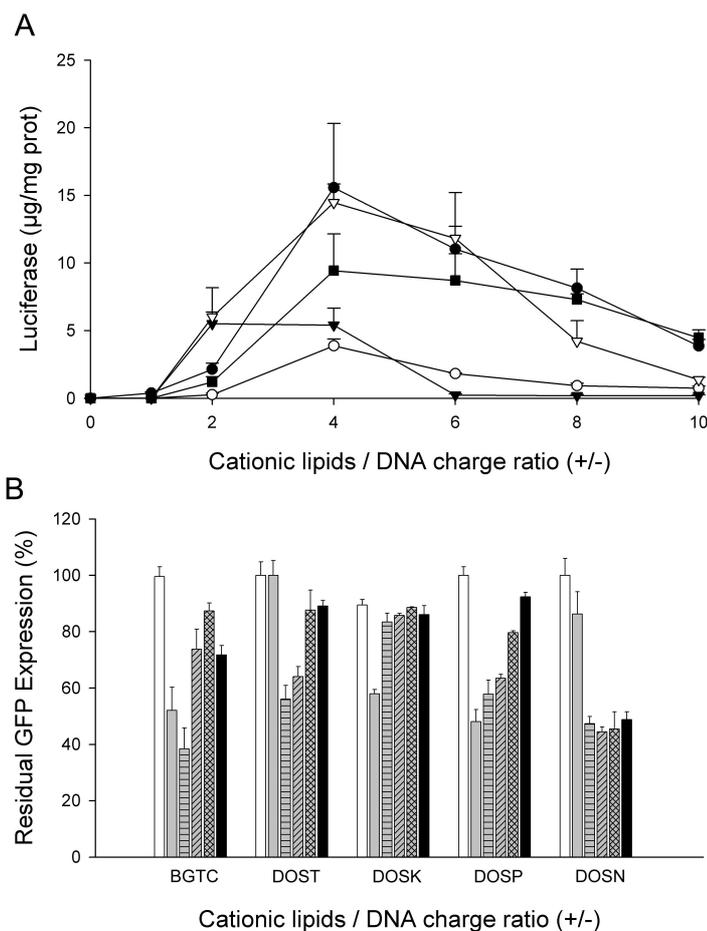


Figure 53 : *Transfection d'ADN plasmidique avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides et le BGTC-DOPE.* (A) Expression de la luciférase dans les cellules d2-GFP en fonction du rapport de charges +/- . Le plasmide (1 μg) codant pour la luciférase a été formulé en présence du BGTC-DOPE (●) ou des lipides cationiques DOSK-DOPE (▼), DOST-DOPE (○), DOSP-DOPE (■) and DOSN-DOPE (▽). (B) Expression de l'hairpin siARN exprimé par le plasmide pTER. Le plasmide pTER (1 μg) a été formulé avec les différents lipides cationiques à des rapports de charges +/- variables : 0 (hitogramme blanc) ; 2 (gris) ; 4 (lignes horizontales) ; 6 (lignes diagonales) ; 8 (lignes croissées) ; 10 (noir). Chaque valeur représente la moyenne et la SEM de six valeurs indépendantes.

La -B montre l'effet du rapport de charges sur le niveau d'expression de la GFP sur des cellules d2-GFP transfectées avec le plasmide pTER, pour les différents lipides cationiques. Les trois liposomes BGTC-DOPE, DOSP-DOPE et DOSN-DOPE ont montré les meilleures efficacités d'inhibition de la GFP optimale pour un rapport de charges 4, ce qui montre également que ces résultats sont en bon accord avec les profils d'expression de la luciférase de la -A. Pour les liposomes BGTC-DOPE et DOSP-DOPE l'efficacité de transfection diminue pour des rapports de charges supérieurs à 4, ce qui est en bon accord avec les résultats obtenus

avec la luciférase. Par contre, le DOSN-DOPE a présenté un plateau d'efficacité pour des rapports de charges supérieurs à 4. Ces résultats contrastent avec les profils d'efficacité de transfection des siARN obtenus avec les mêmes dérivés lipidiques d'aminoglycosides. En effet, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides présentaient une efficacité croissante pour des rapports de charges croissants, jusqu'à atteindre un plateau (-A).

Ainsi, cette étude a montré que la formation des complexes de siARN en présence des dérivés lipidiques d'aminoglycosides correspondait à un mode d'auto-assemblage entre les molécules de siARN et les lipides, répondant au modèle des trois phases de stabilité colloïdale qui avait été démontré pour l'ADN plasmidique. Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont permis de former avec les siARN des complexes de plus petite taille et la condensation totale des molécules de siARN a été obtenue pour des rapports de charges plus faible, par rapport au BGTC-DOPE. L'observation de la structure supramoléculaire des complexes a montré que la classe des dérivés lipidiques d'aminoglycosides 4,6-disubstitués s'organisait en une phase lamellaire comme le BGTC-DOPE, alors que la DOSP-DOPE qui appartient à la classe des 4,5-disubstitués ne présentait pas une phase lamellaire, montrant que l'organisation supra moléculaire des complexes dépendrait de la classe de l'aminoglycosides fixé au niveau de la tête polaire du lipide. Les expériences de transfection *in vitro* de siARN ont montré que les dérivés lipidiques d'aminoglycosides était plus efficaces que des lipides portant au niveau de la tête polaire des fonctions guanidinium ou polyamine. D'autre part, pour des expériences de transfection d'ADN plasmidique, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont révélé des propriétés de transfection similaire au BGTC-DOPE, comme précédemment décrit par (Sainlos *et al.*, 2004 et 2005).

Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont ainsi montré leur capacité à transférer l'ADN plasmidique comme cela a été décrit précédemment pour le BGTC-DOPE, cependant, avec les siARN, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont présenté un comportement différent aussi bien au niveau des propriétés physico-chimiques des complexes que de l'efficacité de transfection.

Transfert de gènes *in vivo*

Cette deuxième partie traite du transfert de gènes *in vivo* et a fait l'objet d'une publication dans la revue *Human Gene Therapy* (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 Jul;16(7):821-9).

Le transfert de gène *in vivo* représente aujourd'hui dans le domaine des vecteurs synthétiques un enjeu majeur. En effet, par rapport aux vecteurs synthétiques, les vecteurs viraux sont plus efficaces, mais ils présentent l'inconvénient d'être potentiellement dangereux pour l'homme et peuvent véhiculer des gènes de taille limitée. L'utilisation des vecteurs synthétiques repose essentiellement sur la condensation des acides nucléiques par des molécules cationiques, qui, comme nous l'a montré la première partie expérimentale de ce projet, sont très efficaces pour des transfections *in vitro*, et forment des complexes hautement ordonnés et chargés positivement (Pitard *et al.*, 1997 et 2002). Cependant, l'importante densité de charges positives présente à la surface des complexes crée une instabilité et une cytotoxicité importante qui limite leur utilisation *in vivo*. Par exemple, dans des expériences de transfert de gène dans les poumons, l'analyse histopathologique suite à une administration par voie intratrachéale des complexes PEI/ADN a montré que ces complexes ont induit une importante inflammation qui s'est traduit par une obstruction des bronches et un infiltrat cellulaire au niveau des vaisseaux sanguins (-A). D'autre part, en utilisant une autre voie d'administration, une injection en systémique de complexes BGTC-DOPE/ADN a conduit à la transfection des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pulmonaires (-B).

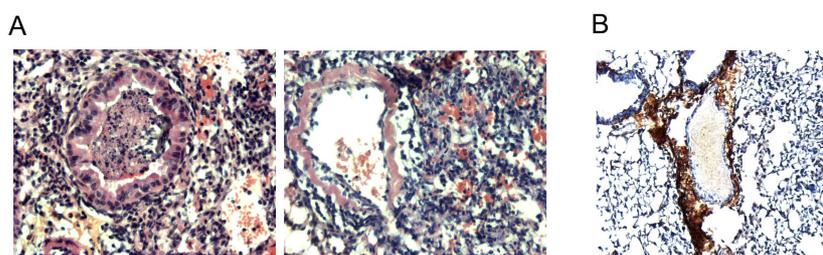


Figure 54 : *Histopathologie (A) et immunomarquage de la CAT (B) dans des poumons deux jours après une injection d'ADN complexé en présence de vecteurs cationiques. (A) Coupe histologique d'une bronche (à gauche) et d'un vaisseau sanguin pulmonaire (à droite) après une injection de 20 µg d'ADN complexés avec le polymère PEI pour un rapport de charges de 2. (B) Immunomarquage de la CAT dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pulmonaires après une injection de 100 µg d'ADN complexés avec le lipide cationique BGTC-DOPE. Agrandissement x20.*

Ces résultats montrent qu'il y a un réel besoin de développer pour le transfert de gène dans les poumons des structures moléculaires originales, efficaces, non toxiques et compatibles avec un mode d'administration envisageable en clinique. Récemment, il a été montré que l'injection intramusculaire d'ADN formulé en présence d'une nouvelle classe de polymère, les copolymères à blocs, augmentait de plusieurs fois la quantité de protéine recombinante produite comme la luciférase, la β -Galactosidase, la GFP, la phosphatase alcaline et l'érythropoïétine (Pitard *et al.*, 2002 ; Richard *et al.*, 2004 ; Pitard *et al.*, 2004).

L'objectif de cette deuxième partie expérimentale était d'évaluer le potentiel de copolymères à bloc pour le transfert de gène dans les poumons de souris. Le gène rapporteur de la chloramphénicol-acétyltransférase (CAT) a été complexé à différents copolymères à blocs, et l'efficacité de transfection a été évaluée dans les poumons de souris. Différents modes d'administration ont été testés, et des analyses histopathologiques ont été réalisées sur des coupes de poumons après l'injection.

Les copolymères à blocs

Tout d'abord, deux copolymères à blocs ont été utilisés : le Lutrol® et le PE6400, qui sont constitués par un motif central de 30 unités de propylèneoxyde (PO) encadrées par deux motifs qui sont composés, respectivement, de 75 et 13 unités d'éthylèneoxyde (EO), représentés par la .



Figure 55 : Représentation schématique des triblocs Lutrol® et PE6400.

A la différence des vecteurs cationiques couramment utilisés pour le transfert de gènes *in vivo*, ces copolymères à blocs ne sont pas chargés positivement. En effet, ce sont des molécules amphiphiles et non-ioniques où les PO sont des groupements hydrophobes et les EO, des groupements hydrophiles.

Utilisation des triblocs pour le transfert d'un gène rapporteur dans les poumons

Le gène rapporteur de la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT) a été formulé en présence de concentrations croissantes de Lutrol® ou de PE6400 et injecté directement dans les poumons de souris Swiss par instillation. Deux jours après l'injection, la quantité de protéine CAT a été dosée dans le broyat pulmonaire (-A). Les injections réalisées en présence

de Lutrol® ont augmenté le niveau d'expression de la CAT de 25 à 33 fois par rapport à l'ADN nu, et le Lutrol® présente une efficacité optimale pour une concentration de 3% (w/v). D'autre part, le PE6400 a également augmenté l'efficacité de transfection par rapport à l'ADN nu mais reste inférieur, en terme d'efficacité, au Lutrol®. Ensuite, l'influence de la concentration d'ADN sur l'efficacité de transfection a été testée en présence du Lutrol® à 3%. La -B montre que le niveau d'expression de la CAT augmente avec la quantité d'ADN injectée. Ces résultats montrent également que le Lutrol® est un polymère qui permet de formuler jusqu'à 350 µg d'ADN sans formation visible de particules agrégées. Ainsi, les formulations Lutrol®/ADN ont été réalisées par la suite avec une concentration constante de 3% en Lutrol®, quelque soit la quantité d'ADN injectée. La -C indique que pour une injection de 100 µg d'ADN formulé dans le Lutrol® à 3%, l'efficacité de transfection est indépendante de la souche de la souris.

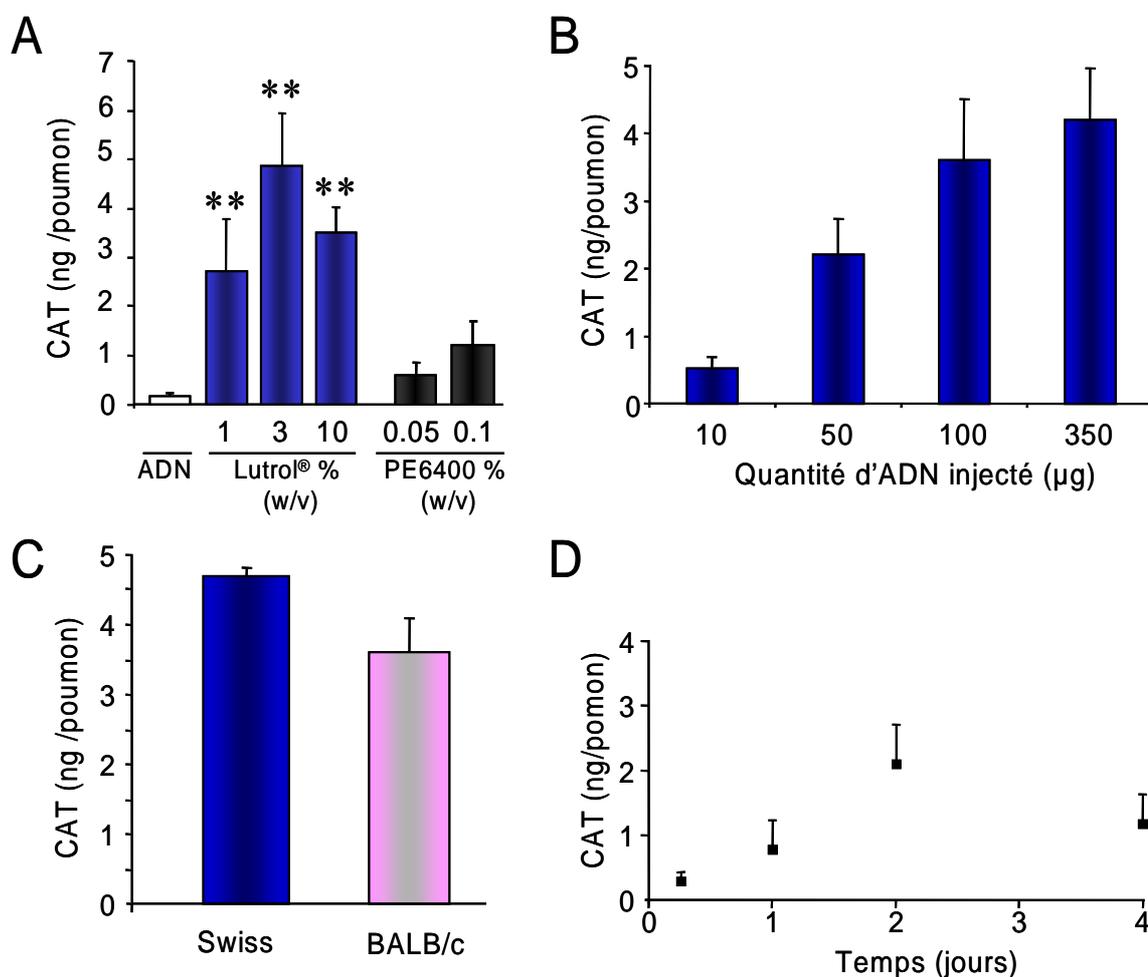


Figure 56 : Expression du gène rapporteur de la CAT dans les poumons de souris, deux jours après une injection intra-trachéale d'ADN complexé ou non en présence de polymère. (A) Expression de la CAT suite à une injection de 100 µg d'ADN nu ou complexé avec les polymères Lutrol® ou PE6400. (B) Expression de la CAT en fonction de la quantité d'ADN complexé avec le Lutrol® à 3%. (C) Influence de la souche de la souris sur l'expression de la CAT après une injection de 100 µg d'ADN complexé avec le Lutrol® à 3%. Chaque histogramme représente la valeur moyenne ainsi que la SEM des cinq valeurs individuelles. Les astérisques indiquent une différence significative ($p < 0.05$) entre les souris injectées avec de l'ADN nu ou complexé avec le Lutrol®. (D) Cinétique d'expression de la CAT suite à une injection de 100 µg d'ADN complexé avec le Lutrol® à 3%. Chaque point représente la valeur moyenne ainsi que la SEM des six valeurs individuelles.

Enfin, la cinétique d'expression de la CAT, après une injection chez la souris Swiss de 100 µg d'ADN formulé dans le Lutrol® à 3% montre que la protéine CAT est détectée dès 6 heures après l'injection (-D). L'expression de la CAT présente un pic deux jours après l'injection, puis reste stable jusqu'à 4 jours.

Pour comparer l'efficacité de transfection du Lutrol® avec celle du PEI, les injections ont été réalisées en présence de 20 µg d'ADN. En effet, le PEI ne permet pas de formuler des quantités d'ADN plus élevées sans empêcher la formation de particules agrégées visibles. La présente la cinétique d'expression de la CAT jusqu'à 7 jours, après une injection de 20 µg d'ADN formulé en présence de Lutrol® ou de PEI.

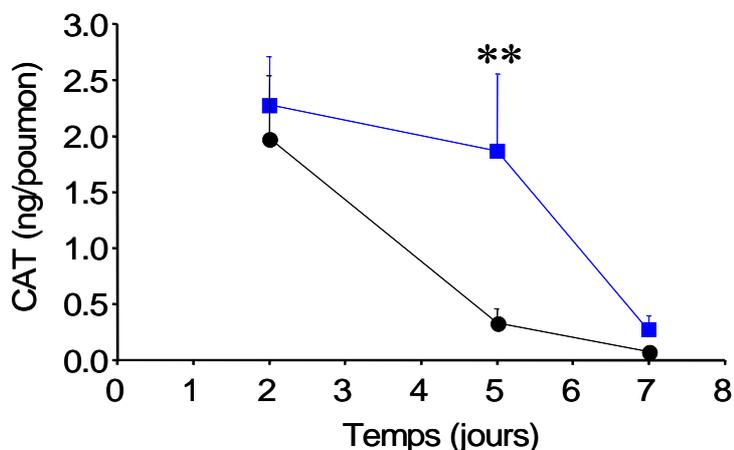


Figure 57 : Cinétique d'expression de la CAT après une injection de 20 µg d'ADN complexé avec le Lutrol® (■) à 3%, ou avec le PEI à un rapport de charges de 2 (●). Les astérisques indiquent une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs obtenues avec le Lutrol® et le PEI.

Deux jour après l'injection, le niveau d'expression de la CAT est identique pour les injections où l'ADN a été formulé en présence de Lutrol® ou de PEI. Cependant, la formulation Lutrol®/ADN a conduit à une expression stable jusqu'à 5 jours après l'injection et diminue lentement par la suite. La formulation Lutrol®/ADN augmente de 6 fois le niveau d'expression de la CAT à 5 jours par rapport à la formulation PEI/ADN (). Le profil

d'expression de la CAT pour la formulation PEI/ADN montre un pic d'expression à 2 jours, puis diminue rapidement pour revenir 7 jours après l'injection à des valeurs qui se confondent avec le niveau basal. En revanche, à 7 jours, la formulation Lutrol®/ADN présente des valeurs qui se distinguent du niveau basal.

Des analyses histopathologiques ont été réalisées sur les poumons pour vérifier l'effet d'une injection de copolymères à blocs dans les poumons. Des analyses histopathologiques représentées dans la , ont été réalisées sur des poumons deux jours après l'instillation chez la souris d'une solution contrôle (A et B), de 100 µg d'ADN nu (C et D), ou d'une solution de Lutrol® seul à 3% (E et F). Ces analyses montrent que les poumons ne présentent aucune anomalies, ni obstruction des bronches, ni infiltration cellulaire au niveau des vaisseaux sanguins. Les souris ont ensuite reçu des formulations Lutrol®/ADN contenant 20 ou 100 µg d'ADN (G et H et I et J respectivement). Aucune différence n'a été observée entre les poumons ayant reçu la formulation Lutrol®/ADN à 20 µg et la solution de Lutrol® à 3%. Les poumons instillés avec la formulation Lutrol®/ADN à 100 µg d'ADN présentent un infiltrat modéré de cellules mononucléées dans la zone péri-bronchiale et autour des vaisseaux sanguins pulmonaires, mais sans obstruer la lumière des bronches (I et J). Ces infiltrations restent tout de même modérées par rapport aux analyses histopathologiques réalisées en présence de PEI (, page 125). En effet, la formulation PEI/ADN ne contenant que 20 µg d'ADN avait conduit à une forte infiltration des cellules du parenchyme, autour des vaisseaux sanguins, dans la zone peri-bronchiale avec une obstruction des bronches et la présence de zones hémorragiques ().

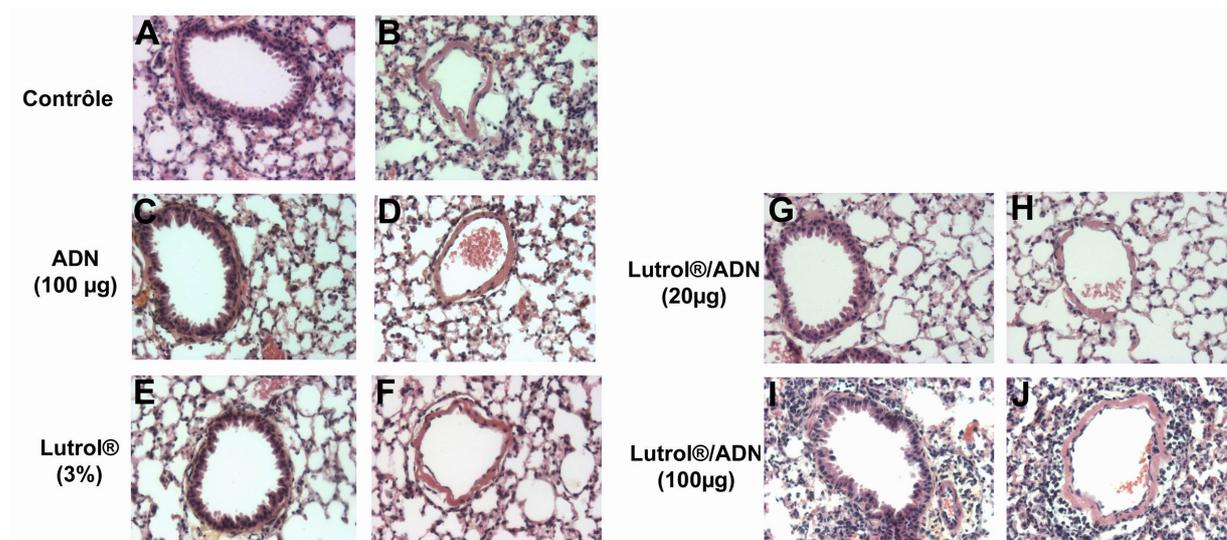


Figure 58 : Analyses histopathologiques des poumons des souris Swiss 2 jours après : une injection d'une solution contrôle (A et B), de 100 µg d'ADN nu (C et D), du polymère Lutrol® seul à 3% (E et F), de 20 µg d'ADN complexé avec le Lutrol à 3% (G et H), de 100 µg d'ADN complexé avec le Lutrol à 3% (I et J). Agrandissement x20.

Ainsi, dans le but de quantifier les réponses inflammatoires observées lors des analyses histopathologiques pour certaines formulations, le niveau de l'interleukine 6 (IL-6) a été mesuré dans le sérum et le broyat pulmonaire à différents temps après l'instillation d'une solution contrôle ou d'une formulation Lutrol®/ADN contenant 100 µg d'ADN. La -A montre que l'instillation, aussi bien de la solution contrôle que de la formulation Lutrol®/ADN, a conduit à une augmentation de la concentration en IL-6 six heures après l'instillation. La concentration en IL-6 dans le sérum diminue ensuite très rapidement pour revenir à un niveau basal 1 jour après l'injection. Dans le broyat pulmonaire (-B), une augmentation de la concentration de l'IL-6 a également été observée pour les deux solutions, six heures après l'injection. Les souris ayant reçu la solution contrôle reviennent à un niveau basal d'IL-6 dans les poumons deux jours après l'injection. Par contre, les souris ayant reçu la formulation Lutrol®/ADN ne retrouvent un niveau basal que quatre jours après l'injection.

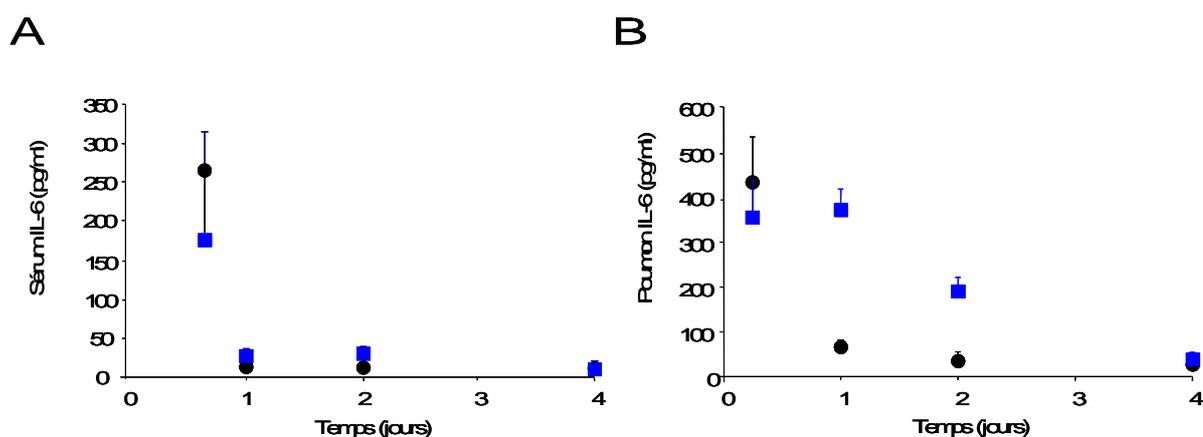


Figure 59 : Concentration en interleukine IL-6 dans le sérum (A) et dans le broyat pulmonaire (B) des souris Swiss après une injection intratrachéale de la solution contrôle (●) et de 100 µg d'ADN complexé avec le Lutrol® 3% (■). La concentration en IL-6 a été quantifiée par test ELISA. Chaque point représente la moyenne et la SEM de cinq valeurs indépendantes.

Pour ces expériences, la voie d'administration utilisée a été l'injection par instillation. Dans l'objectif de localiser l'expression protéique au niveau du poumon avec ce mode d'administration, les poumons ont été injectés avec le gène rapporteur de la β -Galactosidase (β -Gal).

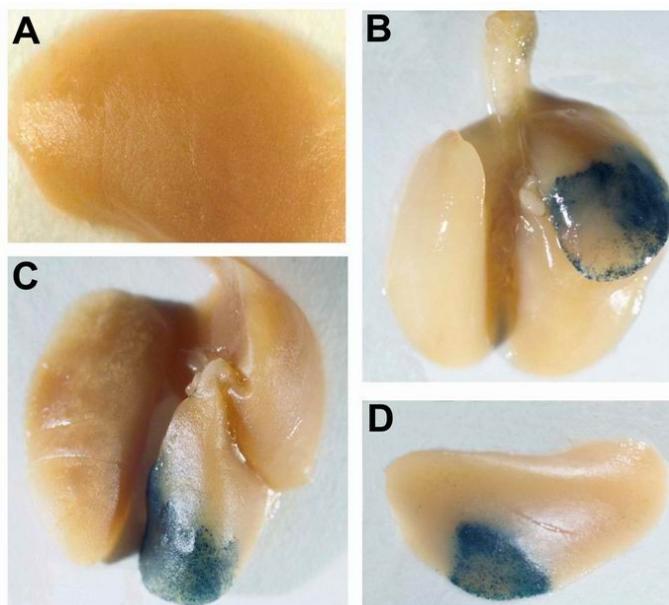


Figure 60 : *Distribution de l'expression du gène rapporteur de la β -Galactosidase dans les poumons de souris deux jours après une injection de 100 μ g d'ADN nu (A) ou de 100 μ g d'ADN complexé avec le Lutrol® 3% (B - D).*

Les poumons ayant reçu une injection de 100 μ g d'ADN nu (-A) ne révèlent pas d'activité β -Galactosidase. Par contre, l'injection de 100 μ g d'ADN formulé en présence de Lutrol® à 3% a conduit à une expression de la β -Galactosidase localisée à la périphérie d'un des lobes des poumons (B-D).

Aérosolisation des formulations Triblocs/ADN et PEI /ADN

Pour avoir une distribution de l'expression de la protéine plus homogène dans l'ensemble du poumon, un autre mode d'administration a été testé et consiste toujours à une injection par voie intra-trachéale mais qui utilise un Microsprayer® délivrant la solution injectée sous forme de spray dans les poumons. Tout d'abord, l'injection d'une formulation de 100 μ g d'ADN en présence de Lutrol® à 3% par instillation ou via le Microsprayer® montre que l'efficacité de transfection de la CAT est diminuée de 2 fois lorsque l'injection est réalisée avec le Microsprayer® (-A). Ensuite, l'efficacité du PEI et du Lutrol® pour des injections avec le Microsprayer® a été comparée et est représentée par la -B. Ces injections ont été réalisées en présence de 20 μ g car pour de plus fortes concentrations d'ADN le PEI forme des agrégats visibles qui ne peuvent être dispersés par le Microsprayer®. Les résultats montrent que la meilleure efficacité de transfection a été obtenue pour les formulations contenant le Lutrol®,

alors que le PEI n'a pas permis d'obtenir une efficacité de transfection supérieure à celle de l'ADN nu.

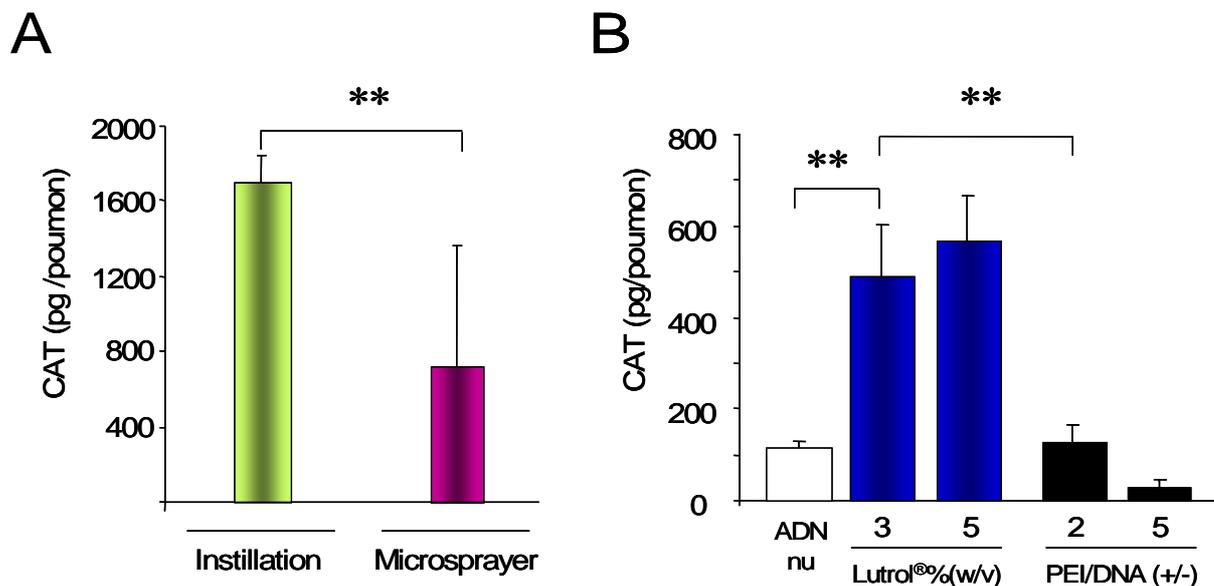


Figure 61 : Efficacité de transfection dans les poumons de souris Swiss deux jours après une injection intratrachéale par instillation ou avec un Microsprayer®. (A) Expression de la CAT en fonction de mode d'administration par instillation ou avec le Microsprayer® d'une solution de 100 µg d'ADN complexé avec le Lutrol® à 3%. Les astérisques indiquent une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs obtenues par instillation et avec le Microsprayer®. (B) Expression de la CAT après une injection avec le Microsprayer® d'une solution de 20 µg d'ADN nu, ou complexé avec le Lutrol® à 3 et 5%, ou avec le PEI à différents rapports de charges. Les astérisques indiquent une différence significative ($p < 0.001$).

L'administration par le Microsprayer® des formulations Lutrol®/ADN ne permet pas de maintenir le niveau d'expression de la CAT obtenu par instillation. Cependant, pour une application clinique, le Microsprayer® apparaîtrait beaucoup plus adapté et moins traumatisant pour les tissus pulmonaires. Ainsi, pour évaluer les avantages du Microsprayer®, les concentrations en IL-6 dosées dans le sérum et le broyat pulmonaire suite à une injection des complexes Lutrol®/ADN par instillation ou par Microsprayer® ont été comparées. La montre que la concentration en IL-6 détectée dans le sérum 6 heures après l'injection est plus faible lorsque les complexes ont été injectés par le Microsprayer®. Cette concentration retrouve un niveau basal 1 jour après l'injection quelque soit le type d'administration (-A). Dans le broyat pulmonaire, la concentration en IL-6 présente également un pic 6 heures après l'injection. Suite à une injection par le Microsprayer®, la concentration en IL-6 diminue rapidement pour retrouver son niveau de base 1 jour après l'injection, alors que dans le cas de l'instillation, la concentration en IL-6 diminue progressivement et retrouve son niveau de base 3 jours après l'injection.

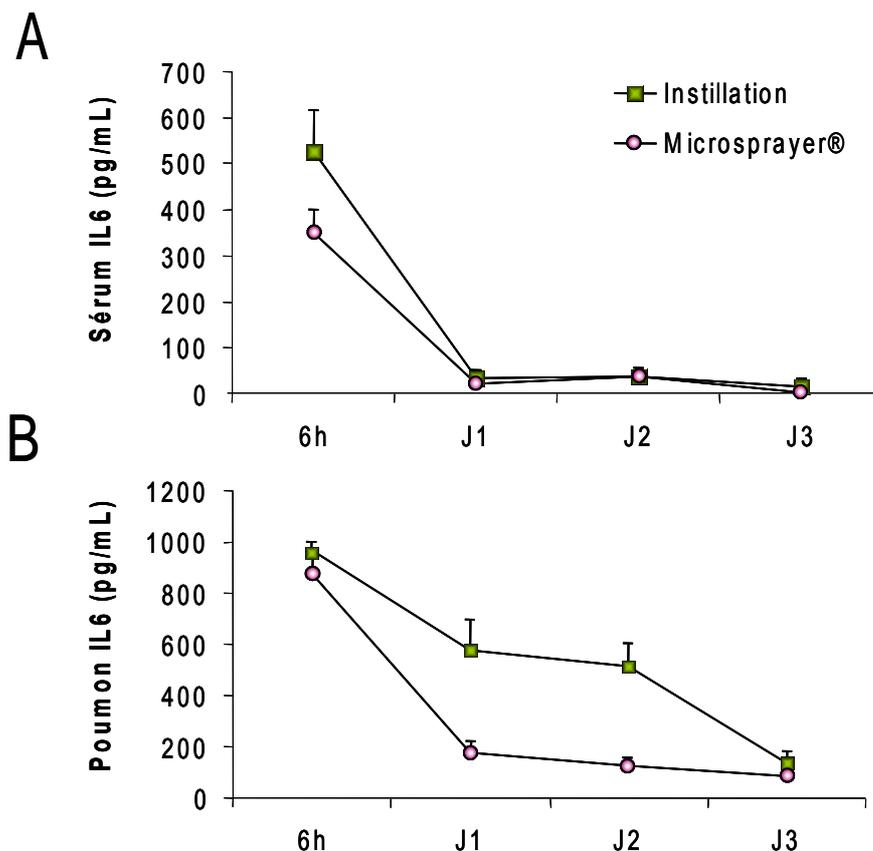


Figure 62 : Concentration en interleukine IL-6 dans le sérum (A) et dans le broyat pulmonaire (B) des souris Swiss après une injection des complexes Lutrol®(3%)/ADN(100 µg) par instillation (■) ou par Microsprayer® (●). La concentration en IL-6 a été quantifiée par test ELISA. Chaque point représente la moyenne et la SEM de cinq valeurs indépendantes.

Les résultats précédents ont montré que le Lutrol® perdait une partie de son efficacité de transfection en utilisant le Microsprayer®, pourtant le Microsprayer® apparaît plus adapté pour une administration dans les poumons.

Utilisation des tétrafonctionnalisés pour le transfert de gènes dans les poumons

Nous avons souhaité développer des formulations qui résistent au stress induit par une administration au Microsprayer®, c'est pourquoi les polymères tétrafonctionnalisés, représentés par la , sont une autre famille de copolymères à blocs qui présentent l'avantage de réunir au sein de la même molécule une charge positive, présente chez les vecteurs cationiques couramment utilisés, et le caractère amphiphile du Lutrol® (). Le copolymère à bloc étudié dans cette partie est le 704, qui contient 13 groupements PO et 30 groupements EO.



Figure 63 : Représentation schématique des polymères tetrafonctionnalisés.

L'efficacité de transfection du 704 dans les poumons a tout d'abord été comparée à celle du Lutrol® par une injection par instillation. La montre que le 704 a permis d'augmenter le niveau d'expression du gène rapporteur dans les poumons jusqu'à 5 fois par rapport au Lutrol®. D'autre part, l'expression du gène rapporteur reste stable jusqu'à 3 jours quand l'ADN est formulé avec le 704.

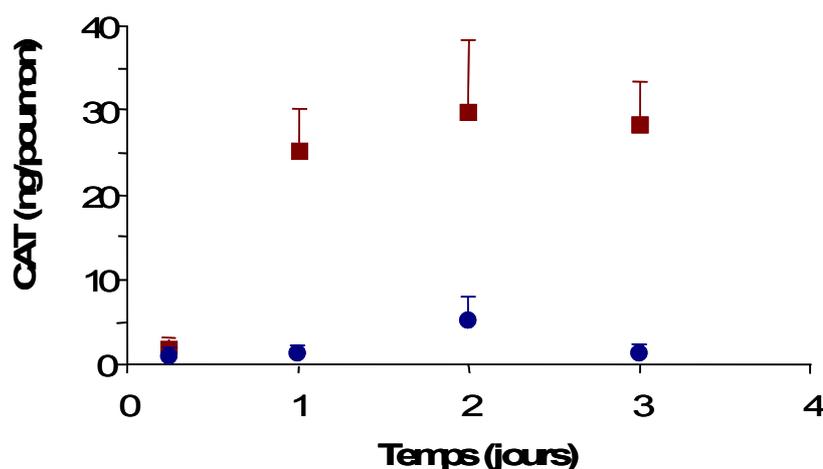


Figure 64 : Cinétique d'expression de la CAT après une injection par instillation de 100 µg d'ADN complexés avec le Lutrol® (●) à 3%, ou avec le 704 (■) à 0,25%.

Ensuite, l'efficacité du 704 a été étudiée avec le Microsprayer® et comparé au Lutrol®. La représente le niveau d'expression du gène rapporteur de la CAT deux jours après l'injection avec le Microsprayer® de complexes Lutrol®/ADN et 704/ADN et montre que le 704 a permis de maintenir un niveau d'expression du gène rapporteur d'environ 5 ng/poumon (-A). Comme pour les injections réalisées avec le Lutrol®, l'injection du gène rapporteur de la β -Galactosidase a permis de visualiser la distribution de l'expression du gène dans les poumons. La -B montre que l'injection des complexes 704/ADN a permis une distribution plus uniforme de l'expression du gène dans l'ensemble des poumons.

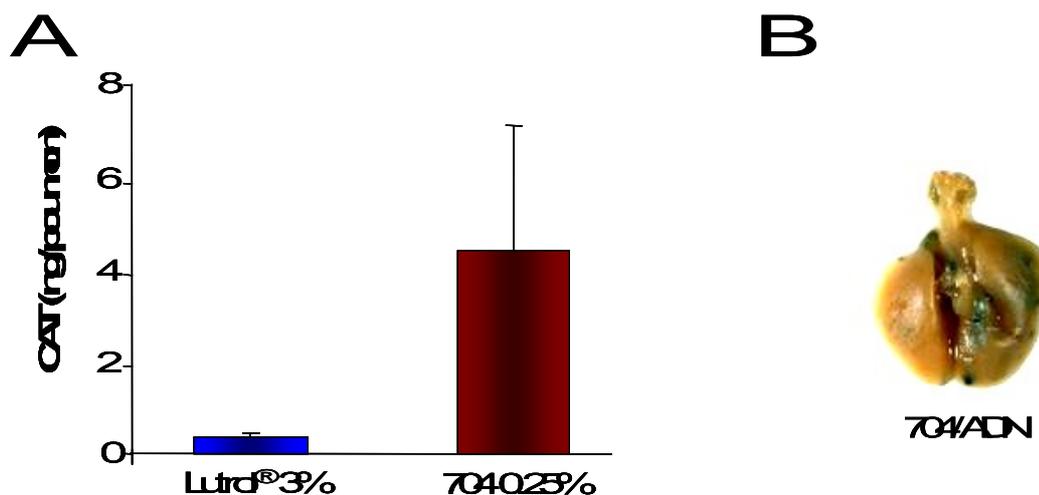


Figure 65 : Expression de la CAT dans les poumons de souris Swiss deux jours après une injection avec un Microsprayer®. (A) Efficacité de transfection pour les complexes Lutrol®/ADN et Poloxamine/ADN contenant 100 µg d'ADN (CAT). (B) Distribution de l'expression du gène rapporteur de la β -Galactosidase dans les poumons de souris deux jours après une injection de 100 µg d'ADN complexé avec le 704.

Dans l'objectif d'approfondir les résultats de la distribution de l'expression, le gène rapporteur de la CAT a été visualisée par immunomarquage sur des coupes de poumons ayant reçu par Microsprayer® une solution contrôle (A-C) ou les complexes 704/ADN (D-F). La protéine CAT est visible par un marquage marron qui s'observe uniquement pour les poumons ayant reçu les complexes 704/ADN, et au niveau des cellules épithéliales de la trachée, des bronches et du parenchyme (D-F).

Ces résultats montrent que l'ADN formulé avec le 704 a permis une expression du gène rapporteur de la CAT dans l'ensemble des poumons.

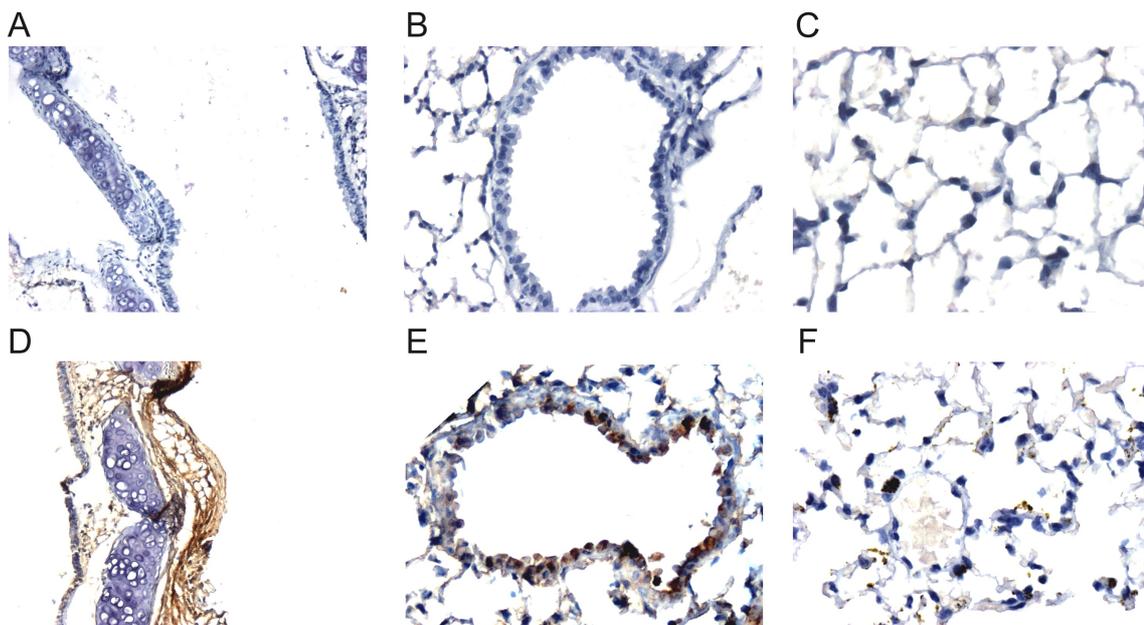


Figure 66 : Expression de la CAT dans les poumons de souris injectés par Microsprayer® avec une solution contrôle (A-C) ou des complexes 704/ADN (D-E) contenant 100 µg d'ADN. L'immunomarquage a été réalisé au niveau des cellules de la trachée (A et D), des bronches (B et E) et du parenchyme (C et E).

Enfin, des analyses histopathologiques de poumons injectés par Microsprayer® avec une solution de 704 seul et de complexes 704/ADN sont présentées sur la . Ces analyses montrent que l'injection d'une solution de 704 seul n'induit pas de réaction inflammatoire au niveau des bronches (A) et aucun infiltrat cellulaire n'est observé au niveau des vaisseaux sanguins pulmonaires (B).

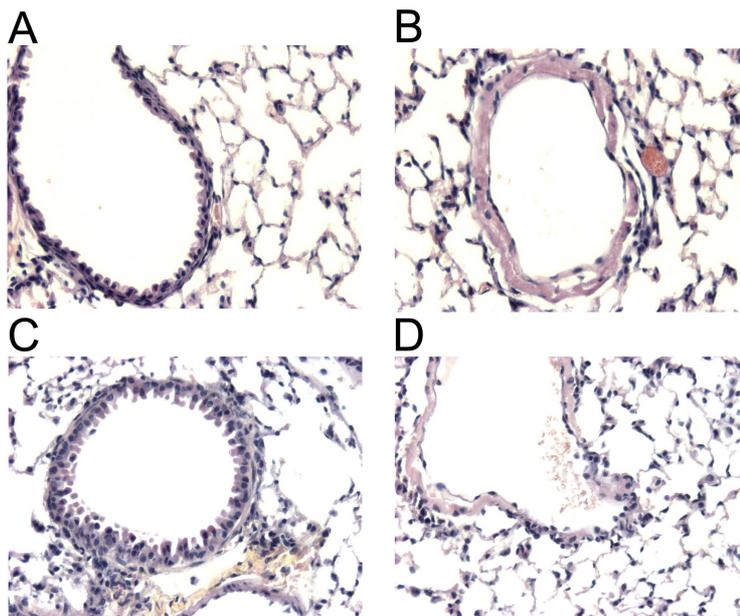


Figure 67 : Analyses histopathologiques des poumons des souris Swiss 2 jours après l'injection d'une solution contrôle (A et B) et de 100 µg d'ADN complexé avec le 704 (C et D). Agrandissement x20.

Quand le 704 est complexé à 100 µg d'ADN, l'observation des coupes histopathologiques a montré un léger infiltrat cellulaire au niveau des bronches (C) et des vaisseaux sanguins (D), cependant les bronches ne sont pas du tout obstruées. L'infiltrat cellulaire observé sur les coupes de poumons après l'injection des complexes 704/ADN (100 µg) est assez faible et est moins important que celui observé avec les mêmes complexes mais réalisés avec le Lutrol® par instillation (I et J).

Transfert de la protéine de fusion GFP-CFTR dans les poumons

Les polymères tetrafonctionnalisés ayant donné les meilleures efficacités de transfection pour le gène rapporteur de la CAT, ces copolymères ont été testés pour le transfert du gène codant pour une protéine de fusion GFP-CFTR, où la protéine « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator » est fusionnée à la protéine fluorescente GFP. Après l'injection de 100 µg du plasmide codant pour la protéine GFP-CFTR, un immunomarquage sur la GFP a été réalisé sur des coupes de poumons et est visible par une coloration marron (). L'expression de la protéine de fusion a été observée dans les cellules épithéliales du parenchyme (A et B) et des bronches (C et D).

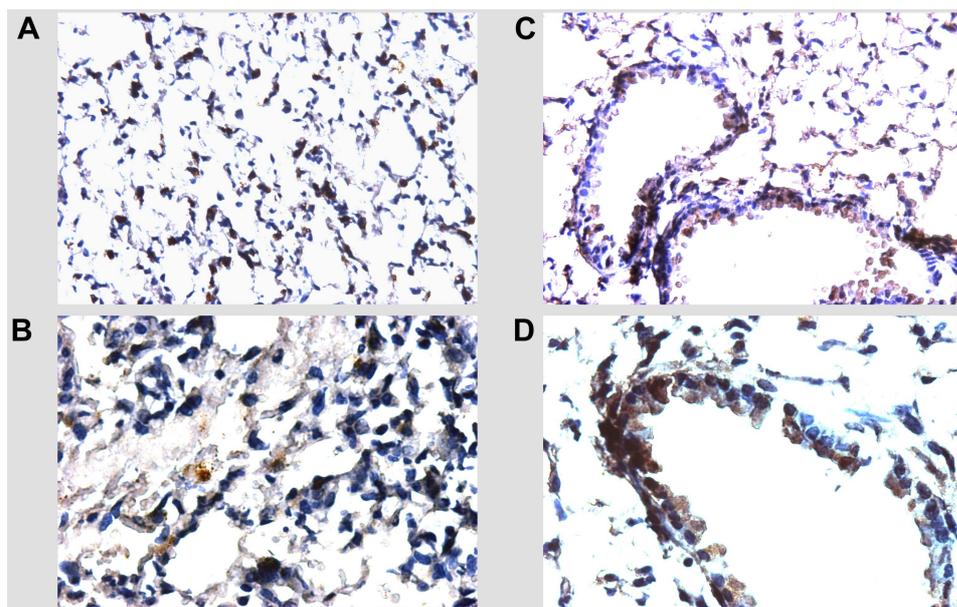


Figure 68 : *Expression de la protéine GFP-CFTR dans les poumons de souris. Le plasmide (100 μ g) codant pour la protéine GFP-CFTR a été injecté par Microsprayer® en présence de 704 à 0,25%. L'immunomarquage a été réalisé au niveau des cellules du parenchyme (A et B) et des bronches (C et D) avec un agrandissement x20 (A et C) et x40 (B et D).*

Ainsi, les résultats ont montré que les polymères triblocs ou tétrafonctionnalisés ont permis d'augmenter nettement l'expression d'une protéine dans les poumons de souris par rapport au PEI. Les polymères tétrafonctionnalisés apparaissent être les vecteurs les plus efficaces d'une part, et leur utilisation *in vivo* pour des injections par aérosolisation a montré des résultats très encourageants en terme d'expression d'une protéine dans l'ensemble des poumons. Ces vecteurs ont permis de transfecter les cellules épithéliales bronchiques, alvéolaire et également les cellules de la trachée. D'autre part, comparés au PEI, les copolymères à blocs sont des vecteurs nettement moins toxiques.

LES HYDROXYDES DOUBLES LAMELLAIRES

Cette dernière partie expérimentale a donné lieu à une publication dans la revue *Nano Letters* (Desigaux L, Belkacem MB, Richard P, Cellier J, Leone P, Cario L, Leroux F, Taviot-Gueho C, Pitard B. *Self-assembly and characterization of layered double hydroxide/DNA hybrids. Nano Lett. 2006 Feb;6(2):199-204*).

Dans la classe des lipides cationiques, certains chercheurs se sont intéressés à introduire des groupements sensibles au pH, ou aux potentiels redox, ou biodégradable. Ce type de groupement a été introduit généralement au niveau du bras espaceur, qui relie la partie polaire et la partie hydrophobe entre elles, dans le but de faciliter la sortie des endosomes des complexes et d'accélérer le relargage de l'ADN dans le compartiment cytoplasmique (Medina-Kwaune *et al.*, 2005). Mais aujourd'hui aucunes fonctions de type pH-sensible n'a réellement apportée un changement significatif de l'efficacité de transfection d'un gène.

Dans des conditions acides, seule la partie qui présente la fonction pH-sensible au niveau du bras espaceur du lipide est clivée. Ainsi, nous avons pensé qu'un vecteur qui serait entièrement dégradé à pH acide apporterait des fonctions innovantes dans ce domaine. Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) sont des matériaux constitués de feuillets hydroxydes inorganiques chargés positivement, entre lesquels s'intercalent des espèces anioniques. De plus, les HDL sont des matériaux entièrement biodégradables à pH acide et des précédentes études ont montré qu'il était possible d'intercaler des macromolécules, comme de très petits fragments d'acides nucléiques, entre des feuillets inorganiques des HDL par la méthode d'échange d'ions (Choy *et al.*, 1999).

L'objectif de cette troisième partie était d'observer la possibilité de synthétiser des matériaux hybrides HDL/ADN par la méthode de co-précipitation, dans laquelle les feuillets hydroxydes se forment en présence d'ADN. Ce type de synthèse utilise le deuxième mode d'assemblage qui consiste à utiliser l'ADN comme support de synthèse des HDL.

Les HDL sont représentées par la formule générale suivante : $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2][A^{m-x/m}.nH_2O]$ (abrégé par la notation $M^R M^III/A$ avec $R = (1-x)/x$) et où M^{II} et M^{III} représentent les cations métalliques di- et tri-valents qui forment les feuillets inorganiques, et $A^{m-x/m}$ les anions intercalés entre les feuillets cationiques (Rives, 2001). Les résultats suivants présentent la caractérisation complète des nanomatériaux hybrides HDL/ADN magnésium-gallium (MgGa), obtenus par co-précipitation de fragments d'ADN de longueurs variables (de 100 à 500 pb ou de 6000 à 8000 pb) ou d'ADN plasmidique. Le choix de la phase inorganique MgGa s'est

justifié par le fait que cette phase se forme pour des valeurs du rapport molaire, $R = \text{Mg}/\text{Ga}$, assez étendues : $7 > R > 1,8$ permettant ainsi de faire varier la densité de charge du feuillet inorganique. En comparaison, des phases inorganiques magnésium-aluminium (MgAl) et magnésium-fer (MgFe) ont été également préparées (Lopez-Salina *et al.*, 1996).

En utilisant l'analyse par diffraction aux rayons X, nous avons étudié l'influence de la température de synthèse, de la longueur des fragments d'ADN et de la densité de charge, sur les propriétés structurales des nanomatériaux HDL/ADN.

Synthèses des HDL en absence ou en présence d'ADN

Les feuillets inorganiques des HDL se forment par mélange de deux sels $\text{M}^{\text{II}}\text{NO}_3$ et $\text{M}^{\text{III}}\text{NO}_3$ qui à pH 10 ont la propriété de s'assembler en feuillet cationique $\text{M}^{\text{II}}_{1-x}\text{M}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2$. Les ions NO_3^- s'intercalent entre les feuillets. Pour préparer des matériaux hybrides HDL/ADN, les phases inorganiques ont été préparées par la méthode co-précipitation. Cette méthode consiste à un ajout simultané de la solution de métaux ($\text{M}^{\text{II}}\text{NO}_3$ et $\text{M}^{\text{III}}\text{NO}_3$) et de la solution de soude, dans la solution d'ADN. Cette méthode a été précédemment décrite pour d'autres types de molécules, et permet de contrôler la variation des paramètres de synthèse pour optimiser la formation des matériaux hybrides HDL/ADN. Le premier paramètre étudié est la composition inorganique du feuillet HDL. Trois phases inorganiques $\text{M}^{\text{II}}_2\text{M}^{\text{III}}/\text{ADN}$ ont été préparées : Mg_2Al , Mg_2Fe et Mg_2Ga , en présence ($\text{M}^{\text{II}}_2\text{M}^{\text{III}}/\text{ADN}$) ou en absence ($\text{M}^{\text{II}}_2\text{M}^{\text{III}}/\text{NO}_3^-$) de fragments courts d'ADN (100 à 500 pb). La figure 69 représente les spectres de diffraction aux rayons X des différentes phases.

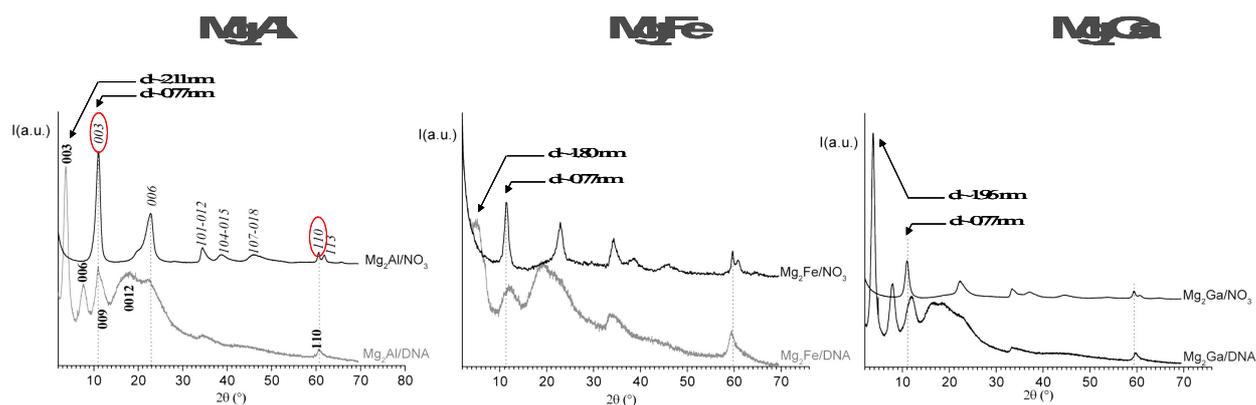


Figure 69 : Spectres de diffraction aux rayons X pour les différentes phases inorganiques synthétisées en présence ($\text{Mg}_2\text{M}^{3+}/\text{DNA}$) ou en absence d'ADN ($\text{Mg}_2\text{M}^{3+}/\text{NO}_3^-$). Les phases inorganiques (Mg_2Al , Mg_2Fe et Mg_2Ga) ont été synthétisées à 50°C en présence de fragments d'ADN de 100 à 500 pb (ADNs).

Le pic de diffraction (110) est attribué à la distance inter-métallique au sein d'un même feuillet hydroxyle. La présence de ce pic dans tous les spectres confirme la formation des feuillets hydroxydes en présence ou en absence d'ADN. Le premier pic du spectre de diffraction est attribué à la réflexion des plans de la famille cristallographique (003), qui correspond à la distance inter-feuillet d . En absence d'ADN, les espaces inter-feuillets sont occupés par l'anion NO_3^- . Dans cette expérience, l'intercalation des molécules d'ADN entre les feuillets a été mise en évidence par la nette augmentation de la distance d d'une valeur de $d = 0.77$ nm en absence d'ADN, à une distance $d \sim 2.11$ nm, ~ 1.80 nm et ~ 1.96 nm en présence d'ADN pour les phases Mg_2Al , Mg_2Fe et Mg_2Ga , respectivement. La présence de plusieurs harmoniques d'une intensité importante (006, 009, 012) met en évidence des matériaux formés bien définis et bien cristallisés pour les phases Mg_2Ga et Mg_2Al . Au contraire, la phase Mg_2Fe présente un faible taux de cristallinité, avec un spectre qui présente des pics plus larges et un bruit de fond important. Les pics (009) et (012) possèdent normalement une forme Gaussienne. Chacun de ces pics sur le spectre la phase $\text{Mg}_2\text{Al}/\text{ADN}$ présentent une déformation (marquée par les pointillés) qui s'expliquerait par la présence d'une phase $\text{Mg}_2\text{Al}/\text{NO}_3$ au sein de la phase $\text{Mg}_2\text{Al}/\text{ADN}$. La présence de la phase $\text{Mg}_2\text{Al}/\text{NO}_3$ est tout a fait probable du fait de la faible concentration de l'ADN par rapport aux ions nitrates.

Des trois phases formées en présence d'ADN, c'est le spectre de la phase $\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{ADN}$ qui présente le plus fort rapport signal-sur-bruit et le moins de déformation des pics.

Paramètres influençant la structure des feuillets hydroxydes des phases MgGa/ADN

La phase $\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{ADN}$ a été utilisée comme modèle pour étudier l'influence des conditions de synthèse dans la formation et la structure des feuillets hydroxydes intercalant l'ADN.

Tout d'abord, l'effet de la variation de la température de synthèse sur la distance inter-feuillets d , a été étudié sur la phase Mg_2Ga . Les phases Mg_2Ga ont été synthétisées à température ambiante, 50°C ou 60°C en présence d'ADN, et les spectres de diffraction sont représentés sur la . Les hydroxydes Mg_2Ga en absence d'ADN ($\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{NO}_3$) ont été synthétisés à température ambiante pour comparaison.

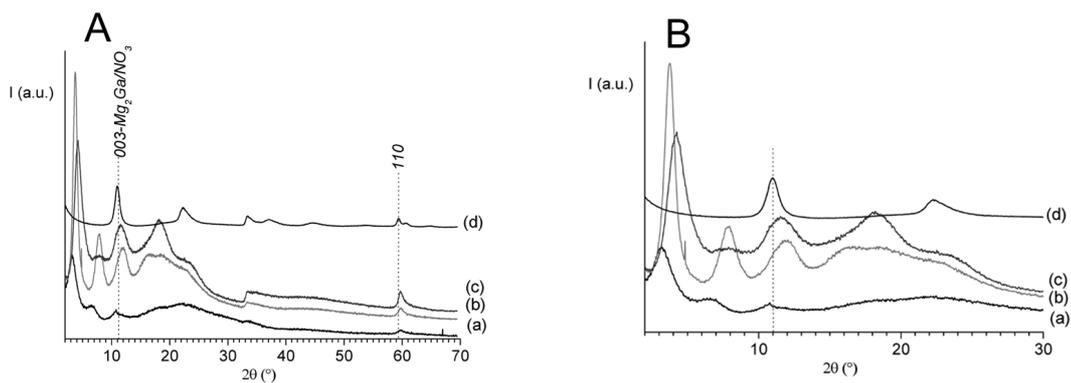


Figure 70 : (A) Spectres de diffraction des hydroxydes MgGa synthétisés en présence d'ADN à température ambiante (a), à 50°C (b) et à 60°C (c), ou en absence d'ADN (d) à 50°C .

La présence du pic de diffraction (110) indique que les HDL se sont bien formées pour les HDL en absence d'ADN à température ambiante (d) et pour les HDL en présence d'ADN à température ambiante (a), à 50°C (b) et à 60°C (c). La comparaison des spectres a, b et c montre qu'en fonction de l'augmentation de la température de synthèse, la structure lamellaire des HDL est contractée, se traduisant par une diminution de d de 2.39 nm (température ambiante) à 1.96 à 50°C , puis 1.86 nm à 60°C . De plus, l'apparition de quatre harmoniques du pic (001) à 50°C , alors que seules deux harmoniques sont présentes à température ambiante, montre que l'empilement des feuillettes a été amélioré par l'augmentation de la température. L'augmentation de l'intensité des pics (009) et (110) pour les spectres des HDL synthétisés à 50°C et 60°C par rapport à ceux obtenus à température ambiante indique également une meilleure organisation intra-lamellaire des feuillettes.

D'autre part, la déformation observée sur les pics (009) des hybrides $\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{ADN}$ synthétisé à température ambiante (spectre a) a été attribuée à la présence d'HDL $\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{NO}_3$, alors que leur présence n'est pas détectée pour les hydroxydes $\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{ADN}$ synthétisé à 50°C et 60°C .

L'influence de la température de synthèse sur la variation de l'espace inter-feuillettes a aussi été étudiée par des analyses thermogravimétriques. Les thermogrammes des hydroxydes MgGa/ADN synthétisés à différentes températures ont été comparés aux hydroxydes MgGa/NO_3 et à l'ADN seul ().

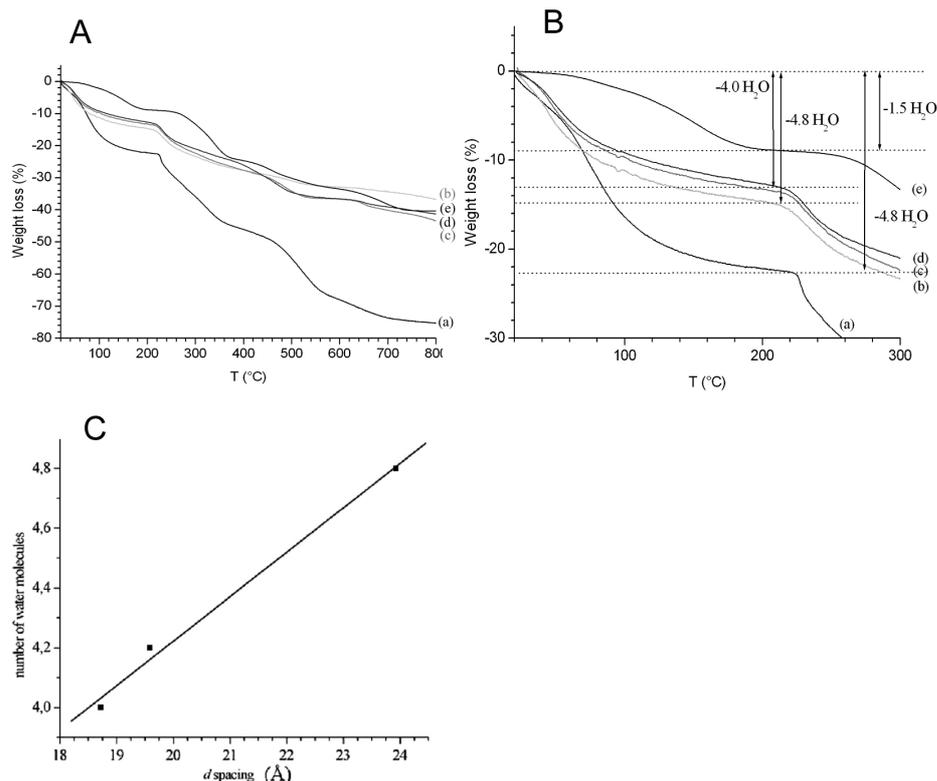


Figure 71 : Analyses thermogravimétriques (ATG) sur un intervalle de température de 20 à 800°C. (A) et son agrandissement de 20 à 300°C (B) pour l'ADN seul (a), les hydroxydes MgGa/ADN préparés à température ambiante (b), à 50°C (c) et à 60°C (d), et pour les hydroxydes MgGa/NO₃ (e). Le graphique C représente la variation de d en fonction du nombre de molécules nH_2O obtenues par les mesures en ATG.

Les HDL MgGaNO₃ et Mg₂Ga/ADN (b, c, d et e) présentent des régions de perte de poids caractéristiques qui correspondent à la perte de molécules d'eau présentes à la surface et également entre les feuillets pour les températures allant de 25°C à 220°C (-B). La dehydroxylation des feuillets s'observe entre 220°C et 400°C, puis la décomposition de l'anion pour des températures supérieures à 450°C (-A). L'ADN seul présente trois pertes de poids dans les intervalles de 25°C à 220°C, de 220°C à 400°C et au dessus de 400°C.

Les pertes de poids à faible température, attribuées au départ de molécule d'eau ont été rapportées à la formule générale des HDL et donne un nombre n de molécules d'eau perdue, avec $n = 1.5$ molécules d'eau pour Mg₂Ga/NO₃, $n = 4.8$ molécules d'eau pour Mg₂Ga/ADN à 50°C et $n = 4.2$ molécules d'eau pour Mg₂Ga/ADN à 60°C, et enfin $n = 4.8$ molécules d'eau pour l'ADN seul. Une relation linéaire a été établie entre les nombre de molécules d'eau et la valeur de d (-C). Il est intéressant de voir que le nombre de molécules d'eau intercalées augmente avec l'espace inter-feuillet d , ce qui correspond à une diminution de la température

de synthèse. Ainsi, pour les expériences qui ont suivit, les synthèses ont été réalisées à une température de 50°C.

Les synthèses d'HDL en présence d'ADN ont été jusqu'à présent étudiées avec de petits fragments d'ADN (ADN_S) et il s'agit de voir si ces conditions peuvent être utilisées pour intercaler de plus grands fragments d'ADN (ADN_L). Les spectres de diffraction aux rayons X des HDL Mg_2Ga/DNA_S et Mg_2Ga/DNA_L sont représentés sur la et indiquent que l'espace inter-feuillets d est le même quelque soit le type de fragments d'ADN utilisé.

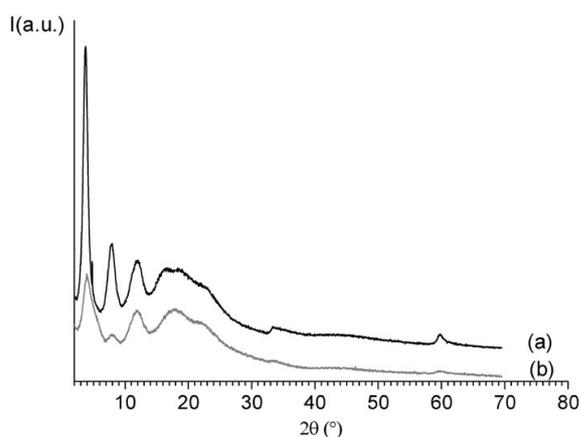


Figure 72 : Spectre de diffraction des hydroxydes $MgGa$ préparés à 50°C avec des fragments d'ADN courts (a) ou longs (b).

Le dernier paramètre étudié, influençant la structure des HDL, a été le rapport molaire R : $R = Mg/Ga$. Les HDL $MgGa$ ont l'avantage de pouvoir être synthétisés sur un large intervalle de R ($7 > R > 1,8$). Ainsi, quatre rapports Mg/Ga ont été utilisés : $R = 2, 3, 4$ et 5 , pour synthétiser des hydroxydes $MgGa/ADN_L$. Les spectres de diffraction des différents HDL obtenus sont représentés sur la .

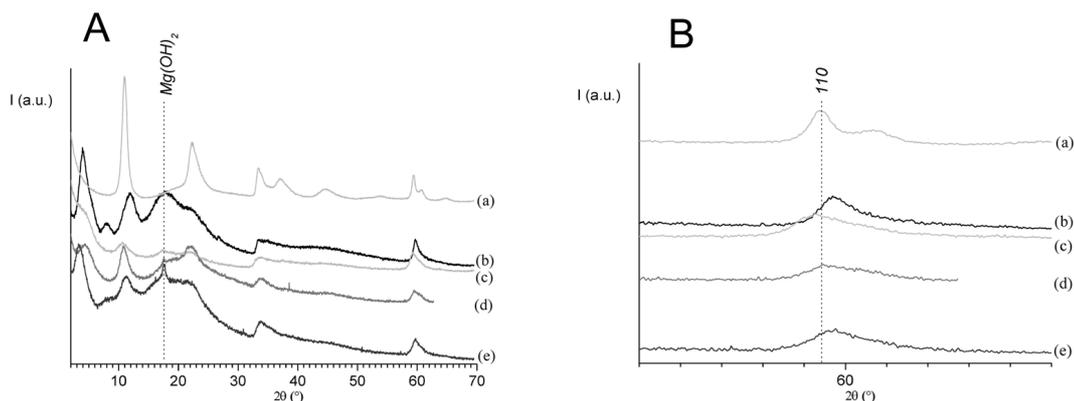


Figure 73 : Spectres de diffraction des hydroxydes $MgGa/NO_3$ (a) et $Mg_R Ga/ADN_L$ préparés à $50^\circ C$ avec différents rapport $R = 2$ (b), $R = 3$ (c), $R = 4$ (d) et $R = 5$ (e) représentés pour un intervalle de 2θ de 2 à 70° (A) ou de 55 à 65° (B).

Le plan de réflexion (110) est relié au paramètre de la cellule de mesure a par la formule suivante : $a = 2x d_{(110)}$, et permet de déterminer à partir du spectre de diffraction la valeur de R du matériau formé. La comparaison des spectres de diffraction de la -B montre que la quantité maximale de Ga incorporé dans le matériau $MgGa/ADN$ est proche de 2 et que, quelque soit le rapport R initial utilisé, le matériau formé présente invariablement un R final d'une valeur comprise entre 2 et 3. D'autre part, si le rapport initial utilisé est de $R = 5$, l'excès de Mg a formé une phase $Mg(OH)_2$ qui est indexée par les pointillés sur la -A. La position du plan de réflexion (003) des hydroxydes $MgGa/ADN_L$ varie en fonction de l'augmentation du rapport molaire initial : 1.58 nm pour $R = 3$, 1.84 nm pour $R = 4$, et 2.29 nm pour $R = 5$.

Potentiel des HDL pour la vectorisation d'acides nucléiques

Les HDL sont des composés sensibles au pH qui sont biodégradables à pH acide. Ainsi, pour vérifier le potentiel des hydroxydes HDL/ADN pour la libération d'acides nucléiques, des études sur la sensibilité au pH des hydroxydes HDL/ADN et des expériences de transfection dans des cellules ont été réalisées avec les phase Mg_2Ga/ADN .

Sensibilité au pH

Le relargage de l'ADN à partir d'hybrides HDL/ADN a été réalisé pour les hydroxydes $MgGa/ADN$ en présence de fragments d' ADN_L et d' ADN_S et comparés aux hydroxydes $MgFe/ADN$ et $MgAl/ADN$. Les hydroxydes $MgGa/ADN$, $MgFe/ADN$ et $MgAl/ADN$

synthétisés à 50°C, avec $R = 2$, ont été déposés sur gel d'agarose afin d'observer la migration des fragments d'ADN. Les résultats sont présentés sur la .

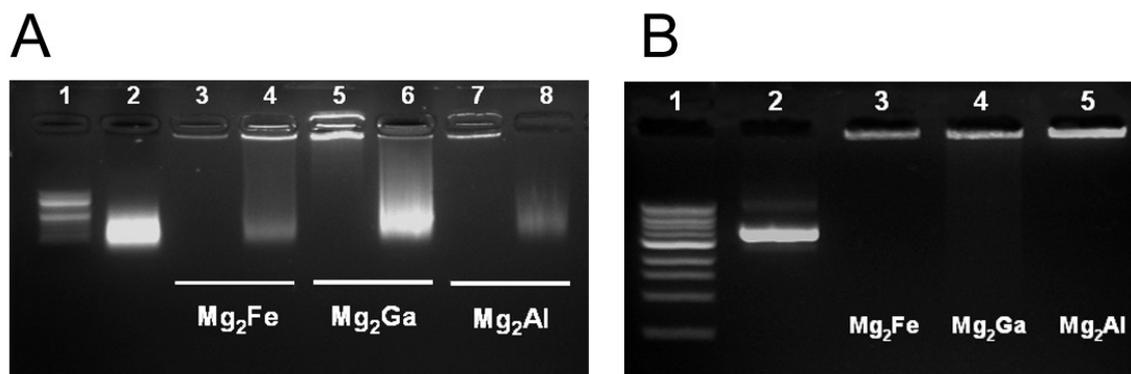


Figure 74 : *Analyse des hydroxydes HDL/ADN par électrophorèse sur gel d'agarose. (A) Les hydroxydes MgFe/ADN_s, MgGa/ADN_s et MgAl/ADN_s ont été incubés 30 minutes à 37°C à pH 8 (ligne 3, 5 et 7, respectivement) ou à pH 2 (ligne 4, 6 et 8, respectivement) et analysés sur le même gel d'agarose. Les lignes 1 et 2 correspondent au marqueur de taille de 100 pb et aux fragments d'ADN_s, respectivement. (B) Les hydroxydes MgFe/ADN_s, MgGa/ADN_s et MgAl/ADN_s ont été synthétisés en présence d'ADN plasmidique, incubés à pH 8 et analysés sur gel d'agarose (ligne 3, 4 et 5, respectivement). Les lignes 1 et 2 correspondent au marqueur de taille de 1 Kpb et aux fragments d'ADN_L, respectivement.*

L'absence de migration d'ADN dans les échantillons incubés à pH 8 montre que les hydroxydes MgGa/ADN, MgFe/ADN et MgAl/ADN ont toutes conduit à l'intercalation de l'ADN_s (-A, lignes 3, 5 et 7) et de l'ADN plasmidique (-B, lignes 3, 4 et 5). L'incubation des hydroxydes synthétisés en présence d'ADN_s à pH 2 conduit à la dissociation partielle des hydroxydes MgFe/ADN et MgAl/ADN, qui se traduit par la migration de l'ADN à travers le gel (-A) et des trois hydroxydes testés les MgGa/ADN_s semblent relarguer la plus importante quantité d'ADN.

Intégration dans les cellules HeLa

Des expériences de transfection sur des cellules en culture ont été réalisées en présence d'ADN de différentes tailles (ADN_s, ADN_L et ADN plasmidique) préalablement marqués à l'aide d'une sonde fluorescente s'intercalant dans l'ADN, le YOYO-1.

Les HDL/ADN fluorescents formés ont été incubés 2h en présence des cellules HeLa, et comme la le montre, les HDL/ADN ont été détectés dans les cellules quelque soit le type d'ADN utilisé. La plupart des spots fluorescents verts observés se présentent sous la forme d'une seule zone fluorescente par cellule proche de la membrane plasmique ou dispersés dans

le cytoplasme (image A, B et C). Au contraire, des cellules incubées en présence d'ADN seul marqué au YOYO-1 ne présentent pas de fluorescence (image non représentée).

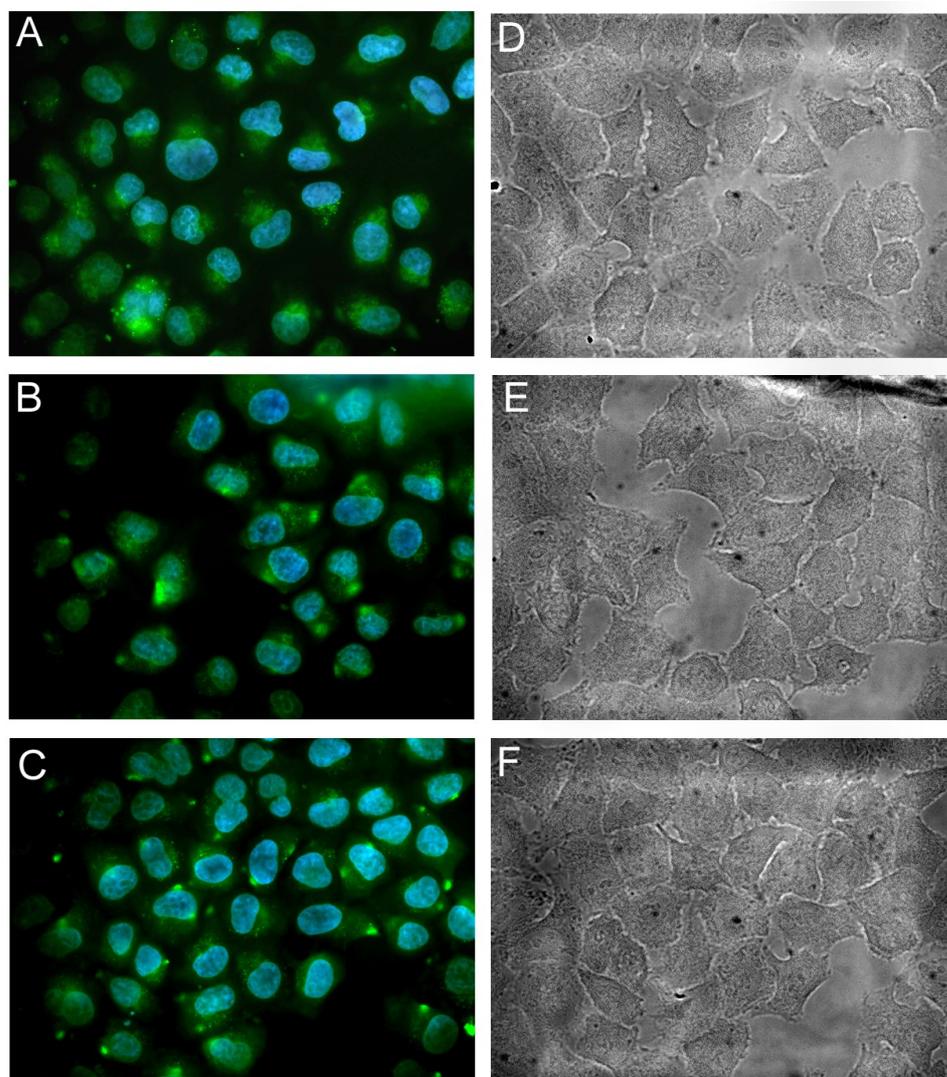


Figure 75 : *Intégration des hydroxydes HDL/ADN dans des cellules HeLa.* Les cellules ont été incubées 2h, à 37°C en présence d'hydroxydes Mg_2Ga/ADN_S , Mg_2Ga/ADN_L , $Mg_2Ga/ADN_{plasmide}$ dans 300 μL d'OPTIMEM. Les molécules d'ADN ont été préalablement marquées avec l'intercalant fluorescent, le YOYO-1 respectant le rapport de 1 molécule de YOYO toutes les 250 pb. Les images A, B et C représentent les micrographes fluorescent et les images D, E et F. Le YOYO émet une fluorescence verte, et les noyaux des cellules, marqués au DAPI, en bleu. Agrandissement x63.

Dans cette étude, nous avons décrit la synthèse d'un matériau hybride nouveau qui consiste à un assemblage supra-moléculaire de feuillets inorganiques à partir desquels des molécules d'ADN peuvent en être extraites en modifiant le pH. En effet, les feuillets inorganiques ont été synthétisés par la méthode de co-précipitation, dans le but d'utiliser l'ADN comme support de synthèse des feuillets. Les résultats ont montré que les conditions de synthèse optimales correspondent à une température de réaction de 50°C pour des feuillets composés de gallium et de magnésium. Le rapport molaire Mg/Ga est de 2/1 et la quantité d'ADN en solution est deux fois plus élevée que celle en ions Ga^{3+} .

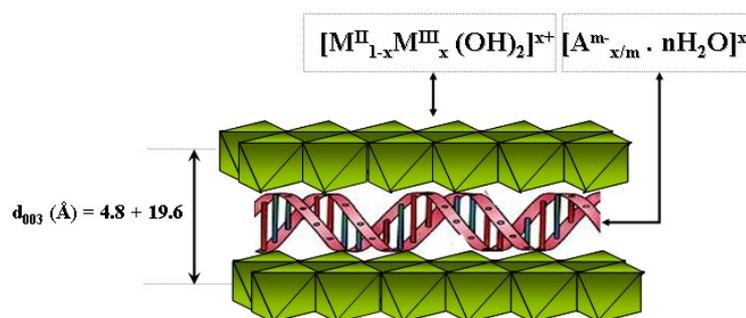


Figure 76 : Représentation schématique de l'intercalation d'une hélice d'ADN entre les feuillets inorganiques de type HDL.

Ces conditions de synthèse ont conduit à la formation de feuillets inorganiques dont l'espace inter-feuillets est de 1.96 nm, ce qui correspond à un arrangement confiné de l'hélice d'ADN orientée parallèlement aux feuillets comme illustré sur la .

L'originalité des matériaux hybrides HDL/ADN réside dans leur capacité à intercaler les molécules d'ADN au sein d'une structure **inorganique**, labile à pH acide et capable de transférer les molécules d'acides nucléiques dans des cellules en culture.

CONCLUSIONS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le développement de nouvelles molécules et de nouvelles stratégies dans la vectorisation synthétique d'acides nucléiques représente aujourd'hui un enjeu majeur pour plusieurs raisons. Par rapport aux vecteurs viraux, les vecteurs synthétiques sont des molécules peu immunogènes, qui ne présentent aucun risque de virulence, et qui permettent de véhiculer des transgènes de grande taille. D'autre part, les vecteurs synthétiques ont le grand avantage d'être simple à élaborer et à utiliser, et ils sont peu coûteux.

L'ARN interférence est un outil technologique très efficace pour inhiber l'expression d'un gène. Dans ce processus les siARN s'apparient de manière spécifique à l'ARNm et bloquent l'étape de traduction de l'ARNm en protéine (Grünweller and Hartmann, 2005). L'ARNi peut être utilisé pour déterminer le rôle cellulaire d'un gène et se présenterait également comme une alternative aux animaux transgéniques « knock-out ». D'autre part, dans les maladies acquises, comme les cancers ou les maladies d'origine virale, l'ARNi se présente comme une application thérapeutique prometteuse. Pour être efficace, les siARN ont besoin d'être transférés jusqu'au cytoplasme de la cellule. Les vecteurs synthétiques aujourd'hui utilisés ont été développés et optimisés pour transporter principalement de l'ADN plasmidique, et il n'est pas évident que ces vecteurs interagissent et transfectent les siARN de manière identique à l'ADN. Compte-tenu des applications thérapeutiques très prometteuses de l'ARNi, il est aujourd'hui primordiale de développer des vecteurs synthétiques conçus pour transporter efficacement ces molécules dans les cellules, en utilisant par exemple des groupements chimiques capables de se lier spécifiquement avec les siARN.

Les aminoglycosides sont des molécules antibiotiques qui interagissent avec les ARN et en particulier avec le site A présent sur les ARN des ribosomes (François *et al.*, 2005). Les aminoglycosides sont des aminos sucres qui présentent plusieurs fonctions amines protonnables à pH physiologique. Ainsi, la stratégie employée a été d'utiliser des dérivés lipidiques d'aminoglycosides (Belmont *et al.*, 2002) dans le but de créer un vecteur synthétique siARN-spécifique. Différents aminoglycosides ont été fixés au niveau de la tête polaire du lipide : la kanamycine, la tobramycine, la néomycine et la paromomycine, ce qui nous a permis d'avoir une mini-librairie de dérivés lipidiques d'aminoglycosides. La kanamycine et la tobramycine appartiennent à la classe des deoxystreptamine 4,6-disubstitués, et la paromomycine et la néomycine à la classe des deoxystreptamine 4,5-disubstitués (Sainlos *et al.*, 2004 et 2005).

Nous avons émis l'hypothèse que les conclusions qui ont pu être faites concernant les propriétés physico-chimique et les relations entre la structure et l'activité des complexes lipides

cationiques/ADN plasmidique, n'étaient pas de toute évidence les mêmes pour des complexes lipides cationiques/siARN. L'ADN plasmidique et les siARN sont des molécules qui présentent des différences de poids moléculaire et de structure qui pourraient être responsables d'une différence de structure ou d'activité des complexes. L'objectif de ma thèse était de déterminer dans un premier temps les propriétés physico-chimiques des complexes lipides cationiques/siARN et de déterminer si les dérivés lipidiques d'aminoglycosides apportaient un avantage à la transfection de siARN dans les cellules, par rapport aux vecteurs optimisés pour transférer l'ADN plasmidique.

Les propriétés physico-chimiques des complexes lipides cationiques/siARN ont été étudiées en présence du BGTC-DOPE, un lipide efficace pour la transfection d'ADN plasmidique (Pitard *et al.*, 1999), et des dérivés lipidiques d'aminoglycosides. Par comparaison, les mêmes complexes ont été réalisés en présence d'ADN plasmidique. Les résultats de stabilité colloïdale (mesure de taille) et de condensation de l'ADN (fluorescence du BET en solution) ont mis en évidence que les complexes formés en présence d'ADN ne présentent pas de différence, qu'ils soient obtenus en présence de BGTC-DOPE ou en présence de dérivés lipidiques d'aminoglycosides. Pour les complexes de siARN, la stabilité colloïdale exprimée en fonction du rapport de charges +/- (lipides cationiques/siARN) correspondait bien au modèle des trois phases de stabilité colloïdale différentes proposées précédemment pour l'ADN plasmidique (Pitard *et al.*, 1999). Cependant, les résultats montrent une différence entre les complexes de siARN formés en présence de BGTC-DOPE et des dérivés lipidiques d'aminoglycosides. En effet, les complexes BGTC-DOPE/siARN présentent une zone B très large et s'étend sur des rapports de charges +/- allant de 2 à 8, avec une taille supérieure à 700 nm. Par contre, les complexes obtenus avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides présentent une zone B assez peu marquée et il n'y a pas de forte agrégation des complexes puisque leur taille ne dépasse pas 500 nm. Et d'une manière générale, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont conduit à la formation de complexes de plus petites tailles qu'avec le BGTC-DOPE en zone A et C. De plus, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont permis de condenser les siARN pour des rapports de charges plus faibles que le BGTC-DOPE. Ainsi, les résultats ont montré que le BGTC-DOPE n'a pas présenté un comportement différent qu'il ait été complexé en présence d'ADN plasmidique ou de siARN. Par contre, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont révélé un comportement différent quand ils étaient complexés en présence de siARN. L'analyse de l'organisation supramoléculaire des complexes a montré que les complexes formés en présence de BGTC-DOPE présentaient une organisation lamellaire concentrique avec les siARN, comme décrit dans la littérature pour l'ADN (Pitard *et al.*, 1999). Par contre, les complexes de siARN obtenus avec le dérivé lipidique de la paromomycine n'ont pas montré une organisation lamellaire concentrique par diffraction des rayons X à petits angles, et la visualisation des complexes de siARN par cryo-microscopie confirme ces résultats. D'autre part, la morphologie des complexes dépendait de la classe d'aminoglycoside utilisée au niveau de la tête polaire : les dérivés lipidiques de la classe des 4,6-disubstitués

présentent une organisation lamellaire concentrique alors que les dérivés lipidiques de la classe des 4,5-disubstitués présentent une organisation beaucoup plus irrégulière (lamellaire, mais sur de très courte distance).

Ces résultats montrent que les dérivés lipidiques d'aminoglycosides se comportent différemment quand ils sont mis en présence de siARN, alors qu'un lipide conçu pour transporter de l'ADN plasmidique n'a pas présenté de différence qu'il soit complexé en présence de siARN ou d'ADN plasmidique. Ces différences observées sont dues à la présence du groupement aminoglycoside au niveau de la tête polaire du lipide cationique. L'interaction particulière des dérivés lipidiques d'aminoglycosides avec les siARN pourrait s'expliquer tout d'abord par le fait que les aminoglycosides sont connus pour interagir de manière spécifique avec le site A de l'ARN (François *et al.*, 2005). Dans le cas du BGTC-DOPE, les deux charges positives sont portées par les fonctions guanidinium très proches l'une de l'autre. Par contre si on observe le positionnement des charges positives sur les dérivés lipidiques d'aminoglycosides, le nombre de charges positives varie de 3 à 6 charges par molécule, et sont réparties sur les différents cycles qui constituent l'aminoglycoside. Dans le cas des complexes de siARN, ce positionnement des charges positives particulier sur les cycles des aminoglycosides aurait un rôle dans l'interaction entre les molécules car seul les dérivés lipidiques d'aminoglycosides sont capables de former des complexes avec les siARN de plus petites tailles, même pour des complexes de la zone B, par rapport au BGTC. D'autre part, les deux classes d'aminoglycosides, 4,6- et 4,5-disubstitués se différencient par leur nombre de cycles et leur nature. La classe des 4,6-disubstitués comporte, deux sucres de type pyranose alors que la classe des 4,5-disubstitués comporte deux sucres de type pyranose et un sucre de type furanose. Les dérivés lipidiques de la classe de 4,6-disubstitués présentent une tête polaire qui est plus allongée que celle des 4,5-disubstitués et il est possible que les premiers adoptent une conformation de type cône, alors que les seconds qui présentent une tête polaire plus importante occuperaient un espace de type tubulaire. Cette différence expliquerait la structure particulière, qui semble être lamellaire mais sur de très courte distance, que les dérivés lipidiques de la classe des 4,5-disubstitués adoptent. D'autre part, la taille des liposomes des dérivés lipidiques de la classe des 4,5-disubstitués est plus petite que celle des dérivés lipidiques de la classe de 4,6-disubstitués, ce qui ne favoriserait pas la formation d'une structure lamellaire concentrique, comme il a été montré précédemment pour des complexes lipides cationiques/ADN (Pitard *et al.*, 1997 ; Pitard *et al.*, 2001).

En termes d'efficacité d'inhibition de l'expression de la GFP, mis à part le comportement particulier du dérivé lipidique de la kanamycine, les autres dérivés lipidiques d'aminoglycosides se sont montrés plus efficaces que le BGTC-DOPE. Par exemple, pour un rapport de charges de 8, on observe que les dérivés lipidiques d'aminoglycosides de la tobramycine, de la paromomycine et de la néomycine ont été plus efficaces que le BGTC-DOPE. Cette différence d'efficacité peut s'expliquer par le fait qu'à ce rapport de charges les complexes BTGC-DOPE se situe encore dans la zone B, alors que les complexes formés en

présence des trois dérivés lipidiques d'aminoglycosides se présentent sous la forme de complexes de petites tailles (< 100 nm) appartenant à la zone C. Le niveau d'internalisation des complexes devraient être le même, car il en déjà été montré pour des complexes lipides cationiques/ADN que le niveau d'internalisation était identique que les complexes se trouvent en zone C ou en zone B (Turek *et al.*, 2000). Ce serait au niveau de la sortie des endosomes que les différences pourraient avoir lieu. La structure chimique particulière des dérivés lipidiques d'aminoglycosides, de part le nombre d'amines protonnables présentent sur les aminoglycosides ainsi que la disposition de ces amines sur des cycles, pourrait avoir une influence dans l'interaction des dérivés lipidiques d'aminoglycosides et des lipides de la membrane interne des endosomes. Il se pourrait que la présence des dérivés lipidiques d'aminoglycosides accentue le phénomène de « flip-flop », proposé dans des études précédentes, qui induit un relargage rapide des acides nucléiques dans le compartiment cytoplasmique (Fattal *et al.*, 1994 ; Medina-Kwaune *et al.*, 2005). Les siARN, complexés aux dérivés lipidiques d'aminoglycosides, seraient ainsi relarguer plus rapidement des endosomes, évitant la dégradation acide lysosomale. Les siARN sont actifs dans le cytoplasme des cellules au niveau de l'ARNm et ne nécessitent donc pas de transport jusqu'au noyau, c'est pourquoi la différence d'efficacité, obtenue avec les dérivés lipidiques d'aminoglycosides, s'expliquerait au niveau du transport intracellulaire des complexes. Ainsi, pour les complexes de siARN, les dérivés lipidiques d'aminoglycosides présentent des différences aussi bien au niveau des propriétés physico-chimiques que d'efficacité, ce qui est en bon accord avec les données de la littérature où il a été largement montré que l'efficacité des complexes dépend principalement des propriétés physico-chimiques des complexes. L'optimisation de vecteurs capables de vectoriser spécifiquement les siARN a permis d'obtenir une très bonne efficacité d'inhibition de l'expression de la GFP en diminuant les quantités de siARN. Ceci est important car il a été montré que l'augmentation de la quantité de siARN amplifiait l'activation de la réponse interféron induite par la présence d'ARN double brin exogène (Sledz *et al.*, 2003 ; Bridge *et al.*, 2003). Les résultats ont montré que pour une transfection de 300 ng de siARN les dérivés lipidiques d'aminoglycosides de la tobramycine, néomycine et paromomycine ont conduit à une expression résiduelle de la protéine GFP de moins de 25% alors qu'en présence de BGTC-DOPE l'expression de la GFP est restée proche de 65% (-B).

Ces résultats ont été obtenus par le suivi de l'expression de la protéine de la GFP dans la cellule. Il s'agit désormais de confirmer ces observations par un dosage de l'ARNm résiduel de la GFP et de vérifier le niveau d'expression des autres protéines dans la cellule.

Les lipides cationiques et les polymères cationiques sont des vecteurs très efficaces pour le transfert d'acides nucléiques dans des cellules en culture, cependant, pour des applications *in vivo*, ils se sont avérés peu efficaces et toxiques. La forte densité de charges positives que présente à la surface des complexes formés par un mode d'auto-assemblage est un frein à leur administration *in vivo*, en raison de la présence des constituants anioniques du sérum ou de la

matrice extracellulaire qui s'agrègent très rapidement avec ces complexes (Kang *et al.*, 2005). Pourtant, le développement d'un système de transfert d'acides nucléiques simple, efficace et non toxique *in vivo* permettrait d'envisager le traitement d'un grand nombre de pathologies. Au cours de ma thèse je me suis intéressée dans une deuxième partie au développement d'un système de vectorisation synthétique dans le poumon. Le transfert d'acides nucléiques dans le poumon peut présenter de nombreuses applications thérapeutiques comme, par exemple, le traitement de la mucoviscidose, de l'asthme, ou des cancers, mais il peut également être utilisé pour la sécrétion de protéine systémique. Actuellement, le vecteur synthétique le plus efficace pour transférer de l'ADN dans les poumons est l'homopolymère cationique PEI (Densmore *et al.*, 2000 ; Goula *et al.*, 2000). Cependant, l'injection des complexes PEI/ADN induit une importante réaction inflammatoire dans les poumons qui se traduit par la présence d'un infiltrat cellulaire au niveau de la zone péri-bronchiale et des vaisseaux sanguins et d'une importante obstruction des bronches. Un système de vectorisation efficace, non invasif et non toxique nécessite réellement d'être développé pour cet organe car ce type de réaction inflammatoire observé avec le PEI n'est pas concevable dans un contexte pathologique comme la mucoviscidose où l'organe présente déjà d'importantes lésions.

Pour développer un nouveau système de vectorisation synthétique dans le poumon, nous avons choisi de rester dans la classe des complexes auto-assemblés, mais en changeant radicalement la structure moléculaire du vecteur. A la différence des vecteurs cationiques, comme le PEI qui est un homopolymère possédant une importante densité de charges positives, nous avons décidé d'utiliser des structures moléculaires amphiphiles et non-ioniques, ou faiblement chargées. Ce type de structure est observé dans la classe des copolymères à blocs et nous avons testé l'efficacité de cette nouvelle classe en utilisant particulièrement la famille des copolymères triblocs et tétrafonctionnalisés. Les triblocs sont non-ioniques et constitués d'un bloc central hydrophobe poly(-propylèneoxyde) (PPO) relié à deux blocs hydrophiles de poly(-éthylèneoxyde) (PEO). Les triblocs ne possèdent pas de groupements cationiques capables d'établir des interactions électrostatiques avec les phosphates de l'ADN, cependant nous avons supposé qu'ils pouvaient interagir avec l'ADN par liaisons des Van der Waals ou des interactions hydrophobes. Au sein de notre laboratoire, il a déjà été montré que de l'ADN formulé en présence des triblocs a conduit à une nette augmentation de l'expression du gène rapporteur par rapport à l'ADN nu dans le muscle (Pitard *et al.*, 2002 ; Richard *et al.*, 2005). D'autres études ont confirmé l'augmentation de l'expression d'un gène rapporteur ou thérapeutique quand l'ADN était formulé en présence de triblocs (Lemieux *et al.*, 2000 ; Liaw *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2003), et ont également montré que les triblocs condensaient l'ADN (Liaw *et al.*, 2001). Pour évaluer l'efficacité des triblocs dans le transfert de gène dans les poumons, nous avons utilisé le PEI comme vecteur synthétique de référence. La comparaison de la formulation de l'ADN avec PEI ou les triblocs a mis en évidence que les triblocs, comme le Lutrol®, permettent de formuler une quantité bien plus importante d'ADN que le PEI. En effet, pour de forte concentration en ADN, le PEI, forme des particules instables

colloïdalement, agrégées et qui sont visibles à l'œil nu. Ce type d'instabilité colloïdale contraint radicalement l'utilisation du PEI *in vivo* pour de fortes concentrations d'ADN. Dans notre modèle d'étude qui consiste en une injection de 100 µl de la solution de complexes dans les poumons, le PEI a permis d'injecter au maximum 20 µg d'ADN alors que le Lutrol® il a été possible de formuler jusqu'à 350 µg d'ADN sans formation visible de particules instables colloïdalement. Ainsi, il a été observé que pour une quantité équivalente d'ADN (20µg), le PEI et le Lutrol® ont conduit à une expression similaire deux jours après l'injection dans les poumons. Par contre, l'augmentation de la quantité d'ADN dans la formulation avec le Lutrol® s'est associée à une nette augmentation de la quantité de protéine exprimée dans les poumons. De plus, avec les polyplexes PEI/ADN, la cinétique d'expression du gène rapporteur a présenté un maximum d'expression 2 jours après l'injection puis a diminué rapidement, alors que les complexes Lutrol®/ADN ont permis de maintenir une expression stable jusqu'à 5 jours, puis a progressivement diminué. Dans le cas des polyplexes PEI/ADN, ce type de profil d'expression peut s'expliquer par une transfection rapide de l'ADN plasmidique au noyau et qu'aucune réserve d'ADN plasmidique ne s'est créée au sein de la cellule pour prolonger l'expression. Ces observations sont en bon accord avec les précédentes études concernant le PEI et d'autres molécules cationiques (Densmore *et al.* 2000). La différence du profil de cinétique d'expression entre le PEI et le Lutrol® peut s'expliquer par des procédés d'internalisations différents. Il a été largement montré que les polyplexes de type PEI/ADN sont internalisés dans les cellules par un processus d'endocytose (Zabner *et al.*, 1995 ; Labat-Moleur *et al.*, 1996). En effet, dans l'internalisation des polyplexes PEI/ADN, une partie des molécules d'ADN arrivent à échapper à la dégradation lysosomale (Howell *et al.*, 2003). Par contre, dans le cas du Lutrol®, il a été montré que les triblocs ont la capacité de déstabiliser les membranes des cellules (Kabanov *et al.*, 2002 ; Maskarinec *et al.* 2002). Ainsi, les triblocs pourraient jouer un rôle dans la perturbation de la membrane des endosomes, permettant une libération plus rapide de l'ADN dans le cytoplasme. Dans un futur proche, il serait intéressant de réaliser ces expériences de transfection en présence d'ADN ou de polymère marqué par des groupements fluorescents afin de comprendre un peu mieux par quelle voie les complexes Lutrol®/ADN s'intègrent dans la cellule. D'autre part, l'expression du gène rapporteur sur une courte période avec le Lutrol® peut s'expliquer par l'utilisation du promoteur CMV qui dirige l'expression de la CAT. En effet, ce promoteur est connu pour sa forte efficacité, mais se caractérise par une inactivation assez rapide dans le temps (Yew *et al.* 2001). Pour améliorer l'expression du gène rapporteur dans le temps, il serait plus judicieux d'utiliser un promoteur du type ubiquitine B, il a en effet été montré que l'expression d'un transgène a pu être augmentée jusqu'à trois mois en utilisant un promoteur humain de l'ubiquitine B, alors que l'expression se limitait à 7 jours en utilisant un promoteur CMV (Gill *et al.*, 2001 ; Yew *et al.*, 2001). D'autre part, les analyses histopathologiques réalisées sur les poumons après une injection d'une solution de Lutrol® ou d'ADN nu (100 µg) ou de complexes Lutrol®/ADN à 20 µg en ADN n'induisait aucun changement visible au niveau des poumons. Par contre, pour

une même quantité d'ADN, les polyplexes PEI/ADN ont été responsable d'une importante réaction inflammatoire qui s'est traduit par une très forte infiltration cellulaire au niveau de la zone péribronchiale, dans lumière des alvéoles, autour des vaisseaux sanguins, et une importante obstruction des bronches. Ainsi, l'analyse histopathologique a été réalisée pour une injection de Lutrol®/ADN contenant 100 µg d'ADN puisqu'elle permet d'obtenir une augmentation de l'expression du gène rapporteur par rapport aux complexes PEI/ADN et Lutrol®/ADN à 20 µg. Il a été montré que les complexes Lutrol®/ADN contenant 100 µg d'ADN ont induit une réponse inflammatoire très modérée. En effet, deux jours après l'injection une infiltration de cellules mononuclées a été observée autour des vaisseaux sanguins et dans la zone péribronchiale. Cependant, il n'a pas été observé d'infiltrat cellulaire au niveau de la lumière des alvéoles, ni d'obstruction des bronches. De plus, deux jours après l'injection, le dosage dans le sérum du niveau d'expression de l'IL-6 montre une expression très proche du niveau de base, ce qui contraste énormément avec ce qui a été observé suite à une injection en systémique de complexes vecteurs cationiques/ADN (Zhao *et al.* 2004).

Ensuite, l'efficacité des complexes PEI/ADN et Lutrol®/ADN ont été évalués pour des transfection réalisées avec un Microsprayer. Il a en effet été montré que des injections réalisées à l'aide d'un Microsprayer® avaient donné une expression plus uniforme suite à l'injection d'un adénovirus (AAV2) dans l'épithélium pulmonaire du macaque (Beck *et al.*, 2002 ; Fisher *et al.*, 2003). Les complexes Lutrol®/ADN injectés par le Microsprayer® ont conduit à une expression 5 à 15 fois supérieure par rapport aux complexes PEI/ADN. Cependant, l'injection des complexes par le Microsprayer® a conduit à une diminution de la quantité de protéine exprimée par rapport à une injection par instillation, aussi bien pour les complexes Lutrol®/ADN que pour les complexes PEI/ADN. L'explication de la perte de fonctionnalité des complexes lors d'une administration avec le Microsprayer® n'est pas vraiment expliquée. Il serait possible que les complexes perdent leurs propriétés physico-chimiques au moment de l'aérosolisation. Compte-tenu de ces résultats, nous avons décidé de comparer l'efficacité de transfection d'un gène rapporteur en présence de Lutrol avec la deuxième famille de copolymères à blocs, les tétrafonctionnalisés. Les tétrafonctionnalisés sont des polymères qui ont la particularité de présenter une charge positive par molécule, portée par un groupement éthylènediamine, mais qui conserve leur caractère amphiphile par la présence de quatre blocs (PEO)-(PPO)-(PEO) reliés à l'éthylènediamine. L'injection par instillation de complexes 704/ADN a permis d'augmenter jusqu'à 5 fois la quantité de protéine exprimée par rapport aux complexes Lutrol®/ADN (100 µg) et suite à une injection par aérosolisation les tétrafonctionnalisés ont conduit à un niveau d'expression d'environ 5 ng de CAT par poumon. Les tétrafonctionnalisés ont donc permis de conserver une efficacité de transfection de l'ADN après une injection par aérosolisation par rapport aux complexes Lutrol®/ADN qui perdaient complètement leur efficacité. Les tétrafonctionnalisés présentent effectivement une charge positive qui n'est pas présente chez les triblocs. La caractérisation des propriétés physico-chimiques des complexes 704/ADN a été récemment publiée au sein de notre équipe (Pitard *et*

al., 2004), et a montré que les tétrafonctionnalisés étaient capables d'interagir avec l'ADN pour former des nanosphères chargées négativement au sein desquelles l'ADN est condensé. À l'inverse, des mesures de la fluorescence du BET en solution d'une solution d'ADN formulé en présence de Lutrol® n'ont pas révélé de diminution de la fluorescence même pour des concentrations de Lutrol® allant jusqu'à 11 mM (résultats non présentés). Ainsi, la persistance de l'efficacité de transfection, d'un gène rapporteur dans les poumons de souris, des complexes 704/ADN après une injection par aérosolisation s'expliquerait par la présence d'interactions plus fortes entre les tétrafonctionnalisés et l'ADN qui résisteraient au stress créé lors de l'aérosolisation.

La nouvelle classe de copolymères à blocs pour le transfert de gènes dans les poumons m'a permis de définir au cours de ma thèse un nouveau système de vectorisation synthétique efficace pour transférer un ADN plasmidique, non-toxique, non invasif, et administrable par une voie d'aérosolisation, et a permis de transférer les cellules épithéliales du parenchyme, des bronches et de la trachée. Désormais, nous envisageons de transférer le gène codant pour le canal CFTR dans des souris CFTR -/-.

Parmi les vecteurs synthétiques/acides nucléiques qui appartiennent à la classe des systèmes auto-assemblés certains chercheurs se sont intéressés à introduire des groupements sensibles au pH, ou aux potentiels redox, ou biodégradable. Par exemple, dans la classe des lipides cationiques, des groupements chimiques ont été introduit généralement au niveau du bras espaceur, qui relie la partie polaire et la partie hydrophobe entre elles. La présence de ce groupement pH-sensible au niveau du lipide a été introduite dans le but de faciliter la sortie des endosomes des complexes et d'accélérer le relargage de l'ADN dans le compartiment cytoplasmique (Fattal *et al.*, 1994 ; Medina-Kwaune *et al.*, 2005). Cependant, à ce jour aucune fonction de type pH-sensible n'a réellement apportée un changement significatif de l'efficacité de transfection d'un gène.

Pour les lipides cationiques présentant une fonction pH-sensible au niveau du bras espaceur, seule cette partie du lipide est clivée dans des conditions acides. C'est pourquoi nous avons pensé qu'un vecteur qui serait entièrement dégradé à pH acide apporterait des fonctions innovantes dans ce domaine. Nous avons trouvé que les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) étaient de très bon candidat pour ce type de synthèse. En effet, les HDL sont des matériaux constitués de feuillet hydroxydes inorganiques chargés positivement, entre lesquels s'intercalent des espèces anioniques (Rives, 2001). Les HDL sont des matériaux entièrement biodégradables à pH acide et des précédentes études ont montré qu'il était possible d'intercaler des macromolécules, comme de très petits fragments d'acides nucléiques, entre des feuillet inorganiques des HDL par la méthode d'échange d'ions (Wilson *et al.*, 1999 ; Leroux *et al.*, 2000 ; Cölfen *et al.*, 2003).

La troisième partie expérimentale de ma thèse a été consacrée au développement d'un nouveau matériau hybride HDL/ADN où les molécules d'ADN seraient intercalées entre les

feuillet des HDL. Dans le but d'obtenir un taux d'intercalation maximal, les matériaux hybrides ont été synthétisés par une méthode de co-précipitation. Ce type de synthèse fait appel au deuxième mode d'assemblage où l'ADN a été utilisé comme support de synthèse des HDL et a permis la formation *in situ* de feuillets inorganiques autour des molécules d'ADN. Nous avons tout d'abord procédé à l'optimisation des paramètres de synthèse : la température de synthèse, le type de métaux utilisé pour former le feuillet inorganique et le rapport molaire entre les métaux. Les résultats ont montré que les conditions de synthèse optimales correspondent à une température de réaction de 50°C pour des feuillets composés de magnésium et de gallium (Mg₂Ga). La synthèse des phases Mg₂Ga/ADN à différentes températures a permis de montrer que l'augmentation de la température de synthèse conduisait à une contraction de l'espace inter-feuillet. D'autre part, la meilleure organisation intralamellaire des feuillets Mg₂Ga a été obtenue pour une température de 50°C par la présence de quatre harmoniques de la famille cristallographique 003. Ensuite, les matériaux hybrides Mg₂Ga ont été synthétisés en utilisant différents rapports molaires Mg/Ga car les phases Mg₂Ga ont la particularité de pouvoir être synthétisés sur un large intervalle de R ($7 > R > 1,8$) (Lopez-Salina *et al.*, 1999). Les spectres de diffraction des phases ont montré que quelque soit le rapport molaire Mg/Ga initial (R = 2, 3, 4 et 5), le matériau hybride Mg₂Ga/ADN formé présente invariablement un R final compris entre 2 et 3. Par contre, en absence d'ADN, des précédentes études ont montré que le R final, des phases Mg₂Ga formées, concordait bien avec le R initial (Lopez-Salina *et al.*, 1999), ce qui montre que la présence d'ADN joue un rôle important dans la composition final des feuillets formés. D'autre part, par rapport aux matériaux hybrides Mg₂Fe/ADN et Mg₂Al/ADN, les phases Mg₂Ga/ADN sont les seules qui présentaient une structure cristalline bien définie, par la présence d'un rapport signal/bruit élevé, de plusieurs harmoniques du pic 003, et des pics de diffraction fins. De plus, en condition acide ce sont les phases Mg₂Ga/ADN qui ont permis de relarguer une plus grande quantité d'ADN. L'ensemble de ces résultats montrent que l'ADN joue un rôle important dans la synthèse par co-précipitation et les matériaux hybrides HDL/ADN les mieux définis et les mieux cristallisés ont été obtenus avec les phases Mg₂Ga/ADN. La souplesse des phases Mg₂Ga, qui peuvent être synthétisés à différents R, pourrait expliquer qu'elles sont les mieux adaptées pour une synthèse par co-précipitation en présence d'ADN.

Ensuite, les phases Mg₂Ga/ADN ont montré leur capacité d'internalisation dans des cellules en culture. L'internalisation a pu être observée pour des phases Mg₂Ga/ADN obtenues avec des fragments d'ADN de différentes tailles et également un ADN plasmidique. L'internalisation des phases Mg₂Ga/ADN se présente sous la forme d'un seul spot fluorescent par cellule proche de la membrane plasmique ou dispersés dans le cytoplasme. Ainsi, l'ensemble de ces résultats a montré qu'il était possible d'intercaler des molécules d'ADN de différentes tailles dans un matériau hybride constitué de feuillets inorganiques dont l'espace inter-feuillets est de 1.96 nm, ce qui correspond à un arrangement confiné de l'hélice d'ADN, orientée parallèlement aux feuillets. L'ADN intercalé dans ces feuillets est capable d'être libéré

des feuillets par hydrolyse totale des feuillets à pH acide. Ainsi, les matériaux hybrides ont un très fort potentiel pour le transfert de gène dans des cellules car ces matériaux sont entièrement dégradables dans des conditions acides.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de montrer qu'il n'existe pas un seul et unique vecteur synthétique capable de véhiculer tous les type d'acides nucléiques utilisés dans les expériences de transfection, et capable de transférer aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. La transfection d'acides nucléiques consiste donc à élaborer tout d'abord une molécule qui présente des fonctions chimiques adaptées au type de transfection et au mode d'administration. Ensuite, la caractérisation physico-chimique des complexes formés en présence d'acides nucléiques permet de définir des relations structure chimique/activité, nécessaires pour le développement de nouvelles molécules.

BIBLIOGRAPHIE

- Aartsma-Rus A., Bremmer-Bout M., Janson AAM, Dunnen J.T., Ommen G.B., Deutekom J.T. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromusc. Disorders*, 12, S71-S77, 2002.
- Abdallah B., Hassan A., et al. A powerful non-viral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain : Polyethylenimine. *Hum. Gene Ther.* 7(16), 1947-1954, 1996.
- Ahn C.H., Chae S.Y., Bae Y.H., Kim S.W. Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release*, 80, 273-282, 2002.
- Aiuti, A, Slavin, S, Aker, M, Ficara, F, Deola, S, Mortellaro, A, Morecki, S, Andolfi, G, Tabucchi, A, Carlucci, F, Marinello, E, Cattaneo, F, Vai, S, Servida, P, Miniero, R, Roncarolo, M. G, and Bordignon, C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, 296, 2410-2413, 2002.
- Akinc A., Anderson D.G., Lynn D.M., Langer R. Synthesis of poly(beta-amino ester)s optimized for highly effective gene delivery. *Bioconjug Chem.* 14(5), 979-988, 2003(b).
- Akinc A., Lynn D.M., Anderson D.G., and Langer R., Paralell synthesis and biophysical characterization of a degradable polymer library for gene delivery. *J Am Chem Soc*, 125, 5316-5323, 2003(a).
- Allen T.M., Hong K., Pahadjopoulos D. Membrane contact, fusion, and hexagonal (HII) transitions in phosphatidylethanolamine liposomes. *Biochemistry*, 29, 2976-2985, 1990.
- Anderson D.G., Akinc A., Hossain N., and Langer R. Structure/Property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters). *Mol Ther*, 11(3), 426-434, 2005.

-
- Anwer K., Bailey A., and Sullivan S.M. Targetted gene delivery : a two-pronged approach. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 17, 377-424, 2000.
- Auerbach A.B. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim. Pol.*, 51, 9-31, 2004.
- Baeurle PA, Huttner WB. Chlorate-a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141, 870-877, 1986.
- Bala I, Hariharan S, and Kumar R. PLGA nanoparticles in drug delivery : the stat of the art., *Crit. Rev. in Therapeutics Drug Carr Syst.* 21(5), 387-422, 2004.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281, 2004.
- Bartlett R.J., Stockinger S., Denis M.M., Bartlett W.T., Inverardi L., Le T.T., thi Man N., Morris G.E., Bogan D.J., Metcalf-Bogan J., and Kornegay J.N. In vivo targeted reparir of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat. Biotech.*, 18, 615-622, 2000.
- Beck SE, Laube BL, Barberena CI, Fischer AC, Adams RJ, Chesnut K, Flotte TR and Guggino WB. Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of rhesus macaques. *Mol Ther.*, 6, 546-554. 2002.
- Behr J.P. L'éponge à proton : un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé. *Med. Sci.*, 12(1), 56-59, 2002.
- Berh J.P., Demeneix B., Loeffler J.P., Mutul J.P., Efficient gene transfer into mammalian primary endocitne cells with lipopolyamine coated DNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 6982-6986, 1989.
- Belmont P, Aissaoui 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. Sep-Oct*;4(5):517-26, 2002.

-
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-366, 2001.
- Bertoni C., and Rando T.A. Dystrophin gene repair in mdx muscle precursor cells in vitro and in vivo mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Hum. Gen. Ther.*, 13, 707-718, 2002.
- Bevilacqua PC, et al. Binding of the protein kinase PKR to RNAs with secondary structure defects: role of the tandem A-G mismatch and noncontiguous helices. *Biochemistry*, 37, 6303-6316, 1998.
- Bieber T., Meissner W., Kostin S., Niemann A., Elsasser H.P. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J. Controlled Release*, 82, 441-454, 2002.
- Blessing T., Remy J.C., Behr J.P., Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus like particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 1427-1431, 1998.
- Bloomfield V.A. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers, Review*, 44(3), 269-282, , 1997.
- Bohl D. Comment régler simultanément l'expression de deux gènes par le système tétracycline ?. *Medicines Sciences*, 5(15), 1999.
- Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasler K., Fleckenstern B., Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41, 5, 521-530, 1985.
- Boukhnikachvili T., Aguerre-Chariol O., Airiau M., Lesieur S., Ollivon M., Vacus J. Structure of in-serum transfecting DNA-cationic lipid complexes. *FEBS Lett*, 409, 188-194, 1997.
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7297-301, 1995.

- Breaker RR, and Joyce GR. A DNA enzyme with Mg(2+)-dependent RNA phosphoesterase activity. *Chem Biol.* 1995 Oct;2(10):655-60.
- Bridge A.J., Pebernard S., Ducraux A., Nicoulaz A.L., Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genet.* 34, 263-264, 2003;
- Brummelkamp T.R., Bernards R., Agani R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296, 550-553, 2002;
- Brunner S., Furtbauer E., et al.. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo : Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(16), 7297-7301, 1995.
- Brunner et al.. Overcoming the nuclear barrier : cell cycle independant nonviral gene tranfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol. Ther.*, , 5, 80-86, 2002.
- Bruscia E, Sangiuolo F, Sinibaldi P, Goncz KK, Novelli G, Gruenert DC. Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting. *Gene Ther.* 2002 Jun;9(11):683-5.
- Buchsacher G.L. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 26, 1-11, 2001.
- Budker V., Budker T., Zhang G., Subbotin V., Loomis A., Wolff JA.. Hypothesis : naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J. Gene Med.*, 2, 76-88, 2000.
- Capecchi M.R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22, 7380-7384, 1980.
- Carmell M.A., Hannon G.J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Structu. Mol. Biol.*, 11, 214-218, 2004.
- Carmen I.H. A death in a laboratory : the politics of the Gelsinger aftermath. *Mol. Ther.*, 3, 425-428, 2001.

-
- Caudy A.A., Myers M., Hannon G.J., Hammond S.M. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.*, 16, 2491-2496, 2002.
- Cavaillé J. Des microARN comme s'il en pleuvait... *Medecines Sciences*, 20(4), 2004.
- Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., Yates F., de Villartay J.P., LeDeist F. and Fisher A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J. Gene Med.*, 3, 201-206, 2001.
- Chang SF, Chang HY, Tong YC, Chen SH, Hsaio FC, Lu SC, Liaw J. Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther.* 15(5):481-93, 2004.
- Chen Z. and Rand R.P. The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophys J.*, 73(1), 267-276, 1997.
- Chittimalla C., Zammuto-Italiano L., Zuber G. and Behr J.P., Monomolecular DNA nanoparticles for intravenous delivery of genes. *J Am Chem Soc*, 127, 11436-11441, 2005.
- Chiu Y.L., Rana T.M. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell.*, 10, 549-561, 2002.
- Choi Y.H., Liu F., Kim J.S., Choi Y.K., Park J.S., Kim S.W. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J. Control. Release* (54), 39-48, 1998.
- Choy JH, Kwak SY, Park JS, Jeong YJ, Portier J. Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphate and DNA in layered metal hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1399-1400, 1999.
- Cohen A.W., Hnasko R., Schubert W., Lisanti M.P. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol. Rev.*, 84, 1341-1379, 2004.
- Cölfen H, Mann S. High-Order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 2350-2365, 42, 2003.

-
- Colosimo A., Guida V., Palka G. and Dallapiccola. Extrachromosomal genes : a powerful tool in gene targeting approaches. *Gen. Ther.*, 9, 679-682, 2002.
- Conner S.D., and Schmid S.L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44, 2003.
- Csaba N., Caamaño P., Sanchez A., Dominguez F. and Alonso M.J., PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend particles : new carriers for gene delivery. *Biomacromolecules*, 6, 271-278, 2005.
- Czauderna F., Fechtner M., Dames S., Aygun H., Klippel A., Prenek G.J., Giese K., Kaufmann J. *Nucleic Acids Res.*, 31, 2705, 2003.
- Danielsen S, Maurstad G, Stokke BT. DNA-polycation complexation and polyplex stability in the presence of competing polyanions. *Biopolymers*. 2005 Feb 5;77(2):86-97.
- Dauty E., Behr J.P., Remy J.S, Development of plasmid and oligonucleotide nanometric particles. *Gen Ther*, 9, 743-748, 2002(a).
- Dauty E., Remy J.S., Blessing T., Behr J.P, Dimerizable cationic detergent with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture. *J Am Chem Soc*, 123, 9227-9234, 2001;
- Dauty E., Remy J.S., Zuber G. Berh J.P., Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor, *Bioconjug Chem*, 13, 831-839, 2002.
- Davda J, Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm*. 21;233(1-2):51-9, 2002.
- Dehecchi M.C., Tamamini A., Bonizzato A. Cabrini G. Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology*, 268, 382-390, 2000.
- Demeneix B., Hassani Z., and Berh J.P. Towards multifunctional synthetic vectors. *Curr. Gene Ther.*, 4, 2004.

-
- Demeneix B. and Behr J.P., Polyethylenimine (PEI). *Adv Gen*, 53, 217-230, 2005.
- Devaux P.F. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21, 417-439, 1992.
- Dias N and Stein CA. Antisens oligonucleotides : basic concepts and mechanisms. *Mol Canc. Ther. A*, 347-355, 2002.
- Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.*, 17, 438-42, 2003.
- Dufès C., Uchegbu I.F., Schätzlein A.G., Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 2177-2202, 2005.
- Dunlap D.D., Magi A., Soria M.R., Monaco L., Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res*, 25, 3095-3101, 1997.
- Dunne M., Bibby D.C., Jones J.C., Cudmore S., Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. *J Control Release*, 92(1-2), 209-19, 2003.
- Edelman G.M., R. Meech, G.C. Owens, F.S. Jones, Synthetic promoter elements obtained by nucleotide sequence variation and selection for activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3038– 3043, 2000.
- Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26, 199-213, 2002.
- Elmen J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Orum H., Koch T., Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.*, 33, 439-47, 2005.

- Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, and Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery : biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm. Res.*, 15(9), 1998.
- Erbacher P., Remy JS, and Behr JP. Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther.*, 6(1), 138-145, 1999.
- Fabre EE, Bigey P, Orsini C, Scherman D. Comparison of promoter region constructs for in vivo intramuscular expression. *J Gene Med.* 8(5), 636-45, 2006.
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11650, 2000.
- Farhood H, Bottega R, Epand RM, Huang L. Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. *Biochem. Biophys. Acta* 1111, 239-246, 1992.
- E. Fattal, S. Nir, R.A. Parente, F.C. Szoka Jr., Pore-forming peptides induce rapid phospholipid flip-flop in membranes, *Biochemistry* 33, 6721– 6731, 1994.
- Felgner P.L., Gadeck T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., *et al.*. Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(21), 7413-7417, 1987.
- Ferrari, S., Moro, E., Pettenazzo, A., Behr, J.P., Zacchello, F., And Scarpa, M. ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 4, 1100-1106, 1997.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-, 1998.
- Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsässer H.P. and Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine : effect of

- molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm. Research*, 16 (8), 1999.
- Fisher A., Hacein-Bey S. and Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 615-621, 2002.
- Fisher AC, Beck SE, Smith CI, Laube BL, Askin FB, Guggino SE, Adams RJ, Flotte TR, and Guggino WB. Successful transgene expression with serial doses of aerosolized rAAV2 vectors in rhesus macaques. *Mol. Ther.*, 8, 918-926, 2003.
- Fraley R., Subramani S., Berg P. and Papahadjopoulos D., Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem*, 255 (21), 10431-10435, 1980.
- Francois B, Russell RJ, Murray JB, Aboul-ela F, Masquida B, Vicens Q, Westhof E. Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res.* 33(17):5677-90, 2005.
- Friend D.S., Papahadjopoulos D. and Debs R.J. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposome. *Biochim. Biophys. Acta*, 1278(1), 41-50, 1996.
- Gao X. and Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.*, 2(10), 710-722, Review, 1995.
- Gao X., Huang L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 30;179(1):280-5, 1991.
- Gill D.R., S.E. Smyth, C.A. Goddard, I.A. Pringle, C.F.Higgins, W.H. Colledge, S.C. Hyde, Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter, *Gene Ther.* 8, 1539– 1546, 2001.
- Glasser SW, Burhans MS, Eszterhas SK, Bruno MD, Korfhagen TR. Human SP-C gene sequences that confer lung epithelium-specific expression in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278(5):L933-45, 2000.

- Godbey WT, Wu KK, and Mikos AG. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J. Control. Release*, 60(2-3), 149-160, 1999.
- Golan R, Pietrasanta LI, Hsieh W, and Hansma HG. DNA toroids : stage in condensation. *Biochemistry*, 38, 14069-14076, 1999.
- Goncz K.K., Colosimo A., Dallapiccola B., Gagne L., Hong K., Novellu G., Papahadjopoulos D., Sawa T., Schreier H., Wiener-Kronish J., *et al.* Expression et Δ F508 CFTR in normal mouse lung after site- spécifique modification of CFTR sequences by SFHR. *Gene Ther.*, 8, 961-965, 2001.
- Goncz K.K., Kunzelmann K., Xu Z., Gruenert D.C. Targeted replacement of normal and mutant CFTR sequences in human air-way epithelial cells using DNA fragments. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1913-1919, 1998.
- Gordon J.W., Seangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 12, 7380-7384, 1980.
- Goula D., Benoist C., Mantero S., Merlo G., Levi G., Demeneix B.A. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther.*, 5(9), 1291-5, 1998(b).
- Goula D., Remy J.S., Erbacher P., Wasowicz M., Levi G., Abdallah B., Demeneix B.A. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther.*, 5(5), 712-717, 1998(a).
- Goyenvallé A., Vulin A., Fougèrouse F., Leturcq F., Kaplan J.C., Garcia L., Danos O. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science*, 306, 1796-1799, 2004.
- Greenland J.R., Liu H., Berry D., Anderson D.G., Kim W.K., Irvine D.J., Langer R., Letvin N.L., β -amino-esters polymers facilitate in vivo DNA transfection and adjuvant plasmid DNA immunization. *Mol Ther*, 12, 164-170, 2005.

-
- Gruenert D.C., Bruscia E., Novelli G., Colosimo A., Dallapiccola B., Sangiuolo F., and Goncz K.K. Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments. *J. Clin. Invest.*, 112(5), 2003.
- Gruenert D.C. Gene correction with small DNA fragments. *Curr. Res. Molec. Ther.*, 607-613, 1998.
- Gruenert D.C. Opportunities and challenges in targeting genes for therapy. *Gene Ther.*, 6, 1347-1348, 1999.
- Grünweller A. and Hartmann R.K. RNA Interference as a gene-specific approach for molecular medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 3143-3161, 2005.
- Guzman LA, Labhasetwar V, Song C, Jang Y, Lincoff AM, Levy R, Topol EJ. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles. A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation*. Sep 15;94(6):1441-8, 1996.
- Haensler J., Szoka F.C. Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem*. Sep-Oct;4(5):372-9, 1993.
- Hafez IM, Cullis PR. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. Apr 25;47(2-3):139-48. Review, 2001.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.*, 286(5441), 950-2, 1999.
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*. Feb;2(2):110-9, 2001.
- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J., An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293-296, 2000.
- Hao T., McKeever U., Hedley M.L., Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA. *J Control Release*, 69(2), 249-259, 2000.

- Harper G.R., Davies M.C., Davis S.S., Tadros T.F., Taylor D.C., Irving M.P., and Waters J.A. Steric stabilization of microspheres with grafted polyethylene oxide reduces phagocytosis by rat Kupffer cells in vitro. *Biomaterials.*, 12, 695-700, 1991.
- Hartikka J., Sukhu L., Buchner C., Hazard D., Bozoukova V., Margalith M., Nishioka W.K., Wheeler CJ, Manthorp M, and Sawdey M. Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle : plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol. Ther.*, 4, 407-415, 2001.
- Hawley-Nelson P., Ciccarone V., Gebeyehu G., Jessee J., Felgner P.L. LipofectAMINE^M reagent: a new higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus* 15:73-79, 1993.
- Hirsch-Lerner D., Zhang M., Eliyahu H., Ferrari M.E., Wheeler C.J., Barenholz Y., Effect of “helper lipid” on lipoplexes electrostatics. *Biochim Biophys Acta*, 1714, 71-84, 2005.
- Hoffmann A, Zakbartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol. Reprod.*, 71, 405-409, 2004.
- Howell DP, Krieser RJ, Eastman A, and Barry MA. Deoxyribonuclease II is a lysosomal barrier to transfection. *Mol. Ther.*, 8, 957-963, 2003.
- Hughes G.A., Nanostructure-mediated drug delivery, *Nanomed : Nanotech. Biol. Med.*, 1, 22-30, 2005.
- Hwang S.J., and Davis M.E. cationic polymers for gene delivery : designs for overcoming barriers to systemic administration. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3, 183-191, 2001.
- Ilies M.A., Seits W.A. and Balabam A.T. Cationic lipids in gene delivery : principles, vector design and therapeutical applications. *Curr. Phar. Des.*, 8, 2441-2473, 2002.
- Imler J.M., Reichhart J.M. Immunité innée : deux recepteurs pour detecter l'ADN bactérien. *Med. Sci.*, 17, 510-512, 2001.

- Jain S., Vyas S.P., Mannosylated niosomes as carrier adjuvant system for topical immunization. *J Pharm Pharmacol*, 57(9), 1177-84, 2005.
- Jayankura M., Boggione C., Frisen C., Boyer O., Fouret P., Saillant G., and Klatzmann D. In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J. Gene Med.*, 5, 618-624., 2003.
- Jones D.H., Corris S., McDonald S., Clegg J.C.S and Farrar G.H, Poly(D,L-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine*, 15(8), 814-817, 1997.
- Kabanov A, Zhu J, and Alakhov V. Pluronic block copolymers for gene delivery. *Adv. Genetics*, 53, 231-261, 2005.
- Kabanov AV and Kabanov VA,. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconj. Chem.*, 6, 7-20, 1995.
- Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Control. Release*, 82, 189-212, 2002.
- Kang CH, Lee M, and Bae YH. Polymeric Gene Carriers. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 15(4), 317-342, 2005.
- Kaspa RM, Quigley A, Lynch GS, Steeper K, Kornberg AJ, Gregorevic P, *et al.* *In vivo* and *in vitro* correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum. Gen. Ther.*, 12, 629-642, 2001.
- Kaspa RM, Quigley AF, Vadolas J, Steeper K, Ioannou PA, Byrne E et al. Targeted gene correction into the mdx mouse using short DNA fragments : towards application with bone marrow-derived cells for autologous remodeling of dystrophic muscle. *Gene Ther.*, 9, 695-699, 2002.
- Katayose S, and Kataoka K. Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconj. Chem.*, 8, 702-707, 1997.

- Katoaka K., Togawa H., Harada A., Yasugi K., Matsumoto T., and Katayose S. Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic polymer in physiological saline. *Macromolecules*, 29, 8556-8557, 1996.
- Kay M.A., Glorioso J.C., and Naldini L. Viral vectors for gene therapy : the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.*, 7, 33-40, 2001.
- Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Bichwald M., Tsui L.C. Identification of the cystic fibrosis gene : genetic analysis. *Science*, 245, 1073-1080, 1989.
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 209-216, 2003.
- Kichler A., Leborgne C., Coeytaux E., Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery : a mechanistic study. *J. Gene Med.*, 3, 135-144, 2001.
- Kim V.N., MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 6, 376, 2005.
- Kim Y.H., Gihm S.H. and Park C.R., Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier. *Bioconjugate Chem*, 12, 932-938, 2001.
- Kircheis R, Schuller S, Brunner S, Ogris M Heider KH, Zauner W, and Wagner E. Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J. Gene Med.*, 1, 111-120, 1999.
- Kircheis R., Wightman L., Wagner E., Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Delivery Rev*, 53, 341-358, 2001(a).
- Kircheis R., Leborgne C., Coeytaux E., Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery : A mechanistic study. *J Gene Med.*, 3(2), 111-120, 2001(b).

- Kircheis R., Wightman L., Schreiber A., Robitza B., Rossler V., Kursa M., and Wagner E. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferring target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.*, 8, 28-40, 2001(c).
- Koltover I., Salditt T., Radler J.O., Safinya C.R., An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, 281, 78-81, 1998.
- Kosuga M., Enosawa S., Li X.K., Suzuki S., Matsuo N., Yamada M., Ray-Chowdury J., Koiwai O., Okuyama T. Strong long-term transgene expression in rat liver using chicken betaactin promoter associated with cytomegalovirus immediate-early enhancer (CAG promoter). *Cell Transplant.*, 9, 675-680, 2000.
- Kreiss P., Schermann D. Optimisation des plasmides et des vecteurs synthétiques pour la thérapie génique. *Méd. Sci.*, 15, 669-676, 1999.
- Krieg A.M., The role of CpG motifs in immediate immunity. *Curr Opin Immunol*, 12, 35-43, 2000.
- Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA, Baker JR Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;93(10):4897-902, 1996.
- Kunath K., Harpe A., Fischer D., Petersen H., Bickel U., Voigt K., Kissel T., Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery : comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release*, 89, 113-125, 2003.
- Kwoh D.Y., Coffin C.C., Lollo C.P., Jovenal J., Banaszczyk M.G., Mullen P., Phillips A., Amini A., Fabrycki J., Bartholomew R.M., Brostoff S.W., Carlo D.J. Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver. *Biochim Biophys Acta*, 1444, 171-190, 1999.

- Labat-Moleur F., Steffan A.M., Brisson C., Perron H., Feugeas O., Furstenberger P., Oberling F., Brambilla E., Behr J.P. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther.* Nov;3(11):1010-7, 1996.
- Labhasetwar V, Song C, Humphrey W, Shebuski R, Levy RJ. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications. *J Pharm Sci.* 1998 Oct;87(10):1229-34.
- Lai C.M., Lai Y.K., and Rackoczy P.E. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell. Biol.*, 21, 895-913, 2002.
- Lasic, D.D. Strey, H. Stuart, M.C.A. Podgornik, R., and Frederik, P.M.. The structure of DNA-liposome complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 832–833, 1997.
- Layzer J.M., McCaffrey A.P., Tanner A.K., Huang Z., Kay M.A., Sullenger B.A. *RNA*, 10, 766, 2004.
- Lechardeur D., Sohn K.J., Haardt M., Joshi P.B., Monck M., Graham R.W., Beatty B., Squire J., O'Brodovich H., Luckas G.L. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol : a potential barrier to gene transfer. *Gen. Ther.*, 6(4), 482-497, 1999.
- Leclercq F., Dubertret C., Pitard B., Scherman D., Herscivici J., Synthesis of glycosylated polyethylenimine with reduced toxicity and high transfecting efficiency. *Bioorg Med Chem Letters*, 10, 1233-1235, 2000.
- Lee C.C., MacKay J.A., Frechet J.M. and Szoka F.C., Designing dendrimers for biological applications. *Nature Biotechnology*, 23(12), 1517-1526, 2005.
- Lee E.R., Marshall J., Siegel C.S., Jiang C., Yew N.S., Nichols M.R., Nietupski J.B., Ziegler R.J., Lane M.B., Wang K.X., Wan N.C., Scheule R.K., Harris D.J., Smith A.E., Cheng S.H. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum. Gene Ther.*, Sep 10;7(14):1701-17, 1996.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochromic gene *lin-4* encodes small RNA with antisens complementary to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854, 1993.

- Lee J, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MiRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21, 4663, 2002.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 25;425(6956):415-9, 2003.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*,13;23(20):4051-60, 2004.
- Lee M, Kim SW. Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharm. Res.*, , 22, 1-10, 2005.
- 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*, (11), 986-91, 2000.
- Leroux F, Gachon J, Besse JP. Biopolymer immobilization during the crystalline growth of layered double hydroxide. *J. Solid. State Chem.*, 177, 245-250, 2004.
- Li X., E.M. Eastman, R.J. Schwartz, R. Draghia-Akli, Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences, *Nat. Biotechnol.* 17 241–245, 1999.
- Liaw J., Chang S.F. and Hsiao F.C., In vivo gene delivery into ocular tissues y eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)- poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles. *Gene Ther*, 8, 999-1004, 2001.
- Liu F, Huang L. Improving plasmid DNA-mediated liver gene tranfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature. *J Gene Med.*, 3, 569-576, 2001.
- Liu G, Molas M, Grossmann GA, Pasumarthy M, Perales JC, Cooper MJ, and Hanson RW. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J. Biol. Chem.*, 276(37), 34379-34397, 2001.

- Liu W.G., Yao K.D., Chitosan and its derivatives-a promising non-viral vector for gene transfection. *J Control Release*, 83, 1-11, 2002.
- Liu D, Ren T and Gao X. Cationic transfection lipids. *Curr. Med. Chem*, 10, 1307-1315, 2003.
- Lopez-Salina E, Garcai-Sanchez M, Ramon-Garcia ML, Schiffer J. *J. Am. Chem. Soc.* 15, 265-279, 1999.
- Lu QL, Bou-Gharios G, and Partridge TA.. Non-viral gene delivery in skeletal muscle : A protein factory. *Gene Ther.*, 10, 131-142, 2003.
- Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, Fletcher S, Partridge TA, Wilton SD. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med.* Aug;9(8):1009-14, 2003.
- Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, Yokota T, Yin H, Alter J, Jadoon A, Bou-Gharios G, Partridge T. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 4;102(1):198-203, 2005.
- Lynn D.M., Anderson D.G., Putnam D., and Langer R., Accelerate discovery of synthetic transfection vectors : parallel synthesis and screening of a degradable polymer library. . *J Am Chem Soc*, 123, 8155-8156, 2001.
- 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, McIntosh TJ. *Biophys J*; 77:2612-2629, 1999.
- Mahato R, Kawabata K, Nomura T, Takakura Y and Hashida M. Physicochemical and pharmacokinetics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. *J. Pharm. Sci.*, 84, 1267-1271, 1995.
- Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, Lloyd F, Fletcher S, Morgan JE, Partridge TA, and Wilton SD. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 98(1), 42-47, 2001.

-
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. *Cell*, 110, 563, 2002.
- Maruyama A, Katoh M, Ishihara T, and Akaike T.. Comb-type polycations effectively stabilize DNA triplex. *Bioconj. Chem.*, 8, 3-6, 1997.
- Maskarinec SA, Hannig J, Lee RC, and Lee KY. Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys.* 82, 1453-1459, 2002.
- McCloy G., Fletcher S and Wilton S. Splicing intervention for Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Pharm.*, 5, 529-534, 2005.
- McLachlan G, Davidson DJ, Stevenson BJ, Dickinson P, Davidson-Smith H, Dorin JR, and Porteous DJ. Evaluation in vitro and in vivo of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. *Gene Ther.*, 2(9), 614-622, 1995.
- Medina-Kauwe LK, Xie J, and Hamm-Alvarez S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther*, 12, 1734-1751, 2005.
- Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer : improving the kinetics of gene delivery in cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 733-753, 2005.
- Mel'nikova Y.S.; Mel'nikov S.M.; Lofroth J.-E. Physico-chemical aspects of the interaction between DNA and oppositely charged mixed liposomes. *Biophys. Chem.*, 125-141,(17), 1999.
- Merdan T, Kunath K, Petersen H, Bakowsky U, Voigt KH, Kopecek J et al.. PEGylation of poly(ethylenimine) affects stability of complexes with plasmids DNA under in vivo conditions in a dose-dependent manner after intravenous injection in to mice. *Bioconjug. Chem.*, 16, 785-792, 2005.
- Miclick KA, Baldeschwieler JD, Kayyem JF, Meade TJ. Transfection of folate-polylysine DNA complexes : evidence for lysosomal delivery. *Bioconjugate Chem.*, 6, 512-515, 1995.

-
- Miller AD. The problem with cationic liposomes/micelle-based non-viral vector system for gene therapy. *Curr. Med. Chem.*, 10, 1195-1211, 2003.
- Miller MW. Gene transfection and drug delivery. *Ultrasound Med. Biol.*, 26, 59-62, 2000.
- Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 93, 12349-12354, 1996.
- Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet.* 5(5):355-65, 2004.
- Mohamed F., van der Walle C.F., PLGA microparticles with novel dimpled surfaces for pulmonary delivery of DNA. *Int J Pharm*, 311(1-2), 97-107, 2006.
- Moradpour D, Schauer JJ, Zurawski VR Jr, Wands JR, Boutin RH. Efficient gene transfer into mammalian cells with cholesteryl-spermidine. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 5;221(1):82-8, 1996.
- Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, Jensen K, Lockrige JA, Dickinson B, McSwiggen JA, Vargaese C, Bawman K, Shaffer CS, Pilisky BA, Zinnen S. . *Hepatology*, 2005.
- Moss EG and Taylor JM. Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nature Cell Biology*, 5(9), 771-772, 2003.
- Mounkes LC et al., Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *J Biol. Chem.*, 273, 26164-26170, 1998.
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield Fr. Endocytosis. *Physiol Rev.*, 77, 759-803, 1997.
- Mumper R.J., Wang J., Claspell J.M., Rolland A.P., Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc Intl Sym Controlled Rel Bioact Mater*, 2, 178-179, 1995.
- Mumper RJ, Wang J, Klakamp SL, Nitta H, Anwer K, Tagliaferri F, and Rolland AP.. Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *J. Contr. Release*, 52, 191-203, 1996.

-
- Neu M, Fischer D, Kissel T, Recent advances in rational gene transfer vector design based on polyethylenimine and its derivatives. *J. Gene Med.*, 7, 992-1009, 2005.
- Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guerin N, Paridis G, Bronich TK, Alakhov VY, and Kabanov AV.. Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther.*, 7, 126-138, 2000.
- Niïdome T and Huang L. Gene therapy progress and prospects : nonviral vectors. *Gene Ther.*, , 9, 1647-1652, 2002.
- Nimesh S., Goyal A., Pawar V., Jayaraman S., Kumar P., Chaandra R., Singh Y., Gupta K.C., Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. *J Control Release*, 110, 457-468, 2006.
- Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107, 309-321, 2001.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 12(4):417-35, 2006.
- Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis E, Wagner E. The size of DNA/transferring-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* 5, 1425-1433, 1998.
- Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, and Wagner E. PEGylated DNA/Transferrin-PEI complexes : reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.*, 6, 595-605, 1999.
- Ogris M, Wagner E, and Steinlein P.. A versatile assay to study cellular uptake of gene transfer complexes by flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1474, 237-243, 2000.
- Oster C.G., Wittmar M., Bakowsky U., Kissel T., DNA nano-carriers from biodegradable cationic branched polyesters are formed by a modified solvent displacement method. *J Control Release*, 111(3), 371-81, 2006.

- Oupicky D, Ogris M, Howard KA, Dash PR, Ulbrich K, Seymour LW. Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation. *Mol. Ther.*, 5, 463-472, 2002.
- Ouyang M., Remy J.S., Szoka F.C., Controlled template-assisted assembly of plasmid DNA into nanometric particles with high DNA concentration. *Bioconjug. Chem*, 121, 104-112, 2000.
- Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 16(10):1217-26, 2002.
- Panyam J, Labhasetwar V.. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. 25, 329-347, 2003.
- Parton RG, Richards AA. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis : new insights and common mechanisms. *Traffic*, 4, 724-738, 2003.
- Pelkmans L and Helenius A. Endocytosis via caveolae., *Traffic*, 3, 311-320, 2002.
- Perez C, Sanchez A, Putman D, Ting D, Langer R, Alonso MJ.. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J. Control. Release*, 75, 211-224, 2001.
- Pitard B, Aguerre O, Airiau M, Lachag'és AM, Boukhnikachvili T, Byk G, Dubertret C, Herviou C, Scherman D, Mayaux JM, Crouzet J. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:14412-14417, 1997.
- Pitard B., Oudhriri N., Vigneron J.P., Hauchecorne M., Aguerre O., Toury R., Airiau M., Ramasawmy R., Scherman D., Crouzet J., Lehn J.M., Lehn P., Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 2621-2626, 1999.
- Pitard B, Oudhriri N, Lambert O, Vivien E, Masson C, Wetzter 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.* Sep-Oct;3(5):478-87, 2001.
- Pitard B. Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat Cell Mol Genet*, 27, 5-15, 2002.
- Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin JT, 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.* Sep 20;13(14):1767-75, 2002.
- 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 nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res.* Nov 16;32(20):e159, 2004.
- Pouton CW, Luca P, Thomas BJ, Uduchi AN, Milroy DA, Moss SH. Polycation-DNA complexes for gene delivery : a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J. Controlled Release*, 53, 189-199, 1998.
- Prabha S., Zhou W.Z., Panyam J., Labhasetwar V., Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm*, 244(1-2), 105-15, 2002.
- Pratten MK and Lloyd JB. Pinocytosis and phagocytosis : the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by a rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 881(3), 307-313, 1986.
- Rädler O.J., Koltover I., Salditt T., Safinya C.R., Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 275, 810-814, 1997.
- Rando TA, Disatnik MH, and Zhou LZH. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, , 97(10), 5363-5368, 2000.

- Rando TA. Oligonucleotide-mediated gene therapy for muscular dystrophies. *Neur. Disorders*, 12, S55-S60, 2002.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-906, 2000.
- Ren T, Zhang G, and Liu D. Synthesis of galactosyl compounds for targeted gene delivery. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 2969-2978, 2001.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 22(3):326-30, 2004.
- 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 Nov;16(11):1318-24 (a).
- 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*, 7(1), 80-6, 2005 (b).
- Riera M, Chillon M, Aran JM, Cruzado JM, Torras J, Grinyo JM, Fillat C., Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J Gene Med*, 6(1), 111-8. 2004.
- Rives V, Layered Double Hydroxide : synthesis and post-synthesis modifications. In *Layered double hydroxides: present and future*. Nova Science Publishers, New York, 2001.
- Rolland AP, and Mumper RJ.. Plasmid delivery to muscle : recent advances in polymer delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 30, 151-172, 1998.
- Roth CM, and Sundaram S. Engineering synthetic vectors for improved DNA delivery : insights from intracellular pathways. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 6, 397-426, 2004.

-
- Ruitenbergh MJ, Eggers R, Boer GJ, and Verhaagen J. Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery : application in disorders and trauma of the central nervous system. *Methods*, , 21, 895-913, 2002.
- Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinylalcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release*, 82, 105-114, 2002.
- Sainlos M., Transfert de genes à l'aide de substances bioactives. Thèse de doctorat de l'université de Paris 6, 6 Juillet, 2004.
- Sainlos M., Hauchecorne M., Oudrhiri N., Zertal-Zidani S., Aissaoui A., Vigneron JP., Lehn JM., Lehn P. Kanamycin A-derived cationic lipids as vectors for gene transfection. *Chembiochem*. Jun;6(6):1023-33, 2005.
- Sakurai F, Inoue R, Nishino Y, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression. *J Control Release* Oct 3;69(1):219-20, 2000.
- Sanguiollo F, Bruscia E, Serafino A, Nardone AM, Bonifazi E, Lais M, Gruenert DC and Novelli G. In vitro correction of cystic fibrosis epithelial cell lines by small fragment homologous replacement (SFHR) technique. *BMC Medical Genetics*, 3, 2002.
- Santoro SW and Joyce GF. Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry* 37, 13330-13342, 1998.
- Sato H, Hattori S, Kawamoto S, Kudoh I, Hayashi A, Yamamoto I, Yoshinari M, Minami M, Kanno H. In vivo gene gun-mediated DNA delivery into rodent brain tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 2;270(1):163-70.
- Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kreger A, Gansbacher B, Plank C. Magnetofection : enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther.*, 9(2), 102-109, 2002.

-
- Scherrer LJ and Rossi J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnology*, 21(12), 2003.
- Schmutz M, Durand D, Debin A, Palvadeau, Y, Etienne A, Thierry AR. DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:12293-12298, 1999.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 17;115(2):199-208, 2003.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Moll.Cell.*, 10, 537, 2002.
- Shih IH, Been MD. Ribozyme cleavage of a 2,5-phosphodiester linkage: mechanism and a restricted divalent metal-ion requirement. *RNA*. 5(9):1140-8, 1999.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biol.*, 5, 834-839, 2003.
- Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):173-8
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 67:227-64, 1998.
- Sebestyen MG, Budker VG, Budker T, Subbotin VM, Zhang G, Monahan SD, Lewis DL, Wong SC, Hagstrom JE, Wolff JA. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med*. 8(7):852-73, 2006.

-
- Sternberg B, Sorgi FL, Huang L. New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett.* Dec 19;356(2-3):361-6, 1994.
- Svenson S., Tomalia D.A., Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 2106-2129, 2005.
- Szoka F, Papahadjopoulos Jr. & D, "Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)", *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467-508, 1980.
- Szoka F. and Papahadjopoulos D., Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75(9), 4194-4198, 1978.
- Tang MX, Li W, Szoka FC Jr. Toroid formation in charge neutralized flexible or semi-flexible biopolymers : potential pathway for assembly of DNA carriers. *J. Gene Med.*, 7, 334-342, 2005.
- Tang MX, Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 1997 Aug;4(8):823-32.
- Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, Pavlakis GN. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol.* Jul;15(7):647-52, 1997.
- Thorpe P, Stevenson BJ and Porteous DJ. Optimising gene repair strategies in cell culture. *Gen. Ther.*, 9, 700-702, 2002.
- Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306, 1377, 2004.
- Trubetsky V.S., Budker V.G., Hanson L.J., Slattum P.M., Wolff J.A., Hagstrom J.E., Self-assembly of DNA-polymer complexes using template polymerization. *Nucleic Acids Res*, 26(18), 4178-4185, 1998.

- Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations mutations. *Trends in Genet*, 8, 392-398, 1992.
- 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.*, 2, 32-40, 2000.
- Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K, Matsuyama N, Niki R, Ikeda JE, Imai H. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res.*, 10(6), 577-582, 2001.
- Uchida T. Introduction of macromolecules into mammalian cells by cell fusion. *Exp Cell Res. Sep*;178(1):1-17. Review, 1988.
- Vandervoort J, Ludwig A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles : a factorial design study. *Int. J. Pharm.*, 238, 77-92, 2002.
- Verbaan FJ, Oussoren C, Dam IM, Takakura Y, Hashida M, Crommelin DJ, Hennink WE, and Storm G.. The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. *Int. J. Pharm.*, 214, 99-101, 2001.
- 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 U S A. Sep 3*;93(18):9682-6, 1996.
- Vinogradov SV, Bronich TK, and Kabanov AV.. Self-assembly of polyamine-poly(ethylene glycol) copolymers with phosphorothioate oligonucleotides. *Bioconj. Chem.*, 9, 805-812, 1998.
- Vyas S.P., Singh R.P., Jain S., Mishra V., Mahor S., Singh P., Gupta P.N., Rawat A., Dubey P., Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *Int J Pharm*, 296(1-2), 80-6, 2005.

-
- Wagner E, Cotton M, Foisner R, and Birnstiel ML. Transferrin-polycation-DNA complexes : the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 4255-4259, 1991.
- Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotton M, Birnstiel ML. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-Terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferring-polylysine-DNA complexes : toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 89. 7934-7938, 1992.
- Wang D., Robinson D.R., Kwon G.S., Samuel J., Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery. *J Control Release,* 57(1), 9-18, 1999.
- Watanabe Y, Nomoto H, Takezawa R, Miyoshi N and Akaike T. Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposomes : an application for immunization. *J. Biochem.,* 116(6), 1220-1226, 1994.
- Waterhouse PM, Wang MB Finnegan EJ. Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant. Sci.,* 7, 297, 2001.
- Wattiaux R, Laurent N, Wattiaux-De Coninck S, Jadot M. Endosomes, lysosomes : their implication in gene transfer. *Adv. Drug. Deliv. Rev.,* 41, 210-208, 2000.
- Whittaker GR. Virus nuclear import. *Virus nuclear import. Adv. Drug Deliv. Rev.,* 55, 733-747, 2003.
- Wiethoff CM and Middaugh CR. Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.,* 92(2), 203-217, 2003.
- Wightman L, Kircheis R, et al.. Different behavior of branched and linear polyethylenimine of polyethylenimine/DNA complexes. *Mol. Ther.* 3(5), 658-664, 2001.
- Wilson OC, olorunyolemi T, Jaworski A, Borum L, Young D, Siriwat A, Dickens E, Oriakhi C, Lerner M. Surface and interfacial properties of polymer-intercalated layered double hydroxide nanocomposites. *Appl. Clay. Sci.,* 15, 265-279, 1999.

- Wolfert MA, and Seymour LW.. Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther.*, 3, 269-273, 1996.
- Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, Oupicky D, Seymour LW, Smart S, Strohalm J, Ulbrich K. Polyelectrolyte vectors for gene delivery : influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconj. Chem.* 10.. 993-1004, 1999.
- Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques.* 11(4):474-85, 1991.
- Yew N.S., M. Przybylska, R.J. Ziegler, D. Liu, S.H. Cheng, High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter, *Molec. Ther.* 4, 75– 82, 2001.
- Yew N.S., H. Zhao, M. Przybylska, I.H. Wu, J.D. Tousignant, R.K. Scheule, S.H. Cheng, CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo, *Molec. Ther.* 5, 731–738, 2002.
- Yew N.S. Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57, 769-780, 2005.
- Yoshida Y, Kobayashi E, Endo H, Hamamoto T, Yamanaka T, Fujimura A, Kagawa Y. Introduction of DNA into rat liver with a hand-held gene gun: distribution of the expressed enzyme, [³²P]DNA, and Ca²⁺ flux. *Biochem Biophys Res Commun.* 29;234(3):695-700, 1997.
- Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA and Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.*, 270(32), 18997-19007, 1995.
- Zatloukal K, et al. Transferrinfection : a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells. *Ann NY Acad Sci*, 660, 136-153, 1992.

-
- Zhang G et al.. Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum. Gene. Ther.*, 12, 427-438, 2001.
- Zhang S, Xu Y, Wang B, Qiao W, Liu D, Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release*. 24;100(2):165-80, 2004.
- Zhang YC, Taylor MM, Samson WK, Phillips MI. Antisense inhibition: oligonucleotides, ribozymes, and siRNAs. *Methods Mol Med*. 106:11-34, 2005.
- Zhao H, Hemmi H, Akira S, Cheng SH, Scheule RK, and Yew SN. Contribution of toll-like receptor 9 signaling to the acute inflammatory response to nonviral vectors. *Mol. Ther.*, 9, 241-248, 2004.
- Zuang F.F., Liang R., Zou C.T., Ma H., Zheng C.X., Duan M.X., High efficient encapsulation of plasmid DNA in PLGA microparticles by organic phase self-emulsification. *J Biochem Biophys Methods*, 52(3), 169-178, 2002.
- Zuber G., Dauty E., Nothisen M., Belguise P., Behr J.P., Towards synthetic viruses. *Adv Drug Deliv Rev*, 52, 245-253, 2001.
- Zuhorn IS, Kalicharan R, Hoekstra D. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem*, 277, 18021-18028, 2002.

Nonionic Amphiphilic Block Copolymers Promote Gene Transfer to the Lung

LÉA DESIGAUX,¹ CLOTHILDE GOURDEN,¹ MAHAJOUR BELLO-ROUFAÏ,¹
PEGGY RICHARD,¹ NOUFISSA OUDRHIRI,² PIERRE LEHN,^{2,3} DENIS ESCANDE,¹
HÉLÈNE POLLARD,¹ and BRUNO PITARD¹

ABSTRACT

Various pulmonary disorders, including cystic fibrosis, are potentially amenable to a treatment modality in which a therapeutic gene is directly delivered to the lung. Current gene delivery systems, either viral or nonviral, need further improvement in terms of efficiency and safety. We reported that nonionic amphiphilic block copolymers hold promise as nonviral gene delivery systems for transfection of muscular tissues. To evaluate the efficiency of these vectors in the lung, intratracheal instillation or aerosolization of reporter genes complexed with Lutrol or PE6400 was performed. Lutrol–DNA and, to a lesser extent, PE6400–DNA complexes promoted efficient gene transfection into mouse airways in a dose-dependent manner. This improvement over naked DNA was observed irrespective of the reporter gene. Lutrol enabled us to deliver significantly higher DNA amounts than current nonviral vectors, with even greater increases in gene expression and without the formation of colloiddally unstable complexes. Time course studies showed that Lutrol–DNA complexes permitted prolonged gene expression for up to 5 days whereas with poly(ethylenimine) (PEI)–DNA polyplexes, expression peaked on days 1–2 postinstillation, was strongly reduced by day 5, and reached background levels on day 7. Aerosolized delivery of Lutrol–DNA complexes, a less invasive approach to deliver genes to the lung, gave 5- to 15-fold higher reporter gene expression compared with PEI–DNA polyplexes administered via the same delivery route. After intratracheal instillation of Lutrol–DNA complexes, histochemical staining for β -galactosidase expression showed the presence of large blue areas. Histopathological analysis showed that Lutrol alone did not elicit inflammation, and that the inflammatory response after intratracheal instillation of Lutrol–DNA complexes was reversible and was observed only with the highest amounts of DNA. We also found that Lutrol can efficiently deliver genes to the airways of cystic fibrosis mice. Thus, we conclude that Lutrol is a highly promising vector for gene delivery to the lung.

OVERVIEW SUMMARY

Pulmonary gene transfer is a promising approach to treat both hereditary and acquired lung diseases. Current gene delivery systems, either viral or nonviral, need to be improved in terms of safety and efficacy. In the present study, we show that nonionic block copolymers constitute a novel class of gene delivery systems not only to muscular tissues but also to the lung. Lutrol, a poly(ethyleneoxide)₇₅-poly(propyleneoxide)₃₀-poly(ethyleneoxide)₇₅ block copolymer, drastically improved

transgene expression in the lung compared with naked DNA. Lutrol enabled the delivery of high DNA concentrations at which most current cationic vectors are colloiddally unstable and can therefore not be used. Aerosolized delivery of Lutrol–DNA complexes produced 5- to 15-fold higher levels of transgene expression than poly(ethylenimine) (PEI)–DNA polyplexes. In addition, Lutrol–DNA complexes led to a stable transgene expression for several days, whereas cationic poly(ethylenimine) yielded gene expression that was maximal on days 1–2 postinstillation, and then rapidly declined.

¹Institut du Thorax, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U533, Faculté de Médecine, 44035 Nantes, France.

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U458, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France.

³Present address: INSERM U613, CHU de Brest, Université de Bretagne Occidentale, 29200 Brest, France.

INTRODUCTION

VARIOUS NONVIRAL VECTORS have been developed for gene transfer to the lung. In general, synthetic vectors are thought to circumvent concerns raised by immunogenicity and safety issues of viral vectors, while offering the potential for repeated administration and large-scale production. Among the current nonviral vectors, cationic lipids are characterized by a structure consisting of a DNA-binding polar head group (with monoamine, polyamine, or guanidinium functions) covalently linked to acyl chains or cholesterol. They are usually combined with a neutral lipid such as dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) (Pitard, 2002). It has been shown that, in mouse airways, direct intratracheal administration of cationic liposome-DNA complexes led to efficient transfection (McLachlan *et al.*, 1995; Fortunati *et al.*, 1996; Oudrhiri *et al.*, 1997; Guillaume-Gable *et al.*, 1998). Non-lipid cationic homopolymers, including polylysine and poly(ethyleneimine) (PEI), were also reported to promote gene transfection into the lung (Ferrari *et al.*, 1997; Ziady *et al.*, 2003). As yet, PEI is actually one of the most potent nonviral vectors for this organ (Densmore *et al.*, 2000; Goula *et al.*, 2000). In the airways, the transfected cells were epithelial cells at the bronchial and/or alveolar levels, as well as, in some instances, macrophages and endothelial cells. Several procedures have been used to administer cationic nonviral vectors to mouse airways, including instillation of a liquid bolus, aerosol delivery via jet nebulization (Densmore *et al.*, 2000; Gautam *et al.*, 2000a,b, 2001), and, more recently, microspraying. In the clinical setting, cationic cholesterol derivatives have, however, been hampered by their relative low transfection efficiency *in vivo* and by concerns regarding their proinflammatory activity (Zabner *et al.*, 1997; Noone *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2001). Thus, further progress in lung gene therapy clearly requires the identification of safer and more efficient gene delivery systems. We have previously reported that intramuscular injection of DNA formulated with block copolymers increased severalfold the amount of recombinant protein produced, including luciferase, β -galactosidase, green fluorescent protein, alkaline phosphatase and inducible erythropoietin (Pitard *et al.*, 2002, 2004; Richard *et al.*, 2004). In the present work, we aimed at investigating whether the same vectors, which include Food and Drug Administration-approved compounds, that is, Lutrol, could also be used for gene transfection into the mouse lung *in vivo*. We herein show that plasmid DNA formulated with Lutrol leads to increased and prolonged gene expression for several days when compared with that achieved by a cationic homopolymer.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Swiss and BALB/c mice were obtained at 8 weeks of age from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Cystic fibrosis (CF) mice (B6;129-CFTR^{tm1Unc}; Snouwaert *et al.*, 1992) were obtained at 4 weeks of age from the Institut de Transgenèse (CNRS, Orléans, France).

Plasmids

Plasmids pCMV-luc (Ferrari *et al.*, 1997), pCMV-LacZ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), and pCIK-CAT (a gen-

erous gift from D. Gill, Oxford, UK) (Pitard *et al.*, 2001) contained luciferase, β -galactosidase, and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter genes, respectively, controlled by the human cytomegalovirus immediate-early gene promoter. Plasmids were purified from recombinant *Escherichia coli* by means of EndoFree plasmid purification columns (Qiagen, Chatsworth, CA). Plasmid DNA was purified according to manufacturer instructions and is thus presumed to contain negligible amounts of endotoxin (<0.1 EU/ μ g plasmid).

Preparation of DNA-polymer formulation

Lutrol, a poly(ethyleneoxide)₇₅-poly(propyleneoxide)₃₀-poly(ethyleneoxide)₇₅ block copolymer, and PE6400, a poly(ethyleneoxide)₁₃-poly(propyleneoxide)₃₀-poly(ethyleneoxide)₁₃ block copolymer, were gifts from BASF (Mount Olive, NJ). Stock solutions were prepared at 20% (w/v) in water and stored at 4°C. Formulations of DNA with Lutrol or PE6400 were prepared by equivolumetric mixing of Lutrol or PE6400 at various concentrations in water with plasmid DNA solution at the desired concentration in 20 mM HEPES, pH 7.4. Complexes of poly(ethyleneimine) (PEI, 25 kDa) and DNA were prepared as previously described (Pollard *et al.*, 1998) in 10 mM HEPES, pH 7.4. Complexes were administered at various PEI-DNA charge ratios (+/-).

Intratracheal administration

Swiss and BALB/c mice were anesthetized with ketamine (70 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg), injected intraperitoneally. After anesthesia, plasmid DNA, either naked or formulated, was intratracheally instilled as a bolus (volume, 100 μ l) through a 22-gauge catheter. At least five mice were included in each experimental group for measurement of reporter gene expression. For aerosol delivery, mice were sprayed in the trachea with either naked or formulated DNA, using a MicroSprayer (volume, 100 μ l; Penn-Century, Philadelphia, PA). In wild-type and CF mice, the volume delivered by the MicroSprayer was 50 μ l containing 50 μ g of DNA. Control experiments were performed with 10 mM HEPES solution, pH 7.4.

Intramuscular injection

Anesthetized Swiss mice were injected into shaved anterior tibial muscle as previously reported (Pitard *et al.*, 2002). They received 50 μ l of the formulation in 10 mM HEPES, pH 7.4, containing 10 μ g of DNA and 3% Lutrol.

Reporter gene assay

Mouse lungs or anterior tibial muscles were dissected, frozen in liquid nitrogen, and homogenized in 1 ml of reporter lysis buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). After centrifugation at 10,000 rpm for 5 min, CAT and luciferase activities were measured from an aliquot of supernatant with a VICTOR² multilabel counter (PerkinElmer, Les Ulis, France), using a CAT enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Roche Diagnostics) or the luciferase assay system (Promega, Madison, WI). Each lung or muscle extract was analyzed in duplicate. CAT activity was determined in 200 μ l of supernatant, according to the instructions of the supplier. A

standard curve, prepared in standard sample buffer (Roche Diagnostics), was included with each microplate using the CAT enzyme standard kit. Luciferase activity was assayed by measuring light emission after addition of 100 μ l of luciferase substrate to 20 μ l of the supernatant. Protein content was measured with a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit.

Histochemistry and histopathology

Immediately after euthanasia of the mice, lungs were inflated to total lung capacity with a fixative solution (cold 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline [PBS]). The trachea was ligated and the lungs were immersed into a container of the same fixative for 4 hr at 4°C. Lungs were rinsed with PBS, and stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) for 12 hr at 37°C, after which they were rinsed with PBS and fixed in 10% buffered formalin for paraffin embedding and thin section preparation. For immunohistochemistry, 4- μ m thin sections were cut. Sections were counterstained with hematoxylin–eosin or Kernechtrot solution. Histopathological analysis of the lungs was performed as described above, but without the X-Gal staining step.

Interleukin 6 assay

Interleukin 6 (IL-6) levels were measured in the serum and lungs of mice intratracheally injected with either a control solution or Lutrol–DNA complexes containing 100 μ g of DNA and 3% Lutrol. The assay was performed by ELISA (Quantikine, mouse IL-6) according to the instructions of the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN).

RESULTS

Airway transfection using nonionic block copolymers

The two triblock copolymers used in this study, Lutrol and PE6400, consist of a central motif of 30 poly(propyleneoxide) units located between two motifs that are, respectively, made of 75 and 13 poly(ethyleneoxide) units. A CAT reporter plasmid was formulated with Lutrol at various ratios and injected intratracheally. After 2 days, lungs were evaluated for reporter gene expression. Formulations containing 1–3% (w/v) Lutrol increased the expression of CAT by a factor of 25–33 when compared with naked DNA (Fig. 1A). Similar data were obtained with the luciferase reporter gene (data not shown). Increasing the Lutrol concentration up to 10% (w/v) did not further improve transgene expression (Fig. 1A). We also evaluated the transfection activity of PE6400 at 0.05 and 0.1% (w/v), which has been previously shown to improve the transfection efficiency in skeletal muscles (Pitard *et al.*, 2002). Figure 1A illustrates that PE6400–DNA complexes actually increased transgene expression to a lower extent than Lutrol. Further experiments were performed with Lutrol at a concentration of 3%. We evaluated the influence of DNA concentration. Figure 1B shows that CAT activity increased with the amount of injected DNA, up to 350 μ g without the formation of visible colloidal unstable particles. The efficiency of Lutrol was found to be similar in Swiss and BALB/c mouse strains (Fig. 1C). After intratracheal administration of Lutrol–DNA complexes, CAT activ-

ity was already detectable at 6 hr postinjection, and then increased and was stable for at least 4 days (Fig. 1D).

We next evaluated how gene transfer efficiency to the lung compares with that achieved in mouse anterior tibial muscle (Pitard *et al.*, 2002). Thus, luciferase- or CAT-expressing plasmids, formulated with 3% Lutrol, were injected into anterior tibial muscles and lungs of the same mice. Quantification of CAT (286 \pm 94 versus 560 \pm 206 ng/mg protein in the lung and muscle, respectively) and luciferase expression (132.5 \pm 52.5 versus 242.5 \pm 85 ng/mg protein) showed that similar levels of transgene expression were obtained in both tissues.

Kinetics of reporter gene expression with Lutrol and PEI

We next investigated the time course of CAT expression after direct intratracheal instillation of a low amount of DNA (20 μ g) complexed with Lutrol or PEI. Such a low amount of plasmid DNA was intentionally selected because complexation of higher DNA amounts by PEI led to large aggregates that could neither be injected nor sprayed. This well-known colloidal instability of cationic vector–DNA complexes was not observed with the Lutrol formulation within the DNA concentration range tested. After 2 days, a similar level of transgene expression was obtained when plasmid DNA was complexed with either Lutrol or PEI. Interestingly, Lutrol–DNA complexes led to CAT expression that was stable for 5 days and declined afterward (Fig. 2). On day 5, Lutrol increased CAT expression by a factor of 6 when compared with PEI. Indeed, CAT expression was maximal on day 2 postinstillation of PEI–DNA polyplexes, and then declined to reach background levels on day 7 (Fig. 2). Of note, CAT expression remained clearly above background on day 7 in mice that received the Lutrol–DNA formulation. Identical results were obtained with a luciferase-expressing plasmid (data not shown). We next evaluated whether increased gene expression could be obtained on day 7 by complexing Lutrol with a higher amount of plasmid DNA (than the previously used 20 μ g). The results indicated that CAT expression obtained 7 days postinstillation corresponded to about 10% of the CAT activity on day 2, irrespective of the amount of DNA injected. Identical results were obtained with another reporter gene, luciferase, the expression of which was also under the control of the human cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE) promoter (data not shown).

Localization of gene expression in the lung

To determine where gene expression occurred after intratracheal administration of Lutrol–DNA complexes, we used a β -galactosidase-expressing plasmid (Fig. 3). Lungs receiving 100 μ g of naked DNA showed no obvious β -galactosidase activity (Fig. 3A). On the other hand, the same amount of plasmid formulated with 3% Lutrol led to significant X-Gal staining of individual pulmonary lobes (Fig. 3B–D). At higher magnification, β -galactosidase activity was concentrated within small “dots” that likely correspond to alveolar sacs. This was confirmed when thin sections were examined (Fig. 3E). Most of the X-Gal-reactive β -galactosidase activity appeared to be localized at the periphery of the lungs, as nonuniform spots in the parenchymal tissue. Intense and light blue staining was seen in

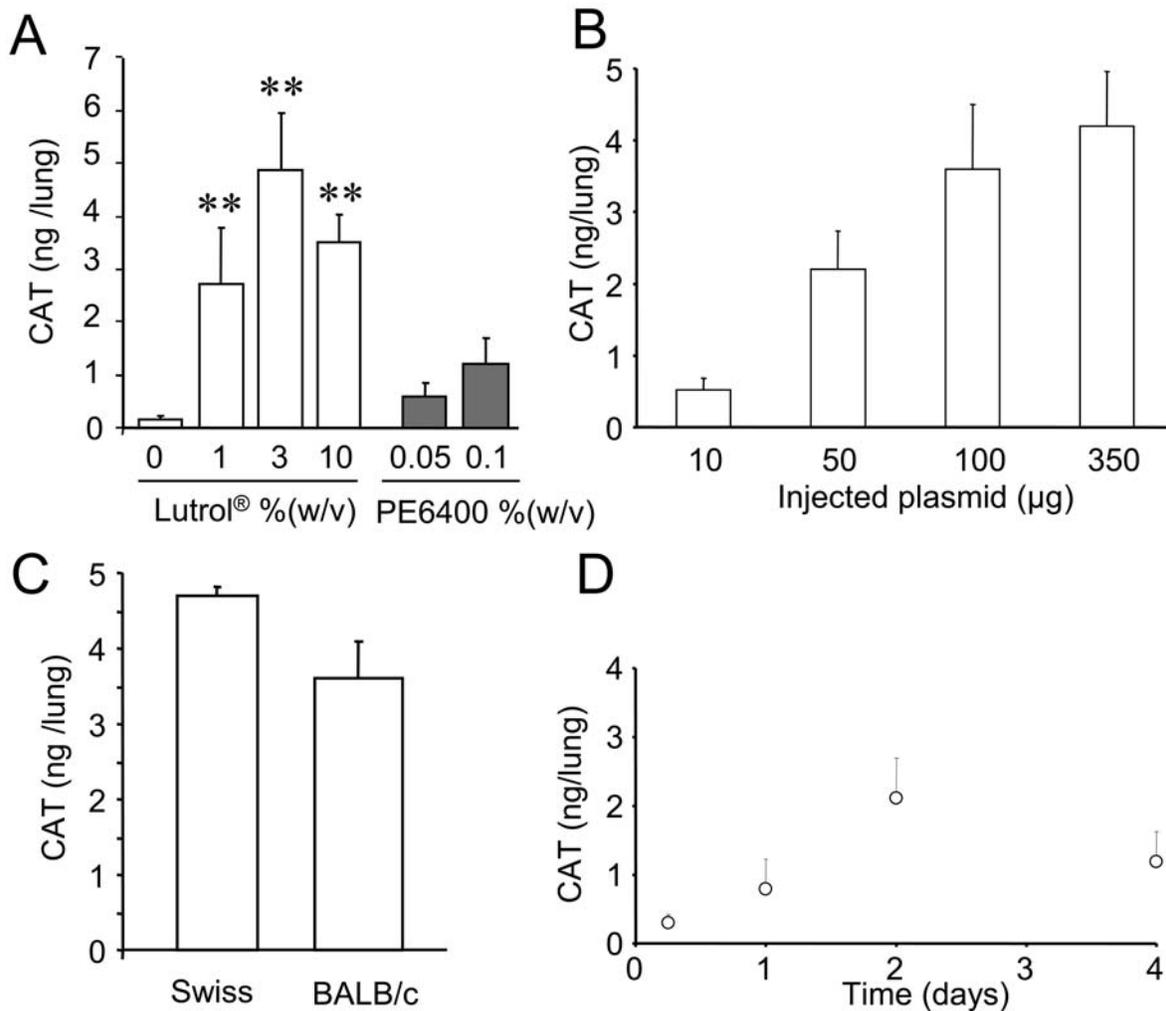


FIG. 1. Reporter gene expression in mouse lung on day 2 after intratracheal instillation of either naked or formulated DNA. **(A)** CAT activity after intratracheal injection of 100 μ g of DNA, naked or formulated with Lutrol (open columns) or with PE6400 (shaded columns). **(B)** CAT gene expression as a function of the amount of DNA formulated with 3% Lutrol in a constant 100- μ l volume. **(C)** Influence of mouse strain on CAT expression after intratracheal instillation of 100 μ g of DNA formulated with 3% Lutrol. Each column represents the mean + SEM of at least five individual values. Asterisks indicate a significant difference, with $p < 0.05$ (**) between lungs injected with naked DNA and Lutrol–DNA complexes. **(D)** Time course of CAT expression after intratracheal instillation of Lutrol–DNA complexes. Each point represents the mean value + SEM of six individual values.

cells of the alveoli, which most probably were type II cells according to their typical morphology (Fig. 3E). Nontransfected control lungs showed no blue staining (data not shown).

Histopathological analysis and inflammatory response

As shown in Fig. 4, the lungs of mice intratracheally injected with the control solution (Fig. 4A and B), 100 μ g of naked DNA (Fig. 4C and D), or 3% Lutrol alone (Fig. 4E and F) did not exhibit histopathological abnormalities. Similarly, no differences were observed between lungs injected with Lutrol alone and Lutrol–DNA complexes obtained with 20 μ g of DNA (Fig. 4G and H). It is noteworthy that lungs of animals injected with 100 μ g of DNA complexed with 3% Lutrol showed moderate mononuclear infiltration in peribronchial zones (Fig. 4I)

as well as around pulmonary blood vessels (Fig. 4J), but no infiltrates were present in the alveoli. In contrast, lungs injected with PEI, even complexed with the lowest amount of DNA (20 μ g), showed the presence of large numbers of infiltrating cells in the parenchyma, around the pulmonary blood vessels, in the peribronchial areas, and inside the conducting airways. The presence of areas of hemorrhage was also observed (Fig. 4K and L).

To quantify the inflammatory response, IL-6 levels were measured in serum and lung at various time points after intratracheal instillation of either the control solution or Lutrol–DNA complexes containing 100 μ g of DNA and 3% Lutrol. Figure 5A shows that the level of IL-6 in serum was increased 6 hr after injection of both control solution and DNA complexes (compared with that observed in noninjected mice). The level of IL-6

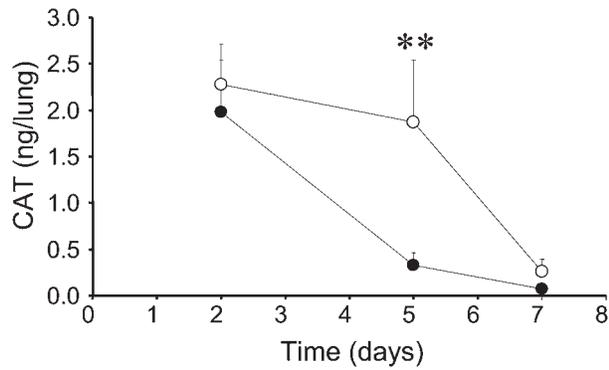


FIG. 2. Time course of CAT activity after intratracheal instillation of 20 μg of DNA complexed with 3% Lutrol (open circles) or formulated with PEI at a charge ratio (+/-) of 2 (solid circles). Asterisks indicate a significant difference, with $p < 0.05$ (***) between lungs injected with Lutrol-DNA complexes and lungs injected with PEI-DNA polyplexes.

then sharply decreased to background levels by day 1 and stayed at this level for the next 3 days. In lungs injected with control solution and Lutrol-DNA complexes, the level of IL-6 also increased by 6 hr after treatment (Fig. 5B). Mice receiving con-

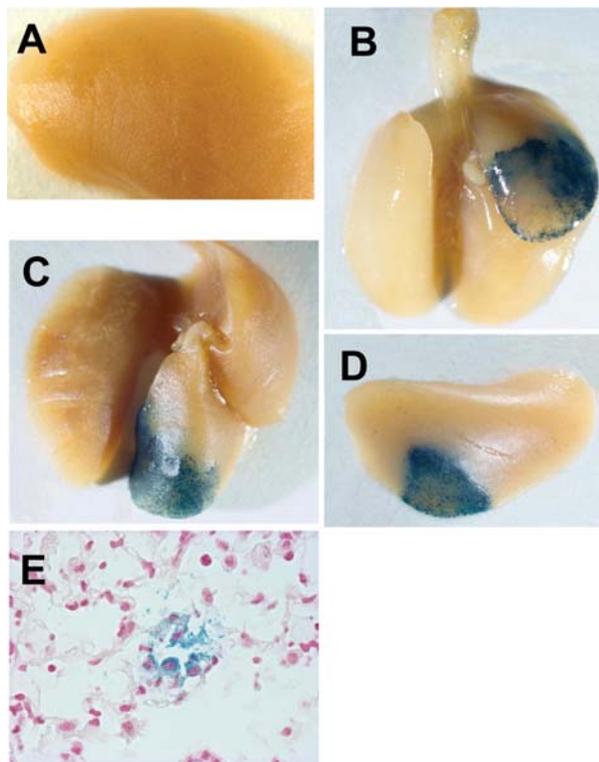


FIG. 3. Distribution of gene expression in intratracheally injected lungs. Global view of β -galactosidase expression in mice injected with naked DNA (A) or with Lutrol-DNA complexes (B-D). (E) Representative area of gene expression (in 4- μm thin sections). pCMV-lacZ plasmid DNA (100 μg) formulated with 3% Lutrol in 100 μl was injected intratracheally. Original magnification: (E) $\times 40$.

rol solution had IL-6 levels that returned to control values by day 2. On the other hand, the level of IL-6 in the lungs of mice injected with DNA complexes decreased to background levels only after 4 days (Fig. 5B).

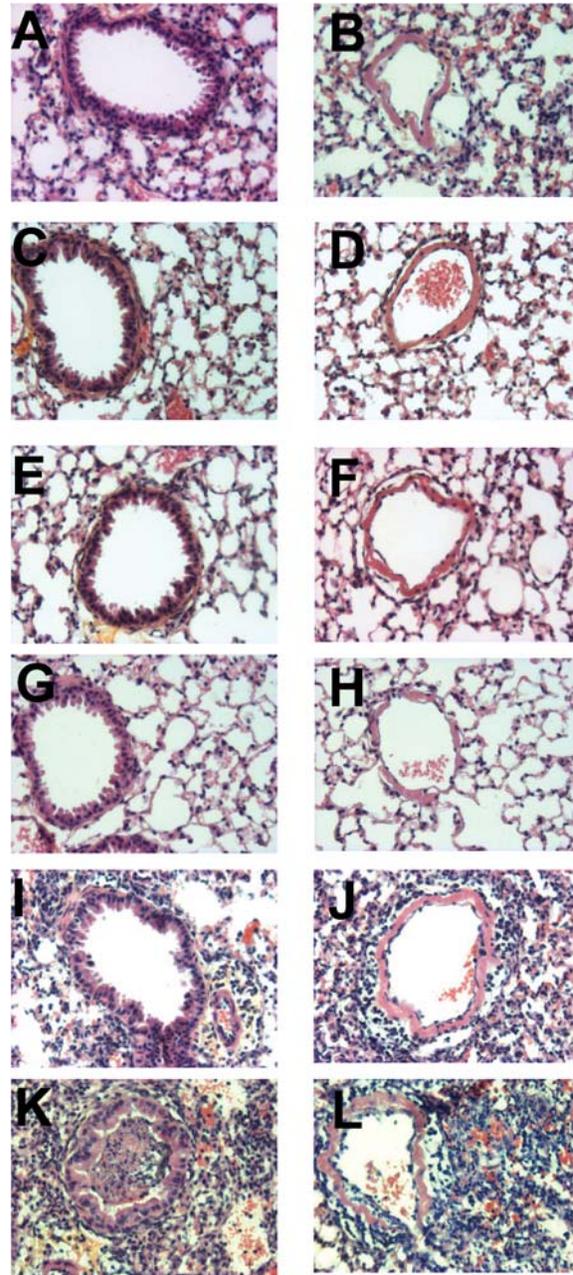


FIG. 4. Histopathological analysis of lungs from Swiss mice on day 2 after intratracheal instillation of control solution (A, airways; B, pulmonary blood vessels), 100 μg of naked DNA (C, airways; D, pulmonary blood vessels), 3% Lutrol alone (E, airways; F, pulmonary blood vessels), Lutrol-DNA complexes containing 20 μg of DNA and 3% Lutrol (G, airways; H, pulmonary blood vessels), Lutrol-DNA complexes containing 100 μg of DNA and 3% Lutrol (I, airways; J, pulmonary blood vessels), PEI-DNA polyplexes containing 20 μg of DNA at a charge ratio of 2 (K, airways; L, pulmonary blood vessels). Original magnification: $\times 20$.

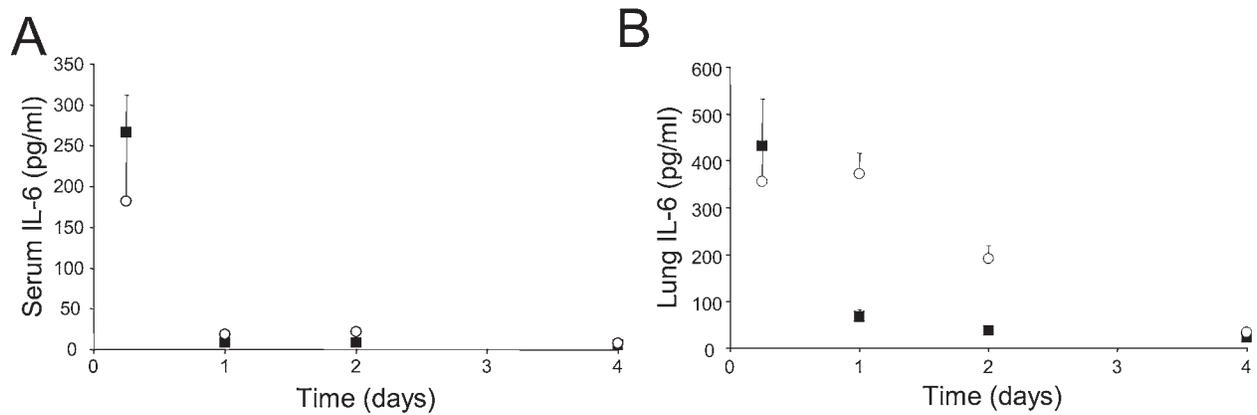


FIG. 5. IL-6 cytokine levels in serum (A) and lung (B) of Swiss mice after intratracheal instillation of control solution (solid squares) and Lutrol–DNA complexes (open circles) containing 100 μg of DNA and 3% Lutrol. Mice were killed at the indicated time points. The concentration of IL-6 was determined by ELISA. Each point represents the mean + SEM of at least five individual values.

Delivery of nonviral vectors with a MicroSprayer

The efficiency of aerosolized Lutrol–DNA complexes was evaluated with a MicroSprayer. Intratracheal instillation of 100 μg of DNA formulated with Lutrol led to CAT activities twice those obtained with the MicroSprayer (Fig. 6A). We next compared Lutrol and PEI. For these experiments, we used 20 μg of DNA because complexation of higher DNA amounts by PEI led to large aggregates that could not be sprayed (and also not injected). Thus, PEI and Lutrol formulations were aerosolized via the MicroSprayer (Fig. 6B). Quantification of CAT activ-

ity showed that the level of transgene expression obtained with Lutrol was clearly higher than that obtained with PEI. Here, the efficiency of PEI was in fact similar to that of naked DNA (Fig. 6B). Identical results were obtained when using a luciferase-encoding plasmid (data not shown).

In vivo transfection of the airways of CF mice

To evaluate whether Lutrol can also deliver genes into CF airways, null CFTR^{-/-} mice were sprayed via the trachea with a MicroSprayer (as these mice did not survive instillation of a

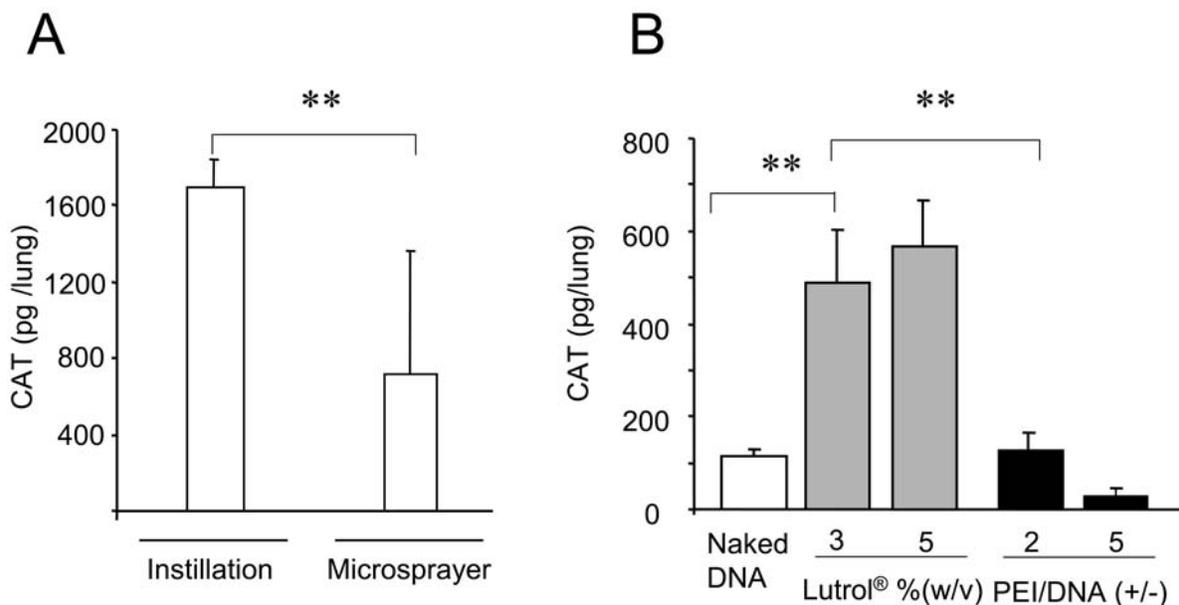


FIG. 6. Lung transfection 2 days after intratracheal instillation or aerosolization with a MicroSprayer. (A) CAT activity of Lutrol–DNA complexes containing 100 μg of DNA and 3% Lutrol delivered via intratracheal instillation or by MicroSprayer. Asterisks indicate a significant difference, with $p < 0.05$ (**). (B) Lung transfection efficiency of Lutrol–DNA complexes and PEI–DNA polyplexes. CAT expression in the lung after microspraying of 20 μg of DNA either naked (open columns) or formulated with Lutrol (shaded columns) or formulated with PEI at various charge ratios (+/-) (solid columns). Asterisks indicate a significant difference, with $p < 0.001$ (**).

liquid bolus). After 1 day, the lungs were harvested and evaluated for CAT expression. Quantitative comparison of the CAT levels observed (392 ± 37 pg/lung in CF mice versus 491 ± 104 pg/lung in wild-type mice) showed that similar levels of transgene expression were obtained in wild-type and CF mice.

DISCUSSION

In the present study, we show that nonionic block copolymers constitute a novel system for gene delivery not only to muscular tissues but also to the lung. We also compared the efficiency of the copolymer Lutrol with that of PEI, one of the most potent nonviral vectors for lung gene transfer. This comparison was performed with low DNA concentrations. Indeed, it is known that cationic vector–DNA complexes are colloiddally unstable at high DNA concentrations, such an instability hampering their use *in vivo* (Pitard *et al.*, 2001). In contrast, formation of colloiddally unstable particles was not observed with Lutrol. As a consequence, we could not compare the maximally effective doses of DNA complexed with Lutrol with the same doses of DNA complexed with PEI. On day 2 after intratracheal instillation of low amounts of DNA, similar transgene expression was obtained when the DNA was complexed with either Lutrol or PEI. However, Lutrol could complex significantly higher DNA amounts than could PEI, with even greater increases in gene expression. Aerosolized Lutrol–DNA complexes produced 5- to 15-fold higher levels of transgene expression than did PEI–DNA polyplexes. Although complexing DNA with PEI stabilizes the DNA during the process of jet nebulization (Densmore *et al.*, 2000), aerosolization of PEI polyplexes appeared to be associated with a significant loss of biological activity. Here, aerosol delivery was performed via microspraying, as it was shown that microspraying produced the most uniform and consistent deposition of adeno-associated virus type 2 (AAV2) in the pulmonary epithelium of rhesus macaques (Beck *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2003). Thus, assuming that the sizes of the aerosol droplets of PEI–DNA complexes and Lutrol–DNA complexes were similar, the difference in reporter gene expression may be due to differences in the pattern of deposition, rate of clearance, or cellular responses. It could obviously also be related to changes in the physical characteristics of the PEI–DNA particles resulting from aerosolization by the MicroSprayer. Further investigations are clearly needed to elucidate this point.

With PEI–DNA polyplexes, reporter gene expression was maximal on day 2 after intratracheal instillation and then declined sharply. This suggests that the DNA molecules were rapidly delivered to the nucleus of the target cells and that there was no reservoir of plasmid DNA that could be used as a source for sustained transgene expression. These observations are in good agreement with previous studies with PEI and other cationic molecules (Densmore *et al.*, 2000). In contrast, when using Lutrol–DNA complexes, reporter gene expression remained stable for at least 5 days, a time frame comparable to that previously reported for electrotransfer in the lung (Dean *et al.*, 2003). Here, the most likely explanation for the difference between Lutrol and PEI may involve differences in the internalization process. It has indeed been documented that cationic DNA complexes are internalized through endocytosis (Zabner *et al.*, 1995; Labat-Moleur *et al.*, 1996), with only a fraction of

the DNA molecules escaping lysosomal degradation (Howell *et al.*, 2003). Inversely, amphiphilic block copolymers have the ability to perturb the plasma membrane (Maskarinec *et al.*, 2002), resulting in internalization of drugs (Liaw and Lin, 2000). Therefore, DNA molecules associated with nonionic block copolymers may be directly delivered to the cytoplasm (or escape more efficiently from the endosome into the cytoplasm), and thereby act as a reservoir feeding the nucleus for sustained transgene expression over several days. Future experiments (such as microscopy studies with labeled DNA and/or vector, transfection studies with cytoplasmic expression systems) should allow insight into the intracellular trafficking steps of Lutrol–DNA complexes. Nevertheless, the moderate duration of gene expression with Lutrol could be due to the human cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE) promoter. Most studies on the time course of transgene expression in the lungs with nonviral vectors found that transgene expression peaked on days 1–2 and then decreased by several logs by days 4–5 postdelivery (Yew *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2003; Ziady *et al.*, 2003). In all these studies, expression of the reporter genes was controlled by the CMV-IE promoter. The transcriptional activity of this widely used promoter is known to be high, but prone to inactivation over time (Yew *et al.*, 2001). In contrast, the use of alternative promoters, such as the human ubiquitin B promoter or a hybrid CMV-ubiquitin B promoter, increased the duration of transgene expression up to 3 months, whereas there is a typical 7-day expression when using the CMV-IE promoter (Gill *et al.*, 2001; Yew *et al.*, 2001). Thus, it is likely that the short duration of transgene expression found in our experiments was due to the CMV promoter and that the use of plasmids encoding reporter genes controlled by other promoters may increase the duration of gene expression in lungs treated with Lutrol–DNA formulations.

Because it has been reported that nonviral vectors can cause significant inflammation in the lungs, IL-6 assays and a histopathological analysis were performed on lungs injected with this novel class of nonviral gene delivery systems. Mice intratracheally instilled with Lutrol alone or with naked DNA (100 μ g) displayed no histopathological abnormalities on day 2, and there was no difference with mice injected with control solution. Intratracheal instillation of 20 μ g of DNA complexed with Lutrol also did not lead to abnormalities in lung histology. However, at such a low dose of DNA, Lutrol–DNA complexes allowed, without inflammation, levels of transgene expression similar to those obtained with PEI polyplexes, which in contrast elicited a much stronger inflammatory response. Indeed, 2 days after injection of PEI–DNA polyplexes, cellular infiltrates were observed in peribronchial areas, in the conducting airways, around the pulmonary blood vessels, and in the alveolar spaces. Most importantly, complexation of 100 μ g of DNA with Lutrol permitted efficient transgene expression, the lungs displaying only a mild, time-dependent inflammatory response. On day 2 postinjection, mononuclear cell infiltrates were observed only around pulmonary blood vessels and in peribronchial zones. There were no alveolar infiltrates and there was also no systemic response, that is, the serum level of IL-6 was close to the background level, a situation clearly contrasting with that observed after systemic injection of cationic vector–DNA complexes (Zhao *et al.*, 2004).

Finally, as we aimed here to evaluate the ability of nonionic block copolymers to transfect genes into the global lung, the

instillation procedure was not optimized to reach primarily the bronchial tree, the epithelial cells of which are the main target cells in diseases such as cystic fibrosis, although it has been shown that CFTR is also expressed in type II alveolar epithelial cells (McCray *et al.*, 1992, 1993; Brochiero *et al.*, 2004). Accordingly, intratracheal instillation of Lutrol-DNA complexes allowed the transfection of alveolar type II epithelial cells. This could be related to our delivery technique, which may have prevented uniform distribution throughout the lung. It also invites further work to determine the administration conditions of nonionic copolymer-DNA formulations that are more efficient for the transfection of tracheal/bronchial epithelial cells and the therapeutic potential of which could be best evaluated in animal models such as the CF mouse.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Deborah Gill (Oxford, UK) for providing pCIK-CAT; to Gregory Lemkine and Christine Sagan for technical expertise in lung histology; and to Patricia Lemarchand, Claire Danel, and Elisabeth Brambilla for fruitful discussions. This work was supported by the APEX program financed by INSERM, by ACI Jeunes Chercheurs from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies, and by special grants from the Association Française contre les Myopathies (Evry, France) and from Vaincre la Mucoviscidose (Paris, France).

REFERENCES

- BECK, S.E., LAUBE, B.L., BARBERENA, C.I., FISCHER, A.C., ADAMS, R.J., CHESNUT, K., FLOTTE, T.R., and GUGGINO, W.B. (2002). Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of rhesus macaques. *Mol. Ther.* **6**, 546–554.
- BROCHIERO, E., DAGENAIS, A., PRIVE, A., BERTHIAUME, Y., and GRYGORCZYK, R. (2004). Evidence of a functional CFTR Cl⁻ channel in adult alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, L382–392.
- DEAN, D.A., MACHADO-ARANDA, D., BLAIR-PARKS, K., YELDANDI, A.V., and YOUNG, J.L. (2003). Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung. *Gene Ther.* **10**, 1608–1615.
- DENSMORE, C.L., ORSON, F.M., XU, B., KINSEY, B.M., WALDREP, J.C., HUA, P., BHOGAL, B., and KNIGHT, V. (2000). Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol. Ther.* **1**, 180–188.
- 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.
- FISHER, A.C., BECK, S.E., SMITH, C.I., LAUBE, B.L., ASKIN, F.B., GUGGINO, S.E., ADAMS, R.J., FLOTTE, T.R., and GUGGINO, W.B. (2003). Successful transgene expression with serial doses of aerosolized rAAV2 vectors in rhesus macaques. *Mol. Ther.* **8**, 918–926.
- FORTUNATI, E., BOUT, A., ZANTA, M.A., VALERIO, D., and SCARPA, M. (1996). *In vitro* and *in vivo* gene transfer to pulmonary cells mediated by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1306**, 55–62.
- GAUTAM, D., DENSMORE, C.L., XU, B., and WALDREP, J.C. (2000a). Enhanced gene expression in mouse lung after PEI-DNA aerosol delivery. *Mol. Ther.* **2**, 63–70.
- GAUTAM, A., DENSMORE, C.L., and WALDREP, J.C. (2000b). Inhibition of experimental lung metastasis by aerosol delivery of PEI-p53 complexes. *Mol. Ther.* **2**, 318–323.
- GAUTAM, A., DENSMORE, C.L., GOLUNSKI, E., XU, B., and WALDREP, J.C. (2001). Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol. Ther.* **4**, 551–556.
- GILL, D.R., SMYTH, S.E., GODDARD, C.A., PRINGLE, I.A., HIGGINS, C.F., COLLEDGE, W.H., and HYDE, S.C. (2001). Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1- α promoter. *Gene Ther.* **8**, 1539–1546.
- GOULA, D., BECKER, N., LEMKINE, G.F., NORMANDIE, P., RODRIGUES, J., MANTERO, S., LEVI, G., and DEMENEIX, B.A. (2000). Rapid crossing of the pulmonary endothelial barrier by polyethylenimine/DNA complexes. *Gene Ther.* **7**, 499–504.
- GUILLAUME-GABLE, C., FLOCH, V., MERCIER, B., AUDREZET, M.P., GOBIN, E., LE BOLCH, G., YAOUANC, J.J., CLEMENT, J.C., DES ABBAYES, H., LEROY, J.P., MORIN, V., and FEREC, C. (1998). Cationic phosphonolipids as nonviral gene transfer agents in the lungs of mice. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2309–2319.
- HOWELL, D.P., KRIESER, R.J., EASTMAN, A., and BARRY, M.A. (2003). Deoxyribonuclease II is a lysosomal barrier to transfection. *Mol. Ther.* **8**, 957–963.
- 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.* **11**, 1010–1017.
- LIAW, J., and LIN, Y. (2000). Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl. *J. Control. Release* **68**, 273–282.
- 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.
- MCCRAY, P.B., Jr., WOHLFORD-LENANE, C.L., and SNYDER, J.M. (1992). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in human fetal lung tissue by *in situ* hybridization. *J. Clin. Invest.* **90**, 619–625.
- MCCRAY, P.B., Jr., REENSTRA, W.W., LOUIE, E., JOHNSON, J., BETTENCOURT, J.D., and BASTACKY, J. (1993). Expression of CFTR and cAMP-stimulated chloride secretory current in cultured human fetal alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**, 578–585.
- 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.* **9**, 614–622.
- NOONE, P.G., HOHNEKER, K.W., ZHOU, Z., JOHNSON, L.G., FOY, C., GIPSON, C., JONES, K., NOAH, T.L., LEIGH, M.W., SCHWARTZBACH, C., EFTHIMIOU, J., PEARLMAN, R., BOUCHER, R.C., and KNOWLES, M.R. (2000). Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol. Ther.* **1**, 105–114.
- OUDRHIRI, N., VIGNERON, J.P., PEUCHMAUR, M., LECLERC, T., LEHN, J.M., and LEHN, P. (1997). Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1651–1656.
- PITARD, B. (2002). Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* **27**, 5–15.
- 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., 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.
- PITARD, B., BELLO-ROUFAL, 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.
- 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.
- RICHARD, P., POLLARD, H., LANCTIN, C., BELLO-ROUFAL, M., DÉSIGAUX, L., ESCANDE, D., and PITARD, B. (2004). Production of erythropoietin using intramuscular injection of nonionic amphiphile block polymer/DNA formulation. *J. Gene Med.* **7**, 80–86.
- RUIZ, F.E., CLANCY, J.P., PERRICONE, M.A., BEBOK, Z., HONG, J.S., CHENG, S.H., MEEKER, D.P., YOUNG, K.R., SCHOUMACHER, R.A., WEATHERLY, M.R., WING, L., MORRIS, J.E., SINDEL, L., ROSENBERG, M., VAN GINKEL, F.W., MCGHEE, J.R., KELLY, D., LYRENE, R.K., and SORSCHER, E.J. (2001). A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid–DNA administration in cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* **12**, 751–761.
- SNOUWAERT, J.N., BRIGMAN, K.K., LATOUR, A.M., MALOUF, N.N., BOUCHER, R.C., SMITHIES, O., and KOLLER, B.H. (1992). An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* **257**, 1083–1088.
- YEW, N.S., PRZYBYLSKA, M., ZIEGLER, R.J., LIU, D., and CHENG, S.H. (2001). High and sustained transgene expression *in vivo* from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter. *Mol. Ther.* **4**, 75–82.
- 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.
- ZABNER, J., CHENG, S.H., MEEKER, D., LAUNSPACH, J., BALFOUR, R., PERRICONE, M.A., MORRIS, J.E., MARSHALL, J., FASBENDER, A., SMITH, A.E., and WELSH, M.J. (1997). Comparison of DNA–lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **100**, 1529–1537.
- ZHAO, H., HEMMI, H., AKIRA, S., CHENG, S.H., SCHEULE, R.K., and YEW, S.N. (2004). Contribution of toll-like receptor 9 signaling to the acute inflammatory response to nonviral vectors. *Mol. Ther.* **9**, 241–248.
- ZIADY, A.G., GEDEON, C.R., MILLER, T., QUAN, W., PAYNE, J.M., HYATT, S.L., FINK, T.L., MUHAMMAD, O., OETTE, S., KOWALCZYK, T., PASUMARTHY, M.K., MOEN, R.C., COOPER, M.J., and DAVIS, P.B. (2003). Transfection of airway epithelium by stable PEGylated poly-L-lysine DNA nanoparticles *in vivo*. *Mol. Ther.* **8**, 936–947.

Address reprint requests to:

Dr. Bruno Pitard
Institut du Thorax, INSERM U533
Faculté de Médecine
1 rue Gaston Veil
44000 Nantes, France

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

Received for publication August 25, 2004; accepted after revision January 19, 2005.

Published online: June 14, 2005.

Self-Assembly and Characterization of Layered Double Hydroxide/DNA Hybrids

Léa Desigaux,^{†,||} Malha Ben Belkacem,^{‡,||} Peggy Richard,[†] Joël Cellier,[‡]
Philippe Léone,[§] Laurent Cario,[§] Fabrice Leroux,[‡] Christine Taviot-Guého,^{*,‡} and
Bruno Pitard^{*,†}

*Inserm U533, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France,
Laboratoire des Matériaux Inorganiques UMR 6002, Université Blaise Pascal
(Clermont-Ferrand II), 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France, and
Institut des Matériaux Jean Rouxel, 2 rue de la Houssinière, 44300 Nantes, France*

Received October 11, 2005; Revised Manuscript Received November 12, 2005

ABSTRACT

The purpose of this study was to control the fabrication of new labile supramolecular assemblies by formulating associations of DNA molecules with inorganic layered double hydroxides (LDHs). The results show that LDH/DNA hybrids synthesized by a coprecipitation route involving the in situ formation of LDHs around DNA molecules acting as templates were characterized by a lamellar organization, with DNA molecules sandwiched between hydroxide layers, exhibiting a regular spacing of 1.96 nm. Our results indicate that labile complexes resulting from the association of nucleic acids and inorganic materials can be obtained not only by anion exchange but also by a direct self-assembly route.

According to the prevailing paradigm, the principle of nonviral gene delivery lies mainly in the condensation of DNA in the presence of organic cationic lipid molecules. The supramolecular assembly between DNA and these cationic molecules is characterized by a lamellar organization in which DNA molecules are sandwiched between lipid bilayers.¹ These complexes have proven their efficacy for in vitro gene transfection but display low in vivo transfection efficiency. Studies on the intracellular fate of organic cationic vector/DNA complexes have revealed that complexes can be taken more or less efficiently into cells by endocytosis.² However, this mode of entry into cells usually leads to DNA entrapment into late endosomes or lysosomes where degradation occurs. Although a great deal of work is still needed, it is clear that the intracellular disassembly of vector/DNA complexes and escape from vesicles before the DNA is degraded are avenues for improvement. In previous studies, biodegradable organic groups such as pH- or redox-sensitive functions were introduced into cationic lipid/DNA complexes to obtain lipids that allowed eventual accelerated release of DNA from complexes.³ However, it should be stressed that no particular biodegradable organic group emerges as consistently optimal in the reported studies, and the direct impact of the specific sensitivities of biodegradable groups

on transfection efficiency remains generally unconfirmed to date. This observation prompted us to design and formulate DNA molecules with new classes of molecules able to release DNA molecules more efficiently from complexes after their penetration into cells. More precisely, our goal was to explore the possibility of formulating DNA molecules into lamellar phases of a different chemical nature that were capable of complete disruption upon acidification within the cells. Layered double hydroxides (LDHs) represented by the general formula $[M_{1-x}^{II}M_x^{III}(OH)_2][A_{x/m}^{m-}nH_2O]$ (abbreviated notation $M_R^{II}M^{III}/A$ with $R = (1-x)/x$), where M^{II} and M^{III} are di- and trivalent metal cations and A^{m-} are interlayer anions, are entirely degradable at acidic pH.⁴ We chose to synthesize LDH/DNA hybrids by a coprecipitation route involving the in situ formation of LDH layers of various ionic compositions around intercalated DNA, as opposed to a previous study's method involving the incorporation of small DNA molecules and antisense oligonucleotides into presynthesized magnesium–aluminum hydroxide layers by a simple ion-exchange reaction, which have already been tested successfully as potential candidates for DNA delivery.^{5,6} The coprecipitation or self-assembly method may enable the incorporation of large DNA fragments. Indeed, for biological applications, LDH/DNA hybrids must be able to carry not only small oligonucleotides but also plasmid DNA encoding genes of therapeutic interest. Furthermore, as shown for LDH hybrid composites grown in the presence of polymers and biopolymers,^{7–9} the DNA macromolecules can be expected to exhibit a templating function, with

* Corresponding authors: E-mail: bruno.pitard@nantes.inserm.fr;
christine.taviot-gueho@univ-bpclermont.fr.

[†] Inserm U533, Faculté de Médecine.

[‡] Université Blaise Pascal.

[§] Institut des Matériaux Jean Rouxel.

^{||} The first two authors contributed equally to this work.

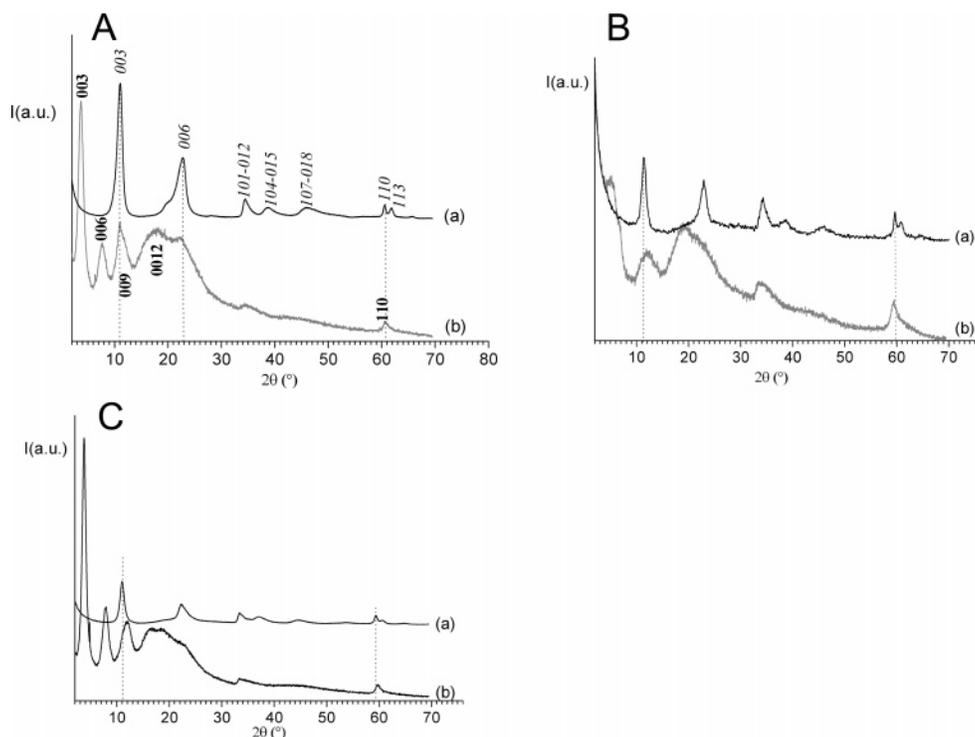


Figure 1. Powder X-ray diffraction patterns in the 2θ range $2\text{--}70^\circ$ of $\text{Mg}_2\text{M}^{3+}/\text{NO}_3$ and $\text{Mg}_2\text{M}^{3+}/\text{DNA}_S$ hybrids prepared at 50°C . (A) $\text{Mg}_2\text{Al}/\text{NO}_3$ (trace a) and $\text{Mg}_2\text{Al}/\text{DNA}_S$ (trace b). (B) $\text{Mg}_2\text{Fe}/\text{NO}_3$ (trace a) and $\text{Mg}_2\text{Fe}/\text{DNA}_S$ (trace b). (C) $\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{NO}_3$ (trace a) and $\text{Mg}_2\text{Ga}/\text{ADN}_S$ (trace b). X-ray diffraction patterns were recorded on a D501 Siemens diffractometer with Cu $K\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) and a diffracted beam graphite monochromator.

consequences for the particle size of this new, inorganic/DNA hybrid.

In this work, we report the complete characterization of magnesium–gallium LDH/DNA hybrids obtained by the coprecipitation method, intercalated with double-stranded DNA fragments of various lengths (100–500 bp and 6000–8000 bp) and with plasmid DNA. The choice of the magnesium–gallium composition was motivated by the fact that it can be exploited over a wide range of trivalent cation (Ga^{3+}) content: $7 > R > 1.8$ where R is the Mg/Ga molar ratio.¹⁰ For comparison, magnesium–aluminum and magnesium–iron LDH/DNA hybrids were also prepared. By means of X-ray diffraction, we sought to understand the effects of the synthesis temperature, DNA length, and hydroxide layer charge density on the structural properties of LDH/DNA hybrids. We conclude that LDH/DNA hybrids, like cationic lipid/DNA lipoplexes, exhibit a lamellar supraorganization with DNA molecules sandwiched between hydroxide layers, but the different chemical nature of the layers ensures the lability of these hybrid supramolecular assemblies.

We first investigated whether LDH/DNA hybrids could be prepared by direct coprecipitation of LDH around DNA, consisting in the simultaneous addition of mixed metal nitrates and NaOH to a solution of DNA. This method described previously for other molecules¹¹ should allow the control of various parameters and thus enable the optimization of LDH/DNA synthesis. The first parameter examined in this study was the composition of the hydroxide layer (M^{2+} and M^{3+} : Al, Fe, or Ga). Three different LDH systems were

investigated: Mg_2Al , Mg_2Fe , and Mg_2Ga , in the presence or in the absence of short DNA fragments of 100–500 bp (DNA_S), at 50°C . Small DNA fragments (Sigma, D6898) were extracted from herring testes DNA and sheared to the size of 100–500 bp as described.¹² Stock solutions were prepared at 10 mg/mL and stored at -20°C . Experiments were carried out with DNA fragments of 100–500 bp, for $R = \text{Mg}^{2+}/\text{M}^{3+}$ and at an M^{3+}/DNA molar ratio of 2/1. LDH/DNA hybrids were recovered after 48 h of aging by ultracentrifugation at 13 000 rpm. The precipitate was then washed and analyzed. Figure 1 shows the X-ray powder diffraction patterns of the LDH/ DNA_S - 50°C hybrids compared to that of the corresponding inorganic parent LDH/ NO_3 - 50°C . The diffraction peaks were indexed based on a hexagonal unit cell with the $R\bar{3}m$ rhombohedral symmetry generally observed in LDH systems. The first peak occurring at a low 2θ angle was attributed to the reflections from the (003) family of crystallographic planes. It corresponds to the interlayer repeat distance d (where $d = \lambda/[2 \sin\{\theta\}]$) including a contribution from the metal hydroxide sheet (approximately 0.48 nm) and the interlayer space that contains the guest anions surrounded by water molecules. The intercalation of DNA_S into the LDH was clearly evidenced by the net increase of the interlayer distance, from ~ 0.77 nm for all nitrate parent LDHs to ~ 2.11 nm, ~ 1.80 nm, and ~ 1.96 nm for DNA molecules complexed with $\text{Mg}_2\text{-Al}$ (Figure 1A), Mg_2Fe (Figure 1B), and Mg_2Ga (Figure 1C), respectively. The diffraction peak profiles were modified through DNA entrapment, which could be explained partly by a shortening of the coherence length. The presence of

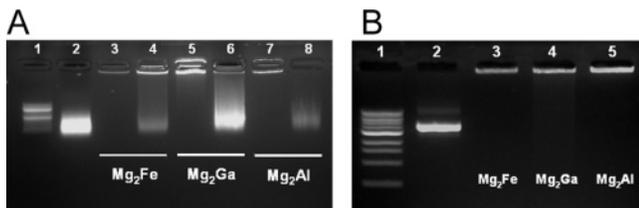


Figure 2. Analysis of DNA–LDH hybrids by agarose gel electrophoresis. (A) Linear DNA was complexed with various LDHs (i.e., Mg_2Fe , Mg_2Ga , and Mg_2Al) and incubated for 30 min at 37 °C and at pH 8 (corresponding to lanes 3, 5, and 7, respectively). LDH–DNA hybrids were also incubated at pH 2 and analyzed on the same gel (lanes 4, 6, and 8). Lanes 1 and 2 correspond to a 100-bp DNA ladder and herring testis DNA (D6898), respectively. (B) Plasmid DNA was complexed to Mg_2Fe , Mg_2Ga , and Mg_2Al , applied to lanes 3, 4, and 5, respectively (pH 8). Lanes 1 and 2 correspond to a 1 Kb DNA ladder and plasmid, respectively.

several harmonics of relatively high intensity was evidence of rather well-defined $MgGa$ and $MgAl$ hybrid materials. In contrast, Mg_2Fe/DNA_S (Figure 1B) shows a lower degree of crystallinity, with broader peaks and a lower signal-to-noise ratio. Figure 1 also reveals that the deformation noted in the peak profile of the (009) reflections, particularly for Mg_2Al/DNA_S (Figure 1A), is likely to be due to the presence of Mg_2Al/NO_3 , which displays a sharp (003) peak that is superimposed on the Gaussian-like (009) peak of Mg_2Al/DNA . Similarly, the deformation of the peak profile of the (012) reflections may originate from the (006) reflection of pure Mg_2Al/NO_3 . Indeed, because the low concentration of DNA relative to that of nitrate anions introduced by the salts, the formation of Mg_2Al/NO_3 is highly probable. The in-plane reflection (110) related to the cell parameter a ($a = 2xd_{110}$), and corresponding to the intermetallic distance within the hydroxide layers, is also visible and confirms the formation of LDH host layers (noted by the dotted line at $\sim 61^\circ$ (2θ) in Figure 1). Of the three LDH/DNA hybrids synthesized, Mg_2Ga displayed the highest signal-to-noise ratio and the least deformation of the peak profile.

DNA entrapment into LDH/DNA hybrids of various ionic compositions was assayed by agarose gel electrophoresis experiments. The results in Figure 2 demonstrate that the use of Mg_2Fe , Mg_2Ga , and Mg_2Al led to complexation of DNA_S (Figure 2A) and supercoiled plasmid DNA encoding

luciferase reporter gene¹³ (Figure 2B), preventing the migration of DNA molecules into the agarose gel. Figure 2 also documents the partial dissociation of DNA_S from Mg_2Fe/DNA_S and Mg_2Al/DNA_S hybrids upon incubation at pH 2, as visualized by the migration of DNA_S into the gel (Figure 2A). Figure 2A also indicates that from the three LDH/DNA tested Mg_2Ga hybrids seemed to lead to the highest level of DNA release.

We next investigated whether the synthesis temperature influences the interlamellar spacing of Mg_2Ga/DNA_S hybrids. Figure 3 displays the powder X-ray diffraction patterns of Mg_2Ga/DNA_S prepared at room temperature (RT), 50 °C, and 60 °C. As the synthesis temperature was increased, the lamellar structure was greatly contracted, from 2.39 nm at room temperature down to 1.96 at 50 °C and 1.86 nm at 60 °C for Mg_2Ga/DNA_S . At the same time, the stacking of the layers was improved, as shown by the appearance of four (00 l) harmonics at 50 °C, while only two are visible at room temperature. The net increases in intensity of the in-plane reflections, (012) and (110), observed at 50 and 60 °C may also indicate a better intralamellar organization (Figure 3A). At 60 °C, major changes within the interlamellar space may occur, which almost obliterate the (006) reflection (Figure 3B). The deformation noted in the peak profile of the (009) reflections of Mg_2Ga/DNA_S-RT was attributed to the presence of Mg_2Ga-NO_3 , which did not form at 50 and 60 °C (Figure 3B). To better understand the variation of d spacing as a function of the synthesis temperature, thermal gravimetric analyses were carried out. The thermograms of Mg_2Ga/DNA_S hybrids prepared at different temperatures are compared to those of Mg_2Ga/NO_3 and DNA molecules in Figure 4. Mg_2Ga/NO_3 and Mg_2Ga/DNA_S samples exhibited characteristic weight loss regions that correspond to the loss of surface and interlayer water (25–220 °C), dehydroxylation of the hydroxide layers (220–400 °C), and anion decomposition (above 450 °C). DNA displays three mass losses over the temperature ranges 25–220 °C, 220–400 °C, and above 400 °C (Figure 4A). The low-temperature mass losses, attributed in all cases to the departure of water molecules and computed with LDH formulas, give rise to $n = 1.5$ water molecules for Mg_2Ga/NO_3 , 4.8 for Mg_2Ga/DNA_S-RT , 4.2 for Mg_2Ga/DNA_S-50 °C, 4.0 for Mg_2Ga/DNA_S-60 °C, and 4.8 for DNA_L alone in Figure 4B. It is remarkable that the

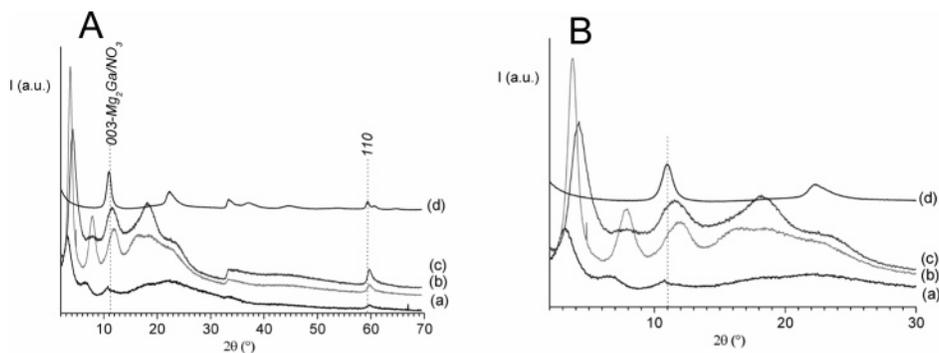


Figure 3. (A) Powder X-ray diffraction patterns in the 2θ range 2–70° for $Mg_2Ga-DNA_S$ hybrids prepared at different temperatures, that is, room temperature (trace a), 50 °C (trace b), and 60 °C (trace c), and for Mg_2Ga/NO_3 (trace d). (B) represents X-ray diffraction data in the low 2θ range 2–30°.

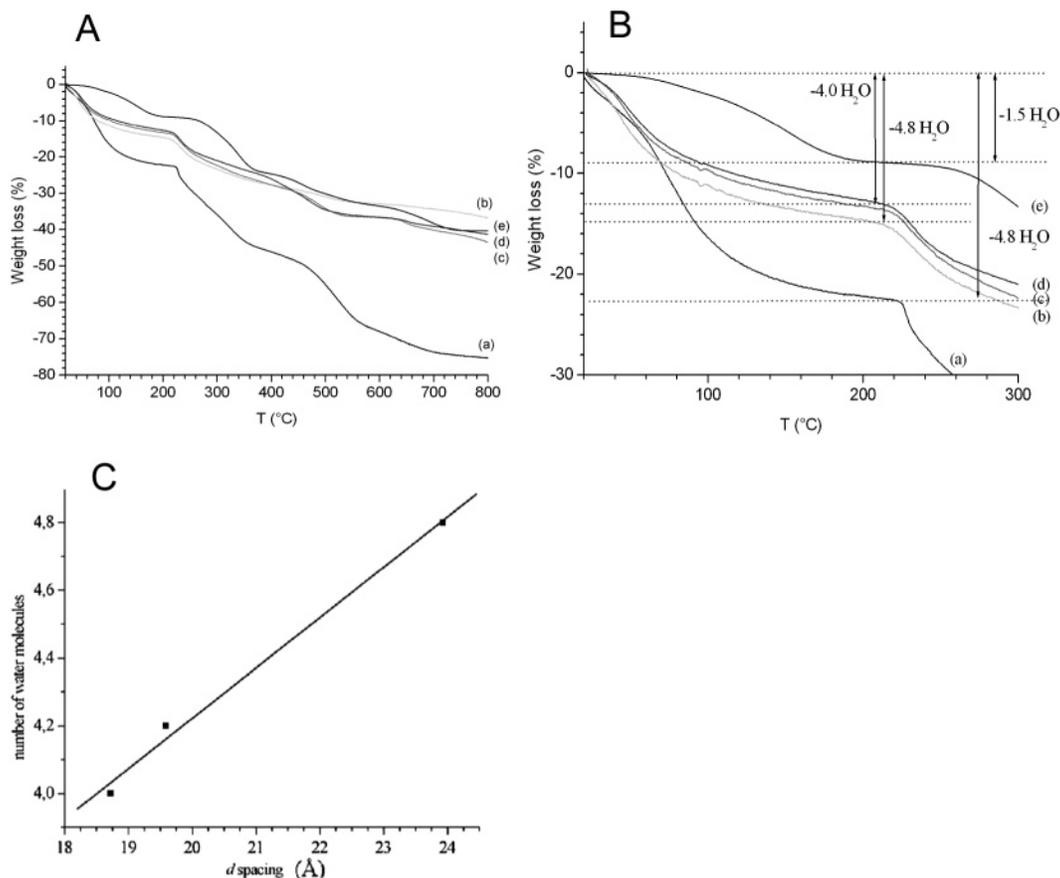


Figure 4. (A) Thermogravimetric analysis (TGA) data in the temperature range 20–800 °C for DNA alone (trace a), for Mg₂Ga-DNA_S hybrids prepared at room temperature (trace b), 50 °C (trace c), and 60 °C (trace d), and for Mg₂Ga-NO₃ (trace e). (B) The same TGA graph in the temperature range 20–300 °C. (C) This figure represents the variation in the *d*-spacing as a function of the number of water molecules calculated from the TGA. Thermogravimetric analyses were performed on a Setaram TGA 92 instrument. The thermograms were recorded in a static air atmosphere with a heating rate of 5 °C/min, in the temperature range of 25–800 °C.

number of intercalated water molecules increased slightly with *d*, which corresponded to a decrease in the synthesis temperature (Figure 4C). An indicative straight line can be drawn, providing a linear relationship between that number of water molecules and the *d* spacing value (Figure 4C).

Next, we investigated whether optimal conditions designed for DNA_S could also be applied to long DNA molecules (DNA_L), again using Mg₂Ga for the hydroxide layer and 50 °C as the synthesis temperature. X-ray diffraction analysis of Mg₂Ga/DNA_L hybrids indicated that the same *d* spacing (1.96 nm) was obtained irrespective of the DNA length (Figure 5).

To gain further insight into the LDH/DNA-hybrid assembly process, we investigated the effect of the Mg/Ga molar ratio (*R*) on the formation of Mg_RGa/DNA_L hybrids. As stated already, the Ga-containing LDHs are of interest because they can be obtained with a wide range of gallium contents. Four different Mg/Ga ratios were examined: *R* = 2, 3, 4, or 5. In all experiments, the concentration of the metallic nitrate solution was 0.033 M and the pH was adjusted to 10 by the simultaneous addition of 0.1 M NaOH under vigorous stirring and nitrogen flow. The position of the (110) reflection was then used to determine the effective *R* values of the prepared materials, using the correlation established elsewhere between parameters *a* and *x* in the

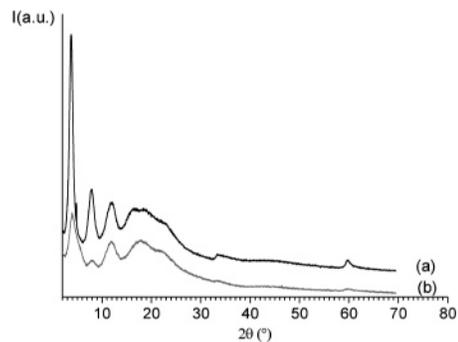


Figure 5. Powder X-ray diffraction patterns in the 2θ range 2–70° of Mg₂Ga/DNA hybrids prepared at 50 °C and intercalated with short (trace a) and long DNA fragments of 6000–8000 bp (Sigma D1626) (trace b).

formula unit.¹⁰ The comparison of the XRD patterns in Figure 6 revealed that the maximum Ga incorporation into an LDH–DNA structure was close to *R* = 2 and that when nominal ratios higher than 3 were used, materials with *R* values between 2 and 3 were invariably obtained (Figure 6B). When the Mg/Ga nominal ratio is 5, the excess Mg forms a Mg(OH)₂ phase that is clearly visible in the diffraction pattern. The position of the (003) reflection for Mg_RGa/DNA_L samples was also modified as the nominal

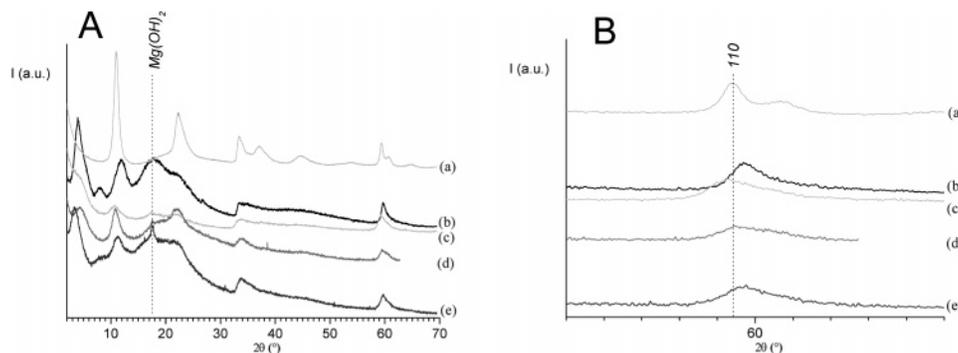


Figure 6. (A) Powder X-ray diffraction patterns in the 2θ range $2\text{--}70^\circ$ of Mg_2GaNO_3 (trace a) and $\text{Mg}_R\text{Ga-DNA}_L$ hybrids prepared at 50°C with various Mg/Ga ratios: $R = 2$ (trace b), $R = 3$ (trace c), $R = 4$ (trace d), and $R = 5$ (trace e). The vertical dashed line denotes Mg(OH)_2 . (B) The figure represents the corresponding in-plane reflections (110) in the 2θ range $55\text{--}65^\circ$.

Mg/Ga molar ratio was raised: 1.58 nm for $R = 3$, 1.84 nm for $R = 4$, and 2.29 nm for $R = 5$.

We finally examined the ability of $\text{Mg}_2\text{Ga/DNA}$ hybrids to carry DNA into carcinoma HeLa cells. The $\text{Mg}_2\text{Ga/DNA}$ hybrids containing DNA of various sizes and topologies were labeled with fluorescent DNA-intercalating dye YOYO-1 prior coprecipitation. Fluorescent LDH/DNA hybrids were incubated for 2 h with cells. The cells were then washed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde prior observation by microscopy. As shown in Figure 7, $\text{Mg}_2\text{Ga/DNA}$ hybrids were detected inside almost all of the cells irrespective of the DNA length and topology. Most of the fluorescent spots were observed in one area of the cell generally close to the plasma membrane or spread throughout the cell cytoplasm. In contrast, for cells incubated with naked DNA-YOYO-labeled, no fluorescence signal inside cells were observed irrespective of the DNA size and topology (data not shown). These photographs also contrast with that generally observed with cationic lipids or polymers mixed with DNA where large clumps accumulate in the perinuclear compartment (data not shown).

In the present study, we report the design and the synthesis of new labile, inorganic supramolecular assemblies of controlled formulation from which DNA is released upon a change in pH. These novel supramolecular assemblies consist of layered double hydroxide-DNA hybrids synthesized by coprecipitation, with the DNA molecules acting as templates. The coprecipitation or self-assembly method^{7,8} involves the in situ formation of LDH layers around intercalated DNA and allowed the intercalation of both short (100–500 bp) and long (6000–8000 bp) linear fragments, and also plasmid DNA, into LDHs. The optimum synthesis conditions were found to be a reaction temperature of 50°C , a magnesium–gallium LDH hydroxide layer with a Mg/Ga molar ratio of 2/1, and an amount of DNA in solution corresponding to twice the amount of Ga^{3+} , that is, twice the theoretical anionic exchange capacity. The intercalation of different DNA molecules in these conditions gave rise to the same interlamellar distance of 1.96 nm, which is indicative of a rather confined arrangement of DNA and consistent with a DNA double helix oriented parallel to the hydroxide layers. The X-ray diffraction patterns were typical of hybrid composites grown in the presence of polymers, with broad

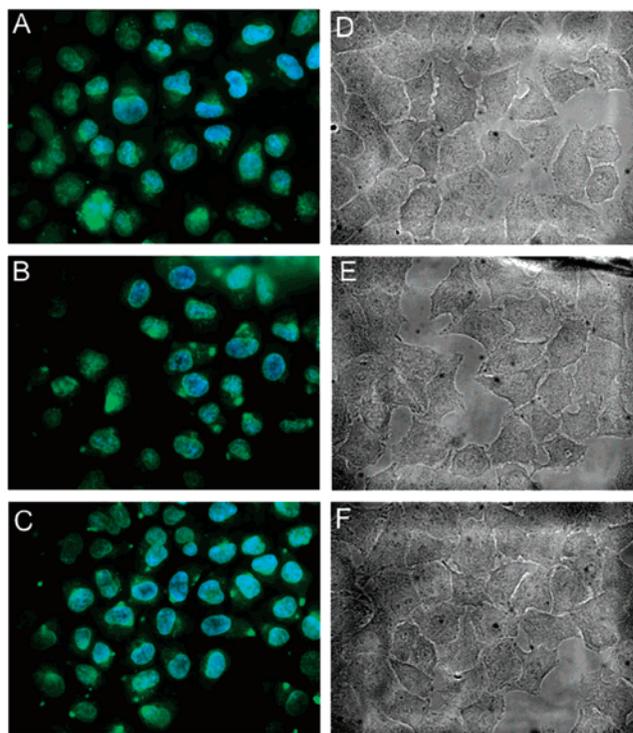


Figure 7. LDH/DNA hybrids were taken up by HeLa cells. Cells were exposed to $\text{Mg}_2\text{Ga/DNA}$ hybrids containing short DNA fragments (A, D), long DNA fragments (B, E), and plasmid DNA (C, D). DNA molecules were labeled with YOYO (1 molecule every 250 base pairs) before self-assembly with LDH. Cells were incubated with LDH/DNA hybrids for 2 h at 37°C in $300\ \mu\text{L}$ of OPTI-MEM. The medium was subsequently removed. Then, cells were washed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Finally, cells were washed with 1 mL of PBS and mounted with Vectashield with DAPI for observation. A–C correspond to the representative fluorescent micrographs. The YOYO-labeled DNA is shown in green, and nuclei are shown in blue because of the staining with DAPI. D–F correspond to the transmission images of the same cells. Magnification $\times 63$.

features attributed to a shortening of the coherence length. Yet, rather well-defined materials were obtained with Mg_2Ga with both short and long DNA fragments, as evidenced by the presence of several (00 l) harmonics and the (110) reflection, denoting relatively good stacking of the layers and intralamellar organization. When a Mg_2Al composition

was tested, the small amount of DNA_S relative to the amount of Al³⁺ was not enough to prevent the formation of Mg₂-Al/NO₃ in addition to Mg₂Al/DNA_S. However, an ill-defined material was formed with Mg₂Fe, and only reported for a Mg/Fe ratio of 2:1. In this case, strong distortions of both the host hydroxide layers and the DNA guest macromolecules are likely to occur, to satisfy the charge requirements of the two counterparts.

On the basis of TGA, the decrease in the interlamellar distance for Mg₂Ga/DNA_S as a function of the synthesis temperature can be ascribed to a decrease in the number of intercalated water molecules. Yet, the variations in the water loss were relatively small, and concomitant changes in DNA conformation may occur to explain the overall effect on the interlamellar distance. Indeed, previous studies^{14–16} have shown that increasing concentrations of cations such as Na⁺ and Mg²⁺, as well as high pH values >9.5, can cause the loss of the hydration of the base and sugar, leaving only the more polar phosphate oxygen atoms hydrated; the consequence is a rupture of hydrogen bonds, base unstacking, and, ultimately, a decrease in the thermal stability of the DNA. In view of the important changes in the XRD patterns of Mg₂Ga/DNA_S hybrids with increasing reaction temperature and of Mg_RGa/DNA_L hybrids with varying Mg²⁺/Ga³⁺ molar ratios, one might be tempted to say that we probably meet these extreme conditions here, at least for synthesis performed at 60 °C.

From the study on the variation of the layer charge density for Mg_RGa/DNA_L, it was inferred that the Mg²⁺/Ga³⁺ molar ratio within the hydroxide layers is somewhat controlled by the charge distribution over DNA macromolecules. Indeed, whatever the nominal Mg²⁺/Ga³⁺ molar ratio in solution, the Mg_RGa/DNA_L formed displayed an *R* value between 2 and 3. Calculations of the charge distribution over the DNA surface along the helix axis indicate surface areas per unit charge for the partially dehydrated DNA¹⁷ of 2.6 nm²/e, which almost coincide with those exhibited by Mg_RGa hydroxide layers for *R* = 2, that is, 2.5 nm²/e. As already mentioned for polymer-intercalated LDHs⁷, DNA molecules are likely to interact with charged complexes that form during cation hydrolysis, thus determining the Mg²⁺/Ga³⁺ molar ratio in LDH/DNA hybrids. The fluctuation of the basal spacing as a function of this ratio is also noticeable, particularly the low value observed for *R* = 3, of 1.58 nm. This again may be interpreted as considerable sensitivity to the sample preparation conditions.

As already reported for LDH hybrids grown in the presence of polymers^{7,8} and for a number of other systems⁹, macromolecules can play a role in the nucleation process, modifying the particle morphology and overall microstructure. Here, the presence of DNA clearly inhibits the growth and modifies the aggregation state of the particles, in comparison to the structure achieved by anion exchange between preformed LDH and DNA, which has already been reported to exhibit an interlayer distance of 2.39 nm.⁵

In conclusion, the cellular disassembly of nonviral gene delivery systems is one of the main avenues for improvement of their efficacy. The present study describes a new self-assembly chemical approach to synthesize degradable inorganic materials at acid pH, which was made previously by anion exchange between preformed Mg₂Al/NO₃ and DNA.^{5,12} We have established that by proper chemical synthesis we are able to entrap DNA molecules into a supramolecular assembly, which was taken up by carcinoma HeLa cells. The treatment of the LDH/DNA hybrids by acidic pH promotes hybrids disruption and the release of DNA from the complexes. We are currently studying in vitro gene delivery using these complexes. The intracellular disassembly process will also be studied through the introduction of molecular probes. Our LDH/DNA-hybrid approach represents a new way to synthesize new labile, nonviral gene delivery systems.

Acknowledgment. We are grateful to Clothilde Gourden for her excellent technical expertise. This work was supported by the APEX program financed by INSERM, by an 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.

References

- (1) Pitard, B. *Somatic Cell Mol. Genet.* **2002**, *27*, 5–15.
- (2) Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997–9007.
- (3) Martin, B.; Sainlos, M.; Aissou, A.; Oudrhiri, N.; Hauchecorne, M.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Lehn, P. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 375–394.
- (4) Layered Double Hydroxide: Synthesis and Postsynthesis Modifications. In *Layered Double Hydroxides: Present and Future*; Rives, V., Ed.; Nova Science Publishers: New York, 2001.
- (5) Choy, J. H.; Kwak, S. Y.; Park, J. S.; Jeong, Y. J.; Portier, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1399–1400.
- (6) Pitard, B. Composition comprising nucleic acids incorporated in bilamellar mineral particles. International patent application PCT/FR00/03702, international publication WO0149869.
- (7) Wilson, O. C.; Olorunoyemi, T.; Jaworski, A.; Borum, L.; Young, D.; Siriawat, A.; Dickens, E.; Oriakhi, C.; Lerner, M. *Appl. Clay Sci.* **1999**, *15*, 265–279.
- (8) Leroux, F.; Gachon, J.; Besse, J. P. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 245–250.
- (9) Cölfen, H.; Mann, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2350–2365.
- (10) Lopez-Salina, E.; Garcia-Sanchez, M.; Ramon-Garcia, M. L.; Schiffer, J. *J. Porous Mater.* **1996**, *3*, 169–174.
- (11) Miyata S. *Clays Clay Miner.* **1983**, *31*, 305–311.
- (12) Choy J. H.; Kwak, S. Y.; Jeong, Y. J.; Park, J. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 4041–4045.
- (13) Ferrari S.; Moro, E.; Pettenazzo, A.; Behr, J. P.; Zacchello, F.; Scarpa, M. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1100–1106.
- (14) Schneider B.; Patel, K.; Berman, H. M. *Biophys. J.* **1998**, *15*, 2422–2434.
- (15) Williams M. C.; Wenner, J. R.; Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 874–881.
- (16) Tarahovsky Y. S.; Rakhmanova, V. A.; Epand, R. E.; MacDonald, R. C. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 264–273.
- (17) Brown T. A. Genomes John Wiley & Sons Inc., BIOS Scientific Publishers Ltd. 2002.

NL052020A

Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for *in vivo* gene transfer

Bruno Pitard*, Mahajoub Bello-Roufaï, Olivier Lambert¹, Peggy Richard, Léa Desigaux, Sarah Fernandes, Caroline Lanctin, Hélène Pollard, Mehdi Zeghal², Pierre-Yves Rescan³ and Denis Escande

L'institut du Thorax, Inserm U533, Faculté de Médecine, 44035 Nantes, France, ¹IECB-UBS UMR CNRS 5471 CNRS, Université Bordeaux 1, avenue des Facultés, 33405 Talence, France, ²Université Paris XI, 91400 Orsay, France and ³INRA-SCRIBE, Campus Beaulieu, 35042 Rennes, France

Received August 25, 2004; Revised and Accepted October 19, 2004

ABSTRACT

Over the past decade, numerous nonviral cationic vectors have been synthesized. They share a high density of positive charges and efficiency for gene transfer *in vitro*. However, their positively charged surface causes instability in body fluids and cytotoxicity, thereby limiting their efficacy *in vivo*. Therefore, there is a need for developing alternative molecular structures. We have examined tetrabranched amphiphilic block copolymers consisting of four polyethyleneoxide/polypropyleneoxide blocks centered on an ethylenediamine moiety. Cryo-electron microscopy, ethidium bromide fluorescence and light and X-ray scattering experiments performed on vector-DNA complexes showed that the dense core of the nanosphere consisted of condensed DNA interacting with poloxamine molecules through electrostatic, hydrogen bonding and hydrophobic interactions, with DNA molecules also being exposed at the surface. The supramolecular organization of block copolymer/DNA nanospheres induced the formation of negatively charged particles. These particles were stable in a solution that had a physiological ionic composition and were resistant to decomplexation by heparin. The new nanostructured material, the structure of which clearly contrasted with that of lipoplexes and polyplexes, efficiently transferred reporter and therapeutic genes in skeletal and heart muscle *in vivo*. Negatively charged supramolecular assemblies hold promise as therapeutic gene carriers for skeletal and heart muscle-related diseases and expression of therapeutic proteins for local or systemic uses.

INTRODUCTION

According to the prevailing paradigm, the principle of nonviral gene delivery lies in the condensation of DNA in the presence of cationic molecules with a high density of positive charges

[cationic lipids, polyethylenimine (PEI), polylysine] (1–5). Polyplexes and lipoplexes consisting of highly ordered structures of DNA molecules trapped within positively charged supramolecular assemblies have clearly demonstrated their transfection efficiency *in vitro* (6). However, aggregation in tissue fluids, toxicity and low *in vivo* efficiency have thus far hampered their clinical use. Non-ionic amphiphilic polymers were recently found to promote gene delivery *in vivo*, in tissues such as skeletal and cardiac muscle (7,8). The physicochemical properties of particles formed by non-ionic polymers and DNA are, however, ill-defined (8). This is a concern for *in vivo* investigation and clinical use, as the latter requires detailed physicochemical characterization. Consequently, new approaches to produce small and highly active assemblies that are homogeneous in size and exhibit colloidal stability are sought. These properties are needed for production of pharmaceutically acceptable formulations aimed at vector-based gene therapy. With this goal in mind, we decided to combine in the same molecule, the properties of cationic vectors and those of non-ionic amphiphilic polymers. We used poloxamine block copolymers, which have a tetrafunctional structure consisting of four polyethyleneoxide/polypropyleneoxide (PEO/PPO) blocks centered on an ethylenediamine moiety. Such block copolymers are largely used in the pharmaceutical sciences. Block copolymers are adsorbed on nanoparticles through binding of their hydrophobic PPO segments while their hydrophilic PEO segments extend outwardly. The steric stabilization thus achieved improves their pharmacokinetics (9). We defined experimental conditions under which DNA molecules collapsed into oligomolecular complexes exhibiting new structural characteristics. These negatively charged nanospheres are able to deliver reporter and therapeutic genes to skeletal and heart muscle cells *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid DNA, poloxamine and formulation

Plasmids encoding reporter genes were described previously (8). The chloramphenicol acetyl transferase (CAT) plasmid was kindly provided by D. Gill (Oxford, UK) and described previously (10). The plasmid encoding human

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 2 40 41 29 74; Fax: +33 2 40 41 29 50; Email: bruno.pitard@nantes.inserm.fr

minidystrophin-GFP (11) was kindly provided by J. Tremblay (Université de Laval, Ste Foy, Qc, Canada) and J.T. Vilquin (Inserm U582, Paris, France). The plasmid encoding the secreted human alkaline phosphatase (SeAP) contains the cytomegalovirus (CMV) IE1 promoter and the bovine growth hormone polyadenylation signal. The plasmid encoding the tetracycline inducible murine erythropoietin (EPO) (pTetO-mEPO) has been described previously (12). All plasmids were purified from recombinant *Escherichia coli* using Endo-Free plasmid purification columns (Qiagen).

Poloxamines, which are four-branched block copolymers of PEO and PPO, were generously provided by BASF, and were used as received. Stock solutions (20% w/v) were prepared in water. Formulations of DNA with poloxamine were always prepared by mixing equal volumes of poloxamine stock solution in water and plasmid DNA solution at the desired concentration in 300 mM NaCl or in 2× Tyrode's solution.

Fluorescence studies

Fluorescence measurements were carried out on a Kontron SFM25 spectrofluorimeter. Fluorescence was monitored immediately after adding ethidium bromide (final concentration of 5 μ M) to solutions containing 10 μ g/ml of DNA and various concentrations of poloxamine.

Electrophoretic and dynamic light scattering

Electrophoretic and dynamic light scattering measurements were made on a Zetasizer 3000HSA (Malvern) at 20°C. The poloxamine 304/DNA complexes were prepared using different DNA and poloxamine 304 concentrations in the Tyrode's solution.

Cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM)

Poloxamine 304/DNA complexes were prepared with 0.3 mg/ml of DNA. A 5 μ l sample was deposited onto a holey carbon coated copper grid, the excess was blotted with a filter paper, and the grid was plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen (Leica EM CPC). Specimens were observed at a temperature of \sim -170°C, using a cryo holder (Gatan), with a FEI Tecnai F20 electron microscope operating at 200 kV. Images were obtained at a nominal magnification of 50 000× under low-dose conditions. Micrographs were recorded on Kodak SO163 films.

X-ray scattering

Poloxamine 304 and poloxamine 304/DNA complexes were prepared in Tyrode's solution or in 150 mM NaCl. Samples were loaded into 1 mm Lindemann type glass capillary. The X-ray scattering experiments were carried out by using the synchrotron radiation source of European Synchrotron Facility (Grenoble, France) on beamline ID2. The experiments were performed at an incident wavelength of 1.45 Å with a sample to detector distance of 3 mm and the scattering vector in the range $0.07 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$. Two-dimension SAXS patterns were recorded using an X-ray image intensifier (Thomson) lens coupled to a fast read out CCD (Frelon) camera, and appropriate corrections were carried out (13).

Reporter gene assay

Intramuscular and intracardiac gene transfer procedures were performed as described previously (8). Luciferase, β -galactosidase and green fluorescent protein (GFP) activities were measured as described previously (8). For SeAP quantification, blood was collected from the retro-orbital cavity and the serum, obtained by centrifugation. Mouse serum levels of SeAP were measured by ELISA (Ozyme).

In vivo delivery of therapeutic genes

Doxycycline (Ronaxan, Merial) was dissolved in drinking water to a final concentration of 200 μ g/ml in 5% sucrose. Swiss mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of 40 mg/kg hypnomidate. Fifty microliters of the poloxamine 304/DNA formulation was injected into shaved tibial anterior muscles at one site, using a microfine syringe (U100, Becton Dickinson). At least five female Swiss mice (8 week) were injected in each experimental group for hematocrit measurement. Hematocrit was determined by microcapillary centrifugation of blood samples. For EPO measurements, blood was collected from the retro-orbital cavity and serum obtained by centrifugation. Mice serum EPO levels were measured as described previously (12). Male mdx mice (8 week) were obtained from Iffa Credo. Mdx mice were anesthetized with xylazine and 50 μ l of the formulation with Tyrode's solution containing 50 μ g of DNA was injected into shaved tibial anterior muscles. Muscles were dissected, embedded in Tissue-Tek, frozen in isopentane, and cut into sections 10 μ m thick. Minidystrophine-GFP expression was analyzed by fluorescence microscopy in transverse sections.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA complexation with poloxamine

Poloxamines are branched block copolymers consisting of PEO and PPO blocks fixed to an aliphatic diamine (Figure 1A). The presence of the central ethylenediamine moiety renders the molecule positively charged. At physiological pH, there is one positive charge per poloxamine molecule, due to a shift in pKa of the second amine caused by the effect of charge repulsion (14). The basic ethylenediamine moiety has a pKa of 9.4 (14). The physical properties of the poloxamines used in this study are summarized in Figure 1B. DNA was complexed in saline with increasing amounts of poloxamine and exposed to ethidium bromide, which was used as a fluorescent probe as it intercalates between DNA base pairs. As the concentration of poloxamine increased, plasmid DNA molecules became progressively inaccessible to the probe. Among the different poloxamines tested, 304 was found to be the most potent for DNA complexation, possibly because of its low molecular weight (Figure 1C). We investigated how DNA complexation with poloxamine may be affected by interactions with electrolytes as they are found *in vivo* and may be required to adjust solution tonicity. In a medium that mimicked physiological extracellular ionic conditions (Tyrode's solution containing divalent cations), poloxamine 304/DNA complexes exhibited a more pronounced decrease in fluorescence intensity than in saline. The minimum fluorescence level was reached at

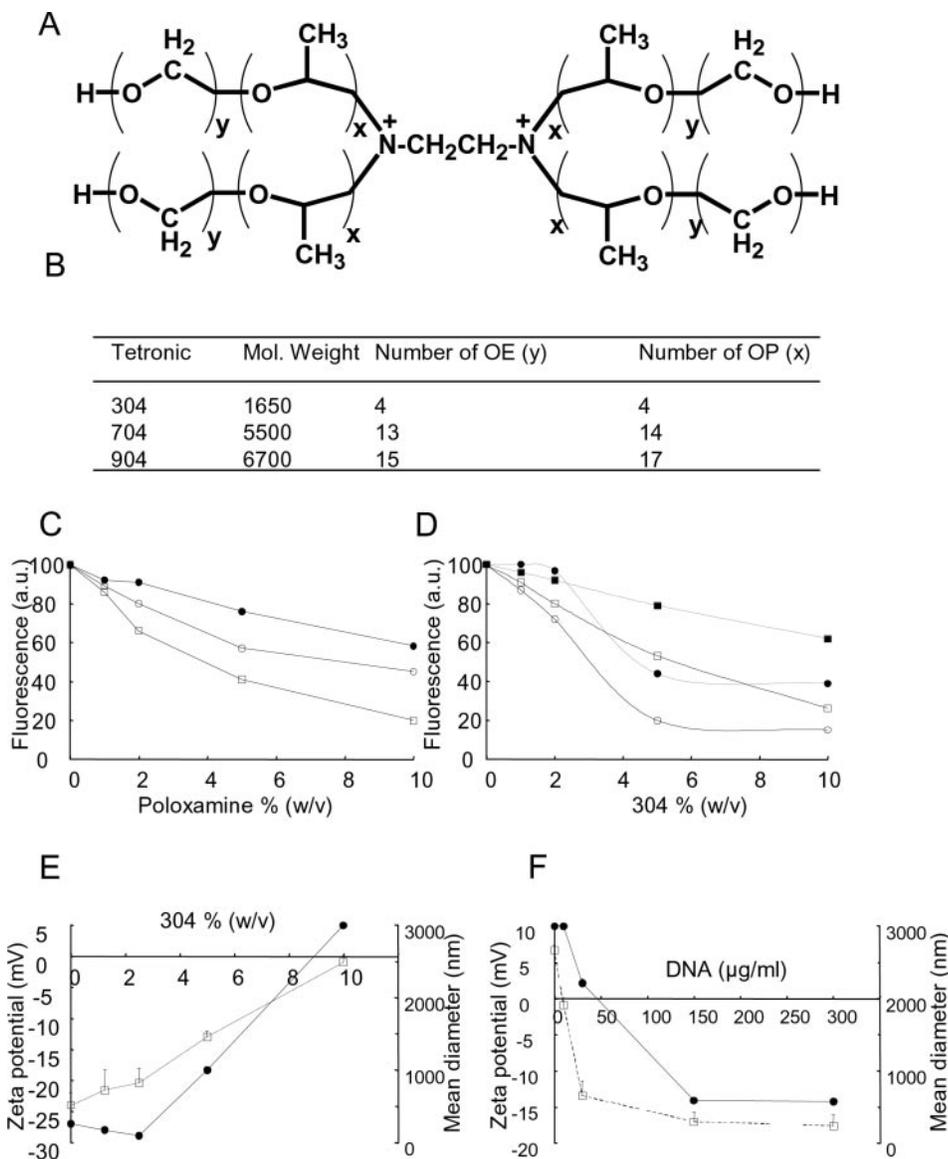


Figure 1. Physicochemical properties of poloxamine and poloxamine/DNA complexes. (A) General structure of poloxamines. (B) Physical properties of various poloxamines. (C) Fluorescence measurements to assess DNA complexation with poloxamine 304 (open squares), 704 (open circles) and 904 (filled circles). (D) Fluorescence measurements of poloxamine 304/DNA complexes formed in saline (open squares) and in Tyrode's solution (open circles). Poloxamine 304/DNA formulations with saline (filled squares) and Tyrode's solution (filled circles) were incubated with 100 mU/ml of heparin (dashed line). (E) Zeta potential (open squares) and hydrodynamic diameter (filled circles) of poloxamine 304/DNA complexes formed in Tyrode's solution with 10 μ g/ml DNA, as a function of the concentration in poloxamine 304. (F) Zeta potential (open squares) and hydrodynamic diameter (filled circles) of poloxamine 304/DNA complexes formed in Tyrode's solution with 10% poloxamine 304, as a function of DNA concentration.

5% poloxamine 304 (Figure 1D). This suggests that the DNA included in the complexes formed in the Tyrode's solution was in a more condensed state.

Interaction of complexes with the extracellular matrix is another important parameter for *in vivo* gene delivery since components such as negatively charged heparin can destabilize complexes made with highly cationic vectors, causing the early release of DNA molecules from the lipoplexes and polyplexes (15,16). As shown in Figure 1D, fluorescence intensity of poloxamine 304/DNA complexes moderately increased in the presence of heparin suggesting that DNA molecules remained complexed with 304. On the contrary, DNA did not remain complexed with PEI under identical conditions (data not shown) suggesting different charge surface

characteristics. Electrophoretic light scattering measurements showed that the zeta potential of poloxamine 304/DNA complexes became less negative as the concentration of poloxamine 304 increased, and reached zero at 10% poloxamine 304 (Figure 1E). Concomitantly, the hydrodynamic diameter of 304/DNA complexes, measured by dynamic light scattering, increased (Figure 1E), likely because neutral complexes tend to aggregate due to attractive Van der Waals forces. Because of the amphiphilic nature of poloxamines, increasing their concentration induces their self-assembly in solution forming large aggregates of lyotropic liquid crystalline mesophases (17). As a result, we could not apply the strategy used with cationic lipids or cationic homopolymers, which consists in increasing the amount of cationic vector to

obtain complexes with a good colloidal stability that is needed for *in vivo* gene transfer. We therefore tested various DNA concentrations with a constant concentration of poloxamine 304, i.e. 10%. Electrophoretic light scattering measurements revealed that poloxamine 304 alone had a positive zeta potential (Figure 1F). When poloxamine 304 was complexed with increasing amounts of DNA compatible with *in vivo* experimentation (see below), the zeta potential decreased to $-18 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$. Concomitantly, the hydrodynamic diameter of poloxamine 304/DNA complexes decreased as DNA concentration increased (Figure 1F). Similar results were obtained with 5% poloxamine 304 (data not shown). Ethidium bromide fluorescence was also measured to monitor condensation of high concentrations of DNA mixed with 10% poloxamine 304. Surprisingly, fluorescence intensity remained low irrespective of DNA concentration (data not shown). In contrast, at a given concentration of cationic homopolymer such as PEI, fluorescence intensity increased when the DNA concentration increased. This suggests that PEI/DNA complexes had to be positively charged for all molecules to condense. Inversely, when poloxamine 304 condensed DNA molecules, negatively charged particles were formed. These complexes formed stable colloids at room temperature for several weeks (data not shown) most likely because of repulsive electrostatic forces which are proportional to the square of the zeta potential (18).

Cryo-electron microscopy and X-ray scattering studies of poloxamine 304 and poloxamine 304/DNA complexes

Cryo-electron micrographs showed that plasmid DNA appeared dispersed in 150 mM NaCl (data not shown) whereas poloxamine 304 formed dense stiff, 25 nm in length (Figure 2A). In 150 mM NaCl, the poloxamine 304/DNA mixture formed a network of bundles, several micrometers in length, suggesting that the presence of poloxamine 304 induced DNA condensation (Figure 2B). At a higher magnification, DNA molecules were linearly condensed and no periodic repeats could be observed between DNA strands (Figure 2C). Molecular interactions between DNA strands were probably mediated through poloxamine 304. In the Tyrode's solution containing divalent cations, poloxamine 304 alone self-assembled into globular nanospheres (of $\sim 35 \text{ nm}$ in diameter) with a smooth surface. These nanospheres were bound together in clusters of several micrometers (Figure 2D). When plasmid DNA in 2 \times Tyrode's solution and poloxamine 304 in water were combined by equivolumetric mixing, globular structures were also formed although they differed from those formed with poloxamine alone (Figure 2E). These globules were larger ($\sim 60 \text{ nm}$ in diameter) and had a rough surface (Figure 2F). In addition, clusters were smaller and did not include as many globules, in agreement with their size determined by dynamic light scattering. These modifications in size and shape of the nanospheres suggested that DNA molecules were condensed inside and at the surface of the globules, in agreement with their negative zeta potential. Altering the ionic environment had a drastic effect on self-assemblies of poloxamine 304, which in turn modulated DNA condensation.

X-ray scattering data for poloxamine 304 revealed that intensity scattering was higher in Tyrode's solution than in

saline, indicating that self-assembly of poloxamine 304 molecules was more efficient in the Tyrode's solution (Figure 2G). In the Tyrode's solution, the presence of both poloxamine 304 and DNA increased scattering intensity by a factor of five as compared to the sum of the scattering intensities for each constituent. This indicated that DNA and poloxamine interacted attractively to form the nanospheres seen in cryo-TEM. A similar, although less spectacular, interaction was also observed in saline. X-ray scattering study of poloxamine/DNA complexes did not reveal a correlation peak within the investigated q range, suggesting that no periodic structure was present irrespective of the medium used. X-ray scan data were corroborated by cryo-TEM results.

To account for the data, it is suggested that the dense core of nanospheres consisted of condensed DNA interacting with poloxamine molecules through electrostatic, hydrogen bonding and hydrophobic interactions, with DNA molecules also being exposed at the surface. This architecture contrasts with that of classical cationic complexes where DNA molecules are trapped into a positively charged supramolecular assembly (19–23).

Cryo-TEM micrographs of combinations of poloxamine/DNA nanospheres with an artificial lipid membrane showed that the complexes were concentrated at the surface of liposomes with some complexes releasing their DNA (Figure 2H). This indicated that poloxamine/DNA nanospheres were able to fuse with lipid membranes. An attractive hypothesis would be that, in the living cell, DNA molecules associated with the nanospheres may be delivered directly to the cytoplasm following fusion with the plasma and/or endosomal membrane. Therefore, this double mode of cytoplasm entry could avoid the endosomal/lysosomal degradation by enzymes which are activated at low pH. In contrast, it has been fully documented that cationic complexes are internalized through endocytosis (24,25) with only a fraction of DNA molecules escaping lysosomal degradation.

***In vivo* reporter gene delivery**

We assessed the potential of poloxamine/DNA nanospheres generated in the Tyrode's solution to transfer genes into the tibial anterior muscle. Seven days after injection of poloxamine/DNA nanospheres, the expression of reporter gene was monitored. The presence of 5 and 10% poloxamine 304 increased luciferase expression by a factor of 17 and 30, respectively, as compared with naked DNA (Figure 3A). A comparable increase in transfection efficiency was observed with the CAT gene (data not shown). Luciferase expression increased as the amount of injected formulated plasmid increased (Figure 3B). Figure 3C shows that luciferase expression increased with poloxamine 304 irrespective of the mouse strain tested (C57Bl6, Swiss, C57Bl10).

Mice were further injected with a plasmid encoding the SeAP reporter gene. Expression in serum was evaluated 7 days post-injection. Formulations containing 5 and 10% (w/v) poloxamine 304 increased SeAP activity in serum by a factor of 12 and 18, respectively, as compared with naked DNA (Figure 3D). *In vivo* transfection efficiency of poloxamine 304/DNA nanospheres was compared with that of sequential injection of DNA and poloxamine 304. Poloxamine 304/DNA

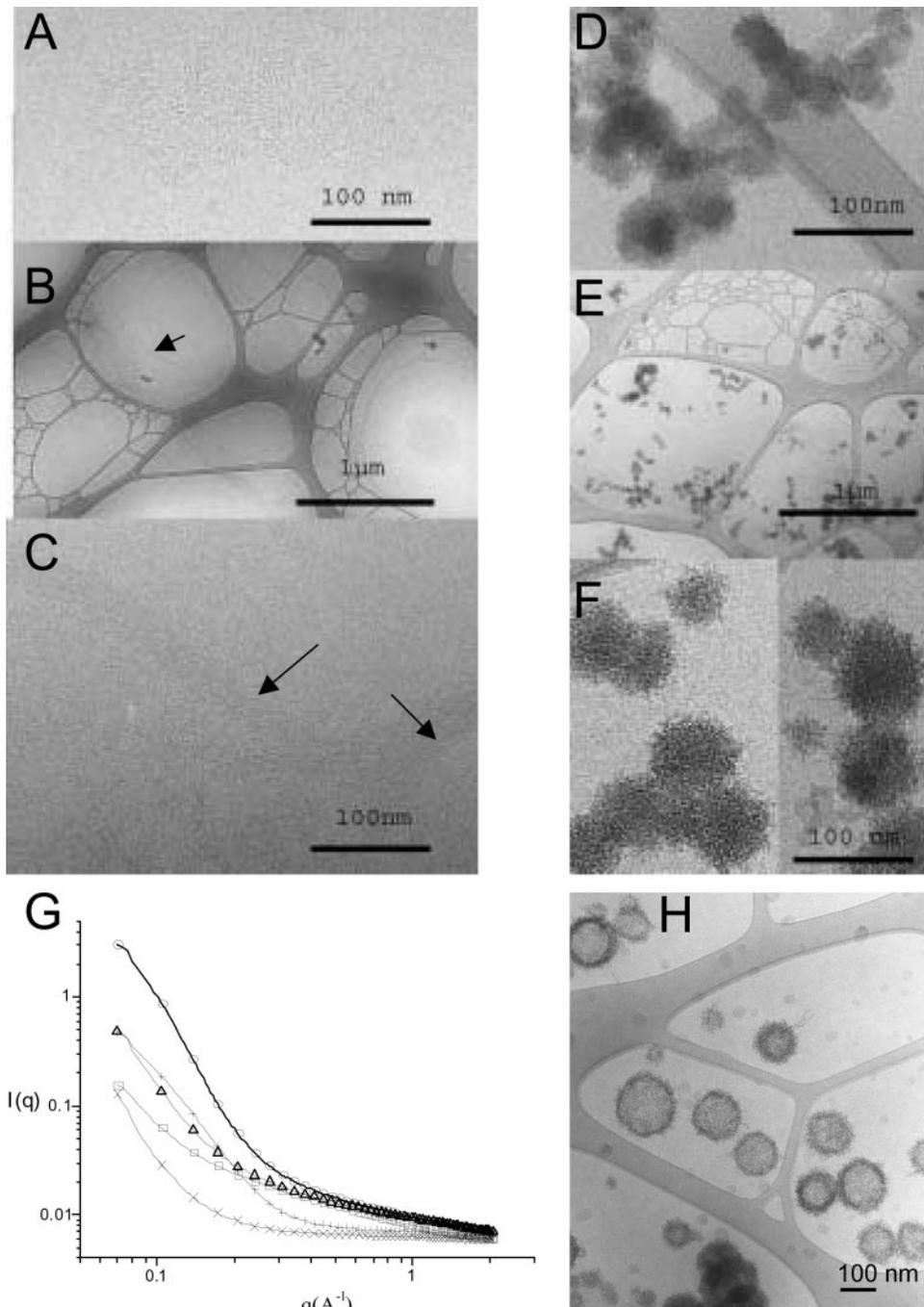


Figure 2. Cryo-TEM micrographs and X-ray scattering of poloxamine 304 and poloxamine 304/DNA complexes in saline and in Tyrode's solution. (A) Cryo-TEM micrograph of a 10% poloxamine 304 in saline. (B) Cryo-TEM micrograph of 304/DNA complexes with 10% poloxamine 304 in saline. (C) Cryo-TEM micrograph of the same sample at higher magnification. (D) Cryo-TEM micrograph of poloxamine 304 in Tyrode's solution. (E) Cryo-TEM micrograph of a poloxamine 304/DNA complexes with 10% poloxamine 304 in Tyrode's solution. (F) The same sample at a higher magnification. (G) Small-angle X-ray scattering scans of: poloxamine 304 in saline (crosses), in Tyrode's solution (plus sign), of DNA in Tyrode's solution (open squares), of poloxamine 304/DNA complexes in saline (open triangles) and in Tyrode's solution (open circles). (H) Cryo-TEM micrograph of poloxamine 304/DNA complexes in Tyrode's solution interacting with unilamellar vesicles of phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol (30:70, w:w).

nanospheres were by far more effective in promoting transfection in the muscle (Figure 3E), suggesting that poloxamine 304 was active when complexed with DNA and did not act as a facilitating agent. Figure 3F shows transfection performance of our nanospheres in comparison with electrotransfer of naked DNA, a potent method for intramuscular transfection. Quantification of β -galactosidase activity showed that the

level of transgene expression obtained with poloxamine 304/DNA nanospheres was slightly higher than that achieved by the electrotransfer procedure. Transgene distribution was assessed using β -galactosidase and GFP reporter plasmids. The number of transgene-expressing fibers increased when poloxamine 304/DNA nanospheres were injected. Transfection of $\sim 40\%$ of the muscle fibers were so obtained

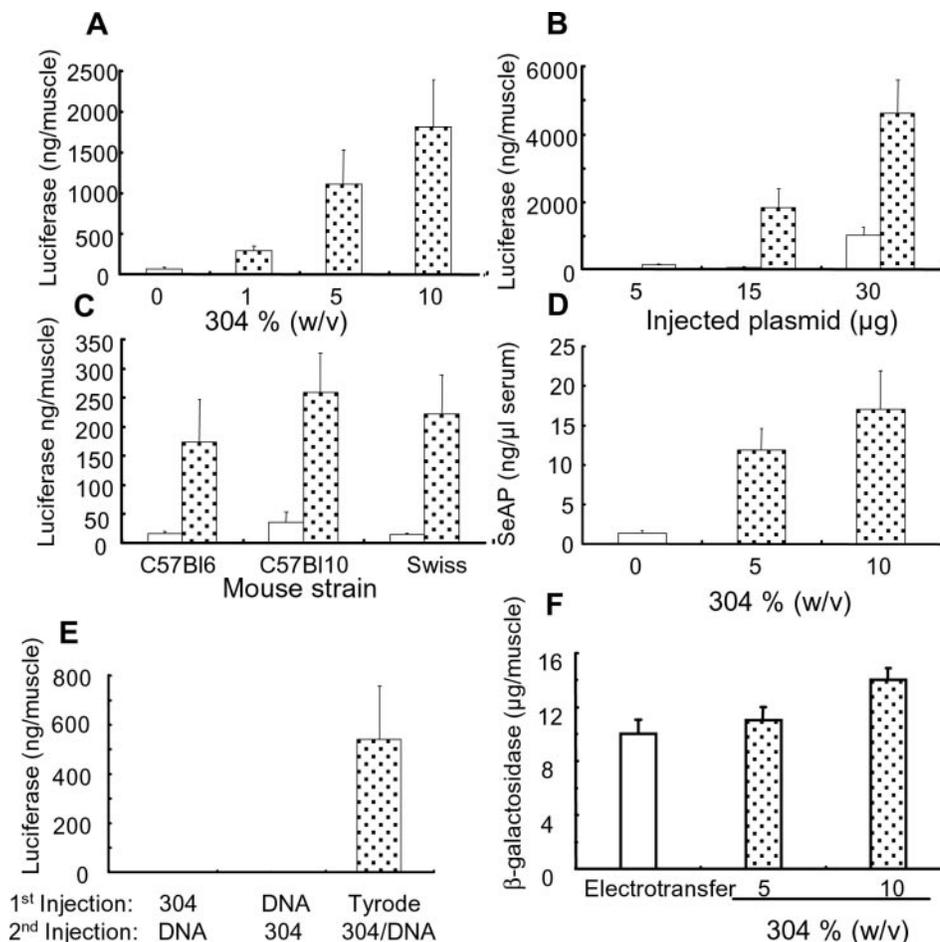


Figure 3. *In vivo* reporter gene transfer in the mouse tibial anterior muscle. (A) Luciferase activity after intramuscular injection of 15 μg of DNA, naked (open column) or complexed with poloxamine 304 (dotted columns). (B) Expression of luciferase in the muscle as a function of the amount of injected DNA, naked (open columns) or complexed with 10% poloxamine 304 (dotted columns). (C) Luciferase expression after intramuscular injection of 15 μg of DNA, naked (open columns) or complexed with 10% poloxamine 304 (dotted columns), in various mouse strains. (D) Secreted alkaline phosphatase quantification after intramuscular injection of 15 μg of naked plasmid DNA (open column) or complexed with poloxamine 304 (dotted columns). (E) Luciferase expression as a function of the composition of the injected formulation. The luciferase plasmid (15 μg of DNA) was first injected, and 3 h later, a solution of 10% poloxamine 304 was injected into the same tibial anterior muscle or vice versa. In the control experiment, Tyrode's solution alone was injected at first. The poloxamine 304/DNA complexes, containing 15 μg of DNA and 10% poloxamine 304 in Tyrode's solution, was injected 3 h later. Reporter gene expression was monitored 7 days after the intramuscular injection of DNA, either naked or complexed with poloxamine 304. (F) Comparison of the muscle transfection efficiency of poloxamine 304/DNA complexes and electrotransferred naked DNA. Quantitative determination of β-galactosidase gene expression 7 days after electrotransfer of pCMV-βgal (open column) or injection of pCMV-βgal complexed with poloxamine 304 (dotted columns).

(Figure 4B–F). Poloxamine 304/DNA nanospheres also increased transfection efficiency in the zebrafish myotome (Figure 4H–J) as compared with naked DNA (Figure 4G).

We also investigated transfection efficiency of poloxamine/DNA nanospheres in the rat heart muscle. Naked DNA or poloxamine 304/DNA nanospheres were injected into the free wall of the left ventricle through a thoracotomy. A larger area of tissue expressed β-galactosidase with poloxamine 304/DNA nanospheres (Figure 5C–E) than with naked DNA (Figure 5A and B).

***In vivo* delivery of therapeutic genes with poloxamine 304**

Next, poloxamine/DNA nanospheres were tested for the delivery of therapeutic genes. We investigated the expression of EPO and dystrophin because of their potential relevance in

renal disease and Duchenne muscular dystrophy. Mice were intramuscularly injected with a naked plasmid encoding Tet-on inducible murine EPO, or with the plasmid formulated with poloxamine 304. Doxycycline was given in drinking water to half of the animals from day one and the hematocrit was repetitively determined. In the absence of doxycycline, mice injected with naked DNA or poloxamine 304/DNA nanospheres had a slightly, albeit nonsignificant, increased hematocrit (Figure 6A). In the presence of doxycycline, the hematocrit increased significantly at day 14 with 30 μg of naked DNA (Figure 6A). This increase was however transient and values progressively returned to control levels. In contrast, in mice treated with doxycycline that were injected with 10 μg of DNA complexed with poloxamine 304, the hematocrit remained elevated for up to 70 days post-injection (Figure 6A). The transient increase in hematocrit following injection of naked DNA was interpreted as resulting from an

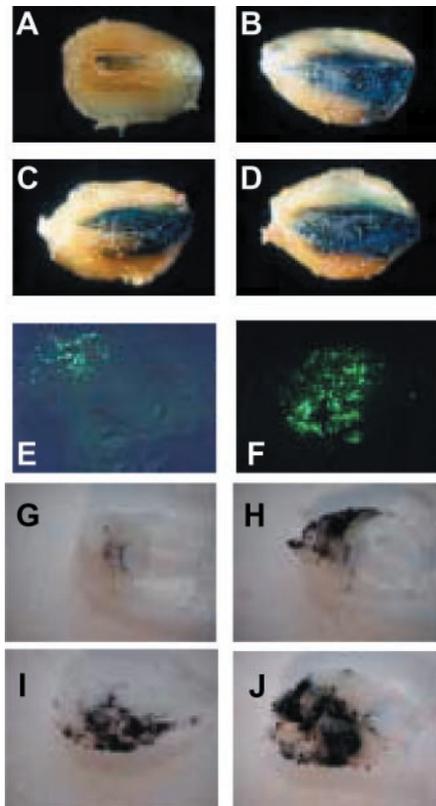


Figure 4. Visualization of reporter gene expression in the mouse tibial anterior muscle and in zebrafish muscle. Photographs of tibial anterior muscles were taken 7 days after intramuscular injection of plasmid DNA encoding the β -galactosidase gene in the absence of poloxamine 304 (A), with 5% (B) or 10% poloxamine 304 (C and D). Tissue sections of mouse tibial anterior muscles, 7 days after injection of naked plasmid DNA encoding GFP (E), and complexes of DNA with 5% poloxamine 304 (F). Photographs of sections of zebrafish myotomes 7 days after injection of plasmid DNA encoding β -galactosidase in the absence of poloxamine 304 (G) or in the presence of 1% (H), 5% (I) and 10% poloxamine 304 (J).

immune response to unmethylated CpG dinucleotides present in bacterial DNA. Lowering the amount of DNA injected in muscles with poloxamine 304 possibly caused a milder immune reaction, which resulted in prolonged expression of erythropoietin. One hundred and ten days after injection of the poloxamine 304/DNA nanospheres containing 10 μ g of DNA and 5% poloxamine 304, serum EPO was 51 \pm 15 mU/ml in the presence of doxycycline and 3.5 \pm 3.3 mU/ml in its absence (data not shown).

Human minidystrophin-GFP plasmids formulated with or without poloxamine 304 were injected into the tibial anterior muscle of mdx mice. After 7 days, tissue sections showed that the percentage of transfected fibers was much greater with poloxamine 304 (15% of fibers on average) (Figure 6C) than without (Figure 6B).

By preventing non-specific interactions with extracellular matrix components and due to their small size, poloxamine/DNA nanostructured complexes may facilitate diffusion through the whole tissue and promote internalization in the target cell. On the contrary, biodiffusion of naked DNA and highly positively charged complexes may be hampered by the large size and electrostatic interaction with extracellular

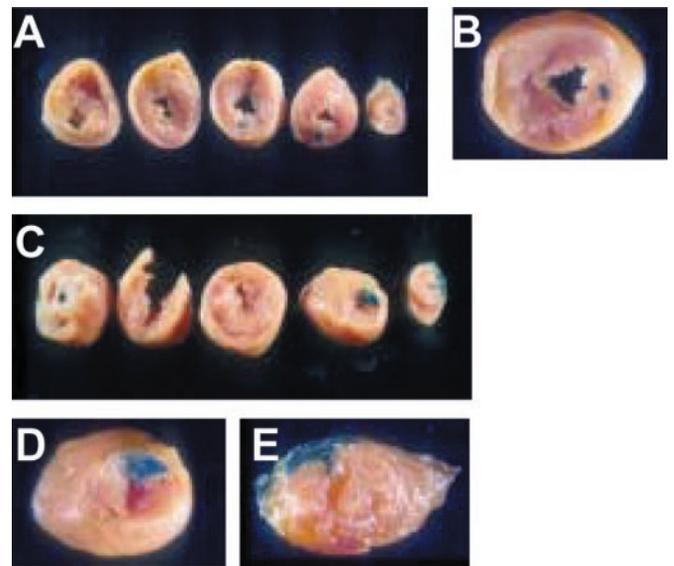


Figure 5. Gene transfer in rat heart muscle after direct injection into the left ventricle myocardium. Heart sections 3 days after injection of 240 μ g of naked plasmid DNA encoding β -galactosidase (A and B). Heart sections 3 days after intramyocardial injection of β -galactosidase with 5% poloxamine 304 (C, D, E).

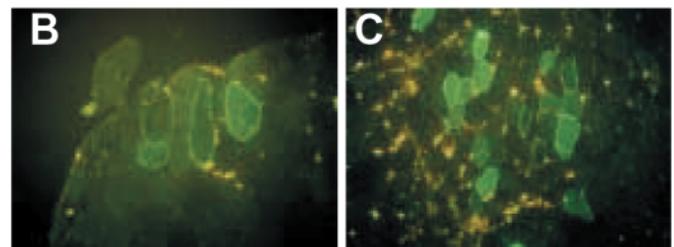
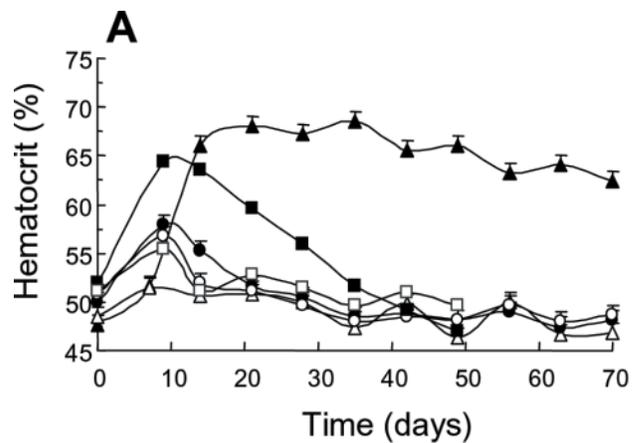


Figure 6. *In vivo* delivery of therapeutic genes. (A) Mice hematocrit as a function of time after injection of plasmid DNA encoding inducible murine EPO either naked or complexed with 5% poloxamine 304. Tibial anterior muscles were injected with 10 μ g (filled and open circles) and 30 μ g (filled and open squares) of naked DNA, and with the poloxamine 304/DNA complexes containing 10 μ g of DNA (filled and open triangles). Ten mice were injected in each experiment: five were treated with doxycycline (filled symbols) while the other five were not (empty symbols). Photomicrographs of tissue sections of tibial anterior muscles of mdx mice injected with naked plasmid DNA encoding the human minidystrophin-GFP (B) or the poloxamine 304/DNA complexes (C).

matrix respectively. These DNA-coated nanostructured complexes can theoretically carry DNA fragments of unlimited size and are compatible with multiple injection schemes. Poloxamine vectors offer advantageous production conditions for pharmaceutically acceptable formulations, which makes them promising new agents for gene therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Clothilde Gourden for her excellent technical expertise, Jacques Tremblay and Jean-Thomas Vilquin for providing us with human minidystrophin-GFP-encoding plasmid, P. Panine for helpful discussion during the synchrotron experiments, and Jean Léger, L. Auvray and P. Davidson for fruitful discussions. This work was supported by the APEX program financed by INSERM, by an 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.

REFERENCES

- 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. USA*, **84**, 7413–7417.
- Gao, X.A. and Huang, L. (1991) A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 280–285.
- 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. USA*, **86**, 6982–6986.
- 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. USA*, **92**, 7297–7301.
- Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raimond, J., Mayer, R., Monsigny, M. and Roche, A.C. (1993) Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 871–878.
- Pitard, B. (2002) Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat Cell Mol. Genet.*, **27**, 5–15.
- 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.
- Pitard, B., Pollard, H., Agbulut, O., Lambert, O., Vilquin, J.T., Chereil, 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.
- Neal, J.C., Stolnik, S., Garnett, M.C., Davis, S.S. and Illum, L. (1998) Modification of the copolymers poloxamer 407 and poloxamine 908 can affect the physical and biological properties of surface modified nanospheres. *Pharm. Res.*, **15**, 318–324.
- 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.
- Chapdelaine, P., Moisset, P.A., Campeau, P., Asselin, I., Vilquin, J.T. and Tremblay, J.P. (2000) Functional EGFP–dystrophin fusion protein for gene therapy vector development. *Protein Eng.*, **13**, 611–615.
- Richard, P., Pollard, H., Lanctin, C., Bello-Roufaï, M., Désigaux, L., Escande, D. and Pitard, B. (2004) Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation. *J. Gene Med.*, doi:10.1002/jgm.631.
- Narayanan, T., Diat, O. and Boesecke, P. (2001) SAXS and USAXS on the high brilliance beamline at the ESRF. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*, **467–468**, 1005–1009.
- Armstrong, J.K., Chowdhry, B.Z., Snowden, M.J., Dong, J. and Leharne, S.A. (2001) The effect of pH and concentration upon aggregation transitions in aqueous solutions of poloxamine T701. *Int. J. Pharm.*, **229**, 57–66.
- Moret, I., Esteban Peris, J., Guillem, V.M., Benet, M., Revert, F., Dasi, F., Crespo, A. and Alino, S.F. (2001) Stability of PEI–DNA and DOTAP–DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. *J. Control. Release*, **76**, 169–181.
- Oupicky, D., Howard, K.A., Konak, C., Dash, P.R., Ulbrich, K. and Seymour, L.W. (2000) Steric stabilization of poly-L-lysine/DNA complexes by the covalent attachment of semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 492–501.
- Alexandridis, P. (1997) Poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) block copolymer surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2**, 478–489.
- Washington, C. (1996) Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **20**, 131–145.
- 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. USA*, **94**, 14412–14417.
- 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. USA*, **96**, 2621–2626.
- Lasic, D., Strey, H., Stuart, M., Podgornik, R. and Frederik, P.M. (1997) The structure of DNA–liposome complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 832–833.
- Rädler, J.O., Koltover, I., Salditt, T. and Safinya, C.R. (1997) Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, **275**, 810–814.
- Koltover, I., Salditt, T., Rädler, 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.
- 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.
- 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.*, **11**, 1010–1017.

Brief Report

Amphiphilic Block Copolymers Promote Gene Delivery *In Vivo* to Pathological Skeletal Muscles

PEGGY RICHARD,^{1,*} FLORIAN BOSSARD,^{1,*} LEA DESIGAUX,¹ CAROLINE LANCTIN,¹
MAHAJOUR BELLO-ROUFAI,^{1,2} and BRUNO PITARD¹

ABSTRACT

We reported that amphiphilic block copolymers hold promise as nonviral vectors for the delivery of plasmid DNA, ranging from 4.7 to 6.2 kb, to healthy muscle for the production of local or secreted proteins. To evaluate the efficiency of these vectors to deliver large plasmid DNA molecules to pathological muscles, plasmid DNAs of various lengths were complexed with Lutrol or poloxamine 304 and injected intramuscularly into dystrophic muscles. Lutrol–DNA and poloxamine 304–DNA complexes promoted gene transfer into muscles of the naturally occurring mouse model for DMD (*mdx*) in a dose- and plasmid DNA size-dependent manner. For small plasmid DNAs encoding reporter genes, this improvement over naked DNA was smaller in *mdx* than in the wild-type control strain. By contrast, Lutrol enabled us to deliver the large plasmid (16.1 kb) encoding the rod-deleted dystrophin in *mdx* mouse muscle, whereas the same amount of naked DNA did not lead to dystrophin expression, under the same experimental conditions. Lutrol-treated *mdx* mice showed the production of dystrophin in large numbers of muscle fibers. More importantly, we also found that expressing dystrophin with Lutrol led to restoration of the dystrophin-associated protein complex. Thus, we conclude that block copolymers constitute a novel class of vectors for the delivery of large plasmid DNA not only to healthy muscles but also to pathological muscle tissues.

INTRODUCTION

BECAUSE OF THE LACK of curative treatment for neuromuscular pathologies such as Duchenne muscular dystrophy (DMD), gene transfer as well as novel genetic approaches including delivery of antisense oligoribonucleotides to promote skipping of one mutated exon are actively explored (Lu *et al.*, 2003, 2005). However, even if the latter approach is promising, the only nonviral gene therapy approach used in clinical trials has been to restore dystrophin expression in diseased muscles by injecting naked plasmid DNA encoding a correct copy of the dystrophin gene (Romero *et al.*, 2004). Gene transfer of naked DNA is a safer alternative to viral vectors and, unlike viral vectors, there is no size limitation to the DNA to be delivered. However, the delivery of naked DNA into muscular tis-

suces has shown relatively limited levels of efficacy. Electrotransfer has been successfully applied to *mdx* mouse (the most widely studied animal model for DMD) muscle to increase dystrophin expression compared with naked DNA (Vilquin *et al.*, 2001). However, the muscle damage that occasionally resulted from the electrotransfer procedure and the difficulty in scaling up to large animal muscles should limit its capacity (Hartikka *et al.*, 2001). Thus, a need exists for alternative carriers to deliver DNA into dystrophic muscle cells. We have previously reported that intramuscular injection, in healthy mice, of DNA formulated with block copolymers increased severalfold the amount of recombinant protein produced, including luciferase, β -galactosidase, green fluorescent protein, alkaline phosphatase, and inducible erythropoietin (Pitard *et al.*, 2002, 2004; Richard *et al.*, 2005). In the present work, we aimed at inves-

¹Institut du Thorax, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U533, Faculté de Médecine, 44000 Nantes, France.

²Present address: College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610.

*P.R. and F.B. contributed equally to this work.

tigating whether the same vectors, which include U.S. Food and Drug Administration (FDA)-approved compounds, could also be used for the transfection of large plasmid DNA molecules into dystrophic muscles of *mdx* mice. We herein show that plasmid DNA formulated with block copolymers leads to an increase in dystrophin expression and the restoration of the dystrophin-associated protein complex when compared with that achieved with naked plasmid DNA. On the basis of its efficiency and ease of production, the nonviral vector described here represents an efficient and reliable alternative to currently available gene delivery vectors for delivering genes of interest or antisense oligoribonucleotides into dystrophic muscles.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male C57BL/10 and *mdx* mice were obtained at 8 weeks of age from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France).

Plasmids

The plasmids pCMV-luc (Pitard *et al.*, 2002) and pCMV-GFP (Clontech, Palo Alto, CA) carry the luciferase and green fluorescent protein (GFP) reporter gene, respectively, controlled by the human cytomegalovirus immediate-early (IE) gene promoter. The plasmid pTG14860 (generous gift of S. Braun, Transgene, Strasbourg, France), an *Escherichia coli* plasmid based on the ColE1 origin of replication, carries the kanamycin resistance gene encoded by Tn903. It carries an expression cassette encoding the D13-49 minidystrophin cDNA driven by the human cytomegalovirus IE1 promoter (from pREP4; Invitrogen, Abingdon, UK). The mouse 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) intron and a simian virus 40 (SV40) polyadenylation signal are present immediately upstream and downstream of the minidystrophin sequence. All plasmids were purified from recombinant *E. coli* with EndoFree plasmid purification columns (Qiagen, Valencia, CA).

Preparation of DNA complexes

Complexes of block copolymer–DNA were prepared as previously described (Pitard *et al.*, 2002). Complexes were administered at various block copolymer and DNA concentrations.

Intramuscular injection

Anesthetized mice were injected, via shaved tibial anterior muscle, with 50 μ l as previously reported (Pitard *et al.*, 2002).

Reporter gene assay

Analysis of luciferase activity and histological visualization of GFP-expressing fibers were done as previously described (Pitard *et al.*, 2002).

Immunohistochemical detection of dystrophin protein complexes

Immediately after mice were killed, muscles were dissected, embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek

USA, Torrance, CA), and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Sections of 10 μ m were cut from the entire tibial anterior muscle at 100- μ m intervals. Sections were then incubated with Triton X-100 at 1% in phosphate-buffered saline (PBS). The sections were then examined for dystrophin expression by immunohistochemistry with antibodies DYS1 (NCL-DYS1; Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) or DYS2 (NCL-DYS2; Novocastra Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Antibodies were detected with biotinylated goat anti-mouse immunoglobulins (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), followed by streptavidin–fluorescein isothiocyanate (FITC). Before the application of NCL-DYS1 or NCL-DYS2 antibodies, sections were incubated with a biotin-blocking system (DakoCytomation) and with nonbiotinylated goat anti-mouse immunoglobulins to block endogenous mouse biotin from binding to the streptavidin–FITC (Molecular Probes, Eugene, OR) and to prevent endogenous mouse immunoglobulins from binding to the secondary antibody, respectively.

The serial sections were stained with a panel of antibodies for the detection of dystrophin-associated proteins. Mouse antibodies to β -dystroglycan and α -sarcoglycan were used according to the manufacturer's instructions (Novocastra Laboratories). Antibodies were detected with biotinylated goat anti-mouse immunoglobulins (DakoCytomation) followed by streptavidin–FITC, as described above.

Statistical analysis

Data from luciferase and dystrophin expression experiments were analyzed by Student unpaired *t* test and Mann–Whitney test, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

The two block copolymers used in this study were Lutrol, which consists of a central motif of 30 poly(propylene oxide) units located between two motifs, which are made of 75 poly(ethylene oxide) units; and poloxamine 304, which has a tetrafunctional structure consisting of four polyethylene oxide–polypropylene oxide (PEO–PPO) blocks centered around an ethylenediamine moiety (see Fig. 1A in Pitard *et al.*, 2004). A luciferase reporter plasmid was formulated with Lutrol and poloxamine 304 at various concentrations and injected intramuscularly into C57BL/10 and *mdx* mice. After 7 days, tibial anterior muscles were evaluated for reporter gene expression. In C57BL/10 mice, formulation containing 0.3–3% (w/v) Lutrol increased the expression of luciferase by a factor of 28 when compared with naked DNA (Fig. 1A). Comparable improvement of transfection efficiency was obtained with 5% poloxamine 304 (Fig. 1C). We also evaluated the transfection capacities of Lutrol and poloxamine 304 in *mdx* mouse tibial anterior muscles. Lutrol–DNA complexes containing 0.3% Lutrol increased luciferase activity by a factor of 2 when compared with values obtained with naked DNA (Fig. 1B). A comparable improvement was also observed when using poloxamine 304 at 0.1% (Fig. 1D). Increasing further the Lutrol and poloxamine 304 concentrations decreased transgene expression to levels close to those obtained with naked DNA (Fig. 1B

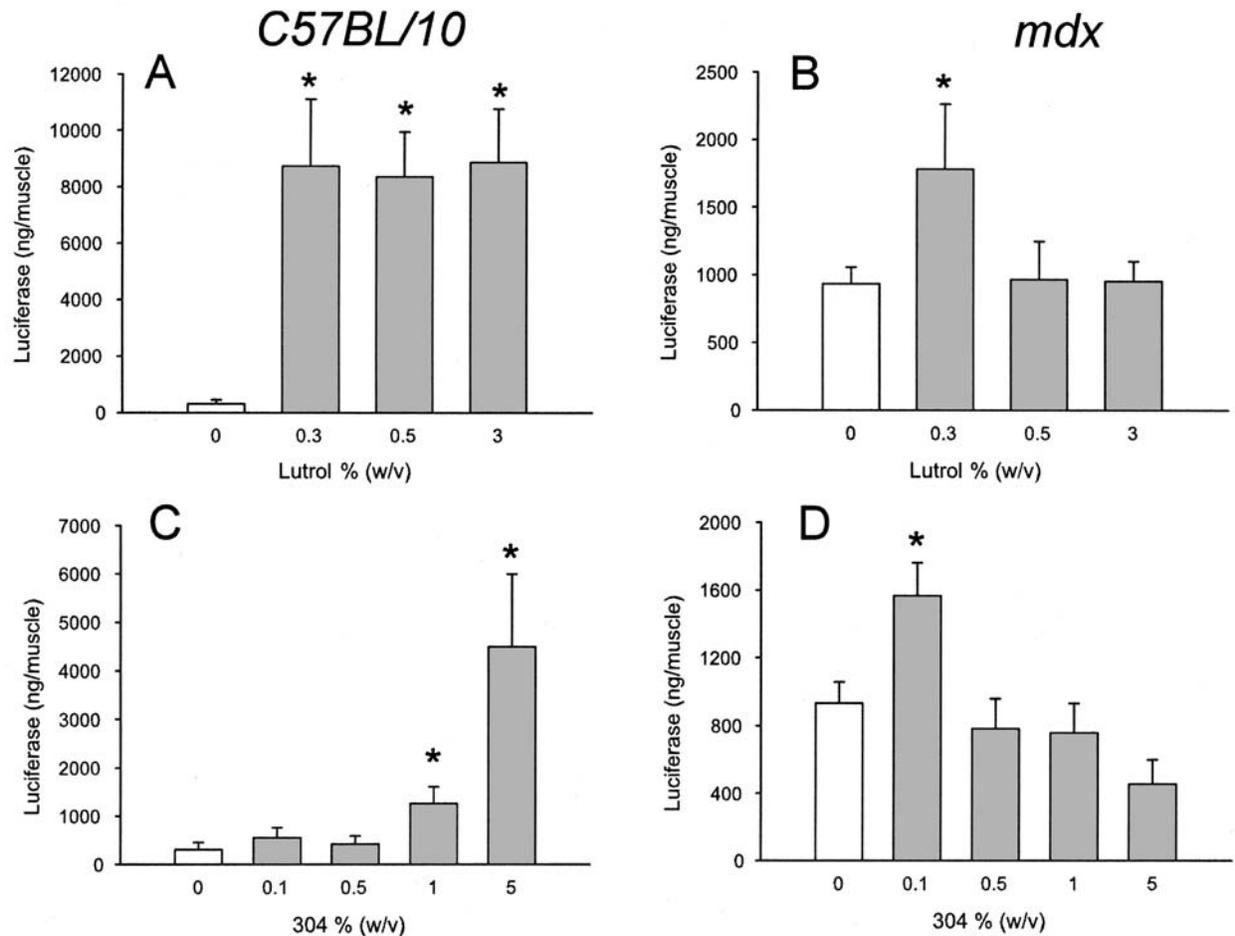


FIG. 1. *In vivo* luciferase gene transfer into mouse tibial anterior muscle. Luciferase activity 7 days after intramuscular injection of 15 μ g of DNA, naked (open column) or complexed with Lutrol (dotted columns), in C57BL/10 mice (A) and *mdx* mice (B) is shown. Luciferase expression on day 7 postinjection of 15 μ g of DNA, either naked (open column) or complexed with poloxamine 304 (dotted columns), in C57BL/10 mice (C) and *mdx* mice (D). Each column and error bar represents the mean value and SEM of at least six individual muscles. Asterisks indicate a significant difference, with $*p < 0.01$ between muscles injected with naked DNA or with amphiphilic block copolymer–DNA complexes.

and D). In *mdx* mice, further experiments were performed with Lutrol and poloxamine 304 at the concentrations of 0.3 and 0.1%, respectively.

To visualize the biodistribution of transgene expression in C57BL/10 and *mdx* muscles, a plasmid encoding the green fluorescent protein was used. Representative tissue sections of four different muscles injected with 15 or 50 μ g of DNA, either naked or formulated with Lutrol or poloxamine 304, are shown in Fig. 2. In C57BL/10 mice, histological data indicated that the number of GFP-expressing fibers markedly increased when 15 μ g of plasmid DNA was formulated with Lutrol (Fig. 2D) or with poloxamine 304 (Fig. 2G), compared with that obtained with naked DNA (Fig. 2A). Next, we evaluated the influence of the amount of injected plasmid on GFP expression. Figure 2 shows that the number of transfected fibers increased with Lutrol and poloxamine 304 when the amount of injected DNA was raised (compare Fig. 2E with Fig. 2D and Fig. 2H with Fig. 2G). By contrast, increasing the amount of naked DNA injected led to a slight increase in the number of GFP-expressing cells (compare Fig. 2B with Fig. 2A). In *mdx* mice, histologi-

cal analysis of injected muscles showed that the number of transfected fibers slightly increased when 50 μ g of plasmid DNA was formulated with 0.3% Lutrol (Fig. 2F) and 0.1% poloxamine 304 (Fig. 2I) as compared with that obtained with naked DNA (Fig. 2C). Of note, in *mdx* mice, Lutrol (compare Fig. 2F with Fig. 2E) and poloxamine 304 (compare Fig. 2I with Fig. 2H) led to a smaller increase in the number of GFP-positive cells than in wild-type C57BL/10 control, for a constant injected DNA amount. These observations were consistent with luciferase expression results. Furthermore, the concentrations of Lutrol and poloxamine 304 that led to optimal transgene expression in *mdx* mouse muscle was less than in physiological muscle. The mechanism by which amphiphilic block copolymers improve transgene expression is not clear. Amphiphilic block copolymers have the property to perturb the plasma membrane (Maskarinec *et al.*, 2002), resulting in internalization of drugs (Liaw and Lin, 2000). Therefore, DNA molecules associated with block copolymers could be directly delivered to the cytoplasm (or escape more efficiently from the endosome into the cytoplasm). Here, the most likely explana-

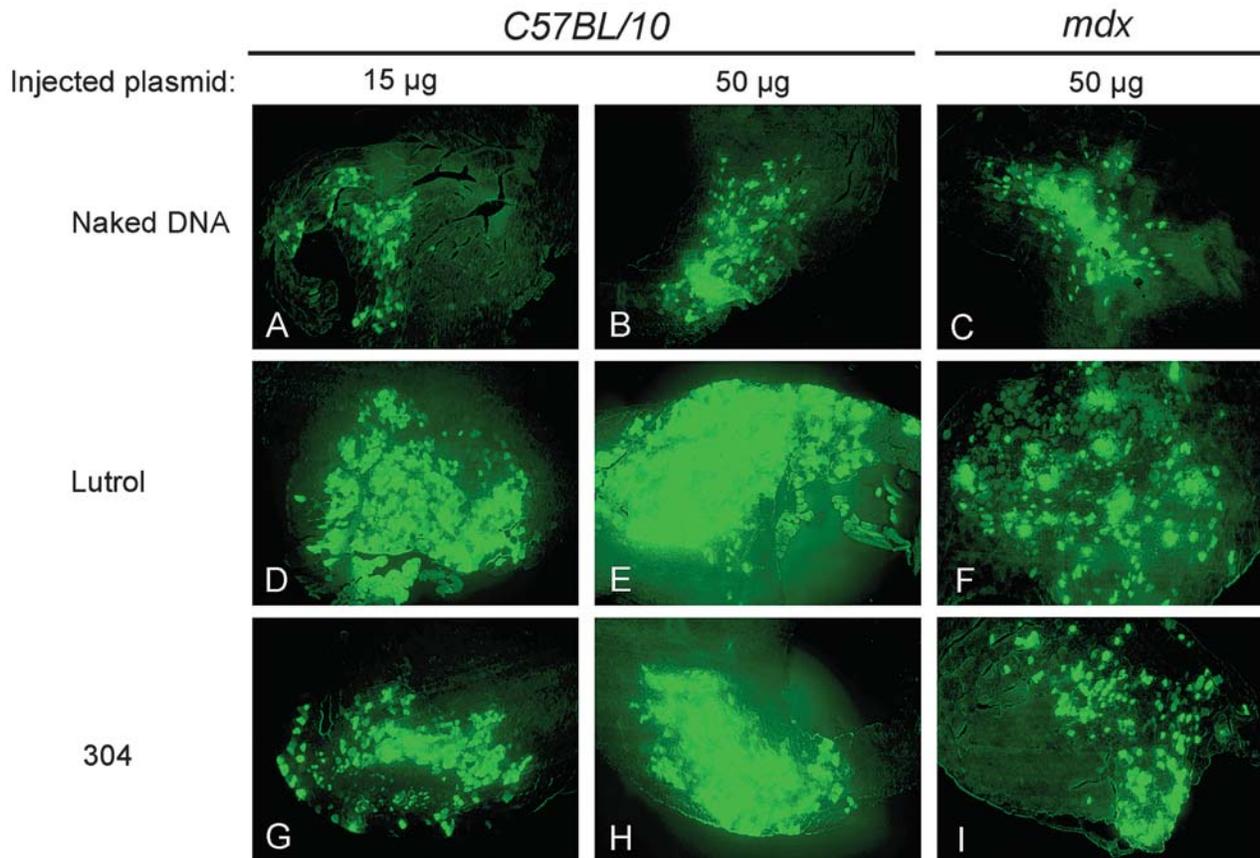


FIG. 2. Visualization of green fluorescent protein expression in C57BL/10 and *mdx* mouse tibial anterior muscle. Representative tissue sections of C57BL/10 mouse muscle, 7 days after injection of 15 μg of DNA, either naked (A) or complexed with 3% Lutrol (D) or with 5% poloxamine 304 (G). (B, E, and H) Representative tissue sections of muscle injected with 50 μg of DNA, either naked or complexed with 3% Lutrol or with 5% poloxamine 304, respectively. Representative tissue sections of *mdx* mouse muscle on day 7 postinjection of 50 μg of DNA, either naked (C) or complexed with 0.3% Lutrol (F) or 0.1% poloxamine 304 (I). Four different muscles were examined in each group.

tion for the difference in transfection efficiency between physiological and *mdx* muscles may involve differences in the number of mature and young cells. Another explanation would be that extracellular matrix is strongly modified in *mdx* mice compared with normal mice; this could result in the absence of some important components or a less favorable structural organization for the delivery of block copolymer–DNA formulation to cells. Further experiments are needed to elucidate the mechanism by which block copolymers increase transgene expression.

We next investigated whether the optimized block copolymer–DNA formulations could deliver the large plasmid DNA (16.1 kb) encoding truncated dystrophin, which is of potential interest for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *mdx* mouse tibial anterior muscles were injected with 50 μg of a truncated dystrophin-encoding plasmid either naked (Fig. 3G–I) or formulated with 0.3% Lutrol (Fig. 3J–L). One week after a single intramuscular injection of Lutrol–DNA complexes (Fig. 3J and K), large numbers of fibers expressing dystrophin were found consistently, compared with the absence of dystrophin expression with naked DNA (Fig. 3G and H), although three to five fibers could also be detected on some tissue sections. Dystrophin expression was more intense in fibers around the in-

jection site (Fig. 3J). To ascertain that cells expressed truncated dystrophin, from which exons from 13 to 49 have been deleted, we performed immunofluorescence epitope mapping on serial sections with antibodies specific for individual exon or exon groups. Antibody DYS2, specific to exon 79, led to immunostaining of exogenous dystrophin (Fig. 3J and K). In contrast, DYS1, specific to exons 25 to 28, did not reveal the truncated dystrophin, as expected (Fig. 3L). Note that fibers were immunostained with a range of green intensities, indicating different levels of expression. In some fibers, dystrophin could also be visualized during its synthesis process, as indicated by the fluorescent signal inside cell cytoplasm (Fig. 3K). Quantification of the number of dystrophin-expressing fibers (corrected for revertant fibers) on random sections from four different injected muscles (78 ± 50 dystrophin-positive fibers, in Lutrol–DNA-treated *mdx* mice, versus 2.6 ± 1.8 dystrophin-positive cells, in naked DNA-treated *mdx* mice) showed a 30-fold increase in the number of dystrophin-expressing fibers with Lutrol–DNA complexes.

Because the absence of dystrophin in muscles (Fig. 4D) results in a dramatic reduction of the dystrophin protein complex at the cell surface (Fig. 4E and F) compared with healthy mus-

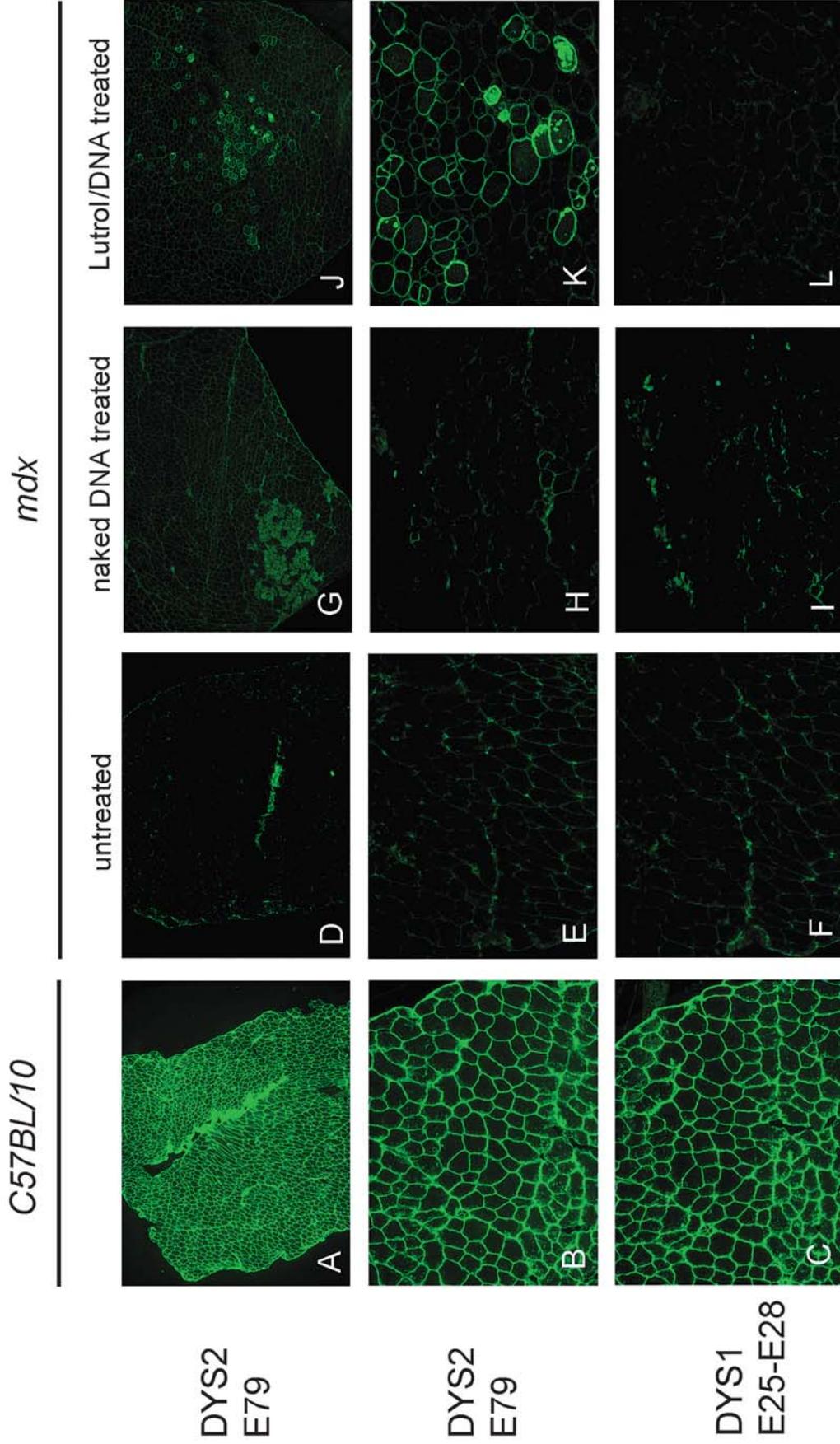


FIG. 3. Detection of dystrophin expression. Dystrophin expression was detected by immunofluorescence epitope mapping of serial sections with antibodies specific for exon 79 (DYS2, *top rows*) and specific for exons 25 to 28 (DYS1, *bottom row*). (A–C) Representative photomicrographs of sections from control tibial anterior muscles of C57BL/10 mice, with the name and exon specificity of the antibody on the left. (D–F) Representative micrographs of sections from *mdx* mouse tibial anterior muscles injected with saline. (G–I) Representative photomicrographs of sections from naked DNA-treated *mdx* tibial anterior muscle. (J–L) Representative tissue sections of Lutrol–DNA-treated *mdx* tibial anterior muscle. Dystrophin expression was assayed 7 days after intramuscular injection. Original magnification: (A, D, G, and J) $\times 5$; (B, E, H, K, C, F, I, and L) $\times 20$. Experimental conditions were the same as described in Fig. 2, with 50 μg of plasmid DNA injected, except that the plasmid used was pTG14860 encoding the D13–49 minidystrophin cDNA. Four individual muscles were examined in each experimental group.

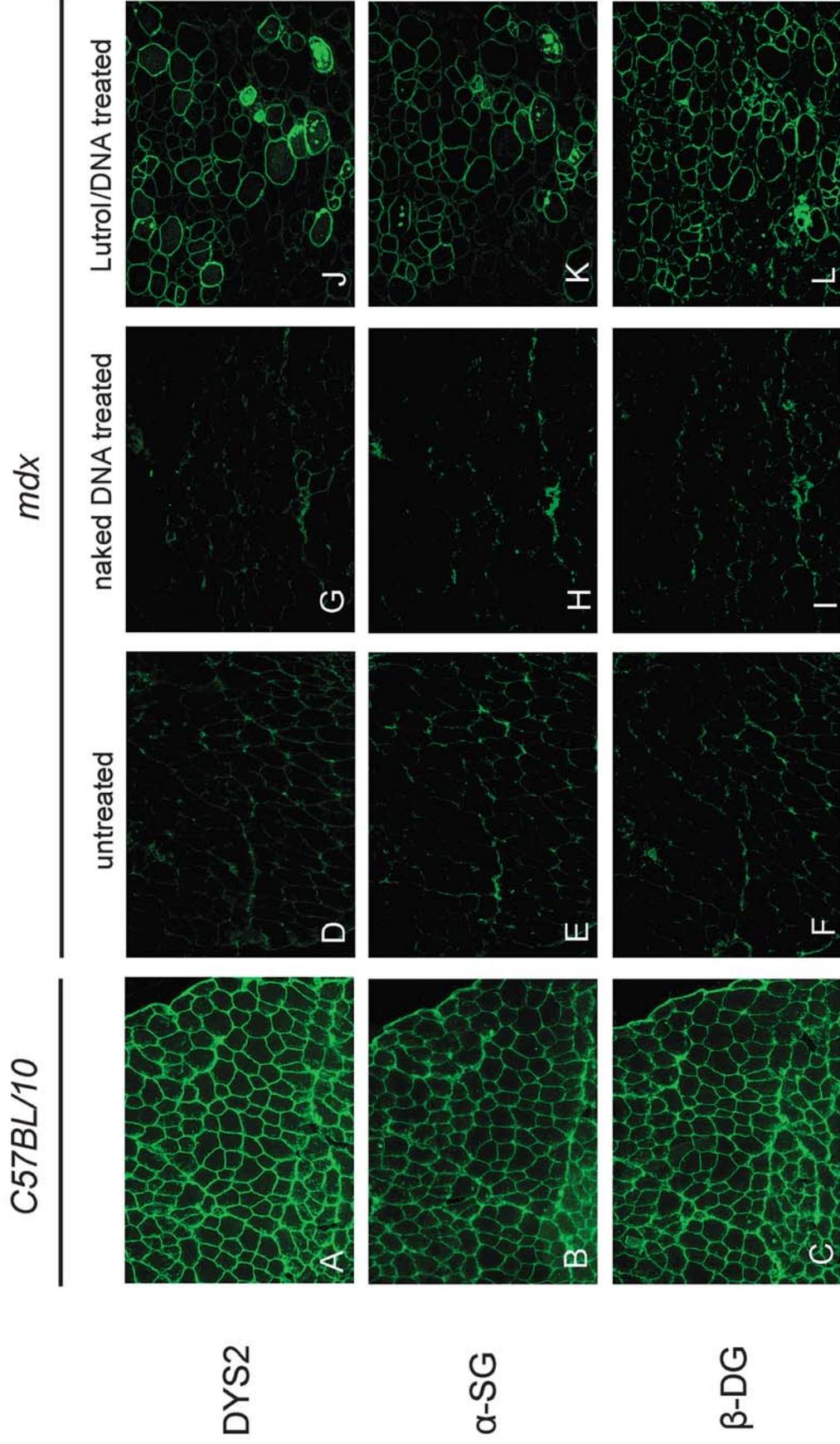


FIG. 4. Detection of membrane-localized α -sarcoglycan and β -dystroglycan in fibers expressing dystrophin. (A–C) Representative photomicrographs of sections of tibial anterior muscle of C57BL/10 mice, used as positive control, with the name of the antibody on the left. (D–F) Representative micrographs of serial sections of tibial anterior muscle of *mdx* mice injected with saline solution. (G–I) Representative sections of naked DNA-treated *mdx* tibial anterior muscle. (J–L) Representative sections of Lutrol–DNA-treated *mdx* muscle. Dystrophin protein complexes were immunostained 7 days after intramuscular injection. Experimental conditions were the same as described in Fig. 3.

cles (Fig. 4B and C), we next investigated whether exogenous truncated dystrophin expression retained the functional domains responsible for assembly of the dystrophin protein complex at the surface of the muscle fiber. Therefore, *mdx* mouse tibial anterior muscles were injected with plasmid DNA encoding truncated dystrophin, either naked or associated with Lutrol (same mice as in experiments shown in Fig. 3). After a single injection of Lutrol–DNA complexes, representative immunofluorescence studies of serial sections showed that Lutrol–DNA complexes led to the restoration of β -dystroglycans and α -sarcoglycans at the membranes of fibers expressing also the truncated dystrophin (Fig. 4K and L). By contrast, intramuscular injection of naked DNA did not lead to dystrophin expression (Fig. 4G) and thus the associated structural proteins were not detected (Fig. 4H and I).

In summary, our results show that amphiphilic block copolymer-mediated muscle transfection is efficient not only in healthy animals but also in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. Another block copolymer family member, that is, F127, has also been used in the same animal model to deliver antisense oligonucleotides to skip the mutated exon in the dystrophin gene, resulting in restoration of the reading frame and dystrophin expression (Lu *et al.*, 2003, 2005). Taken together, these results indicate that this novel class of nonviral vectors represents an efficient and reliable alternative to currently available gene delivery systems for the study of the relationships between genes of interest or modified antisense oligonucleotides and their functional impact in dystrophic muscles. We also expect applicability of this novel class of nonviral vectors to other mouse models of human neuromuscular pathologies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Clothilde Gourden for excellent technical expertise, and to Serge Braun and Christine Thioudelet (Transgene, Strasbourg, France) for providing plasmid encoding the rod-deleted murine dystrophin (pTG14860). This work was supported by the APEX program financed by INSERM, by ACI Jeunes Chercheurs from the Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies, and by special grants from the Association Française contre les Myopathies (Evry, France) and from Vaincre la Mucoviscidose (Paris, France).

REFERENCES

- HARTIKKA, J., SUKHU, L., BUCHNER, C., HAZARD, D., BOZOUKOVA, V., MARGALITH, M., NISHIOKA, W.K., WHEELER, C.J., MANTHROP, 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.
- LIAN, J., and LIN, Y. (2000). Evaluation of poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) (PEO–PPO–PEO) gels

- as a release vehicle for percutaneous fentanyl. *J. Control. Release* **68**, 273–82.
- LU, Q.L., MANN, C.J., LOU, F., BOU-GHARIOS, G., MORRIS, G.E., XUE, S.A., FLETCHER, S., PARTRIDGE, T.A., and WILTON, S.D. (2003). Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the *mdx* dystrophic mouse. *Nat. Med.* **9**, 1009–014.
- LU, Q.L., RABINOWITZ, A., CHEN, Y.C., YOKOTA, T., YIN, H., ALTER, J., JADOON, A., BOU-GHARIOS, G., and PARTRIDGE, T. (2005). Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 198–03.
- 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**, 1453–459.
- 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 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. (2005). Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation. *J. Gene Med.* **7**, 80–86.
- ROMERO, N.B., BRAUN, S., BENVENISTE, O., LETURCQ, F., HOGREL, J.Y., MORRIS, G.E., BAROIS, A., EYMARD, B., PAYAN, C., ORTEGA, V., BOCH, A.L., LEJEAN, L., THIOUDELLET, C., MOUROT, B., ESCOT, C., CHOQUEL, A., RECAN, D., KAPLAN, J.C., DICKSON, G., KLATZMANN, D., MOLINIER-FRENCKEL, V., GUILLET, J.G., SQUIBAN, P., HERSON, S., and FARDEAU, M. (2004). Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* **15**, 1065–1076.
- VILQUIN, J.T., KENNEL, P.F., PATURNEAU-JOUAS, M., CHAPDELAIN, P., BOISSEL, N., DELAERE, P., TREMBLAY, J.P., SCHERMAN, D., FISZMAN, M.Y., and SCHWARTZ, K. (2001). Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* **8**, 1097–1107.

Address reprint requests to:

Dr. Bruno Pitard
 Institut du Thorax
 INSERM U533
 Faculté de Médecine
 1, rue Gaston Veil
 44000 Nantes, France

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

Received for publication May 17, 2005; accepted after revision August 25, 2005.

Published online: September 26, 2005.

RESUME

Vectorisation synthétique d'acides nucléiques

La vectorisation synthétique d'acides nucléiques représente actuellement un enjeu déterminant pour le développement des traitements de pathologies héréditaires ou acquises. Les vecteurs synthétiques optimisés jusqu'à présent s'avèrent très efficaces *in vitro* pour la transfection de molécules d'ADN, cependant ils sont peu efficaces *in vivo*. Il est donc indispensable d'envisager des stratégies de vectorisation innovantes améliorant l'efficacité de transfection *in vivo* et adaptées aux différents acides nucléiques utilisés.

Ainsi, une nouvelle classe de lipides cationiques dérivés de composés naturels, les *aminoglycosides*, a été développée pour la vectorisation d'un nouveau type d'acide nucléique, les siARN, qui sont des petits fragments d'ARN double brin capables d'inhiber l'expression d'un gène. Les dérivés lipidiques d'aminoglycosides ont permis d'obtenir une meilleure efficacité d'inhibition de l'expression d'un gène, en utilisant des quantités de siARN plus faibles, par rapport à un lipide efficace pour la transfection des molécules d'ADN. Dans une deuxième partie, une nouvelle classe de polymères amphiphiles, les *copolymères à blocs*, a été développée pour le transfert de gène dans les poumons. Les copolymères à blocs se sont montrés très efficaces pour transférer un gène dans les cellules de l'épithélium bronchique et alvéolaire des poumons de souris, et présentent aussi l'avantage de pouvoir être administrer par aérosolisation. Enfin, nous avons synthétisé des matériaux hybrides originaux, basés sur l'intercalation des molécules d'ADN entre des feuilletts inorganiques, les hydroxydes double lamellaires (HDL), labiles à pH acide.

Le travail réalisé au cours de cette thèse a décrit la synthèse de nouvelles stratégies de vectorisation synthétique basée sur l'utilisation de structures moléculaires originales.

Synthetic vectorisation of nucleic acids

Synthetic vectorisation of nucleic acid has a promising future in the treatment of both hereditary and acquired lung diseases. Current synthetic vectors are efficient to deliver DNA molecule for *in vitro* studies, but their use for *in vivo* studies have been hampered by their low efficiency. Therefore, there is a need for developing alternative synthetic vectors to improve nucleic acid transfer *in vivo* and to investigate the vectorisation of different nucleic acid molecules.

Thus, a new class of cationic lipid, derivatives from the family of the aminoglycosides natural compounds, have been developed for the transfection of a new type of nucleic acid, the siRNA. siRNA are small interfering RNA able to inhibit the expression of a gene. Lipidic aminoglycosides derivatives have shown their efficiency to deliver siRNA in cells, using smaller quantity than a lipid used for DNA molecules delivery. Then, a new class of amphiphilic block copolymers have been developed to improve gene transfer into the lung. Block copolymers had been very efficient to transfect epithelial cells in the bronchia and the alveolar areas. In a third part, we have synthesized a new supramolecular assemblies by formulation of DNA molecules with inorganic layered double hydroxides (LDH). Results have shown the *in situ* formation of LDH around DNA molecules characterized by a lamellar organization, where DNA molecules sandwiched between LDH.

This work describe the synthesis of new vectorisation sytems based on the use of new molecular structure.